

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



TRẦN THỊ THUÝ QUỲNH

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC

HƯỚNG TÁC DỤNG SINH HỌC

CỦA CÂY XÁO TAM PHẦN

***PARAMIGNYA TRIMERA* (OLIV.) BURKILL, RUTACEAE**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH - NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

TRẦN THỊ THUÝ QUỲNH

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC

HƯỚNG TÁC DỤNG SINH HỌC

CỦA CÂY XÁO TAM PHÂN

PARAMIGNYA TRIMERA (OLIV.) BURKILL, RUTACEAE

NGÀNH: DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ: 62720406

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. PHẠM ĐÔNG PHƯƠNG (HDC)

2. PGS.TS. ĐỖ THỊ HỒNG TƯƠI (HDP)

THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH - Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi tên là Trần Thị Thuý Quỳnh, là Nghiên cứu sinh chuyên ngành Dược học cổ truyền, khóa 2014 – 2017, xin cam đoan:

1. Luận án này do tôi trực tiếp thực hiện, dưới sự hướng dẫn khoa học của Thầy TS. Phạm Đông Phương và cô PGS.TS. Đỗ Thị Hồng Tươi.
2. Các tài liệu tham khảo được tôi xem xét, chọn lọc kỹ lưỡng, trích dẫn và liệt kê tài liệu tham khảo đầy đủ.
3. Kết quả trình bày trong luận án được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của bản thân tôi và các kết quả của nghiên cứu này chưa được dùng cho bất cứ đề tài cùng cấp nào khác.
4. Các kết quả công bố chung đã được Thầy cô hướng dẫn và các đồng tác giả cho phép sử dụng trong luận án.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày tháng năm

Người hướng dẫn
(Ký tên và ghi rõ họ tên)

Tác giả thực hiện
(Ký tên và ghi rõ họ tên)

TS. Phạm Đông Phương

Trần Thị Thuý Quỳnh

PGS.TS. Đỗ Thị Hồng Tươi

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
MỤC LỤC	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH	ix
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Tổng quan chi <i>Paramignya</i> và cây Xáo tam phân	4
1.2. Tổng quan khảo sát hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i>	20
1.3. Mô hình nghiên cứu hoạt tính độc tế bào <i>in vitro</i>	25
1.4. Đại cương về kỹ thuật Western blot	32
1.5. Đại cương về protein KDM2A	34
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. Thiết kế nghiên cứu	36
2.2. Quy trình nghiên cứu	37
2.3. Đối tượng nghiên cứu	37
2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	38
2.5. Cỡ mẫu	38
2.6. Xác định các biến số	39
2.7. Dung môi - hóa chất - trang thiết bị	39
2.8. Phương pháp nghiên cứu	41
Chương 3. KẾT QUẢ	61
3.1. Phân tích thành phần hoá học, thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu	61
3.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư <i>in vitro</i> của cao toàn phần và cao phân đoạn	62
3.3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng	68
3.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập	73
3.5. Sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào <i>in vitro</i> của các hợp chất tiềm năng	96
3.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC	100
Chương 4. BÀN LUẬN	122
4.1. Phân tích thành phần hoá học, thử tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu	123

4.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư <i>in vitro</i> của cao toàn phần và các cao phân đoạn.....	124
4.3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng	130
4.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập.....	131
4.5. Sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào <i>in vitro</i> của ostruthin và 8-methoxyostruthin.....	135
4.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC.	140
KẾT LUẬN	145
1. Phân tích thành phần hoá học, thử tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu.	145
2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư <i>in vitro</i> của cao toàn phần và cao phân đoạn	145
3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng	146
4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập.....	147
5. Về sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào <i>in vitro</i> của ostruthin và 8-methoxyostruthin.....	147
6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC	148
KIẾN NGHỊ.....	149
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI CỦA TÁC GIẢ	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, chữ viết tắt	Từ gốc	Ý nghĩa
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid
ABAP	2,2'-azobis(2-amidopropane)	2,2'-azobis(2-amidopropane)
ACN	Acetonitril	Acetonitril
ALT	Alanin aminotransferase	Alanin aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance	Phân tích phương sai
APG	Angiosperm Phylogeny Group	Hệ thống phân loại thực vật có hoa
AST	Aspartate transaminase	Aspartate transaminase
ATCC	American Type Culture Collection	American Type Culture Collection
CDC	Chất đối chiếu	Chất đối chiếu
COSY	Correlation Spectroscopy	Correlation Spectroscopy
COX-2	Cyclooxygenase-2	Cyclooxygenase-2
CTCL	Chỉ tiêu chất lượng	Chỉ tiêu chất lượng
d	Doublet	Đỉnh đôi
DCM	Dicloromethan	Dicloromethan
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam	Dược điển Việt Nam
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC 50	Half maximal effective concentration	Nồng độ hiệu quả 50%
FID	Flame Ionization Detector	Detector ion hóa bằng ngọn lửa
FRAP	Ferric reducing-antioxidant power	Năng lực khử sắt
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
GF-AFC	Protease glycyphenylalanyl-aminofluoroumarin	Protease glycyphenylalanyl-aminofluoroumarin
HAT	Hydrogen atom transfer	Chuyển nguyên tử hydro
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatog	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IC	Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế
IC50	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%

IL	Interleukin	Interleukin
ISO	International Organization for Standardization	Tổ chức Tiêu chuẩn hóa Quốc tế
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Liên minh Quốc tế về Hóa học cơ bản và ứng dụng
J	Coupling constant	Hằng số ghép
KMBA	α -Keto- γ -(methylthio)butyric acid	Acid α -Keto- γ -(methylthio)butyric
LDH	lactate dehydrogenase	lactate dehydrogenase
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantitation	Giới hạn định lượng
m	Multiplet	Đỉnh đa
MDA	Malonyl dialdehyde	Malonyl dialdehyde
MS	Mass Spectrometry	Khối phổ
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)	3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)
NBT	Nitroblue tetrazolium	Nitroblue tetrazolium
Neocuproin	2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin	2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
NRU	The neutral red uptake	The neutral red uptake
NSCLC	non-small cell lung cancer	Tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ
ORAC	oxygen radical absorbance capacity	Xác định khả năng hấp thụ gốc tự do chứa oxy hoạt động
PDA	Photodiode Array	Dãy diod quang
ppm	Parts per million	Phần triệu
PTN	Phòng thí nghiệm	Phòng thí nghiệm
PVDF	polyvinyliden difluorid	polyvinyliden difluorid
RNS	Reactive nitrogen species	Các gốc nitơ hoạt động
ROS	Reactive oxygen species	Các gốc oxy hoạt động
s	Singlet	Đỉnh đơn
SET	Single electron transfer	Chuyển đơn điện tử
SKC	Sắc ký cột cổ điển	Sắc ký cột cổ điển
SKLM	Sắc ký lớp mỏng	Sắc ký lớp mỏng
SOD	Enzym superoxyd dismutase	Enzym superoxyd dismutase
SRB	Sulforhodamin B	Sulforhodamin B
TCCS	Tiêu chuẩn cơ sở	Tiêu chuẩn cơ sở
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity	Khả năng chống oxy hóa tương đương Trolox
TEMED	Tetramethylethylen-ediamine	Tetramethylethylen-ediamine

TGA	Thermal Gravimetric Analysis	Phân tích nhiệt trọng lượng
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Tumor necrosis factor alpha
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazin	2,4,6-tripyridyl-s-triazin
TRAP	total radical-trapping antioxidant potential	Khả năng chống oxi hóa bằng cách bẫy các gốc tự do
UV	Ultraviolet	Tử ngoại
VLC	Sắc ký cột nhanh	Sắc ký cột nhanh
VS	Vanilin-sulfuric	Thuốc thử vanilin-sulfuric
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới
δ	Chemical shift	Độ dời hóa học

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài trong chi <i>Paramignya</i>	4
Bảng 1.2. Các dẫn xuất triterpen nhóm tirucallan trong chi <i>Paramignya</i>	11
Bảng 2.1. Các nguyên liệu dùng trong nghiên cứu	39
Bảng 2.2. Chương trình rửa giải được khảo sát	60
Bảng 3.1. Kết quả thử tinh khiết của mẫu bột Xáo tam phân (n=3)	64
Bảng 3.2. Hàm lượng polyphenol của các cao Xáo tam phân	65
Bảng 3.3. Phương trình giữa nồng độ và hoạt tính chống oxy hóa, EC ₅₀	66
Bảng 3.4. Tác động của cao toàn phần lên tế bào MDA-MB-231 và HepG2	67
Bảng 3.5. Hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 và HepG2 của cao toàn phần (rễ, lá)	68
Bảng 3.6. Hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao phân đoạn bằng phương pháp DPPH	69
Bảng 3.7. Hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao phân đoạn bằng phương pháp định lượng MDA	70
Bảng 3.8. Tác động của cao phân đoạn lên tế bào gan HepG2	71
Bảng 3.9. Hoạt tính độc tế bào gan HepG2 của cao phân đoạn của rễ	72
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của PT-1 so sánh với ostruthin	79
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của PT-2 so sánh với ostruthin, 8-methoxyostruthin	81
Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của PT-7 so sánh với demethylsuberosin	83
Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của PT-T9	84
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của PT-10 so sánh với 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin	87
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của PT-11 so sánh với 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin	89
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của PT-3 so sánh với xanthyletin	91
Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của PT-6	93
Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của PT4 so sánh với ociriacridon	95
Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của PT-5 so sánh với citrusinin-I	97
Bảng 3.20. Dữ liệu phổ NMR của PT-8 so sánh với limonin	99

Bảng 3.21. Hoạt tính độc tế bào của ostruthin và 8-methoxyostruthin	101
Bảng 3.22. Phương trình biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ mẫu thử và tỷ lệ ức chế, IC ₅₀ của mẫu thử	102
Bảng 3.23. Kết quả đánh giá 8-methoxyostruthin	107
Bảng 3.24. Bảng phân tích ANOVA kết quả đánh giá đồng nhất lô	108
Bảng 3.25. Kết quả định lượng (%) 8-methoxyostruthin tại hai phòng thí nghiệm	109
Bảng 3.26. Bảng phân tích kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm	109
Bảng 3.27. Kết quả giá trị ấn định hàm lượng (%) 8-methoxyostruthin (n = 12)	110
Bảng 3.28. Kết quả đánh giá ostruthin	112
Bảng 3.29. Bảng phân tích ANOVA kết quả đánh giá đồng nhất lô	113
Bảng 3.30. Kết quả định lượng (%) ostruthin tại hai phòng thí nghiệm	113
Bảng 3.31. Bảng phân tích kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm	114
Bảng 3.32. Kết quả giá trị ấn định hàm lượng (%) ostruthin (n = 12)	114
Bảng 3.33. Chương trình rửa giải gradient	117
Bảng 3.34. Kết quả khảo sát dung môi chiết	118
Bảng 3.35. Kết quả khảo sát thời gian chiết	119
Bảng 3.36. Kết quả khảo sát số lần chiết	120
Bảng 3.37. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng demethylsuberosin	120
Bảng 3.38. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng ostruthin	121
Bảng 3.39. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng 8-methoxyostruthin	121
Bảng 3.40. Kết quả xử lý thông kê tính tuyến tính	123
Bảng 3.41. Ý nghĩa các hệ số trong phương trình hồi qui	123
Bảng 3.42. LOD và LOQ của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methylostruthin	124
Bảng 3.43. Kết quả đánh giá độ lặp lại quy trình định lượng	124
Bảng 3.44. Kết quả độ chính xác trung gian	125
Bảng 3.45. Kết quả độ đúng quy trình định lượng	126
Bảng 3.46. Kết quả định lượng mẫu Xáo tam phân thu mua	128

DANH MỤC HÌNH

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ trình tự các nội dung nghiên cứu	38
Sơ đồ 3.1. Sơ đồ phân lập hợp chất từ rễ Xáo tam phân	75
Sơ đồ 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ thân Xáo tam phân	77
Hình 1.1. Các coumarin trong chi <i>Paramignya</i>	5
Hình 1.2. Flavonoid trong trong chi <i>Paramignya</i>	10
Hình 1.3. Các hợp chất khác trong chi <i>Paramignya</i>	12
Hình 1.4. Các bộ phận cây Xáo tam phân	14
Hình 1.5. Acridon alkaloid trong Xáo tam phân	16
Hình 1.6. Phenol và dẫn chất của phenol trong Xáo tam phân	17
Hình 3.1. Công thức PT-1 (ostruthin)	78
Hình 3.2. Công thức của PT-2 (8- methoxyostruthin)	78
Hình 3.3. Công thức của PT-7 (demethylsuberosin)	82
Hình 3.4. Công thức PT-9 (6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin)	85
Hình 3.5. Công thức PT-10 (6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin)	86
Hình 3.6. Công thức PT-11 (6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin)	88
Hình 3.7. Công thức của PT-3 (xanthyletin)	91
Hình 3.8. Công thức PT-6 (3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin)	93
Hình 3.9. Công thức của PT-4 (ociriacridon)	96
Hình 3.10. Công thức của PT-5 (citrusinin-1)	97
Hình 3.11. Công thức PT-8 (limonin)	99
Hình 3.12. Phổ ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) của PT-12	100
Hình 3.13. Hình ảnh Western blot	103

Hình 3.14. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của sorafenib	104
Hình 3.15. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của ostruthin và 8-methoxyostruthin lên dòng tế bào MDA-MB-231	104
Hình 3.16. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của ostruthin và 8-methoxyostruthin lên dòng tế bào HAK1B	105
Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC thăm dò chương trình rửa giải	116
Hình 3.18. Kết quả kiểm tra chất chuẩn demethylsuberosin	118
Hình 3.19. Sắc ký đồ khảo sát dung môi chiết	118
Hình 3.20. Kết quả khảo sát thời gian chiết	119
Hình 3.21. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu	122
Hình 3.22. Sắc ký đồ HPLC khảo sát độ lặp lại	124
Hình 3.23. Sắc ký đồ HPLC khảo sát độ đúng	125
Hình 4.1. Các hợp chất phân lập từ rễ và thân của Xáo tam phân	138
Hình 4.2. Công thức PT-6 và paramicoumarin B	141

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ung thư nói chung và bệnh ung thư gan nói riêng là những bệnh không lây nhiễm gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng, đã và đang trở thành vấn đề cấp bách của ngành y tế ở hầu hết các nước trên thế giới. Theo Tổ chức quốc tế về ung thư (Global Cancer Observatory - GLOBOCAN) năm 2020, Việt Nam có 182 563 ca ung thư mới mắc, có 122 690 người tử vong do ung thư. Tỷ lệ ung thư tại Việt Nam (tương tự các nước đang phát triển khác) cao nhất là ung thư gan (14,5%), phổi (14,4%), vú (11,8%), dạ dày (9,8%), ruột, trực tràng (9%), khác (40,5%)¹. Thuốc chống ung thư được nghiên cứu và phát triển càng ngày càng nhiều, nhưng giá thành của các thuốc tây y thường rất cao và gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tác động chống ung thư của thuốc có nguồn gốc từ dược liệu là xu hướng hiện nay nhằm tìm ra thuốc điều trị ung thư mới, giúp giảm giá thành, nâng cao hiệu quả điều trị và an toàn cho người bệnh.

Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) được sử dụng trong dân gian để giải nhiệt, bồi bổ cơ thể, mát gan, trị viêm gan, xơ gan². Viện Dược liệu lần đầu tiên nghiên cứu và công bố về thành phần hóa học của Xáo tam phân thu hái ở Hòn Hèo, Khánh Hòa và hoạt tính độc tế bào trên 5 dòng tế bào ung thư, bao gồm: Ung thư gan người HepG2, ung thư đại tràng người HTC116, ung thư vú người MDA-MB-231, ung thư buồng trứng người OVCAR-8 và ung thư cổ tử cung người Hela, trong đó hoạt tính độc tế bào ung thư gan HepG2 và tế bào ung thư cổ tử cung Hela mạnh hơn trên 3 dòng tế bào còn lại³.

Xáo tam phân chỉ mới được nghiên cứu trong nước hoặc kết hợp giữa trong nước với nước ngoài và đã công bố về thực vật, hóa học, tác dụng dược lý, kiểm nghiệm. Về thực vật: Nghiên cứu về hình thái và vi học của Xáo tam phân⁴. Về hóa học: Phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của một số hợp chất thuộc nhóm coumarin, triterpenoid và acridon alkaloid với ostruthin là thành phần chính của Xáo tam phân⁵⁻¹⁶. Về tác dụng dược lý: Nghiên cứu độc tính tế bào ung thư, tác

dụng kháng viêm, chống oxy hoá và ức chế α -glucosidase... nhưng chưa đi sâu vào nghiên cứu cơ chế tác động của các hợp chất phân lập được^{3,12,17,18,19}. Về kiểm nghiệm: Đã có công trình trong nước công bố về định lượng ostruthin bằng HPLC⁶. Tuy nhiên, ostruthin cũng có trong các loài khác thuộc chi *Paramignya*²⁰ nên việc nghiên cứu định lượng thêm một số hợp chất khác có hoạt tính sinh học hoặc marker, góp phần tiêu chuẩn hóa Xáo tam phân là rất cần thiết.

Sau khi Viện Dược liệu công bố tác dụng của Xáo tam phân thì việc khai thác tràn lan đã làm cho Xáo tam phân hầu như bị tận diệt. Hiện nay, Xáo tam phân đã được trồng ở nhiều địa phương trong cả nước và được mua bán với giá rất cao nhưng chưa được nghiên cứu nhiều về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học.

Nhằm mục đích nghiên cứu sâu hơn về thành phần hoá học, tác dụng sinh học cũng như kiểm nghiệm Xáo tam phân, đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học hướng tác dụng sinh học của cây Xáo tam phân (*Paramignya trimer* (Oliv.) Burkill) Rutaceae**” được thực hiện với những mục tiêu sau:

- 1. Phân tích thành phần hoá học, thử tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu:** Phân tích sơ bộ thành phần hoá thực vật, thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết, định tính, định lượng polyphenol bộ phận rễ, thân, lá Xáo tam phân.
- 2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tính tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và cao phân đoạn:** So sánh tác dụng chống oxy hóa và độc tính tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và các cao phân đoạn từ các bộ phận rễ, thân, lá Xáo tam phân định hướng nghiên cứu chiết xuất, phân lập các hợp chất.
- 3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao hay phân đoạn tiềm năng:** Các hợp chất được phân lập chủ yếu bằng kỹ thuật sắc ký gồm sắc ký cột chân không, sắc ký cột cổ điển. Phân lập các chất chính với lượng lớn để thiết lập chất chuẩn.
- 4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập:** Các chất phân lập được sau khi kiểm tra sơ bộ độ tinh khiết được đo phổ UV, MS, NMR (¹³C NMR, ¹H NMR), DEPT, HSQC, HMBC và COSY, biện giải, kiểm tra xác định cấu trúc hóa học.

5. Sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào *in vitro* của các hợp chất phân lập có tiềm năng: Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của các hợp chất tiềm năng có liên quan đến KDM2A hay không thông qua thử nghiệm đưa phân tử siRNA vào trong tế bào nhằm bất hoạt gen KDM2A.

6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng: Thiết lập chất chuẩn. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học và marker (chất điểm chỉ) trong Xáo tam phân bằng HPLC. Ứng dụng quy trình định lượng để so sánh hàm lượng hoạt chất trong một số mẫu rễ Xáo tam phân thu mua trên thị trường.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan chi *Paramignya* và cây Xáo tam phân

1.1.1. Tổng quan chi *Paramignya*

Tên chi *Paramignya* được Robert Wight đưa ra năm 1839 dựa trên loài chuẩn là *Paramignya monophylla* thu được ở Ấn Độ và nhận thấy chi này gần gũi với chi *Luvunga* vì cùng có thân leo²¹.

Đặc điểm chi *Paramignya*: Cây leo thân gỗ hoặc cây bụi thẳng đứng. Cành thường có gai thẳng hoặc uốn cong, ít khi không có gai. Lá đơn, mọc so le. Hoa lưỡng tính, mẫu 5 hay mẫu 4, có thể mọc riêng lẻ hay tụ thành chùm, xim ở nách lá. 4-5 lá đài, dính ở đáy hoặc 2/3 chiều dài lá đài. Đài hoa lõm hình chén, hình nón hoặc hình trụ. Nhị 8-10, nhị đều và rời nhau. 3-5 lá noãn hợp thành bầu 3-5 ô, mỗi ô 1-2 noãn. Quả mọng với nhiều thịt quả nhầy, vỏ quả trong nhiều com. Hạt có áo hạt, không có nội nhũ, mầm thẳng, lá mầm hình elip, phẳng hay lồi²¹.

Phân loại chi *Paramignya*: Cho đến năm 2013, đã có 30 loài thuộc chi *Paramignya* được báo cáo²² và trình bày trong **Bảng 1.1**.

