

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

BỘ Y TẾ



NGUYỄN KHÁNH THÙY LINH

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI THIÊN
NIÊN KIẾN LÁ LỚN

(*Homalomena pendula* (Blume) Bakh. f.)

HỌ RÁY (ARACEAE)

Ngành: Dược liệu – Dược học cổ truyền

Mã số: 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2025

Công trình được hoàn thành tại:
Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:
PGS. TS. Hồ Việt Đức
PGS. TS. Trần Thị Vân Anh

Phản biện 1:
Phản biện 2
Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh
vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

TẠP CHÍ TRONG NƯỚC

1. **Nguyễn Khánh Thủy Linh**, Trần Ngân Thi, Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Lê Văn Hậu, Hoàng Thị Như Hạnh, Nguyễn Thị Hoài, Hồ Việt Đức (2022), “Hợp chất steroid và flavone từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*)”, *Tạp chí khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*, 131 (1C), tr. 63-71.
2. **Nguyễn Khánh Thủy Linh**, Nguyễn Thị Hoài, Trần Thị Vân Anh, Hồ Việt Đức (2023), “Thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào của phân đoạn *n*-hexane của loài Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*)”, *Tạp chí Y Dược học – Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế*, 2 (13), tr. 12-19.
3. **Nguyễn Khánh Thủy Linh**, Nguyễn Đình Quỳnh Phú, Đoàn Quốc Tuấn, Trần Thị Nhật Thảo (2023), “Nghiên cứu đặc điểm thực vật và hoạt tính sinh học của cây Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*)”. *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 228(09):192-199.

TẠP CHÍ QUỐC TẾ

1. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Hanh Nhu Thi Hoang, Thao Thi Do, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen, Duc Viet Ho (2022), “Sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena pendula* and their anti-inflammatory activities”, *Natural product research*, 37 (15), pp. 2559-2567.
2. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Hanh Nhu Thi Hoang, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen, Duc Viet Ho (2022), Homalolides C-D, two new sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena pendula*, *Natural product research*, 38 (1), pp. 60-67.
3. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Phu Quynh Dinh Nguyen, Chau Bao Hoai Nguyen, Hoai Thi Nguyen, Thi Van Anh Tran, Thanh-Tan Mai, Thai-Son Tran, Duc Viet Ho (2022), “Sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena pendula* (Blume) Bakh.f showing acetylcholinesterase inhibitory activity: *in vitro* and *in silico* studies”, *Chemical paper*, 77 (W1), pp. 1573-1581.
4. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Hung Quoc Vo, Hanh Nhu Thi Hoang, Thi Van Anh Tran, Hien Minh Nguyen, Ty Viet Pham, Hang Phuong Thi Ngo, Thanh Pham, Duc Viet Ho (2023), “Structure revision and absolute configuration of 5,7-diepi-2- α -hydroxyoplopanone and anti-osteoporotic activities of sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena pendula*”, *Natural product research*, 20, pp. 1-10.
5. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Tuan Quoc Doan, Phu Quynh Dinh Nguyen, Chau Bao Hoai Nguyen, Linh Thuy Thi Tran, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen, Duc Viet Ho (2023), “Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from rhizomes of *Homalomena pendula* and *Homalomena cochinchinensis*”, *Natural product communications*, 18(5), pp. 1-6.
6. **Linh Thuy Khanh Nguyen**, Hien Bich Thi Le, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen, Duc Viet Ho, Hien Minh Nguyen (2024), “Inhibition of pro-inflammatory cytokines by homalolide A and homalomenol A isolated from rhizomes of *Homalomena pendula*”. *Z. Naturforsch.* <https://doi.org/10.1515/znc-2024-0152>

1. Giới thiệu luận án

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Chi Thiên niên kiện (*Homalomena*) là một chi lớn của họ Ráy (Araceae), có khoảng gần 200 loài, phân bố chủ yếu ở khu vực Đông Nam Á, Nam Thái Bình Dương và Nam Mỹ. Thành phần hoá học của chi *Homalomena* khá đa dạng với các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như sesquiterpenoid, phenolic... Một số loài *Homalomena* đã được sử dụng trong y học cổ truyền và y học dân tộc của nhiều nước, đặc biệt là các nước châu Á để điều trị vết thương, tiêu chảy, ho, đau bụng, rối loạn dạ dày và hệ thần kinh trung ương. Ở Việt Nam, từ lâu người dân đã biết dùng rễ loài Thiên niên kiện (*H. occulta*) để điều trị đau dạ dày, viêm khớp dạng thấp, cũng như làm thuốc chống viêm và thuốc bổ. Các hợp chất phân lập từ chi *Homalomena* cũng đã được báo cáo sở hữu nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng như oplodiol được phân lập từ *H. occulta* có tác dụng gây độc tế bào ung thư biểu mô tuyến phổi người A549, homalomenol C phân lập từ rễ loài *H. aromatica*, có hoạt tính kháng sốt rét *P. falciparum* kháng chloroquine... Như vậy, với số lượng loài phong phú, chi *Homalomena* có tiềm năng to lớn cho nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất mới có tác dụng chữa bệnh.

Ở Việt Nam, 5 loài *Homalomena* đã được ghi nhận, phân bố chủ yếu ở nơi ẩm, dưới tán rừng, ven suối. Tuy nhiên, hiện nay các công bố về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của chi này còn rất hạn chế, chủ yếu tập trung vào loài *H. occulta*. Như vậy, việc nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi *Homalomena* ở Việt Nam là bước khởi đầu cần thiết để tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có giá trị, góp phần khai thác và sử dụng nguồn tài nguyên cây thuốc trong nước. Thiên niên kiện lá lớn (*H. pendula*) là loài cây đã được sử dụng trong dân gian để điều trị viêm nhiễm và đau

nhức xương khớp. Tuy nhiên hiện tại ở Việt Nam các nghiên cứu khoa học chứng minh cho các tác dụng này còn rất hạn chế. Để góp phần giải thích, chứng minh tác dụng của dược liệu Thiên niên kiện lá lớn, cũng như cung cấp cơ sở dữ liệu về hóa học và dược lý, làm căn cứ khoa học cho việc khai thác, sử dụng và phát triển loài này.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula* (Blume) Bakh.f.)**” được thực hiện với 2 mục tiêu:

Nghiên cứu về thành phần hóa học: Xác định được hàm lượng và các thành phần chính của tinh dầu; chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ thân rễ cây Thiên niên kiện lá lớn. ***Nghiên cứu về hoạt tính sinh học:*** Đánh giá hoạt tính kháng viêm, độc tế bào ung thư, ức chế acetylcholinesterase của cao chiết toàn phần, cao chiết phân đoạn, tinh dầu và các hợp chất phân lập được từ thân rễ cây Thiên niên kiện lá lớn.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: Thân rễ loài Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*) thu hái tại xã Gung Ré, huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 01 năm 2021, và đã được định danh bởi các chuyên gia thực vật tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu:

+ Nghiên cứu thành phần hoá học:

Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hoá học đặc trưng. Chiết xuất tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước, chiết dược liệu bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng, chiết phân đoạn lỏng-lỏng. Phân lập các hợp chất tinh khiết bằng phương pháp

sắc ký cột, kiểm soát quá trình phân lập bằng sắc ký lớp mỏng. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu bằng phương pháp GC-MS. Xác định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối kết hợp đối chiếu với tài liệu tham khảo.

+ Nghiên cứu hoạt tính sinh học:

Đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro* trên các mô hình khác nhau: mô hình đánh giá khả năng ức chế sản sinh nitric oxid của đại thực bào RAW 264.7; đánh giá mức độ sản sinh PGE₂, IL-6, IL-10 và TNF- α bằng phương pháp ELISA, đánh giá mức độ biểu hiện của COX-2 và iNOS bằng phương pháp Western-blot. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào bằng thuốc nhuộm Sulforhodamin B. Đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase bằng phương pháp Ellman. Hợp chất tiềm năng tiếp tục được khảo sát cơ chế tác động *in silico*.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

Về hóa học

Lần đầu tiên công bố hàm lượng và thành phần tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn.

Lần đầu tiên phân lập được: 04 hợp chất mới: homalolide A, homalolide B, homalolide C và homalolide D. Trong đó, homalolide A là một hợp chất giả, homalolide C là hợp chất mới có cấu trúc khung lần đầu tiên xuất hiện trong tự nhiên. 09 hợp chất lần đầu tiên được phân lập trong chi *Homalomena* là 4 β -hydroxyeudesm-7-en-1-on; spathulenol; paludolon; 1 α ,4 β ,5 α ,6 β ,7 β H,10 β -4,10-epoxy-6-guainol; 1 α ,2 α ,5 α ,6 α ,7 α ,8 α -isoducan-2,5,6-triol; tangeretin; (E)-2,6-dimethyloct-2,7-dien-1,6-diol; ergosterol peroxid; sitoindosid. 15 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài Thiên niên kiện lá lớn *H. pendula* là: taiwaninone A; oplodiol; homalomenol C; homalomenol

A; α -cadinol; homalomenol A; homalomenin D; teucmosin; oplopanon; aromadendran-4 α ,10 α -diol; bullatantriol; 1 β ,4 β ,6 α -trihydroxy-eudesman; 1 β ,4 β ,7 α -trihydroxy-eudesman, 1 β ,4 β ,6 β -trihydroxyeudesman và 2 α -hydroxyoplopanon. Đặc biệt, cấu trúc hóa học của hợp chất 2 α -hydroxyoplopanon lần đầu tiên được làm sáng tỏ trong luận án này.

Về tác dụng sinh học

Lần đầu tiên công bố hoạt tính kháng viêm, gây độc tế bào ung thư, ức chế enzym acetylcholinesterase của các cao chiết, tinh dầu và các hợp chất phân lập được từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn.

Lần đầu tiên nghiên cứu tác dụng chống viêm của homalolide A và homalomenol A trên nhiều mô hình *in vitro* khác nhau: mô hình ức chế sản sinh NO, đánh giá mức độ sản sinh PGE₂, IL-6, IL-10 và TNF- α , đánh giá mức độ biểu hiện của hai protein: iNOS và COX-2.

Đây là một công trình nghiên cứu tổng thể, có hệ thống về thành phần hóa học và tác dụng chống viêm, gây độc tế bào ung thư, ức chế acetylcholinesterase của loài Thiên niên kiện lá lớn. Các kết quả nghiên cứu của đề tài là những đóng góp mới về cơ sở dữ liệu hóa học và sinh học của loài Thiên niên kiện lá lớn.

Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của đề tài góp phần giải thích, chứng minh công dụng của Thiên niên kiện lá lớn dưới góc nhìn khoa học hiện đại, làm tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển sản phẩm từ loài này để phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Ý nghĩa của luận án:

Những kết quả nghiên cứu về hóa học của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn đã bổ sung vào cơ sở dữ liệu các hợp chất thiên nhiên thông tin mới về 4 hợp chất sesquiterpenoid lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên, cung cấp dữ liệu khoa học về thành phần hóa học của dược liệu

Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*). Kết quả nghiên cứu về tác dụng chống viêm của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn góp phần giải thích, chứng minh công dụng của dược liệu Thiên niên kiện lá lớn trên căn cứ khoa học, làm sáng tỏ việc sử dụng cây thuốc này theo tri thức dân gian dưới góc nhìn khoa học hiện đại. Ngoài tác dụng chống viêm, kết quả nghiên cứu đã cung cấp thêm thông tin về hoạt tính gây độc tế bào và ức chế acetylcholinesterase của các cao chiết dược liệu và của các hợp chất tinh khiết đã phân lập được.

e. Bố cục của luận án

Luận án có 157 trang không bao gồm tài liệu tham khảo, gồm các phần: Đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 39 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 18 trang, kết quả nghiên cứu 70 trang, bản luận 25 trang, kết luận 2 trang, kiến nghị 1 trang, 58 bảng, 70 hình và 37 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

2. Tổng quan tài liệu

2.1. Tổng quan về chi *Homalomena* Schott

Chi *Homalomena* được Schott đặt tên vào năm 1832. Ngày nay, theo hệ thống phân loại thực vật của The World Flora Online, vị trí phân loại chi *Homalomena* được tóm tắt như sau: Giới Thực vật (Plantae), ngành Thực vật có hoa (Angiosperms), bộ Trạch tả (Alismatales R. Br. Ex Bercht. & J. Presl), họ Ráy (Araceae Juss.), chi Thiên niên kiện (*Homalomena* Schott).

Homalomena là một trong những chi lớn của họ Ráy (Araceae). Theo The World Flora Online, chi *Homalomena* bao gồm 159 loài được chấp nhận. Trong khi đó, theo Plants of the World online thì có 161 loài được chấp nhận và theo Thực vật chí Trung Quốc thì có khoảng 110 loài được chấp nhận. Theo Nguyễn Văn Dư, ở Việt Nam có 5 loài *Homalomena*, phân bố chủ yếu nơi ẩm, dưới tán rừng, ven

suối, đó là: *H. occulta*, *H. tonkinensis*, *H. pendula*, *H. pierreana* và *H. vietnamensis*.

Cho đến nay số loài được nghiên cứu về thành phần hoá học cũng như hoạt tính sinh học còn khá ít. Trong các loài này, *Homalomena occulta* được nghiên cứu nhiều nhất. Các nhóm hợp chất chính của chi là tinh dầu, sesquiterpenoid, acid phenol. Ngoài ra, các hợp chất lignan, diterpen, steroid, acid carboxylic... cũng được tìm thấy trong chi này.