Bảng 1.1. Các loài trong chi *Paramignya*

Stt	Tên loài	Stt	Tên loài
1.	<i>P. andamanica</i> Tanaka	16.	<i>P. longipedunculata</i> Merr.
2.	<i>P. angulata</i> Kurz	17.	<i>P. hainanensis</i> Swingle
3.	<i>P. armata</i> * Oliv.	18.	<i>P. lobata</i> Burkill
4.	<i>P. beddomei</i> Tanaka	19.	<i>P. longispina</i> Hook.f.
5.	<i>P. blumei</i> Hassk.	20.	<i>P. micrantha</i> Kurz
6.	<i>P. brassii</i> C.T. White (synonym)	21.	<i>P. mindanaensis</i> Merr.
7.	<i>P. citrifolia</i> Ho ok.f.	22.	<i>P. missionis</i> (Oliv.) Burkill
8.	<i>P. citrifolia</i> Oliv.	23.	<i>P. monophylla</i> * Wight (Xáo một hoa)
9.	<i>P. confertifolia</i> Swingle	24.	<i>P. petelotii</i> * Guillaumin (Xáo Pételot)
10.	<i>P. cuspidata</i> (Ridl.) Burkill	25.	<i>P. rectispinosa</i> Craib
11.	<i>P. glabra</i> Tanaka	26.	<i>P. ridleyi</i> Burkill
12.	<i>P. dubia</i> Koord. & Valetton ex Moll & Janssonius	27.	<i>P. hispida</i> * (Pierre ex Guillaumin) Pierre ex Guillaumin
13.	<i>P. grandiflora</i> Oliv.	28.	<i>P. scandens</i> * Craib (Xáo leo)
14.	<i>P. littoralis</i> Miq.	29.	<i>P. surasiana</i> Craib

15. *P. griffithii* * Hook.f. (Xáo Griffith)30. *P. trimera** (Oliv.) Burkill (Xáo tam phân)“Nguồn: *The Plant List*, 2013²²”

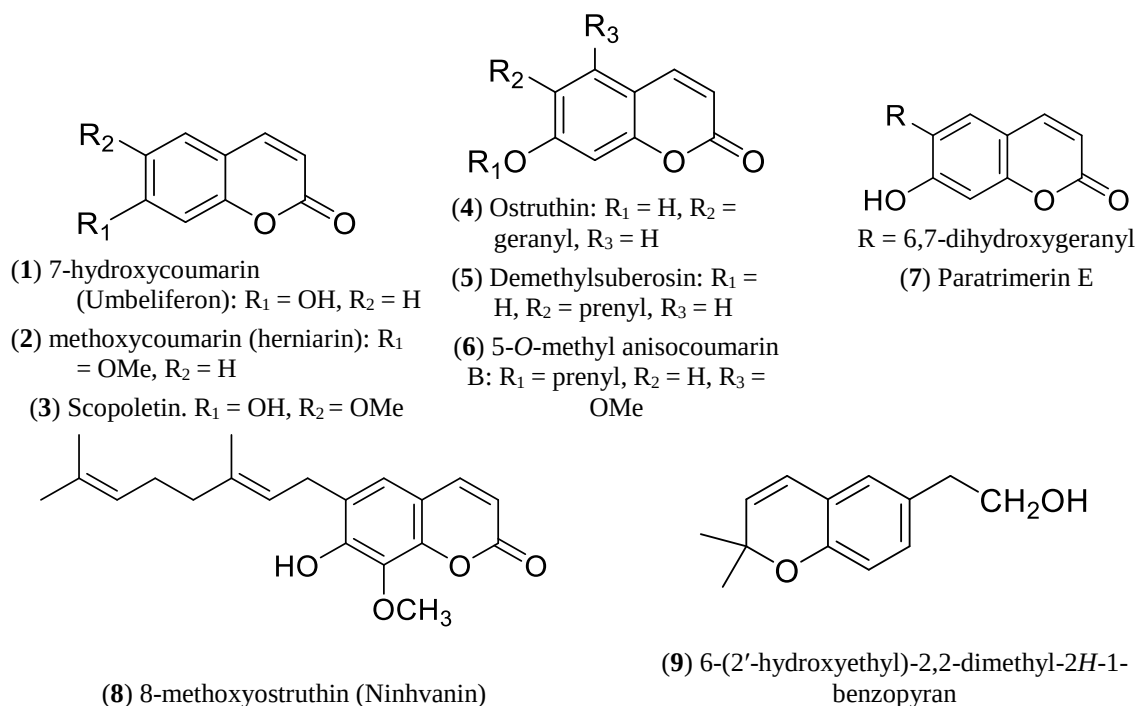
Ở Việt Nam, chi *Paramignya* có 6 loài (đánh dấu *) và *P. armata* Oliv. var. *andamanica* King (Cựa gà, Gai xanh, Quýt gai) đã được báo cáo².

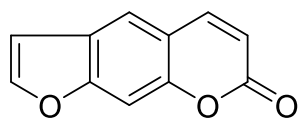
Thành phần hóa học

Theo các tài liệu nghiên cứu trên thế giới chi *Paramignya* có 30 loài, cho đến nay các nghiên cứu về hóa thực vật đã tập trung vào các bộ phận khác nhau (rễ, thân, vỏ thân, lá, cành và quả) của bốn loài *P. trimera*, *P. scandens*, *P. griffithii*, *P. monophylla*. Các nhóm hợp chất của chi *Paramignya* bao gồm coumarin, coumarin glycosid, acridon alkaloid, tirucallan saponin, flavonoid, phenol, chromen và megastigman²⁵.

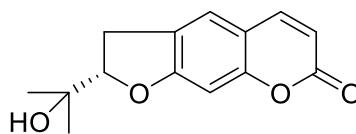
Coumarin

Các hợp chất coumarin thu được dưới dạng các thành phần chiếm ưu thế từ các loài *P. trimera* và *P. monophylla*. Coumarin phân lập từ các loài thuộc chi *Paramignya* thuộc nhóm coumarin đơn giản, furano coumarin, pyrano coumarin²⁵ và được trình bày trong **Hình 1.1**.

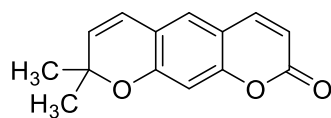




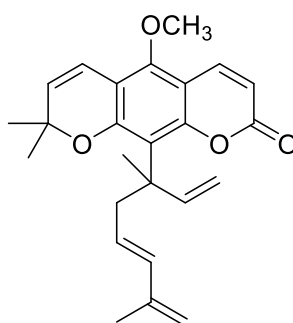
(10) Psoralen



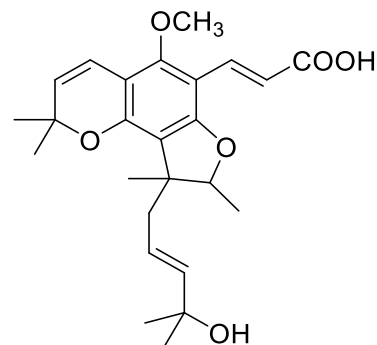
(11) (S)-Marmesin



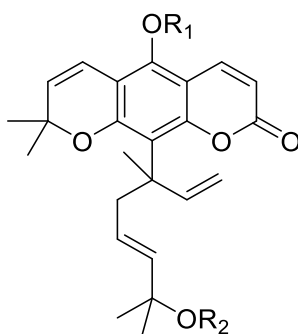
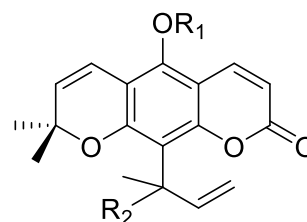
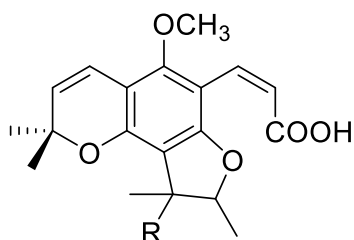
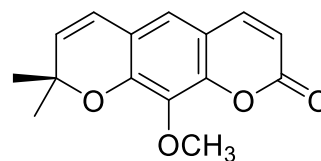
(12) Xanthyletin



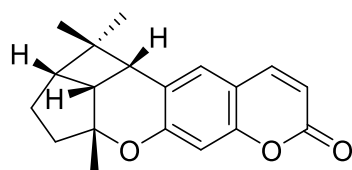
(13) 5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(3',7'-dimethyl-1',5',7'-trien-3'-yl)pyranocoumarin



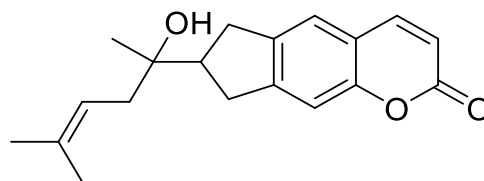
(14) 6-(3'-carboxyethenyl)-5-methoxy-2,2,8,9-tetramethyl-9-(4''-methyl-4''-hydroxypent-3''-enyl)-2H-furo[2,3-h]chromen

(15) 5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-1',5'-dien-3'-yl)pyranocoumarin: $R_1 = \text{Me}$; $R_2 = \text{H}$ (16) 5-hydroxy-8,8-dimethyl-10-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-1',5'-dien-3'-yl)pyranocoumarin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$ (17) dimethyl-10-(7'-acetoxy-3',7'-dimethylocta-1',5'-dien-3'-yl)pyranocoumarin: $R_1 = \text{Me}$; $R_2 = \text{OAc}$ (18) Ponicitrin (Dentatin): $R_1 = \text{Me}$; $R_2 = \text{Me}$ (19) Nordentatin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{Me}$ (20) 5-hydroxy-8,8-dimethyl-10-(3',7'-dimethylocta-1',6'-dien-3'-yl)pyranocoumarin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (21) 5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(3',7'-dimethylocta-1',6'-dien-3'-yl)pyranocoumarin: $R_1 = \text{Me}$; $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (22) 6-(3'-carboxyethenyl)-5-methoxy-2,2,8,9-tetramethyl-9-(4''-methylpent-3''-enyl)-2H-furo[2,3-h]chromen: $R = (\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 

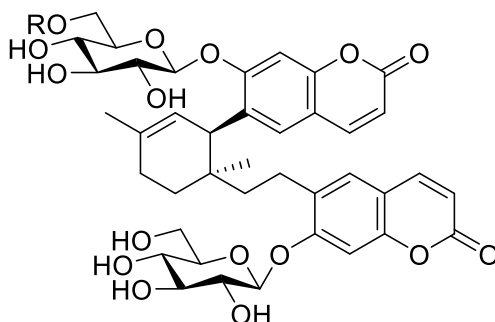
(23) Luvangetin



(24) Paratrimerin F



(25) Pandanusin A



(26) Paratrimerin A: R = H

(27) Paratrimerin B: R = β -D-apiofuranosyl**Hình 1.1.** Các coumarin trong chi *Paramignya*

“Nguồn: Ninh The Son, 2018²⁵”.

Acridon alkaloid

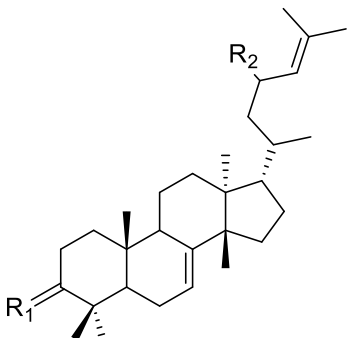
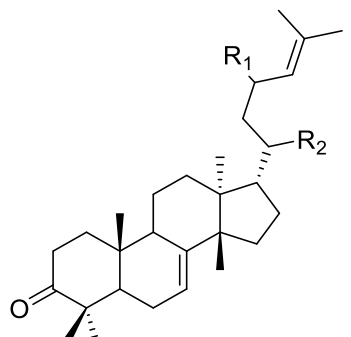
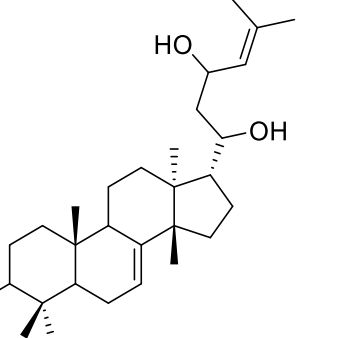
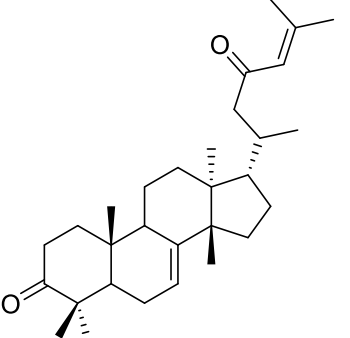
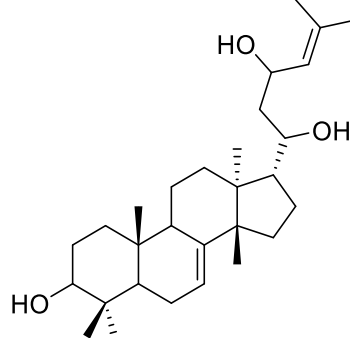
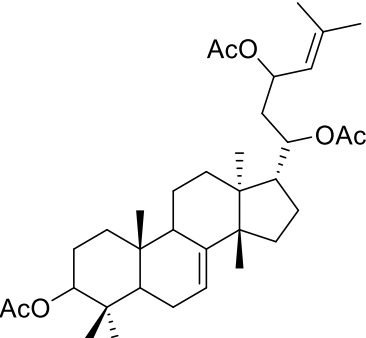
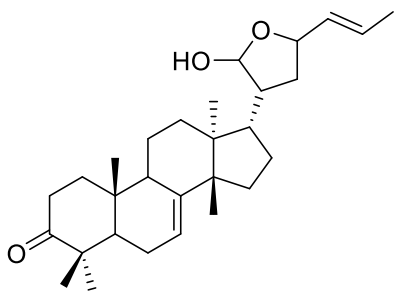
Các acridon alkaloid có trong chi *Paramignya* được báo cáo chủ yếu trong Xáo tam phân, được trình bày chi tiết trong Mục 1.1.2. Tổng quan về cây Xáo tam phân.

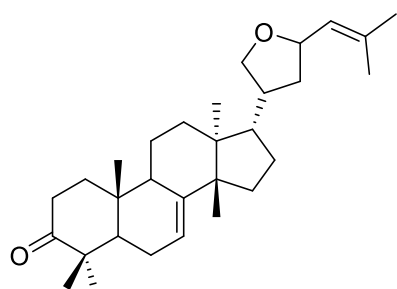
Tirucallan saponin

Các loài thuộc chi *Paramignya* đều có chứa các hợp chất thuộc khung tirucallan. Các nghiên cứu thực vật cũng báo cáo sự hiện diện của các cấu trúc saponin tirucallan từ quả, lá và thân của các loài *P. monophylla*²⁸, phần trên mặt đất của các loài *P. griffithii*²⁷. 7 dẫn xuất tirucallan glycosyl phân lập từ thân và lá của loài *P. scandens*²⁰. Trong số saponin tirucallan sự kết hợp giữa (13S, 14R, 17S, 20S)-lanostan aglycon và β -D-glycopyranosyl glycon qua cầu nối O-acetyl và hiện tượng orglycosyl hóa ở carbon C-25 trong các hợp chất paramignyol A, paramignyol B, paramignyosid A, paramignyosid B, paramignyosid C, paramignyosid D, paramignyosid E có thể là một điểm đánh dấu đáng chú ý cho *P. scandens* và các loài khác trong chi *Paramignya*^{20,30,31}.

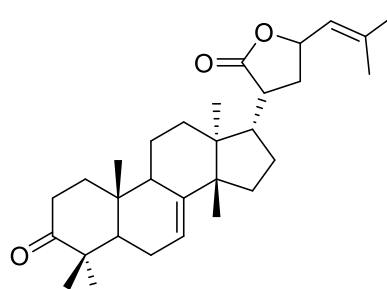
Các triterpenoid trong chi *Paramignya* được trình bày trong **Bảng 1.2**.

Bảng 1.2. Các dẫn xuất triterpen nhóm tirucallan trong chi *Paramignya*

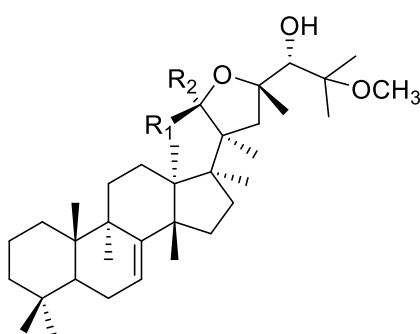
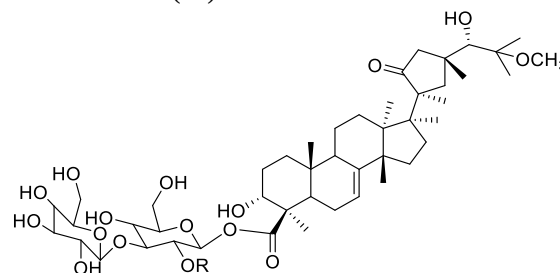
Stt	Tên hợp chất	R ₁	R ₂	Công thức chung
(1)	Tirucalla-7,24-dien-3 β ,23-diol	β OH, α H	OH	
(2)	Tirucalla-7,24-dien-3 α -ol	α OH, β H	H	
(3)	Tirucalla-7,24-dien-3 β -ol	β OH, α H	H	
(4)	3,3-Ethylenedioxy tirucalla-7,24-dien	OCH ₂ CH ₂ O-	H	
(5)	Tirucalla-7,24-dien-23-ol	H, H	OH	
(6)	3-Oxotirucalla-7,24-dien-23-ol	OH	CH ₃	
(7)	3-Oxotirucalla-7,24-dien-23-yl acetat	OAc	CH ₃	
(8)	Tirucalla-7,24-dien-3-on	H	CH ₃	
(9)	3-Oxotirucalla-7,24-dien-21,23-diol	OH	CH ₂ OH	
(10)	3-Oxotirucalla-7,24-dien-21,23-diol diacetat	OAc	CH ₂ OA c	
(11)	Tirucalla-7,24-dien-3,23-dion			
(12)	Tirucalla-7,24-dien-3 β ,21,23-triol			
(13)	Tirucalla-7,24-dien-3 β ,21,23-triol triacetat			
(14)	Flindisson			



(15) Deoxyflindisson



(16) Flindisson lacton

(17) Paramigniyol A: R₁ = OCH₃, R₂ = OH(18) Paramigniyol B: R₁ = H, R₂ = OCH₃

(19) Paramignyosid A: R = H

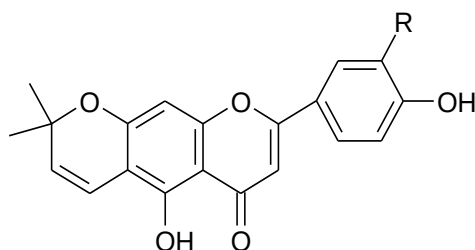
(20) Paramignyosid B: R = Ac

(21) Paramignyosid C: R₁ = R₂ = H(22) Paramignyosid D: R₁ = H, R₂ = D-glucopyranose(23) Paramignyosid E: R₁ = Ac, R₂ = D-glucopyranose

“Nguồn: Bowen I. H, 1998²⁸”

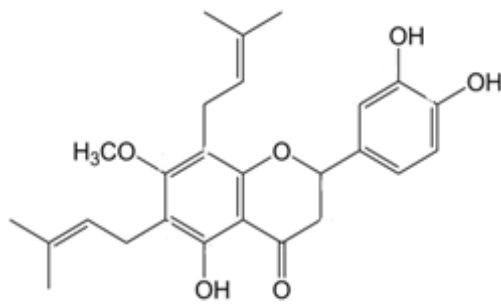
Flavonoid

Bowen và cộng sự đã báo cáo sự tồn tại của flavon carpachromen trong cao chloroform của *P. monophylla*^{28,29}. Wattanapiromsakul C. và cộng sự công bố hai flavanon mới 3', 4'-dihydroxy-7-metoxi-8- (3-metylbut-2-enyl) -furano- (4'', 5'': 6,5) -flavanon và 3', 4'-dihydroxy-7-metoxi-8- (3-metylbut-2-enyl) -2' '' - (1-hydroxy1-metyletyl) -furano- (4'', 5'': 6, 5) -flavanon, amoradin đã được phân lập từ cao methanol của thân cây *P. griffithii*²⁷. Flavanon diglycosid atriplisid B được chiết xuất từ cành và lá *P. scandens*²⁰. Một số flavonoid được phân lập từ chi *Paramignya* được trình bày trong **Hình 1.2**

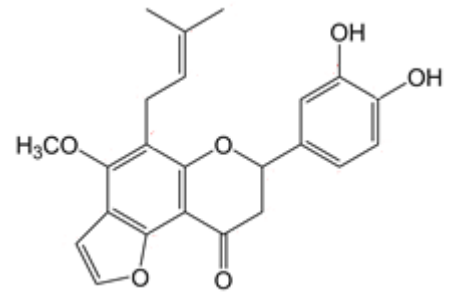


Carpachromen (R = H)

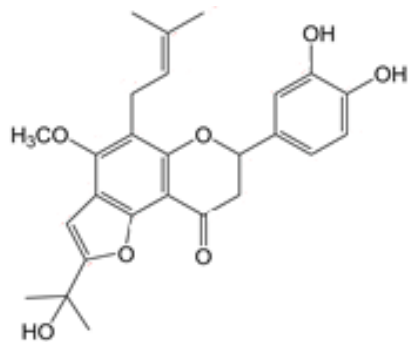
3'-Methoxycarpachromen (R = OCH₃)



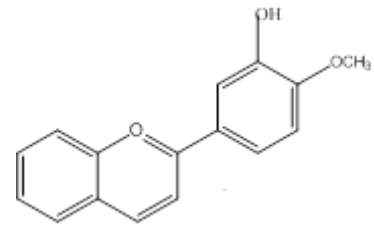
Amoradecin



3',4'-Dihydroxy-7-methoxy-8-(3''-methylbut-2''-enyl)-furan-(4'',5'':6,5)-flavanon



3',4'-Dihydroxy-7-methoxy-8-(3''-methylbut-2''-enyl)-2''-(1-hydroxy-1-methylethyl)-furan-(4'',5'':6,5)-flavanon



Atriplisid B

Hình 1.2. Flavonoid trong chi *Paramignya*

“Nguồn: Wattanapiromsakul C., 2000²⁷”.

Phenol, dẫn chất của phenol và megastigman glycosid

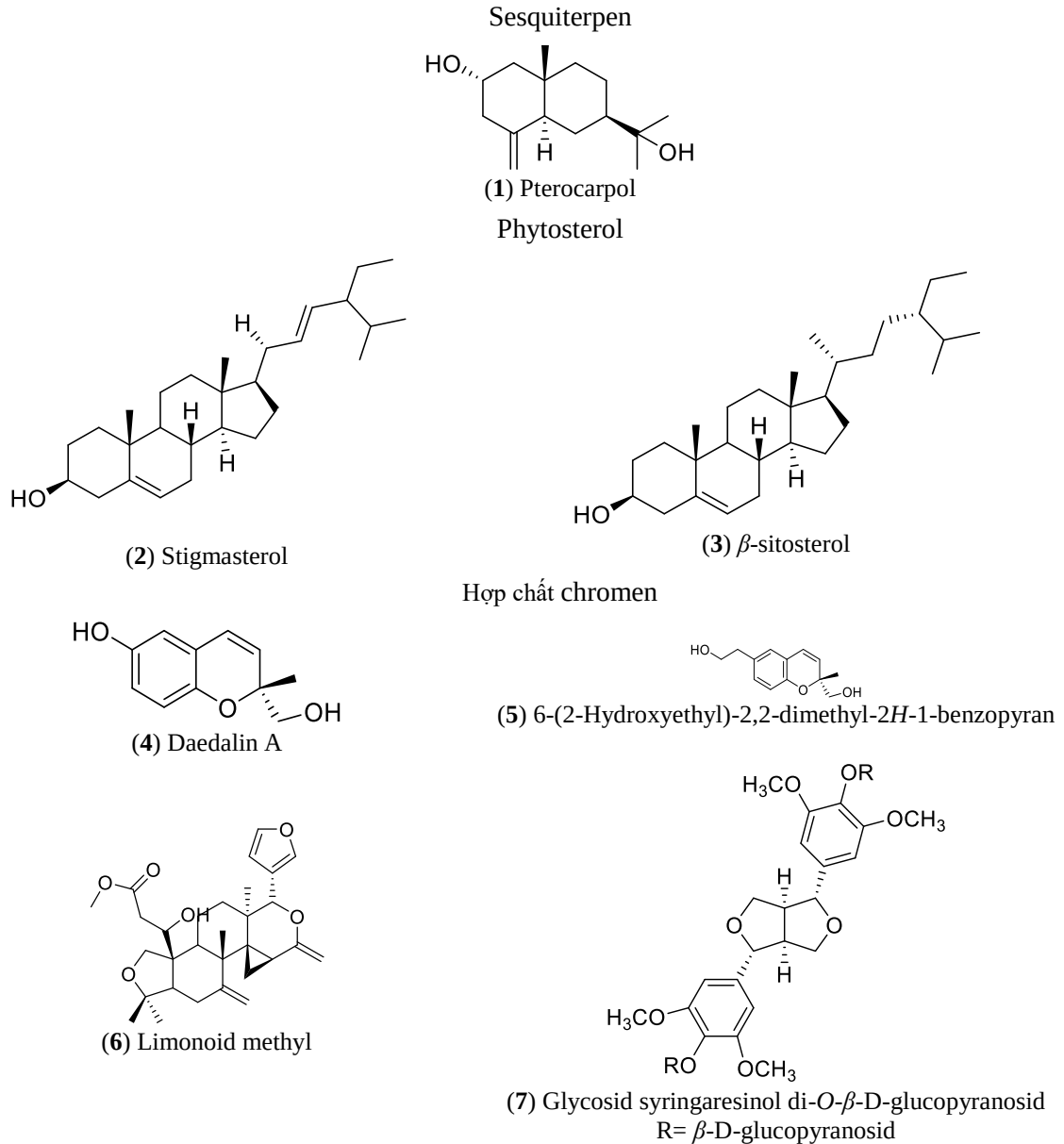
Các hợp chất phenol có cấu trúc đơn giản, acid vanillic và trans-*N*-p-coumaroyl tyramin được phân lập từ cao methanol Xáo tam phân được xác định¹⁰, được trình bày chi tiết trong Mục 1.1.2. Tổng quan về cây Xáo tam phân.