Một số hoạt tính sinh học đáng quan tâm của các loài thuộc chi *Homalomena* là: kháng viêm, giảm đau; chống ung thư; hoạt tính trên hệ thần kinh; hoạt tính kháng vi sinh vật; hoạt tính chống oxy hóa...

Theo các tài liệu về cây thuốc Việt Nam, một số loài trong chi *Homalomena* đã được dùng để điều trị các bệnh về đau nhức xương khớp, đau lưng mỏi gối và hỗ trợ tiêu hóa.

2.2. Tổng quan về loài *Homalomena pendula* (Blume) Bakh.f

Tên tiếng Việt: Thiên niên kiện lá lớn

Tên khoa học: *Homalomena pendula* (Blume) Bakh. f.

Đồng danh: *Homalomena gigantea* Engler; *H. alba* Hassk, *H. bancana* Alderw, *H. coerulescens* Jungh. ex Miq; *H. cordata* Zoll; *H. discolor* Alderw; *H. purpurea* (Thunb.) Backer, Bakh.f. & Steenis; *H. rosea* Alderw; *H. rubra* Hassk.

Thuộc chi Thiên niên kiện (*Homalomena* Schott), họ Ráy (Araceae), bộ Trạch tả (Alismatales R. Br. Ex Bercht. & J. Presl), ngành thực vật có hoa (Angiosperms).

Trên thế giới, loài này phân bố chủ yếu ở các nước như Trung Quốc, Malaysia, Indonesia. Ở Việt Nam, Thiên niên kiện lá lớn đã được tìm thấy ở Lâm Đồng, Đồng Nai.

Cho đến nay chỉ mới có 3 nghiên cứu công bố về thành phần hoá học của loài này. Gang và cs. đã phân lập được 5 hợp chất cerebrosid; bằng phương pháp GC-MS, vào năm 2022, Ty và cs. đã xác định được 60 hợp chất dễ bay hơi có trong dịch chiết *n*-hexan của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn. Cũng bằng phương pháp GC-MS, nghiên cứu của Thanh và cs. vào năm 2024 đã phân tích thành phần các hợp chất bay hơi của dịch chiết methanol và ethyl acetat.

Tổng quan tài liệu cho thấy, mặc dù loài *H. pendula* đã được biết đến từ rất lâu nhưng cho đến năm 2021 vẫn chưa có một nghiên cứu nào về hoạt tính sinh học được công bố. Mới đây, vào năm 2022, nghiên cứu của Ty và cs. đã báo cáo về hoạt tính tái tạo xương của cao chiết *n*-hexan của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn bằng cách sử dụng mô hình *in vitro* trên tế bào nguyên bào xương MC3T3-E1. Hoạt tính chống loãng xương cũng được Thanh Pham và cs. nghiên cứu trên cao chiết methanol và cao chiết ethyl acetat của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn.

Thiên niên kiện lá lớn có vị cay, hơi đắng, tính ấm, có tác dụng nhuận phế chỉ khái, thoái nhiệt, trừ phong thấp, mạnh gân cốt, chỉ huyết, hoạt huyết và giảm đau, kích thích tiêu hóa, làm thuốc bổ. Ở Vân Nam (Trung Quốc) người ta sử dụng Thiên niên kiện lá lớn (*H. pendula*) trị sốt cao, lao phổi, ho ra máu, viêm nhánh khí quản, cúm, cảm mạo, phong thấp đau nhức xương, mụn nhọt sưng lở.

2.3. Khái niệm về viêm và một số phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Viêm là phản ứng phức tạp của cơ thể khởi phát sau khi bị tổn thương. Viêm có thể được khởi phát khi có sự hiện diện của tế bào chết của vật chủ, vi khuẩn hoặc tế bào chết của ký sinh trùng, song dù do bất cứ nguyên nhân nào, viêm cũng có các biểu hiện lâm sàng là

sung, nóng, đỏ, đau và kèm theo các rối loạn chức năng của cơ quan bị viêm. Viêm là một đáp ứng bảo vệ nhằm đưa cơ thể trở lại tình trạng trước khi bị tổn thương để duy trì hằng định nội mô. Tuy nhiên, cũng giống như miễn dịch, khi đáp ứng viêm không phù hợp hoặc có sự gia tăng quá mức, viêm sẽ trở thành có hại cho vật chủ như đau đớn, tổn thương mô lành, rối loạn các chức năng.

Một số mô hình *in vitro* đánh giá hoạt tính kháng viêm: mô hình đánh giá tác dụng ức chế lipooxygenase; mô hình đánh giá tác dụng ức chế cyclooxygenase; mô hình đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO, tác dụng ức chế cytokin tiền viêm.

2.4. Một số phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Để đánh giá hoạt tính chống ung thư của các hợp chất, một trong những phương pháp đầu tiên là đánh giá khả năng gây độc tế bào và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư *in vitro*. Các xét nghiệm độc tính tế bào và khả năng sống của tế bào được phân loại theo loại phép đo của điểm cuối (màu thay đổi, huỳnh quang, phát quang...). Một số phương pháp được sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào: loại trừ thuốc nhuộm, xét nghiệm huỳnh quang, xét nghiệm đo độ sáng, xét nghiệm đo màu.

2.5. Một số phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro*

Một số phương pháp thường được dùng để đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* như sau: phương pháp huỳnh quang, phương pháp dùng đồng vị phóng xạ, phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học, phương pháp quang phổ UV-Vis.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Thu hái mẫu có tên là Thiên niên kiện lá lớn ở Lâm Đồng vào

tháng 01 năm 2021. Nguyên liệu được kiểm tra, xác định loài *Homalomena pendula* dựa trên đặc điểm hình thái, so sánh với tài liệu tham khảo, kết hợp với sự hỗ trợ của các chuyên gia thực vật tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

3.2.1. Phương pháp nghiên cứu hóa học

- ◆ Xác định hàm lượng tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước.
- ◆ Xác định thành phần chính của tinh dầu bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp khối phổ (GC-MS).
- ◆ Định tính các nhóm hợp chất hữu cơ chính có trong dịch chiết toàn phần của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn bằng các phản ứng hóa học đặc trưng.
- ◆ Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc:

Thân rễ Thiên niên kiện lá lớn sau khi thu hái được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 40-50°C, sau đó xay thành bột thô. Bột thô này được ngâm vừa ngập trong methanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng, mỗi lần ngâm trong 07 ngày, thỉnh thoảng khuấy trộn để tăng diện tích tiếp xúc giữa dược liệu và dung môi. Sau 07 ngày, rút toàn bộ dịch chiết, thay lượng methanol mới rồi tiếp tục ngâm trong 07 ngày. Kết thúc 03 đợt chiết thu được dịch chiết toàn phần. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao MeOH toàn phần (HGM).

Phân tách cao toàn phần thành các phân đoạn có độ phân cực tăng dần bằng kỹ thuật phân bố lỏng - lỏng, thu được các cao phân đoạn *n*-hexan (HGH), cao phân đoạn ethyl acetat (HGE) và cao nước (HGW).

Quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất chủ yếu sử dụng phương pháp sắc ký cột kết hợp với sắc ký lớp mỏng.

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý như góc quay cực, các dữ liệu phổ bao gồm phổ khối (EI-MS), phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) và hai chiều (HMBC, HSQC, COSY, NOESY), phổ hồng ngoại (IR), phổ tử ngoại (UV), phổ lưỡng sắc tròn (CD). Đồng thời đối chiếu dữ liệu phổ với các tài liệu tham khảo.

3.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro* trên các mô hình khác nhau: mô hình đánh giá khả năng ức chế sản sinh nitric oxid của đại thực bào RAW 264.7; đánh giá mức độ sản sinh PGE_2 , IL-6, IL-10 và $\text{TNF-}\alpha$ bằng phương pháp ELISA, đánh giá mức độ biểu hiện của COX-2 và iNOS bằng phương pháp Western-blot. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào bằng thuốc nhuộm Sulforhodamin B. Đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase bằng phương pháp Ellman. Hợp chất tiềm năng tiếp tục được khảo sát cơ chế tác động *in silico*.

3.2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Các phép thử đều được tiến hành ba lần và lấy giá trị trung bình để đảm bảo tính chính xác. Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê Y sinh học, sử dụng phần mềm Excel. Số liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình và sai số SD. Đánh giá, so sánh thống kê giữa các lô thí nghiệm bằng phương pháp t-test student. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

4. Kết quả

4.1. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

4.1.1. Khảo sát chất lượng dược liệu

Độ tinh khiết nguyên liệu:

Các chỉ tiêu khảo sát về độ ẩm bột dược liệu, tro toàn phần, tro không tan trong acid và hàm lượng chất chiết được bước đầu là cơ sở để xây dựng chỉ tiêu sơ bộ về chất lượng mẫu nguyên liệu của loài nghiên cứu. Độ ẩm bột dược liệu: $3,58 \pm 0,09\%$; tro toàn phần: $4,8 \pm 0,1\%$; tro không tan trong acid: $0,8 \pm 0,1\%$; hàm lượng chất chiết được: $7,7 \pm 0,2\%$.

Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật:

Kết quả định tính sơ bộ kết luận trong phần thân rễ Thiên niên kiện lá lớn có chứa các hợp chất thuộc các nhóm chất sau: flavonoid, chất béo, steroid, acid hữu cơ, đường khử và terpenoid.

4.1.2. Kết quả xác định hàm lượng và thành phần hóa học của tinh dầu

Tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn có màu vàng, mùi thơm nồng. Hàm lượng tinh dầu được xác định là 0,15% tính theo khối lượng dược liệu tươi. Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được thành phần hóa học của tinh dầu Thiên niên kiện lá lớn. Đã xác định được 59 hợp chất trong tinh dầu thân rễ loài *H. pendula*. Trong đó, nhóm hợp chất chiếm hàm lượng lớn là các monoterpenoid (68,6%), nổi bật nhất là linalool với hàm lượng lần lượt là 31,6%.

4.1.3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

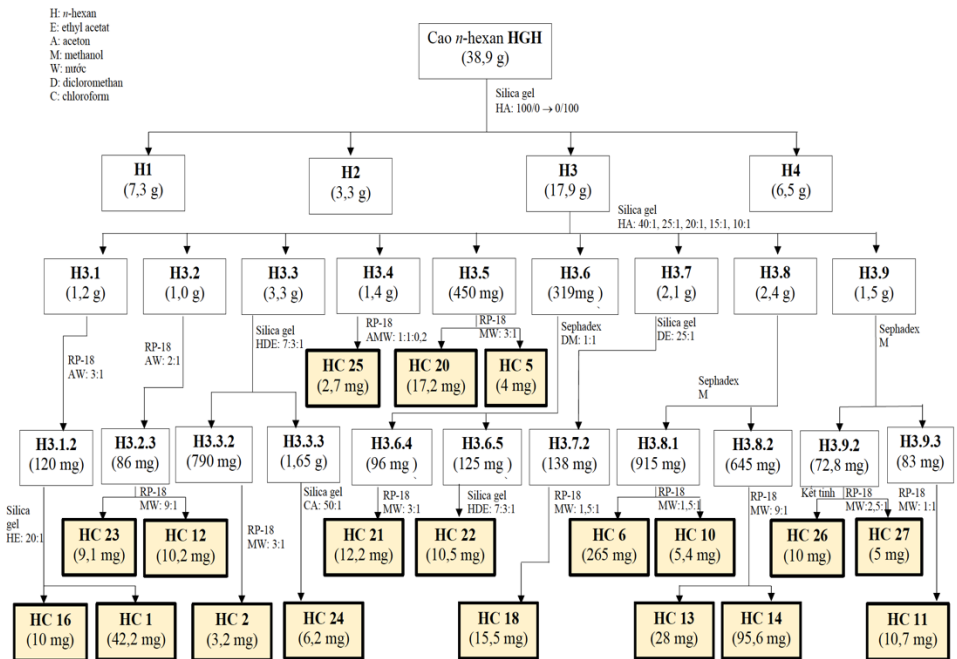
♦ **Chiết xuất:** Từ dược liệu, sau khi chiết bằng phương pháp ngâm với methanol ở nhiệt độ phòng, thu được cao methanol (151 g). Từ cao methanol, tiến hành chiết phân bố với các dung môi có độ phân cực tăng dần, thu được các cao phân đoạn *n*-hexan (HGH: 38,9 g), cao phân đoạn ethyl acetat (HGE: 21,6 g) và cao nước (HGW: 67,5 g).

♦ Sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết

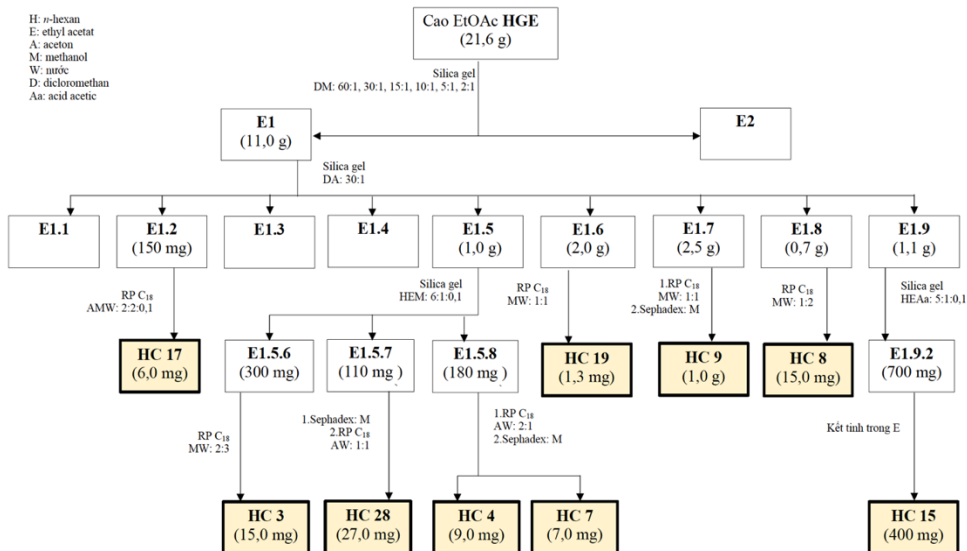
Các cao chiết được tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng viêm bằng mô hình ức chế sản sinh NO. Kết quả cho thấy mẫu cao chiết *n*-