Một vài glycosid sesquiterpen trong chi *Paramignya* xuất hiện như megastigman glycosid, gusanlungionosid C và (6*R*,9*S*)-roseosid, được phân lập từ chiết xuất trong nước của cành và lá khô *P. scandens*²⁰.

Các hợp chất khác

Năm 2016, theo công trình của Nguyễn Thị Diệu Thuận và cộng sự, ngoài các hợp chất atriplisid B, megastigman glycosid²⁰, các hợp chất nhỏ như limonoid

methyl, isolimonat lignin, glycosid syringaresinol di-*O*- β -D-glucopyranosid, nucleosid adenosin cũng được phát hiện từ cành cây và lá *P. scandens*.



Hình 1.3. Các hợp chất khác trong chi *Paramignya*

“Nguồn: Nguyễn Thị Diệu Thuần, 2016²⁰”

Tác dụng dược lý

Tác dụng độc tế bào

Đánh giá sinh học đầu tiên được thực hiện trong việc sàng lọc hoạt động chống khối u của thân và lá *P. lobata* ở Kuala Lumpur³⁴ có giá trị ED₅₀ là 100 μ g/ml đối

với dòng tế bào KB.

Các triterpenoid khung tirucallan được phân lập từ *P. scandens* có tác dụng gây độc tế bào, chống kết tập tiểu cầu, kháng viêm, trị ngứa, có khả năng giãn mạch và ức chế enzyme 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase trên chuột đồng thời có tác động lên protease của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-1)³⁵.

Năm 2014, Nguyễn Hữu Toàn Phan và cộng sự đã công bố kết quả cho thấy hai dẫn xuất mới tirucallan là paramigyol A và B phân lập từ thân và lá của cây *P. scandens* có tác dụng lên các dòng tế bào ung thư ở người như SK-Mel-2 (tế bào ung thư hắc tố), LU-1 (tế bào ung thư phổi) và MCF-7 (tế bào ung thư vú)³¹.

Tác dụng kháng viêm

Trong mô hình khác, tác dụng kháng viêm của các hợp chất phân lập từ chi *Paramignya*, được thực hiện với 5 saponin tirucallan paramignyosid A-E trên các cytokin gây viêm trong suốt quá trình đo sản xuất interleukin (IL) -12 p40, IL-6 và yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α) trong tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ tủy xương được kích thích bởi LPS. Tác dụng mạnh nhất theo thứ tự paramignyosid C (giá trị IC₅₀ là $5,03 \pm 0,19\mu\text{M}$) > paramignyosid D ($19,57 \pm 0,97\mu\text{M}$) > paramignyosid E ($14,09 \pm 0,65\mu\text{M}$) > paramignyosid B ($29,15 \pm 1,33\mu\text{M}$) > paramignyosid A ($48,68 \pm 1,89\mu\text{M}$)³⁰.

Công dụng

Từ lâu, tại các nước Châu Á, các loài thuộc chi *Paramignya* đã được các lương y sử dụng rộng rãi trong dân gian như một vị thuốc quý³⁴. Tại Thái Lan: Loài *P. griffithii* được sử dụng trong hỗ trợ điều trị nhiễm trùng mũi. Tại Malaysia: Rễ của loài *P. scandens* (Xáo leo) được sắc uống có tác dụng làm giảm đau bụng, toàn bộ cây sắc uống trị bệnh giang mai.

Theo Phạm Hoàng Hộ, trong y học cổ truyền, lá và quả *P. armata* (Cựa gà, Gai xanh, Quýt gai) được dùng để trị viêm phổi, ho; rễ *P. monophylla* (Xáo một hoa) được dùng để trị bạch đới hạ; rễ *P. petelotii* (Xáo petelot) làm thuốc bổ cho phụ nữ sau sinh².

1.1.2. Tổng quan về cây Xáo tam phân

Theo hệ thống phân loại của Takhtajan (2009)¹⁷⁵, cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) thuộc: Ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) → Lớp Ngọc lan (Magnoliopsida) → Phân lớp Hoa hồng (Rosidae) → Liên bộ Cam (Rutanae) → Bộ Cam (Rutales) → Họ Cam (Rutaceae) → Phân họ Aurantioideae (Citroideae) → Chi *Paramignya* → Loài *Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill

Tên đồng nghĩa: *Atalantia trimera* Oliv, *Severinia trimera* (Oliv.) Swingle

Đặc điểm thực vật: Xáo tam phân là một loài cây gỗ nhỏ⁴. Rễ hình trụ, có nhiều nếp nhăn dọc, mùi thơm. Thân non màu xanh lục, thân già màu xám, tiết diện tròn, có gai. Lá đơn, mọc so le, không có lá kèm⁴. Cụm hoa: Xim hai ngã. Hoa đều, lưỡng tính, hoa mẫu 3. Lá bắc và 2 lá bắc con dạng vảy hình tam giác nhỏ, bề mặt có nhiều lông. Lá đài 3 đều, dính nhau ở dưới tạo thành một ống hình chuông bên trên chia thành 3 răng hình tam giác, mặt ngoài có nhiều lông và một sọc dọc. Tràng hoa 3 đều, rời, hình bầu dục, màu trắng ngà, mặt ngoài có nhiều đốm trong mờ. Bộ nhị: 6 nhị, đều, rời, dính trên 2 vòng, kiểu đảo lưỡng nhị. Chỉ nhị ngắn, đẹp, thuôn dần về phía đỉnh, màu trắng. Bao phấn hình thuôn dài, màu vàng, 2 ô, nứt dọc, hướng trong, dính đáy. Bộ nhụy gồm 3 lá noãn dính nhau thành bầu trên, 3 ô, mỗi ô 1 noãn, dính noãn trung trụ. Bầu hình bầu dục, màu vàng. 1 vòi nhụy hình trụ ngắn, dính ở đỉnh bầu. 1 đầu nhụy chia 3 thùy, màu cam. Đĩa mật ở đáy bầu. Các bộ phận của cây thường có tinh dầu, nhiều nhất ở rễ, có mùi thơm dịu rất đặc trưng.



Hình 1.4. Các bộ phận cây Xáo tam phân, (A) lá, (B) Thân, (C) Rễ

“Nguồn: Nguyễn Đức Nghĩa, 2013”

Phân bố sinh thái: Xáo tam phân đã được tìm thấy ở một số quốc gia ở Châu Á như: Thái Lan, Malaysia, Ấn Độ, Indonesia²³. Theo Phạm Hoàng Hộ (2003) thì Xáo tam phân trước đây được tìm thấy ở núi Lấp Vò, tỉnh Bình Dương². Gần đây loài này được ghi nhận mọc tự nhiên ở Hòn Hèo, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa và một số khu vực khác ở tỉnh Ninh Thuận.

Bộ phận dùng, thu hái, chế biến: Rễ, thân, lá, quả² thu hái vào mùa khô, rửa sạch, thái nhỏ, dùng tươi hay phơi khô, dùng sắc nước uống.

Nhân giống in vitro cây Xáo tam phân: Năm 2017, Trần Trung Hiếu và cộng sự đã tiến hành nhân giống vô tính *in vitro* Xáo tam phân²⁴. Quy trình nhân giống *in vitro* cây Xáo tam phân đã được thiết lập từ các đoạn thân mang chồi bên của cây 1-

3 năm tuổi ngoài vườn ươm. Nghiên cứu đã xây dựng quy trình nhân giống giúp bảo tồn nguồn gen và nhân sinh khối mô sẹo *in vitro* giúp cho việc khảo sát các hợp chất có giá trị y học được thuận lợi hơn.

Thành phần hóa học

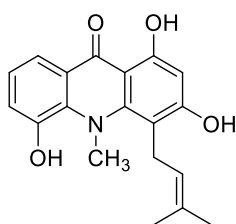
Đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước về thành phần hóa học trong cây Xáo tam phân được công bố^{10, 38, 39, 40}. Các nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào phần rễ của cây Xáo tam phân mọc tự nhiên, cho thấy chứa chủ yếu các nhóm hợp chất như: Acridon alkaloid, coumarin, phenol, dẫn chất của phenol và megastigman glycosid. Ngoài ra, còn có một vài nghiên cứu trên thân⁴¹ và lá^{32,33}.

Acridon alkaloid

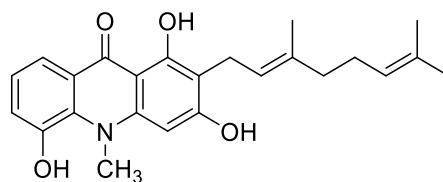
Các acridon alkaloid có trong chi *Paramignya* được báo cáo chủ yếu trong Xáo tam phân. Năm 2016, 2017, 2020, Trịnh Hoàng Dương và cộng sự đã phân lập 3 acridon alkaloid glycocitrin-III, oriciacridon E, 5-hydroxynoracronycin, paramiacridone^{9,13}. Năm 2017, Đặng Hoàng phú và cộng sự đã phân lập 2 acridon paratrimerin C, paratrimerin D¹¹.

Năm 2020, Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự đã phân lập được một acridon alkaloid mới, paratrimerin I từ phân đoạn CHCl_3 của rễ cây Xáo tam phân¹⁵.

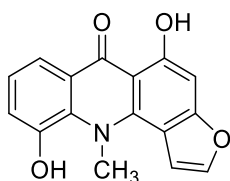
Ngoài ra năm 2017, Nguyễn Trung Nhân và cộng sự phân lập hai alkaloid mới từ chiết xuất hòa tan trong CHCl_3 của thân cây Xáo tam phân, (*E*)-2-(prop-1-enyl)-*N*-metylquinolinium-4-olat và (*R*)-2-ethylhexyl 2*H*-1,2,3-triazol-4-carboxylat⁴¹.



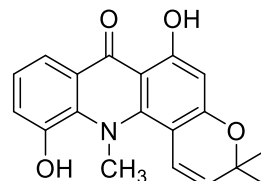
Oriciacridon E



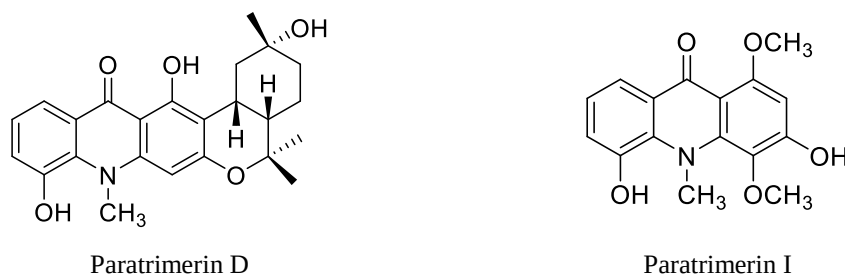
Glycocitrin III



5-Hydroxynoracronycin



Paratrimerin C



Hình 1.5. Acridon alkaloid trong Xáo tam phân

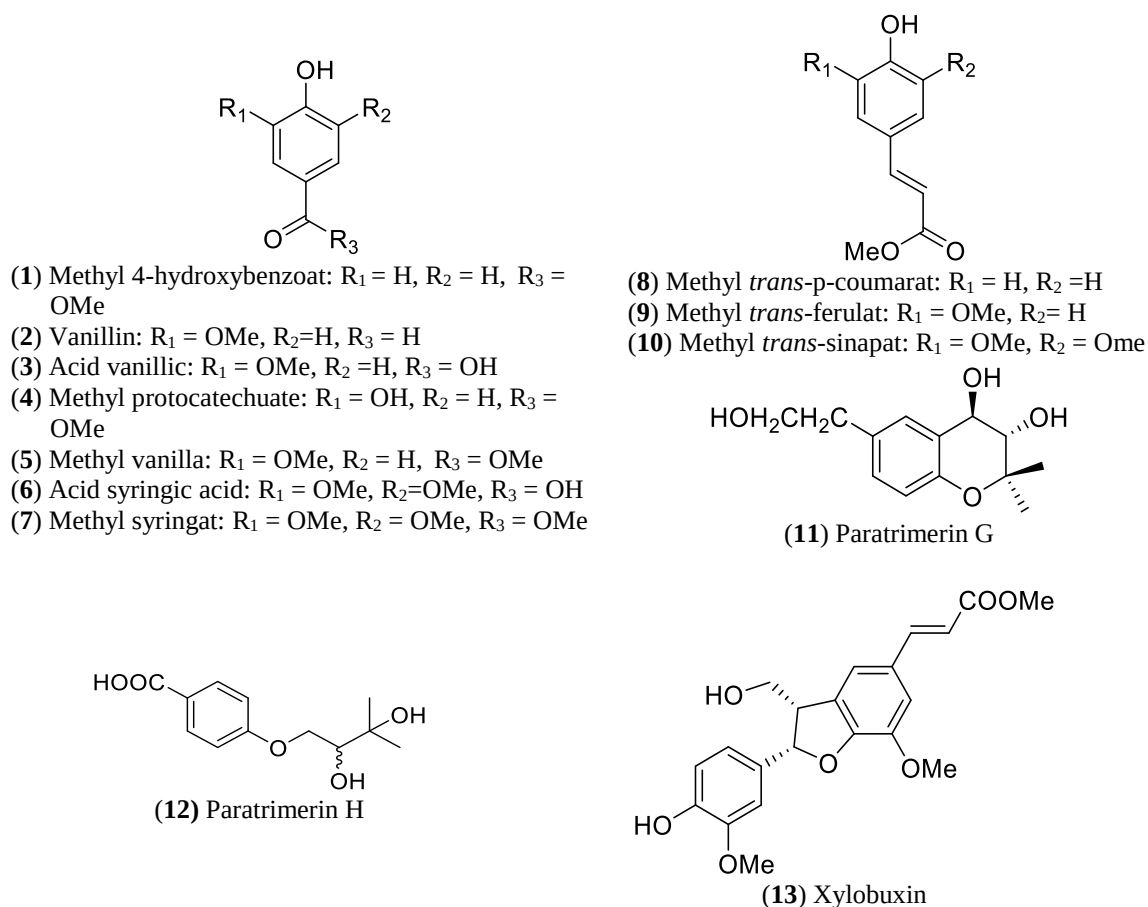
“Nguồn: Trịnh Hoàng Dương, 2016⁹”.

Coumarin

Bài báo trong hóa học thực vật của Xáo tam phân cho thấy hầu hết các coumarin xuất hiện tự nhiên ở dạng tự do, trong khi chỉ có hai hợp chất coumarin glycosid liên kết đơn phân tử có 6–7 được báo cáo. Coumarin dimer Paratrimerin J – Y thu được từ chiết xuất EtOH của thân cây *Paramignya trimera* (Rutaceae) bằng cách sử dụng phân lập có hướng dẫn LC / MS. Ostruthin, Demethylsuberosin, 5-O-methyl anisocoumarin B, 7-hydroxycoumarin, 7-methoxycoumarin Scopoletin, Psoralen, Marmesin, Xanthyletin, 8-methoxyostruthin, Pandanusin A, Luvangetin, Paratrimerin E, Paratrimerin F, Paratrimerin A, B²⁵.

Phenol, dẫn chất của phenol và megastigman glycosid

Năm 2016, Bùi Thị Thuỳ Linh và cộng sự công bố từ cao chloroform của thân Xáo tam phân đã phân lập các hợp chất phenol có cấu trúc đơn giản¹⁰. Bên cạnh đó, acid vanillic và trans-*N*-p-coumaroyl tyramin được phân lập từ cao methanol Xáo tam phân được xác định.



Hình 1.6. Phenol và dẫn chất của phenol trong Xáo tam phân

“Nguồn: Bùi Thị Thuỳ Linh, 2016¹⁰”.

Thành phần trong tinh dầu lá cây

Năm 2018, Đoàn Quốc Tuấn và cộng sự phân tích tinh dầu chưng cất từ lá cây Xáo tam phân *Paramignya trimera* (Oliv.) bằng sắc ký khí kết hợp với khối phổ (GC-MS)³². Các thành phần chính của tinh dầu Xáo tam phân được xác định là β -caryophyllen (10,5 %), β -caryophyllen oxid (9,9 %), 7-epi- α -eudesmol (7,6 %), và γ -muurolen (6,8 %). Ngoài ra, năm 2017 Nguyễn Văn Tăng và cộng sự đã phân lập được 5 hoạt chất chiết xuất từ dịch chiết MeOH của lá Xáo tam phân bao gồm: Acid gallic, acid protocatechuic, acid ellagic, rutin và quercetin³³.

Tác dụng dược lý

Tác dụng độc tế bào

Năm 2013, Nguyễn Minh Khởi và cộng sự công bố khảo sát tác dụng gây độc tế bào ung thư trên 5 dòng tế bào ung thư gồm ung thư gan HepG2, ung thư đại tràng

HTC116, ung thư vú MDA-MB-231, ung thư buồng trứng OVCAR-8 và ung thư cổ tử cung Hela của cao chiết methanol, phân đoạn chiết *n*-hexan và ostruthin. Kết quả cho thấy phân đoạn *n*-hexan thể hiện hoạt tính ở mức độ trung bình (IC_{50} 39,61 μ g/ml) trên dòng tế bào ung thư gan HepG2¹⁷.

Đặc biệt hợp chất ostruthin được phân lập trong phân đoạn *n*-hexan từ rễ Xáo tam phân có tác dụng ức chế tốt viêm gan cấp (gây độc bằng CCl_4) ở thí nghiệm trên chuột nhắt; có tác dụng tiêu diệt đối với năm dòng tế bào ung thư: ung thư gan, ung thư đại tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng và ung thư cổ tử cung¹⁷.

Năm 2018, Nguyễn Thị Huyền Lâm và cộng sự công bố một nghiên cứu về tác dụng chống ung thư từ cao methanol của rễ Xáo tam phân trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 ở người trong mô hình 3D có tác dụng ức chế mạnh sự gia tăng tế bào và gây ra sự chết tế bào của MCF-7³⁶.

Nghiên cứu độc tính cấp tính đối với cao methanol của rễ Xáo tam phân, Nguyễn Minh Khởi và cộng sự đề xuất rằng LD_0 (liều ít nhất không gây chết bất kỳ con vật nào trong thử nghiệm) là nhỏ hơn 329,0 g/kg trọng lượng bằng đường uống và không xác định LD_{50} (liều gây chết trung bình)¹⁷.

Năm 2018, Nguyễn Văn Tăng và cộng sự công bố khả năng gây độc tế bào mạnh của cao rễ Xáo tam phân trên các dòng tế bào ung thư MiaPaCa-2 (tuyến tụy), HT29 (ruột kết), A2780 (buồng trứng), H460 (phổi), A431 (da), Du145 (tuyến tiền liệt), BE2-C (u nguyên bào thần kinh), MCF-7 (vú), MCF-10A (vú bình thường) và U87, SJ-G2, SMA (u nguyên bào thần kinh đệm) được quan sát với giá trị IC_{50} dao động từ 15 đến 32 μ g/ml. Tiềm năng gây độc tế bào trên tế bào ung thư tuyến tụy của cao rễ Xáo tam phân (100-200 μ g / ml) cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với ostruthin (20 μ g/ml) và gemcitabin (50 μ g/ml)³⁷.

Năm 2021, Khong Trong Quan công bố Paratrimerin W thu được từ cao ethanol của thân Xáo tam phân gây độc tế bào ung thư biểu mô tế bào gan Huh7, u sợi HT1080 và tế bào ung thư đại trực tràng HT29 với IC_{50} tương ứng là 14,9, 18,4 và 22,5 μ M³⁹.

Theo Nguyễn Thị Kim Oanh và cộng sự (2022), Pal D và Saha S (2020), hoạt

tính độc tính tế bào ung thư của Xáo tam phân có thể giải thích do thành phần tinh dầu và coumarin có trong dược liệu^{171,172}. Hoạt tính độc tế bào ung thư MCF-7, HepG2, KB, LU-1 và MKN7 in vitro của phân tử nano vàng sử dụng cao nước từ rễ Xáo tam phân làm tác nhân khử và ổn định cũng được Lê Tự Hải và cộng sự (2024) báo cáo với giá trị IC₅₀ lần lượt là 2,01, 7,60, 3,89, 3,99 và 3.53 ppm sau 72 xử lý tế bào¹⁷³.

Tác dụng ức chế α -glucosidase

Năm 2017, Nguyễn Trung Nhân và cộng sự đã công bố từ cao CHCl₃ của thân cây Xáo tam phân đã phân lập được hai alkaloid mới, (*E*)-2-(prop-1-enyl)-*N*-methylquinolinium-4-olat (**1**) và (*R*)-2-ethylhexyl-2*H* -1,2,3-triazol-4-carboxylat (**2**) và hợp chất **2** có hoạt tính ức chế α -glucosidase, với giá trị IC₅₀ là 137,9 μ M³⁸.

Năm 2017, Đặng Hoàng Phú và cộng sự, cao methanol của rễ Xáo tam phân cũng thể hiện hoạt tính ức chế men α -glucosidase đáng kể với giá trị IC₅₀ là 36,6 μ g/ml¹². Năm 2018, Trịnh Hoàng Dương và cộng sự công bố hai hoạt chất được phân lập từ thân Xáo tam phân là paratrimerin G và paratrimerin H có tác dụng ức chế α -glucosidase ở mức độ trung bình với IC₅₀ tương ứng là 89,2 và 58,8 μ M²⁶.

Tác dụng bảo vệ gan

Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự công bố dịch chiết nước Xáo tam phân ở liều uống 10 g/kg cân nặng đã làm giảm nồng độ AST và ALT trong huyết thanh, giảm tổn thương mô bệnh học gan do paracetamol (liều duy nhất 400 mg/kg, cho uống) ở chuột sau 9 ngày điều trị, trong khi cao methanol cho thấy hiệu quả cao tương tự như ở silymarin đối chứng dương liều 50 mg/kg⁴².

Tác dụng kháng viêm

Năm 2017, Lê Hoàng Tuấn Anh và các cộng sự đã báo cáo về tác dụng chống viêm của các thành phần hóa học có trong Xáo tam phân¹⁹. Các hợp chất ostruthin, ninhvanin, 8-geranyl-7-hydroxycoumarin (**3**), 6-(6',7'-dihydroxy-3', 7'-dimethylocta-2'-enyl) -7-hydroxycoumarin và luvangetin ức chế sản xuất NO và PGE2 trong các tế bào BV2 được kích thích bằng LPS, với giá trị IC₅₀ lần lượt từ 9,8 đến 46,8 và từ 9,4 đến 52,8 μ M. Ostruthin và ninhvanin đã được chứng minh là

ngăn chặn sự biểu hiện của protein iNOS và COX-2 do LPS gây ra.

Công dụng

Xáo tam phân được người dân Việt Nam sử dụng trong điều trị nhiều bệnh ung thư và bồi bổ sức khỏe. Theo nhân dân xã Ninh Vân (Khánh Hòa), cành và thân Xáo tam phân dùng chữa viêm gan vàng da, xơ gan cổ trướng, ung thư gan.

Xáo tam phân có vị hơi đắng, hậu vị ngọt, tính bình, mùi thơm dễ chịu, không độc, chưa có nghiên cứu về quy kinh của loài này. Xáo tam phân có thể dùng tươi, khô, sắc lấy thuốc uống, ngâm rượu hoặc tán thành bột mịn.

1.2. Tổng quan khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

Có nhiều phương pháp để khảo sát tác dụng chống oxy hóa *in vitro*. Dựa trên phản ứng hóa học giữa các hợp chất chống oxy hóa và các gốc tự do, các phương pháp khảo sát tác dụng chống oxy hóa *in vitro* được phân loại thành hai loại: Thử nghiệm cho nguyên tử hydro (HAT) và thử nghiệm cho electron (SET)⁴³.

1.2.1. Thử nghiệm cho nguyên tử hydro (HAT)

Các thử nghiệm dựa trên quá trình chuyển trực tiếp nguyên tử hydro từ chất chống oxy hóa sang gốc tự do⁴⁴. $\text{ROO}\cdot + \text{AH}/\text{ArOH} \rightleftharpoons \text{ROOH} + \text{A}\cdot/\text{ArO}\cdot$

Thử nghiệm dựa trên HAT bao gồm: Phương pháp ORAC, phương pháp ABTS, TRAP, hoạt động quét gốc hydroxyl, thử nghiệm phân tích lipid, quét các gốc H_2O_2 ⁴⁵.

Phương pháp ORAC

Phương pháp này đo mức độ phân hủy do bị oxy hóa của fluorescein khi có sự hiện diện của gốc peroxy^{46,47}. Ưu điểm của phương pháp ORAC là xác định được có hoặc không có sự trễ pha trong mẫu chứa các chất chống oxy hóa. Đây là một điều rất thuận lợi khi đo các mẫu thực phẩm chứa cả những hợp chất chống oxy hóa có tốc độ phản ứng khác nhau nhiều⁴⁸.

Phương pháp bắt gốc tự do ABTS

ABTS + [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)] là một gốc tự do bền phát huỳnh quang màu xanh có bước sóng hấp thụ đặc trưng là 734 nm. Khi bổ sung một hợp chất có khả năng kháng oxy hóa, ABTS^+ sẽ bị khử về dạng không

màu dẫn đến độ hấp thụ bước sóng đặc trưng giảm⁴⁹.

Phương pháp TRAP

Phương pháp TRAP sử dụng gốc peroxy được tạo thành từ 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH). Khi cho AAPH vào môi trường plasma, các chất khử sẽ bị oxy hóa. Quá trình oxy hóa này được đo đạt thông qua hàm lượng oxy tiêu thụ bằng một điện cực. Khi có mặt chất chống oxy hóa trong môi trường plasma, quá trình oxy hóa sẽ xảy ra chậm hơn. Giá trị TRAP của mẫu thí nghiệm được tính toán dựa vào độ dài pha loãng của mẫu so với độ dài pha lag của mẫu trắng và độ dài pha lag của chất chuẩn là dung dịch Trolox. Kết quả tính toán là mmol Trolox/kg mẫu rắn hoặc mmol Trolox/L mẫu lỏng^{44,50}.

Phân tích lipid

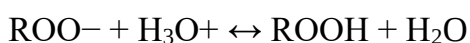
Phương pháp này đánh giá sự khác biệt trong tốc độ oxy hóa acid linoleic bởi gốc ABAP trong mối quan hệ với chất chuẩn là tocopherol⁵¹.

Phương pháp quét các gốc H₂O₂

Các phân tử H₂O₂ sinh ra từ chuyển hoá trong cơ thể với nồng độ vô cùng thấp, dễ dàng bị loại bỏ và không độc hại cho cơ thể. Nhưng nếu hiện diện ở nồng độ cao, chúng có thể tạo ra các gốc tự do có khả năng phản ứng rất cao, dễ dàng phản ứng với các chất hữu cơ tạo ra các peroxid và từ đó tạo ra nhiều sản phẩm độc hại cho tế bào. Hoạt tính chống oxy hoá của mẫu thử được thể hiện qua việc làm giảm lượng H₂O₂ dẫn đến làm giảm màu của phản ứng giữa H₂O₂ và phenol đỏ⁵².

1.2.2. Thử nghiệm cho electron (SET)

Các thử nghiệm dựa trên quá trình chuyển một electron từ chất chống oxy hóa sang gốc tự do⁵³. Các cơ chế hoạt động chống oxy hóa của SET có thể được tóm tắt bằng các phản ứng sau:



Thử nghiệm SET bao gồm: Phương pháp DPPH, phương pháp đánh bắt gốc superoxyd O₂^{•-}, FRAP, TEAC sử dụng ABTS, thử nghiệm CUPRAC, phương pháp

Folin–Ciocalteu, phương pháp ức chế gốc oxit nitric, phương pháp đánh giá bằng hàm lượng MDA, khả năng kết hợp với ion sắt (II)⁵¹.

Phương pháp đánh bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Đây là phương pháp dựa trên việc chuyển điện tử tạo ra một dung dịch màu tím trong methanol. Gốc tự do này ổn định ở nhiệt độ phòng và làm giảm sự hiện diện của phân tử chống oxy hóa. Xét nghiệm DPPH nhanh, đơn giản và là lựa chọn đầu tiên giúp đánh giá tiềm năng chống oxy hóa của các hợp chất⁵⁵.

Thử nghiệm dựa trên phản ứng giữa chất chống oxy hóa với DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) làm DPPH màu tím đậm bị khử thành sản phẩm vàng nhạt⁵⁴. Mức độ giảm OD ở 517 nm phản ánh hoạt tính chống oxy hóa của chất thử. Sharma & Bhat đã trình bày quan điểm về phạm vi độ nhạy của phép đo quang phổ, bên cạnh độ nhạy của DPPH với ánh sáng, pH và độ hòa tan của hợp chất⁵⁶.

Phương pháp đánh bắt gốc superoxyd $O_2^{\bullet-}$

Việc ngăn tạo thành gốc superoxyd giúp đánh giá khả năng loại bỏ các gốc tự do của mẫu thử. Gốc superoxyd được tạo thành trong phản ứng giữa xanthin và xanthin oxydase được định lượng bằng phương pháp khử, dùng nitroblue tetrazolium (NBT) cho phức chất màu tím được đo quang ở bước sóng 550 nm. Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử được thể hiện qua khả năng làm giảm sự hình thành của phức màu tím. Enzym superoxyd dismutase (SOD) được sử dụng như chất đối chiếu dương tính⁵⁷.

Phương pháp FRAP

Nguyên tắc xác định hoạt tính chống oxy hóa của phương pháp này dựa trên khả năng của chất chống oxy hóa trong việc khử phức Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ)] (màu tím) thành phức Fe^{2+} -TPTZ (màu xanh) ở pH thấp⁵⁸. Thử nghiệm FRAP đơn giản, nhanh chóng, tiết kiệm chi phí và không yêu cầu thiết bị chuyên dụng. Tuy nhiên, kết quả FRAP có thể thay đổi tùy theo thời gian phân tích quan sát được đối với phản ứng giữa chất chống oxy hóa và Fe^{3+} , dao động từ vài phút đến vài giờ^{59,60}.

Phương pháp TEAC

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) là phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa so sánh với khả năng chống oxy hóa của Trolox⁶¹. Cation ABTS⁺ [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS)] là một gốc tự do bền, phát quang màu xanh, được đặc trưng ở độ hấp thu 734 nm. Khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS⁺, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS. Đo độ giảm độ hấp thu của dung dịch ở bước sóng 734 nm để xác định hoạt tính của chất chống oxy hóa, so sánh với chất đối chiếu Trolox [acid 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic]. Trong môi trường kali persulfat, gốc ABTS⁺ có thể bền 2 ngày ở nhiệt độ phòng trong tối⁶².

Phương pháp CUPRAC

Phương pháp CUPRAC để xác định tổng khả năng chống oxy hóa đã được phát minh vào đầu những năm 2000, nhưng nó đã được sửa đổi cho các phương pháp khác nhau để đo hoạt tính chống oxy hóa dựa trên quá trình khử Cu²⁺ thành dạng Cu⁺. Neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) là chất thường được sử dụng trong phương pháp CUPRAC nhằm tạo thuận lợi cho phép đo độ hấp thụ⁶³.

Phương pháp Folin–Ciocalteu

Phương pháp Folin–Ciocalteu là một phương pháp nổi tiếng nhằm xác định tổng hàm lượng phenol (TPC). Xét nghiệm Folin-Ciocalteu được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu để đo tổng hàm lượng polyphenol trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật và các mẫu sinh học⁶⁴. Phương pháp này ban đầu được thiết kế để phân tích protein, sau đó trở thành một thử nghiệm thường xuyên để đánh giá chất chống oxy hóa của thực phẩm và chiết xuất thực vật. Đối với một số hợp chất: Epicatechin galate, acid rosmarinic, quercetin, epigallocatechin, catechin, acid caffeic, epicatechin, gallic, rutin và acid chlorogenic khả năng chống oxy hóa tốt nhất đã được ghi nhận bằng phương pháp CUPRAC^{65,66}.

Đánh giá bằng hàm lượng MDA (malonyl dialdehyde) (Phương pháp TBARS)

MDA được sinh ra trong quá trình peroxy hoá lipid. Khi cho phản ứng với acid thiobarbituric, một phân tử MDA phản ứng với 2 phân tử acid thiobarbituric tạo

phức màu hồng hấp thụ cực đại ở bước sóng 532 nm. Phản ứng thường được thực hiện ở môi trường pH 2 - 3, ở nhiệt độ 90-100 °C trong vòng 10 - 15 phút. Đo cường độ màu của phức, tính được hàm lượng MDA có trong mẫu và suy ra khả năng ức chế peroxy hoá lipid⁶⁷.

Khả năng kết hợp với ion sắt (II)

Ion Fe^{2+} dạng tự do xúc tác sinh ra gốc tự do. Đánh giá khả năng phòng ngừa sinh gốc tự do của chất nghiên cứu qua khả năng khóa các ion kim loại chuyển tiếp ở dạng phức sẽ làm mất khả năng xúc tác phản ứng sinh gốc tự do. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc ngăn chặn sự tạo thành phức chất có màu giữa ion Fe^{2+} với thuốc thử Ferrozine (acid 3-[2-pyridyl]-5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-4,4'-disulfonic) được đo ở 562 nm; hay với thuốc thử 2,2'-dipyridyl đo ở 523 nm^{64,68}.

Phương pháp thử hoạt tính ức chế gốc tự do NO

Các dạng oxy hoạt động (ROS) và nitơ hoạt động (RNS) được sinh ra trong quá trình chuyển hóa bình thường của tất cả các sinh vật hiếu khí. Trong điều kiện sinh lý, các chất chống oxy hóa trong cơ thể bảo vệ tế bào và mô chống lại những dạng hoạt động này. Khi ROS/RNS sinh ra nhiều, vượt quá khả năng loại bỏ của các chất chống oxy hóa, các gốc tự do này có thể gây stress oxy/nitro hóa làm tổn thương ADN, protein, lipid, đường... ROS/RNS rất hoạt động và có thời gian bán hủy rất ngắn nên không thể định lượng trực tiếp chúng trong mô hoặc dịch cơ thể. Vì vậy, đo lường thay đổi do oxy/nitro hóa ở ADN, protein, lipid, đường trong mẫu sinh học được hy vọng để phát hiện những chất đánh dấu sinh học tương ứng với những bệnh tật liên quan đến ROS/RNS^{69,70}.

Phản ứng với oxy tạo ra sản phẩm bền vững là nitrit và nitrat, hoạt chất ức chế NO sẽ phản ứng cạnh tranh với oxy, làm giảm sản phẩm nitrit tạo thành trong dung dịch nước và nồng độ nitrit trong dung dịch nước được xác định bằng phương pháp trắc quang sử dụng thuốc thử Greiss (hỗn hợp sulfanilamid và N-1-naphthylethylen diamin dihydrochlorid trong môi trường H_3PO_4). Trong đó, nitrit phản ứng với thuốc thử Greiss tạo hợp chất diazo màu bền vững và có bước sóng hấp thụ cực đại ở 540 nm. Dựa trên sự giảm nồng độ nitrit tạo thành, tính được khả năng chặn gốc

tự do NO của hoạt chất (tính trên % ức chế)⁷¹.

Trong các phương pháp để khảo sát tác dụng chống oxy hóa *in vitro* thì trong luận án này, phương pháp DPPH và phương pháp đánh giá bằng hàm lượng MDA được sử dụng để khảo sát tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của dược liệu Xáo tam phân và các cao phân đoạn với nhiều ưu điểm: Chi phí thấp, dễ thực hiện thí nghiệm, khả năng tái tạo, khả năng ứng dụng ở nhiệt độ phòng cũng như khả năng tự động hóa, phù hợp đối với rất nhiều đối tượng mẫu.

1.3. Mô hình nghiên cứu hoạt tính độc tế bào *in vitro*

Việc xây dựng một mô hình nghiên cứu hoạt tính độc tế bào *in vitro* hợp lý và hiệu quả là một yếu tố cần thiết trong việc phát triển một dược liệu, hoạt chất có khả năng điều trị ung thư, đóng góp vào cơ sở dữ liệu của sự sinh trưởng khối u, cũng như tiến triển của tế bào ung thư trên *in vitro*, thử nghiệm tính hiệu quả của dược liệu, hoạt chất dự đoán có khả năng điều trị ung thư, giảm chi phí sàng lọc đặc hiệu. Khảo sát hoạt tính độc tế bào *in vitro* là một bước cần thiết để cung cấp cơ sở khoa học cho các thí nghiệm *in vivo* sau đó. Các nghiên cứu đã chứng minh mối liên hệ mật thiết giữa thử nghiệm *in vitro* và đáp ứng của mẫu thử trên *in vivo*⁷².

Để sàng lọc nhanh các dược liệu, hoạt chất có tác dụng chống ung thư, phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro* thường được sử dụng. Trong mô hình *in vitro*, các dược liệu, hoạt chất được thử bằng cách ủ trực tiếp với các dòng tế bào ung thư nuôi cấy ở điều kiện đặc biệt và môi trường thích hợp để tạo dạng đơn lớp (2D) hay dạng khối cầu (3D). Phương pháp nuôi cấy 2D là phương pháp cơ bản nhất nhưng có nhiều hạn chế vì không mô phỏng được điều kiện *in vivo* của cơ thể. Còn các tế bào trong mô hình nuôi cấy 3D phát triển trong không gian ba chiều phản ánh đầy đủ các mối quan hệ giữa tế bào với tế bào, tế bào với chất nền ngoại bào và tế bào với môi trường dinh dưỡng như trong cơ thể bình thường. Trong mô hình này, các chỉ số như tỷ lệ tế bào sống/chết, chỉ số IC₅₀, tỷ số tăng/giảm kích thước khối cầu các tế bào ung thư và các ảnh hưởng của chế phẩm lên hình thái tế bào sẽ được đánh giá⁷³.

1.3.1. Các dòng tế bào sử dụng trong khảo sát hoạt tính độc tế bào *in vitro*

Phòng thí nghiệm thường sử dụng các dòng tế bào ung thư người như: Tế bào

ung thư gan (HepG2), tế bào ung thư gan người (HAK1B), tế bào ung thư vú người (MDA-MB-231), tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư biểu mô vú (MCF-7), MCF-7 kháng Tamocifen (MCF-7/TamR), MCF-7 kháng Adriamicin (MCF-7/ADR), ung thư phổi (A549), ung thư buồng trứng (OVCAR-8) trong nghiên cứu *in vitro*.

Trong luận án này đã sử dụng các dòng tế bào: Tế bào ung thư gan (HepG2), tế bào ung thư gan người (HAK1B), tế bào ung thư vú người (MDA-MB-231).

Tế bào ung thư gan người HepG2

Tế bào ung thư gan HepG2 là một dòng tế bào bắt từ bao gồm các tế bào ung thư biểu mô gan ở người, có nguồn gốc từ mô gan của một nam thanh niên da trắng 15 tuổi bị ung thư biểu mô tế bào gan biệt hóa cao. Đây là một trong những dòng tế bào được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu ung thư gan và được phổ biến rộng rãi như một nguồn tài nguyên cho các nhà nghiên cứu sinh học ung thư gan. Các tế bào HepG2 được biết đến với hàm lượng enzyme chuyển hóa thuốc cao và khả năng biệt hóa thành các tế bào giống như tế bào gan, khiến chúng trở thành một công cụ có giá trị để nghiên cứu chức năng gan và chuyển hóa thuốc⁷⁴.

Các tế bào HepG2 có các đặc tính kết dính và phát triển dưới dạng các lớp đơn trong các tập hợp nhỏ. HepG2 có thể được phát triển thành công ở quy mô lớn và được kích thích bằng hormon tăng trưởng của con người. Các tế bào cũng có khả năng tiết ra nhiều protein huyết tương, chẳng hạn như transferrin, fibrinogen, plasminogen và albumin.

Tế bào ung thư gan người HAK1B

Hai dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan riêng biệt ở người (HAK-1A và 1B) được phân lập từ một nốt duy nhất cho thấy cấu trúc ba lớp với một loại mô học khác nhau trong mỗi lớp. Về mặt hình thái, HAK-1A và 1B tương ứng giống với các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan biệt hóa tốt ở lớp ngoài của khối u ban đầu và tương ứng với các tế bào biệt hóa kém ở lớp bên trong. HAK-1B ít khác biệt hơn về mặt hình thái và mạnh hơn về mặt sinh học so với HAK-1A; HAK-1B có thời gian nhân đôi ngắn hơn, khả năng sinh khối u cao hơn và DNA dị bội. HAK-1B sẽ tăng

sinh mạnh hơn và có thể liên quan chặt chẽ đến sự tiến triển của khối u tiếp theo trong ung thư biểu mô tế bào gan⁷⁵.

Tế bào ung thư vú người MDA-MB-231

Dòng tế bào khối u MDA-MB được phân lập từ Bệnh viện M. D. Anderson và Viện Ung thư gồm 19 dòng tế bào MDA-MB từ bệnh nhân, trong đó 16 dòng tế bào MDA-MB thiết lập từ dịch tràn màng phổi (MDA-MB-134/468/469/157/231/436/435S/330/415/175-VII/253/309/431/416/411/390), 2 dòng tế bào từ di căn não (MDA-MB-361, MDA-MB-461) và 1 dòng tế bào ung thư vú (MDA-MB-453). 19 dòng tế bào MDA-MB được chia thành nhiều loại tùy theo tốc độ tăng trưởng và điều kiện tăng trưởng khác nhau⁷⁶. Trong số các dòng tế bào ung thư vú MDA-MB, dòng tế bào MDA-MB-231 có mạng lưới ty thể phân mảnh hơn nhưng không biểu hiện ER α , PR và cả HER's-2^{77,78}. Dòng tế bào MDA-MB-231 có thể được sử dụng làm đại diện cho ung thư vú không biểu hiện ER α , PR, HER's-2, đây là phân nhóm ung thư vú ác tính nhất và có khả năng di căn cao. Do đó, nhiều nhà nghiên cứu sử dụng dòng tế bào MDA-MB-231 để nghiên cứu sự phát triển và xâm lấn của ung thư vú⁷⁹.

1.3.2. Các phương pháp sử dụng trong khảo sát hoạt tính độc tế bào in vitro

Có nhiều phương pháp đánh giá khả năng gây độc tế bào của một chất. Cách đơn giản nhất là quan sát hình dạng, kích thước tế bào dưới kính hiển vi. Tuy nhiên, phương pháp này có độ chính xác kém, phụ thuộc kinh nghiệm của người nghiên cứu.

Do đó, các phương pháp khác đã được phát triển để xác định khả năng gây độc tế bào của hóa chất như phương pháp nhuộm tế bào hoặc quang phổ (đo màu, đo huỳnh quang, phương pháp đo sáng) dựa trên sự thay đổi nồng độ của các phân tử sinh học được tạo ra bằng các phản ứng sinh hóa trong tế bào⁸⁰.

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, ...).

1. Xét nghiệm đo màu: Xét nghiệm giảm tetrazolium (xét nghiệm MTT, xét nghiệm MTS, xét nghiệm XTT, xét nghiệm WST-1), xét nghiệm LDH, xét nghiệm

SRB, xét nghiệm NRU (hấp thu màu đỏ trung tính)

2. Loại trừ thuốc nhuộm: Xét nghiệm trypan blue, erythrosine B.

3. Xét nghiệm huỳnh quang: Xét nghiệm khử resazurin và xét nghiệm đánh dấu khả năng sống của protease (xét nghiệm GF-AFC).

4. Xét nghiệm đo độ sáng: Xét nghiệm ATP và xét nghiệm đo thời gian thực.

1.3.2.1. Xét nghiệm đo màu

Xét nghiệm khử Tetrazolium

Các hợp chất tetrazolium: MTT, MTS, XTT và WST-1 đã được sử dụng để phát hiện các tế bào. Các hợp chất này được chia thành hai loại: MTT tích điện dương và dễ dàng thâm nhập vào các tế bào và các hợp chất như MTS, XTT và WST-1 tích điện âm và không dễ dàng xâm nhập vào tế bào. Loại thứ hai (MTS, XTT, WST-1) thường được dùng với chất nhận điện tử trung gian có thể chuyển điện tử từ tế bào chất hoặc màng sinh chất để tạo điều kiện khử tetrazolium thành formazan có màu⁸⁰.

Xét nghiệm khử tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid): Là xét nghiệm khả năng sống của tế bào đồng nhất đầu tiên được phát triển cho định dạng 96 giếng phù hợp để sàng lọc hoạt tính độc tế bào của các mẫu thí nghiệm⁸¹. Hoạt tính độc tế bào đánh giá qua tỷ lệ sống của tế bào được xác định nhờ hoạt tính enzyme succinat dehydrogenase (SDH) của ty thể chỉ có trong tế bào sống. SDH chuyển muối tetrazolium MTT thành tinh thể formazan tan trong dung môi hữu cơ như isopropanol tạo dung dịch màu tím được đo OD ở 570 nm, sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong mẫu nuôi cấy^{83,84}.

Ưu điểm: Phù hợp với nhiều dòng tế bào, phạm vi đường tuyến tính rộng, từ 200-1000 đến 50.000-100.000 tế bào/giếng. Tương quan tốt với đếm tế bào phóng xạ.