hexan thể hiện hoạt tính tốt với IC_{50} là $46,80 \pm 2,09 \mu\text{g/ml}$. Mẫu cao ethyl acetat thể hiện mức hoạt tính trung bình với IC_{50} là $75,52 \pm 3,90 \mu\text{g/ml}$. Trong khi đó, mẫu cao methanol toàn phần, cao nước chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Do vậy, cao *n*-hexan và ethyl acetat được lựa chọn để tiếp tục phân lập các hợp chất tinh khiết nhằm tìm kiếm, sàng lọc, phát hiện được hợp chất tiềm năng kháng viêm

◆ Phân lập các hợp chất



Hình 4.1. Quy trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ cao phân đoạn *n*-hexan của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn



Hình 4.2. Quy trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ cao phân đoạn ethyl acetat của thân rễ Thiên niên kiện lá lớn

4.1.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất

Từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn, luận án đã phân lập được 28 hợp chất tinh khiết: 19 hợp chất từ phân đoạn *n*-hexan và 09 hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat. Cụ thể, trong số 28 hợp chất phân lập được từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn có 24 hợp chất sesquiterpenoid, 01 flavonoid, 01 monoterpeneoid và 02 steroid. Trong đó có 04 hợp chất mới lần đầu tiên phân lập trong tự nhiên, 01 hợp chất lần đầu tiên được phân lập trong tự nhiên, 08 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ chi *Homalomena* và 15 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ loài Thiên niên kiện lá lớn *Homalomena pendula*. Đây là những đóng góp mới nổi bật của luận án trong lĩnh vực hóa thực vật học, về cơ sở dữ liệu thành phần hóa học của một cây thuốc.

Thông tin của các hợp chất mới:

Hợp chất 1: Homalolide A (Chất mới)

Chất dầu màu vàng nhạt; $[\alpha]_D^{25} +154,3$ (c 0,1, CH_2Cl_2), **UV** (CHCl_3) λ_{max} ($\log \epsilon$) 240 (1,74) nm; **IR** (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 2955, 2932, 2868, 1719, 1634, 1462, 1368, 1263, 1196, 1163, 1101, 1051, 1005, 964, 908, 804; **HRESIMS**: m/z 291,1937 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Na}^+$, 291,1931); CTPT $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_3$; $M = 268$ g/mol; **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 3,59 (1H, dd, $J = 10,2$; 3,0 Hz, H-2), 1,69 (1H, m, H-3a), 1,75 (1H, m, H-3b), 2,51 (1H, ddd, $J = 17,4$; 9,0; 6,3 MHz, H-4a), 2,71 (1H, ddd, $J = 17,4$; 9,3; 5,7 MHz, H-4b), 4,54 (1H, s, H-6), 1,78* (1H, H-7), 1,36 (1H, m, H-8), 1,28 (1H, m, H-9), 1,77* (1H, H-9), 1,21 (1H, ddd, $J = 17,0$; 11,4; 5,5 MHz, H-10a), 1,53 (1H, m, H-10b), 1,05 (3H, s, H-11), 2,17 (3H, s, H-12), 1,49 (1H, m, H-13), 0,92 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-14), 0,89 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-15), 3,28 (3H, s, OCH_3) và **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 52,9 (C1), 83,8 (C2), 23,4 (C3), 41,7 (C4), 208,6 (C5), 110,8 (C6), 63,8 (C7), 53,9 (C8), 31,1 (C9), 33,5 (C10), 24,2 (C11), 30,0 (C12), 33,7 (C13), 21,5 (C14), 21,2 (C15), 54,5 (OCH_3).

Hợp chất 2: Homalolide B (Chất mới)

Chất bột màu trắng; **UV** (CHCl_3) λ_{max} ($\log \epsilon$) 240 (2,35) nm; **IR** (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3447, 2957, 2922, 2853, 1634, 1464, 1383, 1094, 1024, 665; **HRESIMS**: m/z 239,2008 (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_2^+$, 239,2006); $[\text{M}+\text{H}]^+$ CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$; $M = 238$ g/mol; **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 2,68 (1H, m, H-1), 1,65 (1H, dddd $J = 12,6$; 6,2; 1,1; 0,8, H-2a), 2,08 (1H, m, H-2b), 1,58* (1H, H-3a), 1,79 (1H, ddd $J = 12,7$; 6,1; 1,0; H-3b), 2,14 (1H, dd, $J = 11,0$; 10,8; H-5), 3,78 (1H, dd, $J = 10,8$; 7,9; H-6), 1,28 (1H, m, H-7), 1,58* (1H-8a), 1,88 (1H, m, H-8b), 2,06 (1H, m, H-9a), 2,36 (1H, ddd, $J = 14,5$; 11,6;

4,7; H-9b), 1,96 (1H, m, H-11), 1,01 (3H, d, $J = 6,8$, H-12), 0,90 (3H, d, $J = 6,8$, H-13), 4,82 (1H, d, $J = 1,8$, H-14a), 4,83 (1H, d, $J = 1,8$, H-14b), 1,46 (3H, s, H-15), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): δ_{C} 46,2 (C1), 27,9 (C2), 41,8 (C3), 82,5 (C4), 54,3 (C5), 73,7 (C6), 52,3 (C7), 24,4 (C8), 34,9 (C9), 149,8 (C10), 28,5 (C11), 21,9 (C12), 19,7 (C13), 109,2 (C14), 31,2 (C15).