Nhược điểm: MTT không hòa tan được hoàn toàn, sự hiện diện của phenol đỏ, số lượng tế bào lớn và thiếu glucose sẽ cản trở hoạt động của enzyme SDH. Sự giảm của các hoạt chất tham gia vào quá trình chuyển đổi MTT như acid ascorbic, hợp chất chứa sulfhydryl có thể làm thay đổi kết quả⁸⁵.

Xét nghiệm khử tetrazolium MST, XTT, WST-1

Các thuốc thử tetrazolium được phát triển gần đây hơn có thể được khử bằng các tế bào để tạo ra các sản phẩm formazan hòa tan trực tiếp trong môi trường nuôi cấy tế bào. Các hợp chất tetrazolium phù hợp với loại này bao gồm MTS, XTT, WST-1. Các thuốc thử tetrazolium cải tiến loại bỏ bước xử lý chất lỏng trong quy trình xét nghiệm vì không cần thêm thuốc thử thứ hai vào đĩa xét nghiệm để hòa tan kết tủa formazan, do đó làm cho các quy trình thuận tiện hơn. Điện tích âm của các sản phẩm formazan góp phần vào khả năng hòa tan trong môi trường nuôi cấy tế bào được cho là hạn chế tính thấm tế bào của tetrazolium⁸⁰.

Xét nghiệm LDH

Xét nghiệm LDH là một xét nghiệm gây độc tế bào thường được sử dụng trong ngành dược phẩm. Mức tăng hơn 40 U/L trên mức bình thường được quan sát thấy ở ung thư hạch hệ thần kinh trung ương, bệnh bạch cầu và ung thư biểu mô di căn. LDH là dấu ấn sinh học huyết thanh hữu ích để đánh giá khối u ác tính di căn. Các khối u đang phát triển trải qua quá trình sản xuất năng lượng qua trung gian LDH để đáp ứng nhu cầu tăng trưởng tế bào nhanh. Khi mất tính ổn định của màng tế bào do tế bào chết thì sẽ giải phóng LDH vào môi trường nuôi cấy. LDH là enzyme xúc tác quá trình chuyển đổi thuận nghịch của lactate thành pyruvate đồng thời khử NAD + thành NADH (hoặc oxy hóa NADH thành NAD⁺). Mức LDH tỷ lệ thuận với lượng tế bào chết được phát hiện bằng cách thêm muối tetrazolium^{86,87}.

Phương pháp sử dụng sulforhodamin B

Sulforhodamin B (SRB) là một loại thuốc nhuộm nhóm aminoxanthen màu hồng sáng với nhóm sulfonic mang điện tích âm, liên kết tĩnh điện với amino acid mang điện tích dương trong protein của tế bào được cố định bằng acid trichloroacetic (TCA). Định lượng thuốc nhuộm liên kết này bằng phương pháp so màu, màu sắc sẽ phản ánh lượng protein tổng của tế bào. Khi tế bào chết, tổng lượng protein sẽ bị phân hủy, từ đó có thể xác định được tác dụng độc tế bào của chất cần khảo sát^{88,89}.

Xét nghiệm NRU (hấp thu màu đỏ trung tính)

Đỏ trung tính (neutral red) là một cation yếu, khuếch tán dễ dàng qua màng tế bào, tập trung tại lysosom mang điện tích âm. Phương pháp này vận dụng khả năng

kết hợp của tế bào sống và thuốc nhuộm. Đỏ trung tính được hòa tan trong hỗn hợp ethanol và acid acetic băng, tạo thành dung dịch có màu đỏ, đo độ hấp thu OD ở bước sóng 450 nm. Chỉ số OD đo được tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống. Các chất có hoạt tính độc tế bào sẽ làm giảm độ hấp thu của đỏ trung tính⁹⁰.

1.3.2.2. Loại bỏ thuốc nhuộm

Tỷ lệ các tế bào khả thi trong quần thể tế bào có thể được ước tính bằng nhiều phương pháp khác nhau. Một trong những phương pháp đơn giản nhất và được sử dụng rộng rãi là phương pháp loại bỏ thuốc nhuộm. Trong phương pháp này, các tế bào sống loại bỏ thuốc nhuộm, nhưng các tế bào chết không loại bỏ chúng. Mặc dù quy trình nhuộm khá đơn giản, nhưng quy trình thử nghiệm với số lượng lớn mẫu rất khó và tốn thời gian⁹¹.

Phương pháp sử dụng trypan blue

Trypan blue, với công thức phân tử $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$, là thuốc nhuộm thuộc nhóm diazo màu xanh dùng để nhuộm chọn lọc mô hoặc tế bào chết. Với tế bào còn sống, màng tế bào có tính chất thẩm chọn lọc, trypan blue không thể đi qua được, do đó tế bào không bắt màu. Màng tế bào chết không còn chức năng này nữa, trypan blue di chuyển qua màng tế bào dễ dàng, khiến tế bào bị nhuộm màu xanh. Sau đó, đếm số tế bào sống không bị nhuộm xanh bằng buồng đếm^{92,93}.

Xét nghiệm loại trừ thuốc nhuộm Erythrosine B

Erythrosine B, còn được gọi là Red No. 3, chủ yếu được sử dụng làm chất tạo màu thực phẩm. Erythrosine B đã được giới thiệu như một chất nhuộm an toàn sinh học để đếm khả thi tế bào. Nguyên tắc của xét nghiệm loại bỏ thuốc nhuộm này tương tự như nguyên tắc của xét nghiệm loại bỏ thuốc nhuộm trypan blue⁹⁴.

1.3.2.3. Xét nghiệm huỳnh quang

Các xét nghiệm đo huỳnh quang về khả năng sống của tế bào và độc tính tế bào rất dễ thực hiện bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang, máy đo huỳnh quang, đầu đọc vi bản huỳnh quang hoặc máy đo lưu lượng tế bào dòng chảy và kết quả mang lại nhiều lợi thế so với các xét nghiệm loại bỏ thuốc nhuộm và so màu truyền thống. Các xét nghiệm này nhạy hơn các xét nghiệm so màu⁹¹.

Xét nghiệm khử resazurin

Trong kỹ thuật này, resazurin khi được thêm vào các tế bào hoạt động chuyển hóa sẽ được chuyển đổi thành resorufin, một hợp chất huỳnh quang màu hồng. Mức độ resorufin là biểu hiện của khả năng tồn tại của tế bào. Xét nghiệm này rất nhạy và việc định lượng resorufin được thực hiện bằng cách ghi huỳnh quang ở bước sóng 560 nm (kích thích) và 590 nm (phát xạ)⁹⁵.

Xét nghiệm đánh dấu khả năng sống của protease (xét nghiệm GF-AFC)

Protease cũng được sử dụng để xác định tế bào sống. Gần đây, chất nền fluorogenic của protease glycyphenylalanyl-aminofluoroumarin (GF-AFC) được dùng để phát hiện protease trong tế bào sống. Chất nền này xâm nhập vào tế bào sống, đến nơi enzym cytoplasmic aminopeptidase tiến hành loại acid amin Gly và Phe để giải phóng aminofluoroumarin (AFC), tạo tín hiệu huỳnh quang tỷ lệ với số lượng tế bào sống. Khi các tế bào chết đi, hoạt động của protease bị mất đi rất nhanh, do đó hoạt tính này có thể dùng làm chỉ dấu chọn lọc cho tế bào sống⁹⁶.

1.3.2.4. Xét nghiệm đo độ sáng

Xét nghiệm đo độ sáng giúp xác định nhanh chóng và đơn giản sự tăng sinh tế bào và khả năng gây độc tế bào. Các xét nghiệm này có thể được thực hiện ở 96 giếng và 384 giếng phù hợp để sàng lọc hoạt tính độc tế bào của các mẫu thí nghiệm và được phát hiện bằng đầu đọc vi bản đo quang⁹⁷.

Xét nghiệm Adenosine tri phosphate (ATP)

ATP là một xét nghiệm chức năng về khả năng sống/độc tính tế bào nhanh nhất. Khi tế bào trải qua quá trình chết theo chu trình (apoptosis) hoặc hoại tử, người ta thấy rằng mức ATP giảm đáng kể. Chất này được sử dụng như một dấu ấn sinh học cho các hiệu ứng diệt tế bào. Mức độ ATP được định lượng bằng cách sử dụng enzym luciferase, dẫn đến sự phát quang được ghi lại. Có một mối quan hệ tuyến tính giữa cường độ tín hiệu phát quang và nồng độ ATP hoặc số lượng tế bào^{98,99,100}.

Khảo sát thời gian thực

Trong khoảng thời gian gần đây, một cách đo lường tế bào sống mới được phát triển là đo lường tế bào sống trong thời gian thực. Sử dụng một luciferase có nguồn

gốc từ tôm biển và một chất tiền nền. Cả chất tiền nền và luciferase được cho thêm trực tiếp vào môi trường nuôi cấy như thuốc thử. Các tế bào sống có khả năng trao đổi chất làm giảm nồng độ chất tiền nền, tạo thành chất nền khuếch tán trong môi trường nuôi cấy. Chính chất nền này sẽ gắn với luciferase tạo ra một tín hiệu phát quang. Tế bào không có hoạt động trao đổi chất (tế bào chết) sẽ không tạo ra chất nền, do đó không tạo thành tín hiệu phát quang. Tín hiệu phát quang sẽ giảm ngay khi tế bào chết. Nếu có chất độc tế bào, phương pháp này có thể xác định được hoạt tính của chất thông qua sự giảm tín hiệu phát quang. Phương pháp này có thể áp dụng theo cách đo liên tục hoặc đo điểm cuối, tùy thuộc mục đích sử dụng và có thể tái sử dụng các mẫu tế bào thử nghiệm vào phép thử khác. Đây được xem là một điểm tối ưu khi phương pháp khác vẫn chưa thể đáp ứng được⁹⁷.

Trong các phương pháp khảo sát hoạt tính độc tế bào *in vitro* liệt kê trên, luận án thực hiện đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư gan HepG2, HAK1B và tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 của cao chiết Xáo tam phân, các cao phân đoạn và các hợp chất phân lập được trong điều kiện phòng thí nghiệm. Hiệu quả gây độc tế bào ung thư gan và ung thư vú được xác định bằng thử nghiệm khử tetrazolium MTT. Thử nghiệm MTT được sử dụng trong các thử nghiệm ghi nhận độc tính tế bào dễ thực hiện nhất đơn giản, đặc trưng và được sử dụng thường xuyên trong quá trình phát triển phương pháp đánh giá độc tính tế bào mới.

1.4. Đại cương về kỹ thuật Western blot

1.4.1. Định nghĩa

Western blot là kỹ thuật lai giữa protein với protein (kháng nguyên – kháng thể), được sử dụng với mục đích phát hiện và phân tích protein, dựa vào việc phát hiện phức hợp kháng thể đặc hiệu - protein được gắn trên màng. Protein kháng nguyên được phát hiện qua phản ứng tạo màu hoặc phát huỳnh quang.

Kỹ thuật này lần đầu tiên được giới thiệu bởi Towbin năm 1979¹⁰¹. Tuy nhiên đến năm 1981, cái tên “Western blot” mới được chính thức thừa nhận và sử dụng rộng rãi. Kể từ lúc được phát hiện đến nay, kỹ thuật đã không ngừng được phát triển để tối ưu hóa cũng như tăng tính ứng dụng¹⁰².

Phương pháp Western blot có nhiều ưu điểm so với các xét nghiệm hấp thụ miễn dịch khác. Western blot mở rộng ý tưởng về ELISA bằng cách cho phép phân tách hỗn hợp protein theo kích thước, điện tích và hình dạng. Phương pháp cho phép phát hiện một số protein mục tiêu, trái ngược với ELISA chỉ có thể phát hiện một protein. Khi điện di gel của protein phân tách protein thành các dải, có thể xác định kích thước của protein/polypeptide đích và có thể định lượng protein quan tâm bằng cách chạy một chất chuẩn định lượng bên trong song song với các mẫu trong gel.

Nhược điểm của phương pháp Western blot là tốn thời gian và yêu cầu cao về kinh nghiệm của người làm thí nghiệm. Ngoài ra, phương pháp yêu cầu tối ưu hóa các điều kiện thí nghiệm (phân lập protein, bộ đệm, loại phân tách, nồng độ gel,...).

1.4.2. Các bước tiến hành

Western Blot bắt đầu bằng chuẩn bị mẫu protein và kết thúc bằng phát hiện một loại protein quan tâm cụ thể. Các bước tiến hành Western Blot bao gồm chuẩn bị mẫu, điện di trên gel (SDS-PAGE), chuyển protein, block màng trước khi ủ kháng thể, ủ với kháng thể sơ cấp và thứ cấp, phát hiện protein mục tiêu và phân tích kết quả¹⁰³.

Lưu ý khi tiến hành: Western blot là một công cụ thiết yếu trong nghiên cứu sinh lý học, tuy nhiên với sự hiểu biết và triển khai kém, các phân tích tiếp theo cũng có thể tạo ra cách giải thích sai lệch và khó hiểu. Trước khi mẫu được nạp vào gel, phải chú ý bộ đệm thích hợp để đồng nhất hóa và chiết xuất protein mục tiêu dự định để biến tính. Thành phần gel sẽ phân tách hiệu quả các protein theo kích thước, với những thay đổi về nồng độ mang lại độ phân giải cho mục tiêu dự định bằng cách thay đổi tốc độ di chuyển. Việc định lượng và phân tích cường độ dải phải được đánh giá nhất quán xuyên suốt với tất cả tín hiệu đơn và đa, vì làm như vậy có thể tạo ra dữ liệu chính xác và đáng tin cậy¹⁰⁴.

1.4.3. Ứng dụng

Western blot có thể được dùng để xác định sự có mặt của protein, xác định trọng lượng phân tử của protein hoặc để xác định sự thay đổi của lượng protein do sự thay đổi mức độ biểu hiện gen. Kỹ thuật được sử dụng trong sinh học phân tử, miễn dịch

di truyền học và một số ngành khác¹⁰².

1.5. Đại cương về protein KDM2A

Thông tin di truyền của một tế bào nhân chuẩn được lưu trữ trong nhân dưới dạng chất nhiễm sắc. Nhiễm sắc thể là đơn vị cơ bản của chất nhiễm sắc trong đó 147 bp DNA được quấn quanh một octamer histone¹⁰⁵. Những thay đổi biểu sinh của histone trong nucleosom như methyl hóa và acetyl hóa... tác động lớn đến sự biểu hiện của các gen liên quan¹⁰⁶. KDM2A là một demethylase histone nhắm vào H3K36me2 nhưng hoạt động hạn chế trên H3K36me và H3K36me3. KDM2A thuộc họ KDM2¹⁰⁷. Tsukada và cộng sự đã phát hiện ra histone demethylase đầu tiên chứa miền JmjC bằng phương pháp sinh học và hóa học. Họ KDM2 trong bộ gen người bao gồm hai gen, KDM2A và KDM2B. Gen KDM2A nằm trong 11q13.2, còn được gọi là FBXL11/JHDM1A/FBL7/CXXC8/FBL11/LILINA. Protein mã hóa thuộc họ protein hộp F, được đặc trưng bởi hộp F chứa 40 trình tự acid amin, cấu thành một trong bốn tiểu đơn vị của phức hợp ligase ubiquitin-protein¹⁰⁸.

KDM2A nằm trong nhân và liên kết với DNA CpG không được methyl hóa thông qua miền ZF-CxxC và được biểu hiện rộng rãi trong các mô khác nhau, với mức độ biểu hiện cao trong não, tinh hoàn, buồng trứng và phôi^{109,110}.

KDM2A loại bỏ tế bào trứng đặc hiệu dẫn đến tình trạng vô sinh ở nữ giới, cho thấy vai trò quan trọng của KDM2A trong việc biến đổi biểu sinh và phát triển nang trứng và tế bào trứng¹¹¹. KDM2A đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì các tế bào gốc phôi đồng thời điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến tế bào mầm¹¹². KDM2A biểu hiện bất thường ở các khối u khác nhau và đóng một vai trò quan trọng trong sự hình thành và tiến triển của khối u¹¹³. Biểu hiện cao của KDM2A đã được quan sát thấy ở nhiều loại ung thư, bao gồm ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, u nguyên bào thần kinh đệm và ung thư cổ tử cung, trong đó nó thúc đẩy sự tăng sinh và các kiểu hình ác tính khác của các tế bào ung thư này¹¹⁴. Sự can thiệp vào biểu hiện KDM2A trong các tế bào HT29 làm tăng sự hình thành khuẩn lạc trong môi trường thạch mềm¹¹⁵. Trong các loại khối u, KDM2A có tác dụng gây ung thư hoặc chống ung thư khác nhau, có

thể liên quan đến tính không đồng nhất giữa các khối u hoặc sự mở rộng của các gen mục tiêu ở KDM2A và các vị trí khử methyl. Ngoài ra, nhiều dạng ghép nối của KDM2A đóng vai trò khác nhau trong quá trình hình thành khối u và sự tiến triển của các loại ung thư khác nhau¹¹⁶. Wagner và cộng sự đã chứng minh rằng KDM2A liên kết với vùng khởi động gen phosphatase 3 (DUSP3) đặc hiệu kép và ức chế sự biểu hiện của nó, do đó làm tăng quá trình phosphoryl hóa ERK1 / 2 và thúc đẩy sự xuất hiện và di căn của ung thư phổi không phải tế bào nhỏ¹¹⁷. Một nghiên cứu khác đã báo cáo histone H3 lysine 36 (H3K36) demethylase KDM2A (còn được gọi là FBXL11 và JHDM1A) là cần thiết cho khả năng gây khối u và di căn của các tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC) biểu hiện quá mức KDM2A với HDAC3 là gen mục tiêu¹¹⁸.

Trong bệnh ung thư vú, các nghiên cứu đã báo cáo rằng KDM2A liên kết với vùng khởi động của các gen, chẳng hạn như E2F1, ức chế sự điều hòa phiên mã của nó và dẫn đến sự xâm lấn và di căn của các tế bào ung thư vú^{119,120}. Mức độ biểu hiện cao của KDM2A tăng cường nguyên bào sợi liên quan đến ung thư¹²¹ và biểu hiện kết hợp của KDM2A và KDM2B có thể liên quan đến tiên lượng lâm sàng ở bệnh nhân ung thư vú¹²². Trong các mô ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) biểu hiện KDM2A được điều chỉnh đáng kể so với các mô bình thường lân cận. Ngoài ra, biểu hiện KDM2A cao có liên quan đến tiên lượng xấu và tỷ lệ sống thêm ở bệnh nhân HCC¹²³. KDM2A tăng cường các đặc điểm giống tế bào gốc thông qua quá trình khử methyl của histone H3K36 tại các chất xúc tiến của các yếu tố phiên mã liên quan đến tính thân, chẳng hạn như OCT4, NANOG và SOX2¹²³.

Luận án đã sử dụng kỹ thuật Western blot khảo sát mức độ biểu hiện protein KDM2A và xác định vai trò của protein KDM2A trong tác động ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư vú MDA-MB-231 và ung thư gan HAK1B.

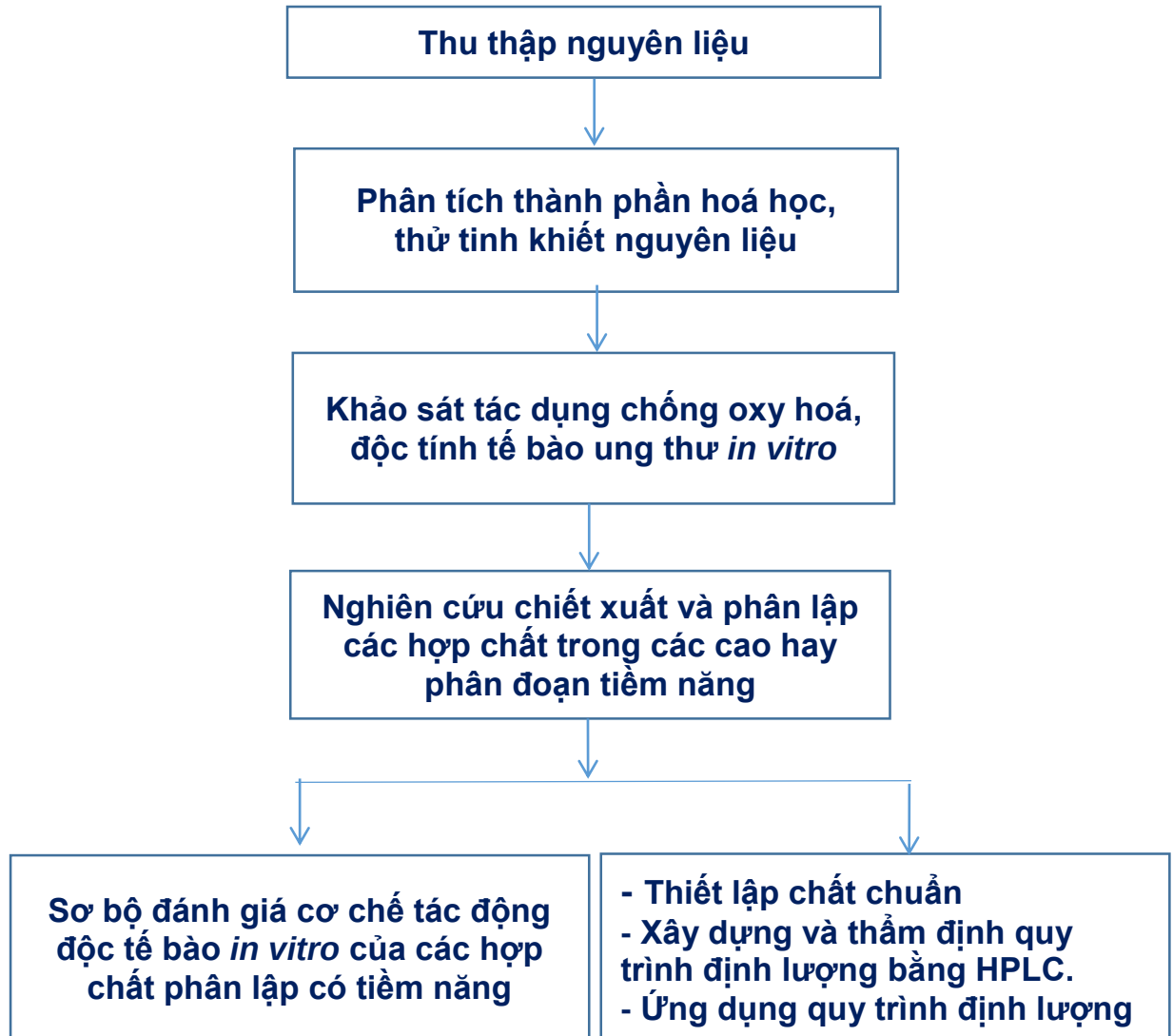
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU

- Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm.
- Nghiên cứu được thiết kế phù hợp theo trình tự mục tiêu nghiên cứu.
- Nghiên cứu khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro*: Bột dược liệu được chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với ethanol 96 % theo tỷ lệ 1:10 (dược liệu : dung môi); thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để được cao toàn phần. Thử nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* đối với mẫu cao toàn phần rễ, thân, lá Xáo tam phân.
- Từ kết quả khảo sát, chọn bộ phận dược liệu có hoạt tính sinh học tiềm năng dùng để nghiên cứu chiết xuất phân đoạn. Hòa cao toàn phần bộ phận dược liệu đã khảo sát ở trên trong cồn 25 % theo tỷ lệ 1:5 và lắc phân bố lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, theo nguyên tắc ở mỗi phân đoạn phải được chiết kiệt (cho đến khi không còn chất chiết). Thu hồi dung môi dưới áp suất để thu được các cao phân đoạn *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, nước (phần còn lại không tan trong 3 dung môi trên). Thử nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* đối với mẫu cao phân đoạn.
- Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong những cao phân đoạn tiềm năng.
- Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập.
- Nghiên cứu đánh giá hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của các chất tinh khiết có tiềm năng và trữ lượng lớn.
- Thiết lập chất đối chiếu, xây dựng và đánh giá quy trình định lượng các hợp chất phân lập tiềm năng bằng phương pháp HPLC. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu rễ Xáo tam phân trên thị trường bằng phương pháp HPLC.

2.2. QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU

Nội dung nghiên cứu của đề tài được tóm tắt như sau:



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ trình tự các nội dung nghiên cứu

2.3. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Xáo tam phân (rễ, thân, lá) được thu hái và thu mua vào các thời điểm khác nhau, phục vụ cho từng mục đích nghiên cứu, chi tiết xem ở **Bảng 2.1**. Nguyên liệu sau khi thu hái được cắt nhỏ, phơi dưới bóng râm, sấy khô rồi xay bột qua rây, đóng gói dán nhãn trước nghiên cứu. Mẫu nguyên liệu được lưu tại Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh (XTP 01-2013/KD-DHYD và XTP 02-2017/KD-DHYD).

2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thời gian nghiên cứu từ 8/2014 đến 8/2022 tại:

- Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp. HCM: Bộ môn Dược liệu, Bộ môn Hóa phân tích – Kiểm nghiệm, Bộ môn Dược lý.
- Khoa Y học cổ truyền: Bộ môn Dược học cổ truyền.
- Khoa Y - ĐH QG TP HCM: Bộ môn Dược liệu - Thực vật.
- Department of Molecular Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, Takasaki, Japan.

2.5. CỖ MẪU

Mẫu thu hái ở môi trường tự nhiên có đầy đủ các bộ phận sinh trưởng (rễ, thân, lá). Số lượng mẫu, khối lượng mẫu được thu hái và thu mua vào các thời điểm khác nhau, phục vụ cho từng mục đích nghiên cứu, chi tiết xem ở **Bảng 2.1**.

Bảng 2.1. Các nguyên liệu dùng trong nghiên cứu

Nguyên liệu	Thời gian thu mẫu
1. Chiết xuất – phân lập – khảo sát tác dụng sinh học: Rễ (4.5 kg), thân (5.3 kg), lá (2 kg) Xáo tam phân được thu hái ở đảo Hòn Lớn, vịnh Vân Phong, xã Vạn Thạnh, huyện Vạn Ninh, tỉnh Khánh Hòa	3/2013
2. Kiểm nghiệm (Xây dựng quy trình định lượng) Rễ Xáo tam phân (2,0 kg) được thu hái tại cơ sở trồng dược liệu Quang Minh, Đồng Nai	3/2017
3. Định lượng các mẫu dược liệu Rễ Xáo tam phân thu mua trên thị trường (100 g cho mỗi mẫu): M1: Thu hái tại cơ sở trồng dược liệu Quang Minh, Đồng Nai M2: Mua tại Nguyễn Thị Minh Khai, P.1, Đà Lạt, Lâm Đồng M3: Mua tại Vũ Tùng, P. 1, Bình Thạnh, Tp. Hồ Chí Minh M4: Mua tại ấp 5, xã Thạnh Phú, Vĩnh Cửu, Đồng Nai M5: Mua tại Hải Thượng Lãn Ông P.10, Q.5, Tp. HCM M6: Mua tại Phú Riềng Đỏ, Tân Xuân, Đồng Xoài, Bình Phước M7: Mua tại Cách Mạng Tháng Tám, Ninh Thạnh, Tây Ninh M8: Mua tại Lê Hoàng Phái, P. 17, Gò Vấp, Tp. HCM M9: Mua tại Hải Thượng Lãn Ông, P. 10, Quận 5, Tp. HCM M10: Mua tại Triệu Quang Phục, P. 10, Quận 5, Tp. HCM	8/2022

2.6. XÁC ĐỊNH CÁC BIẾN SỐ

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*: Kết quả được xử lý bằng Microsoft Excel, trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD) của 3 lần thực hiện. Tính hoạt tính chống oxy hóa. Thông qua phương trình hồi quy lập được, xác định EC₅₀ (nồng độ có HCTO bằng 50%) của mẫu thử.

Khảo sát hoạt tính độc tế bào *in vitro*: Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean $\pm$ SEM), sau đó phân tích thống kê bằng phép kiểm Mann-Whitney trên phần mềm SPSS 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Xác định cấu trúc chất phân lập được bằng các hằng số vật lý, phản ứng hóa học, phổ UV, IR, MS, phổ NMR 1 chiều và 2 chiều.

Xây dựng và đánh giá quy trình định lượng hoạt chất bằng phương pháp HPLC. Xác định hàm lượng hoạt chất có tác dụng trong Xáo tam phân. Kết quả được ghi nhận theo hàm lượng phần trăm hoạt chất trong 100 g bột dược liệu khô.

2.7. DUNG MÔI - HÓA CHẤT - TRANG THIẾT BỊ

2.7.1. Dung môi - hóa chất

Nghiên cứu hóa học

Dung môi dùng trong chiết xuất và phân lập: Ethanol, methanol, cloroform, ethyl acetat, *n*-hexan (Trung Quốc hoặc Việt Nam) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích. Dung môi phân tích HPLC: Acetonitril, methanol (Merck, Đức) nước cất 2 lần. Bản mỏng silica gel F₂₅₄ (dày 0,25 mm, Merck) tráng sẵn. Silica gel 60 (40 - 63 μ m, Merck). Thuốc thử FeCl₃ 5%/EtOH, vanilin 1%/acid sulfuric 10% (VS), Na₂CO₃ 10%, thuốc thử Folin-Ciocalteu, pyrogallol (Sigma-Aldrich), NaOH 20%, (CH₃COO)₂Pb 1%.

Nghiên cứu tác dụng sinh học

Thử nghiệm DPPH: Thuốc thử DPPH (Sigma), methanol (Labscan), DMSO (Merck). Thử nghiệm MDA: KCl 1,15%; đệm phosphat 50 mM, đệm phosphat pH 6,6; trichloroacetic (TCA) 10%; acid thiobarbituric (TBA) 0,8%, kali ferricyanid.

Chất đối chiếu: Acid ascorbic (Vitamin C) (Viện Kiểm Nghiệm TPHCM) hàm

lượng 99,17%, Silymarin (Sigma), Quercetin (hàm lượng > 99%) của Sigma – Aldrich. Doxorubicin, Paclitaxel (hàm lượng > 99%) mua từ công ty Ebewe Pharma (Úc). Sorafenib (hàm lượng > 99%) được cung cấp bởi Bayer HealthCare Pharmaceuticals, USA.

Dòng tế bào thử nghiệm: Dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231, dòng tế bào ung thư gan người HepG2 được cung cấp từ ATCC (American Type Culture Collection, Mỹ), hoạt hóa và lưu tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. Dòng tế bào vú người MDA-MB-231 và dòng tế bào ung thư gan người HAK1B được mua từ ATCC, hoạt hóa và lưu tại Bộ môn Dược phân tử, Khoa Dược, Trường Đại học Sức Khỏe và Phúc Lợi Takasaki (Takasaki University of Health and Welfare), Thành phố Takasaki, Nhật Bản.

Môi trường nuôi cấy tế bào: Môi trường EMEM, bổ sung 10% FCS, 2 mM L-glutamin, 100 IU/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin. Môi trường DMEM, bổ sung 10% FCS, 100 IU/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, ủ ở 37 °C, 5% CO₂. Huyết thanh bào thai bê (FCS), L-glutamin, penicilin-streptomycin, Trypsin-EDTA, đệm phosphate (PBS) mua từ công ty Gibco (Hoa Kỳ); trypan blue, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) (MTT) mua từ công ty Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

2.7.2. Trang thiết bị

Các thiết bị dùng trong chiết xuất - phân lập: Máy cô quay Büchi 20 L - R220 và Büchi 1 L - 210S; bể siêu âm Sonorex RK-1028H; bếp cách thủy Memmert WB-14. Máy đo khối phổ (Micromass Quattro microTM API-Waters). Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) BRUKER-AV-500, tại Viện hóa học thuộc Trung tâm Khoa học công nghệ Việt Nam – Hà Nội. Cột sắc ký: Cột cổ điển (6 × 80 cm), cột chân không, cột cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4,6 × 250 mm, 5 µm.

Các thiết bị dùng trong phân tích: Cân phân tích 5 số lẻ CP-2250 (Sartorius); Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Alliance 2695 XE (Waters), đầu dò PDA 2996 (Waters). Hệ thống HPLC LC-2030C 3D, đầu dò PDA (Shimadzu, Nhật Bản).

Các thiết bị dùng trong thử nghiệm sinh học: Máy đo phổ UV U-2010 (Shimadzu), máy đo pH (HI210-Hana), máy khuấy gia nhiệt (Arec-Velp), máy nghiền đồng thể (T25 Basic-IKA), máy đọc ELISA quang phổ Powerwave HT (BioTek, Mỹ), máy đọc microplate Sunrise™ (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ), hệ thống máy ChemiDoc XRS+ của hãng Bio-Rad và phân tích dữ liệu bằng chương trình Quantity One.

2.8. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.8.1. Phân tích thành phần hoá học, thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu

2.8.1.1. Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật

Áp dụng quy trình phân tích thành phần hóa thực vật từ quy trình phân tích của Ciulei (Trường đại học dược khoa Rumani có cải tiến của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh)¹⁶¹. Thực hiện trên 20 g dược liệu, chiết hỗn hợp các chất trong dược liệu thành 3 phân đoạn theo độ phân cực tăng dần, thu được 50 ml dịch chiết ether ethylic, 50 ml dịch chiết ethanol, 50 ml dịch chiết nước rồi dùng các phản ứng hóa học đặc trưng để phát hiện các nhóm hợp chất.

2.8.1.2. Thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết

Độ ẩm, độ tro và hàm lượng chất chiết được tiến hành theo Phụ lục 9.6, 9.7, 9.8 trong Dược điển Việt Nam V¹²⁴. Kết quả được tiến hành 3 lần và lấy giá trị trung bình.

2.8.1.3. Định tính polyphenol

Theo Bowyer và cộng sự (2015), các polyphenol có mặt trong Xáo tam phân đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến tác dụng kháng ung thư của dược liệu này¹²⁵. Do đó, đề tài tiến hành định tính polyphenol trong các cao chiết còn từ rễ, thân, lá Xáo tam phân. Cân 5 g bột dược liệu cho vào bình nón, thêm 50 ml ethanol 50%, lắc đều, đun hồi lưu cách thủy khoảng 2 giờ. Lọc, thu dịch lọc để thực hiện các phản ứng.

Phản ứng với FeCl_3 2 %: 2 ml dung dịch thử pha loãng, thêm vài giọt FeCl_3 2%.

Phản ứng NaOH 20 %: 2 ml dung dịch thử, thêm vài giọt NaOH 20%.

Phản ứng với $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$: 2 ml dung dịch thử, vài giọt $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 1%.

2.8.1.4. Định lượng polyphenol

Định lượng polyphenol toàn phần bằng phương pháp Folin - Ciocalteu, dựa trên sự khử của tungstat/molybdat trong thuốc thử Folin - Ciocalteu bởi hợp chất phenol trong môi trường kiềm tạo sản phẩm màu xanh dương⁶⁴. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao chiết được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn được dựng bởi đồ thị thể hiện sự liên quan giữa OD và nồng độ chất chuẩn pyrogallol.

Chuẩn bị cao chiết: 100 g bột nguyên liệu (rễ, thân, lá) xay nhỏ thành bột, sàng qua rây có đường kính lỗ rây 0,5 mm - 0,8 mm, chiết ngấm kiệt với ethanol 96%, mỗi lần chiết với một lượng dung môi vừa đủ, rồi lọc qua giấy lọc cho đến khi dịch lọc không đổi màu khi phản ứng với FeCl_3 , tổng lượng dung môi chiết mỗi mẫu thu được khoảng 2 L. Dịch chiết được bốc hơi dung môi trên bếp cách thủy ở 50 °C thu cao, hút ẩm đến khối lượng không đổi.

Tính hiệu suất chiết H theo công thức: $H (\%) = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$, trong đó, m_1 và m_2 lần lượt là khối lượng (g) của dược liệu khô và cao thu được sau khi chiết.

Chuẩn bị dung dịch thử: Hòa tan mỗi cao rễ, thân, lá Xáo tam phân trong ethanol 70 % đến nồng độ 50 µg/ml sau đó lọc qua giấy lọc.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg pyrogallol chuẩn vào bình định mức 100 ml, thêm ethanol 70% để hòa tan và vừa đủ đến vạch. Lấy chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm ethanol 70% vừa đủ, lắc đều (dung dịch chuẩn có nồng độ pyrogallol 50 µg/ml).

Tiến hành

- Xây dựng đường chuẩn: Lấy chính xác lần lượt 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dung dịch chuẩn vào các bình định mức 25 ml riêng biệt, thêm lần lượt 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml ethanol 70% vào mỗi bình tương ứng. Sau đó thêm vào mỗi bình 1 ml thuốc thử Folin - Ciocalteu và 7 ml nước. Thêm dung dịch Na_2CO_3 29% đến vạch, lắc đều. Ly tâm 5000 rpm trong 5 phút để lắng các tinh thể Na_2CO_3 . Hút 200 µl dịch trong các dung dịch cho vào giếng trên đĩa ELISA 96 giếng. Đo OD của các dung dịch ở 760 nm trên máy đọc ELISA quang phổ Powerwave HT (BioTek, Mỹ).

Chuẩn bị song song 1 mẫu trắng gồm thuốc thử Folin – Ciocalteu, Na_2CO_3 29% và nước cất.

- Lấy chính xác 5 ml dịch thử vào bình định mức 25 ml, 1 ml thuốc thử, 7 ml nước, thêm dung dịch Na_2CO_3 29% đến vạch, lắc đều. Ly tâm 5000 rpm trong 5 phút, tốc độ để lắng các tinh thể Na_2CO_3 . Lấy 200 μl dịch trong các dung dịch cho vào giếng trên đĩa ELISA 96 giếng. Đo OD của dung dịch ở 760 nm trên máy đọc ELISA quang phổ Powerwave HT (BioTek, Hoa kỳ). Tiến hành 3 lần và lấy kết quả trung bình.

Kết quả được thể hiện bằng đơn vị mg pyrogallol/g dược liệu. Hàm lượng polyphenol trong dược liệu được tính bằng công thức: $P = a \times V/m \times N \times H$

Trong đó: P: Hàm lượng polyphenol tổng (mg pyrogallol/g); a: Nồng độ xác định từ đường chuẩn với pyrogallol ($\mu\text{g/ml}$); V: Thể tích dung dịch đo (ml); m: khối lượng cao chiết (g), N: Độ ẩm của dược liệu (%), H: Hiệu suất chiết (%).

2.8.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tính tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và cao phân đoạn

2.8.2.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần

Chuẩn bị cao toàn phần: Bột Xáo tam phân (rễ, thân, lá: 1,0 kg cho mỗi bộ phận dùng) được chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với ethanol 96% theo tỷ lệ 1:10 (dược liệu : dung môi); thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để được cao toàn phần.

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH

Nguyên tắc: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là một gốc tự do có bước sóng cực đại $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$ và có màu tím. Các chất chống oxy hóa sẽ trung hòa gốc tự do DPPH bằng cách cho hydro, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch chuyển từ tím sang vàng.

Cách tiến hành: Theo thử nghiệm được mô tả bởi Kulisic và cộng sự (2004)¹⁵⁹.

Chuẩn bị dung dịch đối chứng

Dung dịch đối chứng vitamin C được pha ở nồng độ 5 mg/ml (5000 µg/ml) trong methanol, sau đó pha loãng 10 lần để được nồng độ 500 µg/ml. Sau đó pha loãng vitamin C từ nồng độ 500 µg/ml để có được dung dịch vitamin C nồng độ là 10, 20, 40, 60, 80 µg/ml, các nồng độ đạt được trong phản ứng là 1, 2, 4, 6, 8 µg/ml.

Dung dịch đối chứng quercetin các nồng độ đạt được trong phản ứng là 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µg/ml.

Chuẩn bị thuốc thử DPPH

Pha thuốc thử DPPH 0,2 mM/MeOH, pha xong dùng ngay, đựng trong chai thủy tinh màu.

Chuẩn bị mẫu thử

Nồng độ khảo sát của mẫu thử: Pha loãng mẫu thử với nhiều nồng độ khác nhau.

Tiến hành

Dùng 2 ml DPPH (nồng độ 0,2 mM trong methanol) cho vào 2 ml dung dịch mẫu thử có nồng độ khác nhau trong methanol. Hỗn hợp được lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Tiến hành đồng thời với mẫu trắng (dung môi hòa tan mẫu thử + MeOH), mẫu chứng (dung môi hòa tan mẫu thử + DPPH trong MeOH) trên cùng một đĩa 96 giếng. Đo OD sau 30 phút ở bước sóng 517 nm.

Tiến hành 3 lần, lấy giá trị trung bình. Tính hoạt tính chống oxy hóa (HTCO):

$$\text{HTCO (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}}{\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{trắng}}} \times 100$$

Trong đó: OD_{chứng}: Độ hấp thụ của mẫu chứng, OD_{thử}: Độ hấp thụ của mẫu thử. Thông qua phương trình hồi quy lập được, xác định EC₅₀ (nồng độ có HTCO bằng 50%) của mẫu thử.

Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư in vitro

Nguyên tắc: Hoạt tính độc tế bào đánh giá qua tỷ lệ sống của tế bào được xác định nhờ hoạt tính enzym succinat dehydrogenase (SDH) của ty thể chỉ có trong tế bào sống. SDH chuyển muối tetrazolium MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)] thành tinh thể formazan tan trong dung môi hữu cơ

như isopropanol tạo dung dịch màu tím được đo OD ở 570 nm, sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong mẫu nuôi cấy¹⁶⁰.

Chuẩn bị mẫu thử: Mẫu thử được chuẩn bị trong dimethyl sulfoxid (DMSO) ở nồng độ 50 mg/ml, bảo quản ở -20 °C, rã đông và pha loãng trong môi trường nuôi cấy để đạt các nồng độ khảo sát (100; 50; 25; 12,5 µg/ml) trước khi xử lý tế bào.

Dung dịch MTT 5 mg/ml: Pha MTT trong nước khử khoáng, vortex đều. Lọc qua màng lọc 0,22 µm, bảo quản ở -20 °C.

Dung dịch isopropanol acid hóa: Cho 1 µl HCl đậm đặc vào 1 ml isopropanol.

Nuôi cấy tế bào: Tế bào (MDA-MB-231, HepG2) được nuôi cấy trong môi trường EMEM, bổ sung 10% FCS, 2 mM L-glutamin, 100 IU/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin sử dụng bình nuôi cấy 75 cm², ủ ở 37 °C, 5% CO₂. Sau đó, các tế bào được trypsin hóa, thu nhận và đếm số tế bào sống bằng xanh trypan và được chuyển vào các đĩa 96 giếng ở nồng độ 104 tế bào/ giếng. Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, 5% CO₂, xử lý tế bào với mẫu thử ở các nồng độ khác nhau hoặc mẫu đối chiếu paclitaxel 0,43 µg/ml (0,5 µM), doxorubicin 10 µg/ml trong 72 giờ. DMSO ở các nồng độ khác nhau tương ứng với nồng độ các mẫu thử được dùng như mẫu trắng. Loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung 100 µl môi trường nuôi cấy không có huyết thanh chứa MTT (0,05 mg/ml) vào mỗi giếng. Ủ 3 giờ ở 37 °C, 5% CO₂. Loại bỏ môi trường chứa MTT. Hòa tan tinh thể formazan tạo thành trong 100 µl isopropanol acid hóa. Lắc rung 5 phút ở nhiệt độ phòng. Đo OD ở 570 nm trên máy đọc ELISA quang phổ Powerwave HT (BioTek, Hoa kỳ). Thí nghiệm được lặp lại 3 giếng cho mỗi nồng độ mẫu thử.

Tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào được tính bằng công thức:

$$\% \text{ ức chế tăng trưởng tế bào} = 100 - \left(\frac{OD_{\text{thử}}}{OD_{\text{chứng}}} \times 100 \right)$$

Trong đó: OD_{chứng}: Độ hấp thu của mẫu chứng, OD_{thử}: Độ hấp thu của mẫu thử

Mẫu thử được chuẩn bị trong DMSO, vì vậy mẫu chứng tiến hành đồng thời trong đó tế bào được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO với nồng độ tương đương trong mẫu thử. Các mẫu có nồng độ DMSO cuối cùng trong môi trường <

0,05% sử dụng mẫu chứng nuôi cấy trong môi trường bình thường vì những nồng độ này không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào.

2.8.2.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao phân đoạn

Chuẩn bị cao phân đoạn

Bột Xảo tam phân (1,0 kg cho mỗi bộ phận dùng tiềm năng) chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với ethanol 96% theo tỷ lệ 1:10 (dược liệu : dung môi), thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để thu cao còn toàn phần.

Hòa cao toàn phần trong ethanol 25% theo tỷ lệ 1:5 và lắc phân bố lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, theo nguyên tắc ở mỗi phân đoạn phải được chiết kiệt (cho đến khi không còn chất chiết). Thu hồi dung môi dưới áp suất để thu được các cao phân đoạn *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, nước (phần còn lại không tan trong 3 dung môi trên).

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao phân đoạn bằng phương pháp DPPH

Thực hiện tương tự theo mục 2.8.2.1.

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao phân đoạn theo phương pháp định lượng MDA

Nguyên tắc: MDA (Malondialdehyd) là chất được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, khi phản ứng với thuốc thử acid thiobarbituric (TBA) tạo ra phức hợp trimethin có màu hồng, có hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) ở bước sóng 532 nm. Phản ứng xảy ra ở môi trường pH từ 2 - 3, nhiệt độ 90 - 100 °C trong 10 - 15 phút.

HTCO của chất thử nghiệm thể hiện qua việc làm giảm màu của phức hợp này do làm giảm lượng MDA có trong mẫu dẫn đến giảm độ hấp thụ ở bước sóng 532 nm¹²⁷.