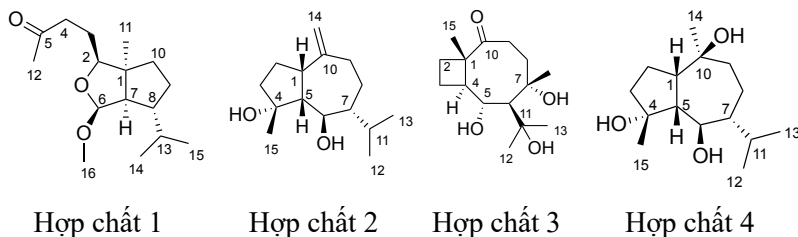
Hợp chất 3: Homalolide C (Chất mới)

Chất bột màu trắng; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -3,27$ (c 0,24, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) (nm): 200 (2,42), 227 (2,02), 287 (1,60); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3431, 2968, 2944, 2891, 1692, 1639, 1450, 1383, 1333, 1258, 1200, 1117, 1090, 1020, 980, 949, 887; HRESIMS: m/z 293,1715 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}^+$, 293,1723); CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$; $M = 270$ g/mol; $^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 600 MHz): δ_{H} 1,27* (1H, H-2a), 1,80 (1H, m, H-2b), 1,27* (1H, H-3a), 1,71 (1H, m, H-3b), 1,57 (1H, m, H-4), 4,30 (1H, dd, $J = 10,1$; $10,1$; H-5), 1,61 (1H, d, $J = 10,1$, H-6), 1,90 (1H, ddd, $J = 13,7$; $4,6$; $4,6$; H-8a), 2,19 (1H, ddd, $J = 13,7$; $13,3$; $3,7$; H-8b), 2,30 (1H, ddd, $J = 17,0$; $13,3$; $4,6$; H-9a), 2,51 (1H, ddd, $J = 17,0$; $4,6$; $3,7$; H-9b), 1,22 (3H, s, H-12), 1,30 (3H, s, H-13), 1,55 (3H, s, H-14), 1,23 (3H, H-15), $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, 150 MHz): δ_{C} 48,7 (C1), 35,0 (C2), 23,3 (C3), 54,6 (C4), 72,0 (C5), 54,9 (C6), 72,4 (C7), 38,5 (C8), 35,9 (C9), 218,6 (C10), 75,7 (C11), 30,0 (C12), 23,9 (C13), 33,2 (C14), 19,0 (C15).

Hợp chất 4: Homalolide D (Chất mới)

Chất bột màu trắng; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -1,88$ (c 0,07, CH_2Cl_2); UV (CH_2Cl_2) λ_{max} (log ϵ) (nm): 225 (2,12), 232 (2,15), 235 (2,18), 240 (2,18); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3339, 2961, 2932, 2871, 1736, 1665, 1460, 1371, 1279, 1175, 1113, 1043, 1005, 926, 818, 768, 735, 679; HRESIMS: m/z 279,1930

$[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{28}O_3Na^+$, 279,1931); CTPT $C_{15}H_{28}O_3$; $M = 256$ g/mol; 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 2,19 (1H, m, H-1), 1,73 (1H, m, H-2a), 1,87 (1H, m, H-2b), 1,60 (1H, m, H-3a), 1,79 (1H, m, H-3b), 2,00 (1H, dd, $J = 10,4$; $10,4$; H-5), 3,81 (1H, dd, $J = 10,4$; $10,0$; H-6), 1,47 (1H, m, H-7), 1,21 (1H, m, H-8a), 1,65 (1H, m, H-8b), 1,57 (1H, ddd, $J = 13,2$; $13,2$; $3,6$, H-9a), 1,82 (1H, m, H-9b), 2,30 (1H, m, H-11), 0,93 (3H, d, $J = 6,9$, H-12), 0,82 (3H, d, $J = 6,9$, H-13), 1,23 (3H, s, H-14), 1,46 (3H, s, H-15), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ_C 53,5 (C1), 26,2 (C2), 41,7 (C3), 82,2 (C4), 57,5 (C5), 72,8 (C6), 50,6 (C7), 21,4 (C8), 43,3 (C9), 74,6 (C10), 26,7 (C11), 21,3 (C12), 15,7 (C13), 26,1 (C14), 32,3 (C15).



Hình 4.3. Cấu trúc của các hợp chất mới phân lập từ thân rễ Thiên nhiên kiện lá lớn

Ngoài 4 hợp chất mới này còn có thêm 24 hợp chất được phân lập bao gồm: 4 β -Hydroxyeudesm-7-en-1-on (5), oplodiol (6), 1 β ,4 β ,6 β -trihydroxyeudesman (7), 1 β ,4 β ,6 α -trihydroxyeudesman (8), 1 β ,4 β ,7 α -trihydroxyeudesman (9), homalomenin D (10), 1 α ,2 α ,5 α ,6 α ,7 α ,8 α -isoducan-2,5,6-triol (11), homalomenol C (12), homalomenol D (13), homalomenol A (14), bullatantriol (15), spathulenol (16), aromadendran-4 α ,10 α -diol (17), oplopanon (18), 2 α -hydroxyoplopanon (19), taiwaninon A (20), teucmosin (21), paludolon (22), α -cadinol (23), 1 α ,4 β ,5 α ,6 β ,7 β H,10 β -4,10-epoxy-6-

guainol (24), ergosterol peroxid (25), sitoindosid I (26), tangeretin (27), (*E*)-2,6-dimethyloct-2,7-dien-1,6-diol (28).

4.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính sinh học

4.2.1. Kết quả đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết và tinh dầu

4.2.1.1. Hoạt tính ức chế sản sinh NO

19 hợp chất phân lập được từ phân đoạn *n*-hexan (hợp chất **1**, **2**, **5**, **6**, **10-14**, **16**, **18**, **19**, **21-27**) và 08 hợp chất được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat (hợp chất **3**, **4**, **7-9**, **15**, **19**, **28**) cùng với tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn được đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro*. Hợp chất **17** có khối lượng mẫu ít, không đủ để tiến hành các phép thử hoạt tính sinh học. Kết quả cho thấy có 10/27 hợp chất thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO. Trong đó các hợp chất **1**, **10**, **13**, **14**, **16**, **20**, **21**, **23** thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO tương đương với chứng dương được sử dụng trong mô hình thử nghiệm là L-NMMA. Tinh dầu chưa thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO ở điều kiện thí nghiệm.

4.2.1.2. Ảnh hưởng của hợp chất homalolide A (1) và homalomenol A (14) lên mức độ sản sinh PGE₂, IL-6, IL-10 và TNF- α

Các hợp chất **1**, **10**, **13**, **14**, **16**, **20**, **21**, **23** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tương đương chứng dương. Trong số các hợp chất này thì homalolide A (**1**) là một chất mới và homalomenol A (**14**) là hợp chất có khối lượng phân lập được cao nhất. Do đó, hai hợp chất này được lựa chọn để đánh giá sâu hơn hoạt tính kháng viêm *in vitro*, nhằm có luận chứng khoa học về hoạt tính kháng viêm tiềm năng của loài *H. pendula*. Cụ thể, hai hợp chất (**1** và **14**) được chọn để tiếp tục đánh giá mức độ sản sinh PGE₂ và khả năng điều hòa trên các cytokin IL-6, IL-10 và TNF- α bằng phương pháp xét nghiệm ELISA. Dexamethason 10 μ M được sử dụng là chất đối chứng dương.