Cách tiến hành: Nghiền đồng thể gan chuột trong KCl 1,15% (tỷ lệ 1,0 g:10 ml) ở 0-5 °C. Dùng 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ khác nhau phản ứng với 0,5 ml dịch đồng thể gan. Thêm đệm phosphat 50 mM vừa đủ 2 ml, ủ hỗn hợp 15 phút ở 37 °C và dừng phản ứng bằng cách thêm 1,0 ml acid tricloacetic 10%. Sau khi ly tâm

(3000 vòng/phút trong 10 phút), lấy 1 ml dịch trong phản ứng với 1,0 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100 °C trong 15 phút. Làm lạnh và đo OD ở bước sóng 532 nm. Mẫu chứng được tiến hành trong cùng điều kiện nhưng không sử dụng cao thử. Thực hiện 3 lần (3 ống nghiệm cho mỗi nồng độ mẫu thử), lấy giá trị trung bình.

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}}{\text{OD}_{\text{chứng}}} \times 100$$

trong đó: $\text{OD}_{\text{chứng}}$ và $\text{OD}_{\text{thử}}$: độ hấp thụ của mẫu chứng và mẫu thử.

Thông qua phương trình hồi quy lập được, xác định EC_{50} (nồng độ có HTCO bằng 50%) của mẫu thử.

Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* cao phân đoạn

Thực hiện tương tự theo mục 2.8.2.1.

2.8.3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng

2.8.3.1. Chiết xuất

Bột rễ Xáo tam phân (4,5 kg) được chiết nóng với ethanol 96% (35 lít × 4 lần), lọc, cô thu hồi dung môi thu được 1,6 L cao lỏng. Cao lỏng được lắc phân bố với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat. Các dịch sau khi lắc phân bố được cô áp suất giảm cho tủa Ho (82 g, từ phân đoạn *n*-hexan) và các cao *n*-hexan (N_0 , 86 g), cao cloroform (C_0 , 200 g), cao ethyl acetat (E_0 , 40 g) và cao nước (330 g).

Bột thân Xáo tam phân (5,3 kg) được chiết ngấm kiệt với ethanol 96% thu được 90 L dịch chiết. Dịch chiết được cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 4,3 L cao lỏng. Cao lỏng được lắc phân bố với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần, bao gồm: *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat. Các dịch sau khi lắc phân bố được cô áp suất giảm cho các cao *n*-hexan (36 g), cao cloroform (19 g), cao ethyl acetat (39,7 g) và cao nước (92 g).

2.8.3.2. Phân lập và tinh chế

Các cao chiết được tiến hành sắc ký với các kỹ thuật sắc ký như sau: Sắc kí cột chân không (VLC) và sắc ký cột cổ điển thu được các hợp chất tinh khiết và các phân đoạn chỉ chứa chủ yếu một vết chính.

Sắc kí cột chân không (VLC)

Mục đích: tách hỗn hợp toàn phần thành vài (< 10) phân đoạn có độ phân cực khác nhau, thành phần của các phân đoạn này đơn giản (gồm ít chất). Từ các phân đoạn đơn giản này có thể dễ dàng phân lập tiếp bằng SKC cổ điển một cách hiệu quả hơn.

Khảo sát pha động cho VLC: Khảo sát bằng kỹ thuật SKLM, chọn được hệ dung môi sắc kí ổn định, có khả năng tách tốt nhất.

Nhồi cột: Silica gel được nhồi khô vào cột với khối lượng gấp 10 – 15 lần mẫu khô. Dùng chân không hút để nén chặt silica gel. Ổn định cột bằng dung môi nền chảy qua cột nhờ áp suất hút.

Nạp mẫu: Mẫu được nạp dưới dạng dung dịch (hòa trong dung môi nền) hoặc nạp mẫu khô (hòa tan mẫu trong dung môi thích hợp, sau đó trộn với một lượng silica gel thích hợp, trộn đều rồi sấy ở 40°C đến khô tới).

Khai triển cột: Khi cột khô dung môi, giữ nguyên áp suất, nạp mẫu. Cho 1 thể tích pha động nhất định vào cột rồi hút chân không cho đến khi cột khô hẳn dung môi để thu phân đoạn.

Gộp phân đoạn: Các phân đoạn được kiểm tra bằng SKLM với hệ dung môi khai triển thích hợp. Phát hiện bằng cách dùng UV 254nm, UV 365nm, thuốc thử VS, FeCl_3 . Gộp các phân đoạn có R_f giống nhau, cô áp suất giảm để thu cặn khô hoặc dịch đậm đặc

Sắc kí cột cổ điển (SKC)

Mục đích: Phân lập chất tinh khiết từ hỗn hợp nhiều thành phần. Tiêu chí chọn lựa dung môi cho sắc kí cột cổ điển: Tối đa nên gồm 2 thành phần. Các vết di chuyển, có tách nhau, không kéo vệt dài. Các vết cần tách cho R_f khoảng 0,25 – 0,35 sau 1 lần khai triển trên SKLM.

Chuẩn bị cột: Cột thủy tinh có thể có lưới thủy tinh xốp hoặc không.

Pha động: Chọn pha động dựa vào kết quả khảo sát trên SKLM.

Nhồi cột: Dùng phương pháp nhồi cột khô hay hỗn dịch. Với cột có đường kính nhỏ hơn 5 cm, ổn định cột bằng dung môi khai triển từ 1 – 6 h tùy vào hệ dung môi.

Nạp mẫu: nạp mẫu dạng bột khô hay dạng dung dịch (mẫu được hòa tan trong dung môi nền hoặc dung môi có độ phân cực kém hơn dung môi nền).

Khai triển cột: dùng các ống nghiệm để hứng phân đoạn.

Gộp các phân đoạn: kiểm tra bằng SKLM với hệ dung môi đã khảo sát trước đó. Phát hiện bằng UV 254 nm/ 365 nm, thuốc thử VS. Các phân đoạn có thành phần giống nhau trên sắc kí đồ được gộp lại, cô thu hồi dung môi cho tới cạn khô hoặc dịch đậm đặc.

Phương pháp kết tinh phân đoạn

Từ các phân đoạn chỉ chứa chủ yếu một vết chính, loại hết dung môi, cần thu được được rửa bằng các dung môi hữu cơ kém phân cực (petroleum ether, benzen, n-hexan, cloroform, ether ethylic,...) để loại tạp kém phân cực. Tìm cách kết tinh trong các dung môi thích hợp theo phương pháp thử và sai. Cần được hòa tan trong dung môi, có thể gia nhiệt hoặc siêu âm cho tan hoàn toàn, để nguội tự nhiên cho kết tinh. Lọc và rửa kết tinh qua phễu thủy tinh xóp bằng dung môi lạnh. Kiểm tra sơ bộ tinh khiết trên SKLM.

2.8.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập

2.8.4.1. Kiểm tra độ tinh khiết

Kiểm tra sơ bộ độ tinh khiết của các chất phân lập được trên SKLM. Chấm trên 3 bản mỏng silica gel F₂₅₄, triển khai với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau. Kiểm tra dưới UV 254 nm/ 365 nm và thuốc thử đặc trưng (VS, FeCl₃ 1% và KOH 5%/MeOH). Nếu kết quả phân tích chỉ cho 1 vết trên sắc ký đồ thì được xem là tinh khiết trên SKLM.

2.8.4.2. Xác định cấu trúc của các chất phân lập được

Các chất phân lập được sau khi kiểm tra sơ bộ độ tinh khiết được đo phổ UV, MS, NMR (¹³C NMR, ¹H NMR, DEPT, HSQC, HMBC và COSY). Phổ MS được đo tại Viện Công nghệ hóa học – TpHCM. Tín hiệu được ghi nhận theo số khối (*m/z*) và

cường độ tương đối (relative intensity). Phổ NMR được đo tại Phòng cấu trúc, Viện Hóa học, Hà Nội. Mẫu được hòa tan trong dung môi thích hợp DMSO, CDCl_3 hoặc MeOD với chất chuẩn nội TMS; thực hiện trên máy AVANCE 500 (Burker). Độ dời hóa học theo thang δ (ppm) với $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm là tín hiệu dung môi. Từ các dữ liệu ghi nhận được, kết hợp với các dữ liệu trong các tài liệu tham khảo, có thể định hướng, biện giải và sau khi kiểm tra có thể xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được.

2.8.5. Sơ bộ đánh giá cơ chế hoạt tính độc tế bào in vitro của hợp chất tiềm năng

2.8.5.1. Đánh giá hoạt tính độc tế bào của các hợp chất tiềm năng

Nuôi cấy tế bào: Tế bào ung thư gan người HAK1B, tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 được nuôi cấy trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FCS, 100 IU/ml penicilin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, ủ ở 37°C , 5% CO_2 . Khi tế bào đạt độ phủ 70-80%, hút bỏ môi trường nuôi cấy, rửa tế bào với dung dịch PBS 1X. Ủ với trypsin-EDTA ở 37°C đến khi tế bào tách ra khỏi bề mặt bình. Thu huyền dịch tế bào trong môi trường, cấy chuyển hoặc đếm số lượng, chia vào đĩa nuôi cấy 96 giếng để tiến hành thí nghiệm khảo sát hoạt tính độc tế bào của mẫu thử bằng test MTT.

Chuẩn bị mẫu thử: Mẫu thử được pha trong dung dịch DMSO ở nồng độ 250X, bảo quản ở -20°C . Pha loãng 250 lần mẫu thử trong môi trường nuôi cấy để đạt các nồng độ khảo sát (100; 75, 50; 25; 12,5 μM) xử lý tế bào. Nồng độ cuối cùng của DMSO trong môi trường nuôi cấy là 0,4%.

Dung dịch đối chiếu sorafenib được pha ở nồng độ 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25 và 100 μM .

Tiến hành: Tế bào được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng trong 24 giờ ở 37°C , 5 % CO_2 sau đó xử lý tế bào với mẫu thử hoặc mẫu đối chiếu sorafenib ở các nồng độ khác nhau trong 72 giờ. Loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung môi trường DMEM chứa 0,05 mg/ml MTT. Ủ 3 giờ ở 37°C , 5 % CO_2 . Loại bỏ môi trường chứa MTT. Hòa tan tinh thể formazan tạo thành trong isopropanol acid hóa. Lắc 2 phút ở nhiệt độ phòng. Đo OD ở 570 nm trên máy đọc microplate Sunrise™ (Tecan, Männedorf,

Thụy Sĩ). Thí nghiệm thực hiện trên 3 giếng cho 1 nồng độ mẫu thử song song với mẫu chứng nuôi cấy tế bào trong môi trường bổ sung DMSO ở nồng độ 0,4%.

Tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế tăng trưởng} = 100 - \left(\frac{OD_{\text{thử}}}{OD_{\text{chứng}}} \times 100 \right)$$

trong đó $OD_{\text{chứng}}$ và $OD_{\text{thử}}$ lần lượt là độ hấp thụ của mẫu chứng và mẫu thử.

Về đồ thị biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ mẫu thử với tỷ lệ ức chế tăng trưởng, từ đó xác định IC_{50} của mẫu thử (nồng độ làm giảm 50% tỷ lệ tế bào sống).

2.8.5.2. Khảo sát vai trò của protein KDM2A đối quá trình tăng trưởng của tế bào ung thư gan HAK1B và tế bào ung thư vú MDA-MB-231

Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư của các hợp chất tiềm năng có liên quan đến KDM2A hay không thông qua thử nghiệm đưa phân tử siRNA vào trong tế bào nhằm bất hoạt gen KDM2A siRNA đặc hiệu gen đích KDM2A (siRNA được thiết kế trước, cung cấp bởi Applied Biosystems, Hoa Kỳ) được đưa vào tế bào được nuôi cấy ở mật độ 2×10^5 tế bào/ml, sử dụng chất dẫn Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Hoa Kỳ) các bước thực nghiệm được tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất¹²⁸.

Trình tự oligonucleotid của siRNA đối với KDM2A là 5'-GAACCCGAAGAAGAAAGGAUUCGUU-3'. Lượng KDM2A-siRNA sử dụng cho 2×10^5 tế bào là 40 nM.

Chuẩn bị hỗn hợp siRNA và Lipofectamine RNAiMAX pha loãng theo tỷ lệ 3 μ l lipofectamin trong 3 ml môi trường tế bào. Tế bào được ủ trong 48 giờ ở 37 °C, 5% CO₂. Sau khi rửa 3 lần với PBS, các tế bào đã bất hoạt gen đích sẽ được kiểm tra và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kỹ thuật Western blot khảo sát mức độ biểu hiện protein

Chuẩn bị các dung dịch: 250 ml dung dịch 30% acrylamid/Bis (20:1): Cân 72,5 g acrylamid, 2,5 g Bis, thêm nước đến đủ thể tích và bảo quản ở 4 °C. 100 ml dung dịch Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 gồm 7,88 g Tris-HCl và thể tích nước vừa đủ. 100 ml dung dịch Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 gồm 23,64 g Tris-HCl trong thể tích nước vừa đủ. 15 ml dung dịch 10% APS cần 1,5 g APS trong 15 ml H₂O. 1,0 L Running buffer

10X cần 30,3 g Tris base, 114,2 g glycin, thêm nước đến đủ thể tích. 1,0 L Running buffer 1X bao gồm 100 ml Running buffer 10X, 900 ml H₂O và 10 ml SDS 10%. 0,9 L Transfer buffer 10X chứa 144 g Glycine, 30,2 g Tris base và thêm H₂O cho đủ thể tích. 1,0 L dung dịch Tranffer buffer 1X gồm 90 ml Tranffer buffer 10X, 100 ml methanol và thêm nước cho đủ 1 L. 1,0 L TBS 10X cần 24,2 g Tris base, 80 g NaCl và thêm H₂O vừa đủ, chuẩn độ pH 7,6. 1,0 L TBS 1X được pha bởi 100 ml TBS 10X trong 900 ml H₂O. Dung dịch đệm RIPA có thành phần 3 ml dung dịch NaCl 5M; 1,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 5 ml dung dịch Tris 1,0 M pH 8,0; 1 ml dung dịch NP-40 (IGEAL CA-630), 5 ml sodium deoxycholat 10%; 1,0 ml dung dịch SDS 10% và 84 ml nước. Bảo quản dung dịch ở 4 °C.

Chuẩn bị mẫu phân tích (tách chiết protein từ tế bào): Tế bào được phá vỡ tế bào bằng trypsin để thu protein toàn phần: 100 µl trypsin được thêm vào huyền phù tế bào, giữ hỗn hợp trên đá 10 phút. Sau đó, ly tâm 12.000 vòng/10 phút/4 °C. Chuyển dịch nổi sang tube mới, định lượng protein toàn phần bằng phương pháp Bradford.

Phân tách protein bằng điện di SDS-PAGE

Chuẩn bị gel acrylamid sử dụng cho bản kính 0,75×90× 60 cm gồm lớp gel cô (còn gọi là Stacking gel) pH 6,8 và lớp gel tách (hay còn gọi là Resolving gel) pH 8,8 và đệm điện di pH 8,3. Trong đó, 5 ml gel 10% có thành phần 1650 µl acrylamide/Bis 30% (20:1); 1250 µl Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µl SDS 10%; 2 µl nước cất để ion hóa; 5 µl TEMED (tetramethylethylen-ediamine); 50 µl APS 10%.

Thành phần của 2,5 ml gel tách gồm 350 µl acrylamid/Bis 30% (20:1); 625 µl Tris-HCl 1,5M pH 6,8; 25 µl SDS 10%; 1,5 µl nước cất để ion hóa; 5 µl TEMED; 25 µl APS 10%. Sau khi bản gel đông cứng, đặt bản gel vào dung dịch đệm điện di và tiến hành tra mẫu vào giếng với thể tích 3-4 µl mỗi giếng, điện di ở 110 V trong 2 giờ.

Chuyển protein lên màng lai

Sau khi điện di protein bằng SDS-PAGE, các phân tử protein được phân tách trên gel thành các băng khác nhau, sau đó các băng protein trên bản gel được chuyển sang màng lai polyvinyliden difluorid (PVDF). Khi một điện trường được đặt vào,

các protein di chuyển ra khỏi bản gel polyacrylamide và bám lên bề mặt của màng lai. Tại đó protein được gắn chặt vào màng PVDF, màng này chứa các băng protein, với sự sắp xếp và vị trí các băng protein giống như trên bản gel.

Xử lý màng lai (Blocking)

Màng lai được xếp vào bộ chuyển màng, theo nguyên tắc “cùng màu - cùng vị trí”. Sau đó, điện di chuyển màng với dòng điện 70 V, 100 mA trong 2 giờ. Sau khi chuyển sang màng lai, rửa màng lai 3 lần với dung dịch TBST (5 ml mỗi lần). Ngâm màng lai trong dung dịch đệm khóa blocking buffer (Skim milk) ở 4 °C trong 2 giờ. Tiếp tục rửa màng lai 3 lần với dung dịch TBST (5 ml mỗi lần).

Quá trình lai (ủ với kháng thể)

Bước 1: Ủ qua đêm với kháng thể sơ cấp anti-p-I κ B α , anti-p-STAT-1 (727), anti-p-ST AT3 và anti-GAPDH (Santa Cruz) trong dung dịch đệm, sau đó rửa 5 lần.

Bước 2: ủ 1 giờ tại nhiệt độ phòng với kháng thể thứ cấp HRP anti-rabbit hoặc anti-mouse (Amersham) và rửa 5 lần để loại bỏ kháng thể thừa.

Phát hiện các protein đích

Ủ màng lai trong một hỗn hợp phản ứng đặc hiệu với enzym sử dụng kit ECL Plus kit (GE Healthcare). Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tóm tắt như sau: Ủ màng lai qua đêm với kháng thể sơ cấp ở 4 °C, rửa 3 lần với TBST (5 ml mỗi lần trong 10 phút). Sau đó, ủ màng lai 1 giờ với kháng thể thứ cấp ở nhiệt độ phòng, rửa 3 lần với TBST (5 ml mỗi lần trong 10 phút). Màng lai được cố định bằng 1ml dung dịch ECL là hỗn hợp của 0,5 ml dung dịch peroxid và 0,5 ml luminol (enhancer solution), ủ 3 phút. Đọc kết quả dựa trên độ nhạy của tín hiệu, sử dụng hệ thống máy ChemiDoc XRS⁺ của hãng Bio-Rad và phân tích dữ liệu bằng chương trình Quantity One.

Kết quả bất hoạt gen KDM2A trong tế bào

Để xác định vai trò của gen KDM2A trong tác động ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư vú và ung thư gan, thí nghiệm đều được thiết kế gồm nhóm chứng và nhóm bất hoạt gen KDM2A để so sánh kết quả giữa 2 nhóm này.

Để bất hoạt gen KDM2A trong tế bào, phân tử siRNA đặc hiệu gen đích

KDM2A (siRNA được thiết kế, cung cấp bởi Applied Biosystems, Hoa kỳ) được đưa vào tế bào với nồng độ 2×10^5 tế bào/ml, sử dụng chất dẫn Lipofectamine RNAiMAX.

2.8.5.3. Phân tích kết quả và xử lý số liệu thống kê

Kết quả được xử lý bằng Microsoft Excel, trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD) của 3 lần đối với hoạt tính chống oxy hóa và giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean $\pm$ SEM) của một thí nghiệm đại diện đối với hoạt tính độc tế bào, sau đó phân tích thống kê bằng phép kiểm Mann-Whitney trên phần mềm SPSS 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

2.8.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC

2.8.6.1. Thiết lập chất đối chiếu

Hợp chất tự nhiên được lựa chọn để thiết lập chất đối chiếu phải là những chất đại diện, chiếm hàm lượng lớn trong dược liệu, có tác dụng sinh học cũng như có quy trình phân lập ổn định, khối lượng phân lập được nhiều với độ tinh khiết cao ($> 95\%$) để thiết lập chất đối chiếu (CDC). Các bước thực hiện dựa theo hướng dẫn của các tài liệu do ASEAN ban hành về quy trình thiết lập CDC^{129, 130}, cụ thể như sau:

Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất đối chiếu

Dữ liệu chuẩn dùng để nhận dạng chất nhằm cung cấp thông tin cho thiết lập hồ sơ nhận dạng chất đối chiếu. Việc nhận dạng chất dựa vào: So sánh phổ của chất phân tích với phổ chất chuẩn trong cùng điều kiện. So sánh thông tin phổ, dữ liệu hóa lý, hằng số vật lý của chất với tài liệu khoa học hoặc thông tin đã công bố. Tập hợp các dữ liệu chuẩn đó có thể khẳng định được hợp chất là đúng đối tượng nghiên cứu. Các phương pháp được dùng để xây dựng bộ dữ liệu gồm: Đo điểm chảy, đo phổ tử ngoại khả kiến, đo phổ hồng ngoại, đo phổ khối lượng, đo phổ NMR 1 chiều và 2 chiều.

Xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết

Chất đối chiếu được xác định độ tinh khiết sắc ký bằng phương pháp HPLC/PDA với các điều kiện phân tích tương ứng với mẫu. Quy trình được khảo sát tính phù

hợp của hệ thống và thẩm định theo hướng dẫn của ICH¹³¹. Áp dụng phương pháp HPLC và quy về 100% diện tích pic để xác định độ tinh khiết của chất đối chiếu.

Phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC). Xác định độ tinh khiết và hàm ẩm. Gia nhiệt tốc độ 1 °C/ phút đến qua khỏi nhiệt độ nóng chảy của mẫu khoảng 50 °C, lưu lượng dòng khí nitơ 50 ml/phút. Mỗi mẫu xác định 3 lần, lấy kết quả trung bình.

Xây dựng các chỉ tiêu đánh giá nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu

Căn cứ tính chất lý - hóa của nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu và các chỉ tiêu chất lượng thông thường của chất đối chiếu gốc để xây dựng CTCL của chất đối chiếu cần thiết lập. Chất đối chiếu đạt yêu cầu như chất đối chiếu hóa học thứ cấp dùng cho phép thử định lượng. Các CTCL và phương pháp đánh giá được xây dựng dựa vào tài liệu tham khảo DDVN V và các dược điển quốc tế để lựa chọn phương pháp phù hợp đánh giá các CTCL. Các CTCL đề xuất xây dựng bao gồm: Tính chất, độ ẩm, định tính, độ tinh khiết và tạp chất liên quan.

Thiết lập chất đối chiếu

Đóng gói: Các chất đối chiếu sau khi được đánh giá đạt yêu cầu chất lượng được đóng thành từng lọ nhỏ có khối lượng thích hợp. Sử dụng lọ thủy tinh nâu hàn kín, có lớp đệm teflon đạt tiêu chuẩn chất lượng theo quy định, dán nhãn tạm ghi tên hoạt chất và đánh số thứ tự từng lọ. Việc đóng gói được thực hiện trong glove-box: nạp khí nitơ 99,99%, độ ẩm tương đối trong buồng đóng khoảng 40%.

Đánh giá đồng nhất lọ: Thực hiện tại phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP và ISO 17025 là Khoa Nghiên cứu phân tích (PTN-1), Khoa Thiết lập chất chuẩn chất đối chiếu (PTN-2) Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. Lấy ngẫu nhiên theo phần mềm Excel. Xác định hàm lượng: Áp dụng phương pháp định lượng để xác định hàm lượng trong mỗi lọ; mỗi lọ được kiểm tra hai lần. Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị F_{tn} và F_{tc} . Nếu $F_{tn} < F_{tc}$: Kết quả giữa các mẫu là đồng nhất. Nếu $F_{tn} > F_{tc}$: Kết quả giữa các mẫu là không đồng nhất.