Căn cứ vào giá trị IC_{50} của mỗi hợp chất khi tiến hành test thử kháng viêm *in vitro* trên mô hình ức chế sản sinh NO mà lựa chọn nồng độ thích hợp của mỗi chất trong thí nghiệm này. Hợp chất **1** được thử nghiệm ở nồng độ 106; 53 và 26,5 μM , hợp chất **14** được thử nghiệm ở nồng độ 128; 64 và 32 μM (tương ứng với $2 \times IC_{50}$, IC_{50} và $0,5 \times IC_{50}$). Đối với hợp chất **1**, ở nồng độ 106 μM làm giảm đáng kể mức độ sản sinh IL-6, TNF- α so với nhóm đối chứng viêm LPS, đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) và làm giảm nồng độ PGE₂ với $p < 0,05$. Ở nồng độ 53 μM , hợp chất này có tác dụng làm giảm sản sinh IL-6 ($p < 0,01$) và TNF- α ($p < 0,05$). Tại nồng độ 26,6 μM , hợp chất **1** làm giảm nồng độ IL-6 với $p < 0,05$. Hợp chất **1** chưa thể hiện tác động đến sự sản sinh IL-10. Đối với hợp chất **14**, ở hai nồng độ 128 và 64 μM thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh TNF- α , IL-6 và PGE₂ ($p < 0,01$). Tại nồng độ 128 μM , hợp chất **14** đã làm tăng nồng độ sản sinh IL-10 ($p < 0,05$).

4.2.1.3. Ảnh hưởng của hợp chất (1), (14) đến mức độ biểu hiện của COX-2 và iNOS

Hai hợp chất **1** và **14** được tiếp tục đánh giá khả năng ảnh hưởng lên sự biểu hiện của COX-2 và iNOS. Nồng độ thử nghiệm của hợp chất **1** là 26,5; 53 và 106 μM và nồng độ thử nghiệm của hợp chất **14** là 32; 64 và 128 μM . Đối chứng viêm được sử dụng là LPS ở nồng độ 1 $\mu g/ml$. GAPDH được sử dụng làm protein nội chuẩn.

Khi tế bào RAW 264.7 bị kích thích viêm bằng LPS, mức biểu hiện protein của iNOS và COX-2 tăng lên rõ. Các tế bào được ủ với hợp chất **1** và hợp chất **14** cho thấy đã làm giảm sự biểu hiện protein iNOS và COX-2 do LPS gây ra theo phương thức phụ thuộc nồng độ. Đối với hợp chất **1**, ở nồng độ 106 μM thể hiện khả năng làm giảm

biểu hiện của iNOS và COX-2 ($p < 0,05$). Đối với hợp chất **14**, ở hai mức nồng độ 64 và 128 μM đều thể hiện khả năng làm giảm biểu hiện protein iNOS và COX-2 trong tế bào RAW 264.7 đã cảm ứng viêm bằng LPS khi phân tích bằng kỹ thuật Western-blot.

4.2.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của Thiên niên kiện lá lớn

4.2.2.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao toàn phần methanol, các cao phân đoạn và tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn

Cao toàn phần HGM và các cao chiết phân đoạn HGH, HGE, HGW và tinh dầu được tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế tế bào ung thư phổi SK-LU-1 *in vitro*. Các mẫu thử được sàng lọc ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. Ellipticine được sử dụng là chất đối chứng dương, trong đó ellipticin thử ở nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả cho thấy, các cao thử nghiệm và tinh dầu ức chế dòng tế bào ung thư phổi SK-LU-1 với phần trăm ức chế dao động trong khoảng 22,79 – 37,42%.

4.2.2.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn

27 hợp chất đã phân lập được tiến hành sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư phổi ở người SK-LU-1 ở nồng độ 100 μM . Hợp chất **17** do không đủ khối lượng nên không thể tiến hành thí nghiệm đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 100 μM , chỉ có 2 hợp chất **23** và **26** thể hiện khả năng ức chế dòng tế bào ung thư phổi SK-LU-1 với phần trăm ức chế lần lượt là 51,12 và 85,90%. Nhằm tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư, nghiên cứu tiếp tục sàng lọc 11 hợp chất (hợp chất **6, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 18, 23, 26, 28**) trên 3 dòng tế bào ung thư khác là ung thư vú MCF7, ung thư gan Hep-G2, ung thư tuyến giáp 8505c,

kết hợp với dòng tế bào thường là tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A. Kết quả cho thấy, chỉ có 02/27 hợp chất thể hiện hoạt tính ở mô hình thí nghiệm. Sitoindosid I thể hiện mức hoạt tính trung bình trên 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với IC_{50} trong khoảng 44,05 – 60,64 μM . α -Cadinol thể hiện mức hoạt tính yếu trên 2 dòng tế bào thử nghiệm là SK-LU-1 và HEK-293A với giá trị IC_{50} lần lượt là 97,75 và 92,52 μM . Các hợp chất còn lại chưa thể hiện hoạt tính trên các dòng tế bào thử nghiệm.

4.2.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* của Thiên niên kiện lá lớn

4.2.3.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của cao toàn phần methanol, cao phân đoạn và tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn

Các cao chiết và tinh dầu được sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* bằng phương pháp Ellman. Trong các mẫu thử chỉ có mẫu cao *n*-hexan và tinh dầu có thể hiện hoạt tính ức chế acetylcholinesterase. Cao *n*-hexan và tinh dầu thể hiện khả năng ức chế acetylcholinesterase ở mức trung bình với IC_{50} lần lượt là 133,87 và 130,65 $\mu g/ml$.

4.2.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của các hợp chất phân lập được từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn

Các hợp chất phân lập được sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* bằng phương pháp Ellman, trong 20 mẫu chất được sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase chỉ có teucmosin có khả năng ức chế mạnh acetylcholinesterase với giá trị IC_{50} là 4,53 μM , tương đương với chứng dương của thí nghiệm là berberin với IC_{50} là 3,78 μM .

4.2.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế *acetylcholinesterase* trên mô hình docking in silico của hợp chất tiềm năng

Kết quả chỉ ra rằng teucmosin được gắn vào túi liên kết của AChE và tạo ra tương tác *van de Waals* với các acid amin Trp86, Gly120, Gly126, Leu130, Tyr133, Glu202, Phe295, Phe297, Tyr337 và His447. Hợp chất này cũng hình thành bốn liên kết hydro quan trọng với các acid amin của bộ ba xúc tác (Ser203, điểm số tương tác: 41%, chiều dài: 2,24 Å) và hốc “oxyanion” (Gly121, điểm số tương tác: 35%, chiều dài: 2,96 Å, Gly122, điểm số tương tác: 13%, chiều dài: 2,61 Å, Ala204, điểm số tương tác: 16%, chiều dài: 3,05 Å). Các acid amin này đều đóng vai trò quan trọng trong quá trình xúc tác của AChE¹⁵⁵. Do đó, có thể thấy rằng teucmosin có khả năng gắn kết mạnh với vùng tác động của enzym. Điều này có thể giải thích hoạt tính ức chế AChE đầy hứa hẹn của hợp chất teucmosin.

5. Bàn luận

Đã có một số ý kiến bàn luận về giá trị khoa học và ý nghĩa về kết quả của luận án.

6. Kết luận và kiến nghị

6.1. Kết luận

Sau quá trình thực hiện, luận án đã xác định được thành phần hóa học của tinh dầu, chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc một số hợp chất hóa học, đánh giá hoạt tính sinh học của các cao chiết và các chất phân lập được, đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và đạt được tất cả các mục tiêu đề ra ban đầu:

Về thành phần hóa học của loài Thiên niên kiện lá lớn

◆ Đã xác định hàm lượng tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn là 0,15%. Thành phần chính của tinh dầu là linalool với hàm lượng là 31,6%.

◆ Bảng phản ứng hóa học, đã xác định được thân rễ Thiên niên kiện lá lớn có 06 nhóm chất sau: flavonoid, chất béo, steroid, acid hữu cơ, đường khử và terpenoid.

◆ Đã phân lập và xác định cấu trúc của 28 hợp chất từ thân rễ Thiên niên kiện lá lớn, bao gồm: 04 hợp chất mới lần đầu tiên được phân lập trong tự nhiên là: homalolide A, homalolide B, homalolide C và homalolide D. Trong đó, homalolide A là một chất giả; homalolide C sở hữu khung cấu trúc mới, lần đầu tiên được tìm thấy trong tự nhiên. 09 hợp chất lần đầu tiên được phân lập trong chi *Homalomena* là 4 β -hydroxyeudesm-7-en-1-on; spathulenol; paludolon; 1 α ,4 β ,5 α ,6 β ,7 β H,10 β -4,10-epoxy-6-guainol; 1 α ,2 α ,5 α ,6 α ,7 α ,8 α -isoducan-2,5,6-triol; tangeretin; (*E*)-2,6-dimethyloct-2,7-dien-1,6-diol; ergosterol peroxid và sitoindosid. 15 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài Thiên niên kiện lá lớn (*H. pendula*) là: taiwaninon A; oplodiol; homalomenol C; homalomenol A; α -cadinol; homalomenol A; homalomenin D; teucmosin; oplopanon; aromadendran-4 α ,10 α -diol; bullatantriol; 1 β ,4 β ,6 α -trihydroxy-eudesman; 1 β ,4 β ,7 α -trihydroxyeudesman, 1 β ,4 β ,6 β -trihydroxyeudesman và 2 α -hydroxyoplopanon. Đặc biệt, cấu trúc hóa học của hợp chất 2 α -hydroxyoplopanon lần đầu tiên được làm sáng tỏ trong luận án này.

Về hoạt tính sinh học của loài Thiên niên kiện lá lớn

◆ Hoạt tính chống viêm *in vitro*

- Cao chiết *n*-hexan và ethyl acetat thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bởi LPS với giá trị IC₅₀ lần lượt là 46,80 và 75,52 μ g/ml. Tinh dầu, cao methanol, cao chiết nước chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu.

- Các hợp chất taiwaninon A, spathulenol, homalolide A,

homalomenol C, homalomenol A, α -cadinol, homalomenol A, homalomenin D, teucmosin, tangeretin có tác dụng ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} trong khoảng 35,41–98,10 μ M.

- Hợp chất homalolide A ở nồng độ 106 μ M làm giảm đáng kể mức độ sản sinh IL-6, TNF- α so với nhóm đối chứng viêm LPS ($p < 0,01$) và làm giảm nồng độ PGE_2 ($p < 0,05$). Ở nồng độ 53 μ M, hợp chất này có tác dụng làm giảm sản sinh IL-6 ($p < 0,01$) và TNF- α ($p < 0,05$). Tại nồng độ 26,6 μ M, hợp chất này làm giảm nồng độ IL-6 với $p < 0,05$. Hợp chất này chưa thể hiện tác động đến IL-10.

- Hợp chất homalomenol A ở hai nồng độ 128 và 64 μ M thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh TNF- α , IL-6 và PGE_2 ($p < 0,01$). Tại nồng độ 128 μ M, hợp chất **14** đã làm tăng nồng độ sản sinh IL-10 ($p < 0,05$).

- Đã xác định được homalolide A và homalomenol A ức chế mức độ biểu hiện gen COX-2, iNOS trên tế bào RAW 264.7 kích thích viêm bởi LPS phụ thuộc nồng độ.

◆ Hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro*

Các cao chiết, tinh dầu chưa thể hiện hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi ở người (SK-LU-1) ở điều kiện thí nghiệm. Hợp chất α -cadinol có khả năng ức chế yếu dòng tế bào ung thư phổi và tế bào thân gốc phổi với giá trị IC_{50} lần lượt là 97,75 và 92,52 μ M. Hợp chất sitoindosid I có khả năng ức chế trung bình trên 5 dòng tế bào thử nghiệm với giá trị IC_{50} trong khoảng 44,05 – 60,64 μ M.

◆ Hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro*

Cao *n*-hexan và tinh dầu thể hiện hoạt tính ức chế acetylcholinesterase trung bình với giá trị IC_{50} lần lượt là 133,87 và 130,65 μ g/ml. Teucmosin có khả năng ức chế acetylcholinesterase với IC_{50} là $4,53 \pm 0,39$ μ M.

◆ Hoạt tính ức chế acetylcholinesterase trên mô hình docking *in silico*

Mô hình docking *in silico* cho thấy, teucmosin gắn vào túi liên kết của AChE và tạo ra tương tác *van der Waals* với các acid amin Trp86, Gly120, Gly126, Leu130, Tyr133, Glu202, Phe295, Phe297, Tyr337 và His447. Hợp chất này cũng hình thành bốn liên kết hydro quan trọng với các acid amin của bộ ba xúc tác và hốc “oxyanion”. Các acid amin này đóng vai trò quan trọng trong quá trình xúc tác AChE.

6.2. Kiến nghị

Kết quả nghiên cứu của luận án là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về mặt hóa học, hoạt tính sinh học. Để kế thừa và phát huy những kết quả thu được từ nghiên cứu, các hướng nghiên cứu tiếp theo được kiến nghị bao gồm:

1. Thử thêm một số hoạt tính sinh học khác của tinh dầu thân rễ Thiên niên kiện lá lớn như hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống loãng xương.
2. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế kháng viêm của hợp chất homalolide A và homalomenol A. Tiếp tục nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của cao chiết *n*-hexan trên mô hình *in vivo*.
3. Cần có hướng nghiên cứu tiếp theo sâu hơn để xác định marker quyết định tác dụng kháng viêm của cao Thiên niên kiện lá lớn. Từ đó định hướng để tiêu chuẩn hóa cao nguyên liệu.
4. Nghiên cứu tổng hợp, bán tổng hợp tạo dẫn xuất từ các hợp chất có hoạt tính sinh học tiềm năng.