Đánh giá liên phòng thí nghiệm

Thành phẩm sau khi đóng gói và đánh giá đồng nhất lô đạt yêu cầu được lấy mẫu

ngẫu nhiên và tiến hành định lượng tại hai phòng thí nghiệm độc lập. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu phải đạt tiêu chuẩn GLP hoặc ISO/IEC 17025. Mỗi phòng thí nghiệm sẽ nhận được 6 lọ mẫu ngẫu nhiên kèm theo quy trình phân tích và các tài liệu liên quan. Trước khi phân tích, mỗi phòng thí nghiệm sẽ đánh giá lại tính phù hợp của hệ thống. Nếu đạt yêu cầu, tiến hành xác định độ tinh khiết trên 6 mẫu đã nhận, mỗi mẫu nên được kiểm tra 2 lần để tránh sai số. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu: Khoa Nghiên cứu phân tích (PTN-1) và Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN-2) thuộc Viện kiểm nghiệm thuốc TP.HCM.

Mỗi phòng thí nghiệm sẽ trả lời kết quả độc lập trên 6 lọ mẫu gửi. Tập hợp các kết quả của hai phòng thí nghiệm tham gia ($n = 12$), đánh giá kết quả theo ANOVA, so sánh 2 giá trị F_{tn} và F_{tc} .

Trường hợp 1: $F_{tn} \leq F_{tc} \rightarrow$ kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, quy trình phân tích có độ lặp lại cao, độ tinh khiết chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá. Trường hợp 2: $F_{tn} \geq F_{tc} \rightarrow$ kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau có ý nghĩa, quy trình phân tích có độ lặp lại thấp, độ tinh khiết chất phân tích thay đổi tùy vào mỗi phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Xác định giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm

Tiến hành xác định giá trị công bố¹³² trên phiếu kiểm nghiệm khi kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm đạt yêu cầu ($F \leq F_{0,05}$).

- Các giá trị:
- x^* : Trung vị của x_i .
 - $s^* = 1,483 \times$ trung vị của $|x_i - x^*|$.

Xác định các giá trị: $\delta = 1,5s^*$

$$\text{Khi đó } x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta & \text{nếu } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta & \text{nếu } x_i > x^* + \delta \\ x^* & \text{nếu } x^* - \delta < x_i < x^* + \delta \end{cases}$$

Tính toán các giá trị mới: $x^* = \sum x_i^* / p$

$$s^* = 1,134\sqrt{\sum(x_i - x^*)^2/(p-1)}$$

Giá trị ấn định $x^*_{(n)}$ được chọn khi giá trị s^* không thay đổi sau n lần tính; sử dụng giá trị ấn định $x^*_{(n)}$ để đánh giá từng kết quả phân tích theo test-z, loại bỏ các kết quả phân tích có $|z| > 2,0$; chọn các giá trị $|z| \leq 2,0$; tính giá trị trung bình.

$$\text{Xác định độ không đảm bảo đo: } \mu_x = 1,25 \times x \times s^* / \sqrt{p}$$

2.8.6.2. Xây dựng quy trình định lượng các hợp chất phân lập tiềm năng bằng phương pháp HPLC

Định lượng bằng phương pháp HPLC dựa vào phần trăm diện tích pic. Thăm dò điều kiện định lượng. Chọn điều kiện tối ưu để làm điều kiện định lượng.

Khảo sát điều kiện sắc ký HPLC

- Khảo sát bước sóng phát hiện:
- Khảo sát pha động: Triển khai sắc ký mẫu thử trong cùng điều kiện với hệ dung môi acetonitril – nước theo các tỷ lệ khác nhau để chọn ra pha động có tỷ lệ phù hợp. Khảo sát với 3 chương trình rửa giải khác nhau (**Bảng 2.2.**).

Bảng 2.2. Chương trình rửa giải được khảo sát

Chương trình rửa giải	Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)
1	0	50	50
	15-20	80	20
	20-25	100	0
2	0	55	45
	15-20	80	20
	20-25	100	0
3	0-25	75	25

- Kiểm tra độ tinh khiết của chất chuẩn: Hòa tan chuẩn trong acetonitril để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,5 mg/ml. Lọc dịch qua màng lọc 0,45 μm và phân tích theo điều kiện HPLC đã chọn. Ghi nhận thời gian lưu, sắc ký đồ 3D, phổ UV và độ tinh khiết pic.

Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu thử

Khảo sát dung môi chiết: Cân 100 mg bột dược liệu, thêm vào 20 ml dung môi khảo sát (lựa chọn trong 3 dung môi acetonitril / ethanol 96%/ methanol), chiết siêu âm trong 30 phút. Ly tâm 15 phút (4000 rpm). Thu dịch ly tâm cho vào bình định

mức 20 ml. Thêm dung môi cho đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm , dịch lọc dùng làm mẫu thử. Tiến hành phân tích bằng HPLC theo điều kiện đã chọn.

Khảo sát phương pháp chiết

Khảo sát thời gian chiết: Cân chính xác 100 mg dược liệu cho vào cốc, thêm MeOH, siêu âm thời gian 15, 30, 60 phút, gạn dịch chiết chuyển sang bình định mức 10 ml. Tráng cốc, thêm MeOH tới vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , mẫu thử có nồng độ 10 mg/ml. Tiến hành phân tích bằng HPLC theo điều kiện đã chọn.

Khảo sát số lần chiết: Cân 100 mg dược liệu, thêm 20 ml dung môi chiết và thời gian siêu âm đã xác định. Ly tâm 15 phút (4000 rpm), lấy dịch 1. Phần bã còn lại được thực hiện như trên để thu được dịch thử 2 và dịch thử 3. Mỗi dịch thử được làm thành dung dịch chính xác và tiến hành phân tích bằng HPLC theo điều kiện đã chọn.

2.8.6.3. Đánh giá quy trình định lượng

Quy trình định lượng đã khảo sát sẽ được đánh giá theo hướng dẫn của ICH bao gồm¹³³: Tính tương thích hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại trong ngày, độ chính xác trung gian và độ đúng.

Khảo sát tính tương thích hệ thống: Ổn định cột bằng pha động ít nhất 30 phút. Tiến hành sắc ký mẫu với ít nhất 6 lần tiêm mẫu liên tiếp. Khảo sát các thông số: diện tích đỉnh, thời gian lưu, hệ số kéo đuôi AS và số đĩa lý thuyết N. Yêu cầu: Tất cả các thông số trên phải có $\text{RSD} \leq 2 \%$, riêng thời gian lưu có $\text{RSD} \leq 1 \%$. Hệ số kéo đuôi A_S : $0,8 \leq A_S \leq 1,5$.

Khảo sát tính đặc hiệu (tính chọn lọc): Đảm bảo kết quả xác định hàm lượng chất cần phân tích trong mẫu là chính xác, tránh ảnh hưởng của các thành phần khác có trong mẫu. Với kỹ thuật HPLC sử dụng đầu dò PDA, việc sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của pic sẽ giúp tránh nhầm lẫn các hợp chất khác có trong mẫu có cấu trúc tương tự với hợp chất cần định lượng và có lợi trong việc chứng minh rằng pic sắc ký không phải là pic của hai thành phần trở lên. Tiến hành sắc ký

lần lượt mẫu thử và mẫu trắng. Yêu cầu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của chất khảo sát. Phổ UV của chất khảo sát ở 3 vị trí khác nhau của pic phải cho phổ đặc trưng của chất đó. Pic chất khảo sát không có các thành phần khác khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của đầu dò PDA.

Khảo sát tính tuyến tính: Khả năng luận ra các kết quả của phương pháp dựa vào đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích đỉnh và nồng độ là một đường thẳng. Tiến hành sắc ký tối thiểu 5 mức nồng độ khác nhau, đo và xác định diện tích đỉnh ở từng nồng độ. Thiết lập phương trình hồi quy $y = ax + b$ và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích đỉnh và nồng độ. Sử dụng trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình. Nếu $t_0 < t_{0,05}$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê. Nếu $t_0 > t_{0,05}$: Hệ số b có ý nghĩa thống kê. Sử dụng trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy. Nếu $F < F_{0,05}$: Phương trình hồi quy không tương thích. Nếu $F > F_{0,05}$: Phương trình hồi quy tương thích. Yêu cầu: Hệ số tương quan $R^2 \geq 0,995$.

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ): Đo tín hiệu thu được từ mẫu trắng và mẫu chuẩn có nồng độ đã biết. Tín hiệu thu được từ mẫu trắng là N, từ mẫu chuẩn là S, thiết lập tỷ số S/N. Pha loãng dần mẫu chuẩn và tiến hành sắc ký đến khi $S/N = 10/1$ thì nồng độ đó là LOQ, và $S/N = 3/1$ thì nồng độ đó là LOD.

Độ lặp lại: Mức độ sát gần giữa các kết quả thử riêng rẽ x_i với giá trị trung bình thu được khi áp dụng phương pháp đề xuất cho cùng một mẫu thử đồng nhất trong điều kiện xác định. Độ lặp lại bị ảnh hưởng bởi sai số ngẫu nhiên. Tiến hành sắc ký tối thiểu 6 mẫu thử ở nồng độ 100%. Tiến hành xử lý thống kê các số liệu, xác định độ lệch chuẩn tương đối. Yêu cầu $RSD \leq 2\%$

Khảo sát độ chính xác trung gian: Thực hiện tương tự như độ lặp lại, nhưng với các điều kiện sau: cùng mẫu thử và định lượng 3 lần nhưng khác ngày phân tích. Xác định giá trị trung bình và % độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu. Kết quả đạt tiêu chuẩn nếu phù hợp yêu cầu $RSD \leq 2\%$.

Khảo sát độ đúng: Thêm chính xác một lượng chuẩn vào lượng chính xác được liệu đã xác định hàm lượng tương đương với 80%, 100%, 120% so với hàm lượng trong

mẫu thử. Tiến hành chiết xuất và định lượng theo quy trình đã xây dựng. Tính phần trăm hàm lượng chất chuẩn tìm lại được so với lượng chuẩn ban đầu đã thêm vào.

2.8.6.4. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu rẽ Xáo tam phân trên thị trường bằng phương pháp HPLC

Quy trình định lượng được ứng dụng định lượng một số mẫu rẽ Xáo tam phân thu mua trên thị trường bằng phương pháp HPLC.

Công thức tính hàm lượng của các chất định lượng trong mẫu thử là:

$$X(\%) = \frac{S_t}{S_c} \times C_c \times \frac{V}{m(1-h) \times 10000} \times k$$

Trong đó: X : Hàm lượng của chất định lượng có trong mẫu thử (%)

Sc: Diện tích đỉnh thu được của mẫu chuẩn ($\mu V \times s$)

St: Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử ($\mu V \times s$)

Cc: Nồng độ của dung dịch đối chiếu ($\mu g/mL$)

V: Thể tích dung dịch thử (mL)

m: Khối lượng cân của mẫu thử (mg)

k: Độ tinh khiết của chuẩn

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Phân tích thành phần hoá học, thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu

3.1.1. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật

Kết quả phân tích sơ bộ cho thấy rễ, thân, lá Xáo tam phân có thành phần hóa học chính là nhóm hợp chất coumarin ngoài ra còn có alkaloid, triterpenoid, flavonoid, tinh dầu, saponin được thể hiện trong **Phụ lục 12**.

3.1.2. Thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết

Dược liệu được tiến hành thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết với độ ẩm, độ tro và hàm lượng chất chiết được trong dung môi nước và dung môi ethanol 96%. Kết quả được thể hiện trên **Bảng 3.1**.

Bảng 3.1. Kết quả thử số chỉ tiêu độ tinh khiết tinh khiết của mẫu Xáo tam phân (n=3)

Bộ phận dùng	Độ ẩm (%)	Tro toàn phần (%)	Tro không tan / HCl (%)	Hàm lượng chất chiết được (%)	
				Dung môi nước	Dung môi EtOH 96 %
Rễ	7,61 ± 0,23	3,30 ± 0,14	0,036 ± 0,010	17,80 ± 0,12	17,73 ± 0,14
Thân	7,25 ± 0,10	4,31 ± 0,22	0,030 ± 0,020	1,74 ± 0,21	2,03 ± 0,22
Lá	8,81 ± 0,26	3,25 ± 0,12	0,027 ± 0,005	1,53 ± 0,15	1,42 ± 0,18

Kết quả cho thấy hàm lượng chất chiết được (dung môi nước) từ rễ có kết quả cao nhất (17,8%) gấp hơn 10 lần so với cao từ thân (1,74%) và gấp hơn 11 lần so với cao từ lá (1,53%). Hàm lượng chất chiết được (dung môi ethanol 96%) từ rễ có kết quả cao nhất (17,73%) gấp gần 9 lần so với cao từ thân (2,03%) và gấp hơn 12 lần so với cao từ lá (1,42%). Kết quả chất chiết được bằng dung môi ethanol và nước gần như không có chênh lệch đáng kể.

3.1.3. Định tính polyphenol

Theo nghiên cứu của Bowyer và cộng sự (2015), các polyphenol có mặt trong Xáo tam phân đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến tác dụng kháng ung thư của dược liệu này. Do đó, đề tài định tính polyphenol trong các cao chiết ethanol 96%

từ rễ, thân, lá Xáo tam phân. Kết quả của các phản ứng định tính polyphenol bằng sắt (III) clorua (FeCl_3) 2%, NaOH 20% và $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 1% đều dương tính, điều đó chứng tỏ sự hiện diện của những hợp chất polyphenol trong các cao ethanol từ Xáo tam phân.

3.1.4. Định lượng polyphenol

Hàm lượng polyphenol của cao rễ, thân, lá Xáo tam phân được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu với chất chuẩn được sử dụng là pyrogallol. Độ hấp thụ được đo tại bước sóng 760 nm. Kết quả thu được được thể hiện thông qua phương trình đường chuẩn $y = 0,0233x - 0,158$ với $R^2 = 0,9974$ (xem **Phụ lục 13**). Từ phương trình biểu diễn đường chuẩn, hàm lượng polyphenol trong các cao Xáo tam phân được biểu diễn theo miligam pyrogallol/gam dược liệu, trình bày trong **Bảng 3.2**.

Bảng 3.2. Hàm lượng polyphenol của Xáo tam phân

Bộ phận định lượng	OD	Độ ẩm (%)	Hiệu suất chiết (%)	Polyphenol (mg pyrogallol /g)
Rễ	0,339	9,47	17,73	106,65
Thân	0,561	15,30	2,03	154,29
Lá	0,103	10,21	1,42	56,01

Như vậy, hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao thân lớn nhất, gấp khoảng 1,5 lần cao rễ và gấp khoảng gần 3 lần cao lá.

3.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và cao phân đoạn

3.2.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần

3.2.1.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao toàn phần (rễ, thân, lá) bằng phương pháp DPPH được khảo sát sơ bộ ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ này, cao toàn phần cho hoạt tính chống oxy hóa lần lượt là 90,70% (thân), 88,81% (rễ) và 63,62% (lá). Kết quả này cho thấy cả ba cao đều có hoạt tính chống oxy hóa ở mức độ trung

bình đến mạnh (HTCO > 50%). Từ đó, tiến hành thử hoạt tính chống oxy hóa của ba cao ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị EC₅₀ (xem **Phụ lục 14**). **Bảng 3.3** ghi nhận phương trình tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* cũng như giá trị EC₅₀ của các cao toàn phần (rễ, thân, lá).

Bảng 3.3. Phương trình giữa nồng độ và hoạt tính chống oxy hóa, EC₅₀

Mẫu thử	Phương trình hồi quy	R ²	EC ₅₀ (µg/ml)
Cao rễ	$y = -0,0001x^2 + 0,2218x - 3,3257$	0,9924	274,36
Cao thân	$y = -0,0001x^2 + 0,1809x + 23,894$	0,9959	158,14
Cao lá	$y = -3E-05x^2 + 0,0925x + 5,6434$	0,9921	593,94

Kết quả thu được từ **Bảng 3.3** cho thấy hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao giảm dần theo thứ tự cao thân (158,14 µg/ml) > cao rễ (274,36 µg/ml) > cao lá (593,94 µg/ml). Cụ thể, cao thân có hoạt tính chống oxy mạnh gần gấp 2 lần so với cao rễ và gấp gần 4 lần cao lá. Chất đối chứng được sử dụng là acid ascorbic (vitamin C) với EC₅₀ là 5,27 µg/ml.

3.2.1.2. Khảo sát hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 và HepG2 *in vitro*

Hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần (rễ, thân, lá) ở các nồng độ 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/ml được khảo sát trên dòng tế bào MDA-MB-231 và dòng tế bào HepG2 (xem **Phụ lục 15**). Kết quả được thể hiện qua tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào (%), được trình bày trong **Bảng 3.4**.

Bảng 3.4. Tác động của cao toàn phần lên tế bào MDA-MB-231 và HepG2

Mẫu thử	Nồng độ (µg/ml)	MDA-MB-231		HepG2	
		OD _{570nm} ± SD	% ức chế	OD _{570nm} ± SD	% ức chế
Cao rễ	100	0,078 ± 0,022	89,6	0,055 ± 0,003	93,8
	50	0,109 ± 0,006	85,8	0,085 ± 0,005	90,5
	25	0,418 ± 0,009	46,9	0,360 ± 0,036	60,7
	12,5	0,854 ± 0,049	-8,6	0,882 ± 0,046	3,7
	6,25	0,950 ± 0,032	-20,7	0,872 ± 0,046	4,7
Cao thân	100	0,428 ± 0,052	42,9	0,741 ± 0,033	16,6
	50	0,678 ± 0,058	11,8	0,774 ± 0,033	13,3
	25	0,743 ± 0,039	5,5	0,771 ± 0,011	15,8

	12,5	$0,802 \pm 0,034$	-1,9	$0,821 \pm 0,038$	10,3
	6,25	$0,813 \pm 0,009$	-3,3	$0,838 \pm 0,026$	8,5
Cao lá	100	$0,126 \pm 0,016$	83,2	$0,118 \pm 0,024$	86,7
	50	$0,465 \pm 0,018$	39,5	$0,958 \pm 0,013$	-7,4
	25	$0,839 \pm 0,059$	-6,6	$0,949 \pm 0,049$	-3,7
	12,5	$1,091 \pm 0,030$	-38,6	$0,841 \pm 0,066$	-8,1
	6,25	$1,153 \pm 0,036$	-46,5	$0,785 \pm 0,019$	-14,2
DMSO	0,2%	$0,75 \pm 0,024$	1,1	$0,888 \pm 0,058$	1,2
	0,1%	$0,768 \pm 0,040$	0,9	$0,892 \pm 0,038$	1,1
	0%	$0,787 \pm 0,010$	0	$0,915 \pm 0,042$	0
Paclitaxel	0,43 (0,5 μ M)	$0,410 \pm 0,030$	47,9	$0,587 \pm 0,015$	35,9

Trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, cao rễ ở nồng độ 25-100 μ g/ml và cao lá ở nồng độ 50, 100 μ g/ml thể hiện tác động độc tế bào. So với mẫu chứng, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 39,5-89,6%.

Trên dòng tế bào ung thư HepG2, cao rễ thể hiện tác động độc tế bào tốt hơn trên ở các nồng độ khảo sát 25-100 μ g/ml, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 60-94%. Cao lá chỉ thể hiện tác động độc tế bào ở nồng độ 100 μ g/ml, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 86,7%

Đối với hoạt tính độc tế bào ung thư MDA-MB-231 và HepG2 *in vitro*, cao thân tác động thấp, ở các nồng độ khảo sát 100 μ g/ml, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào dưới 50% nên không tiếp tục nghiên cứu độc tính tế bào của bộ phận này.

Phương trình hồi quy biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ và hoạt tính độc tế bào, giá trị IC_{50} của cao toàn phần (rễ, lá) trên tế bào MDA-MB-231 và HepG2 được trình bày ở **Bảng 3.5**.

Bảng 3.5. Hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 và HepG2 của cao toàn phần (rễ, lá)

Cao thử	Phương trình hồi quy	R^2	IC_{50} (μ g/ml)
MDA-MB-231			
Cao rễ	$y = -0,0275x^2 + 4,1177x - 47,708$	0,9848	29,57
Cao lá	$y = -0,0119x^2 + 2,6853x - 66,168$	0,9975	58,35

HepG2			
Cao rễ	$y = -0,0223x^2 + 3,4886x - 22,448$	0,9553	24,91
Cao lá	$y = -0,025x^2 + 1,9142x - 26,906$	0,9986	86,86

Hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 *in vitro*: Giá trị IC₅₀ của cao rễ và lá lần lượt là 29,57 µg/ml và 58,35 µg/ml, cao rễ mạnh gấp hai lần so với cao lá.

Hoạt tính độc tế bào ung thư gan HepG2 *in vitro*: Giá trị IC₅₀ của cao rễ và cao lá lần lượt là 24,91 µg/ml và 86,86 µg/ml, cao rễ mạnh gấp khoảng 3,5 lần cao lá.

3.2.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao phân đoạn

Từ kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của các cao toàn phần (rễ, thân, lá) cho thấy cao thân và cao rễ có hoạt tính tiềm năng nên được chiết xuất phân đoạn để khảo sát hoạt tính sinh học của cao phân đoạn.

3.2.2.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH

Phương trình hồi quy biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ và hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao phân đoạn cùng giá trị EC₅₀ được trình bày ở **Bảng 3.6.** và xem **Phụ lục 16, Phụ lục 17, Phụ lục 18.**

Kết quả thu được cho thấy cao phân đoạn từ rễ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh theo thứ tự giảm dần: cao cloroform (133,41 µg/ml) > cao ethyl acetat (180,6 µg/ml) > cao *n*-hexan (377,39 µg/ml) > cao nước (599,18 µg/ml). Đối với cao phân đoạn từ thân, các cao có hoạt tính oxy hóa mạnh theo thứ tự giảm dần: cao ethyl acetat (86,33 µg/ml) > cao cloroform (182,27 µg/ml) > cao *n*-hexan (329,28 µg/ml) > cao nước (377,68 µg/ml).

Bảng 3.6. Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao phân đoạn bằng phương pháp DPPH

Mẫu thử	Rễ			Thân		
	Phương trình hồi quy	R²	EC₅₀ (µg/ml)	Phương trình hồi quy	R²	EC₅₀ (µg/ml)
Cao <i>n</i> -hexan	$y = -0,00002x^2 + 0,0989x + 15,525$	0,9820	377,39	$y = 0,000002x^2 + 0,131x + 6,6478$	0,9986	329,28
Cao cloroform	$y = -0,0007x^2 + 0,4788x - 1,4185$	0,9932	133,41	$y = -0,0003x^2 + 0,318x + 2,0041$	0,9974	182,27

Cao ethyl acetat	$y = -0,0004x^2 + 0,3461x + 0,541$	0,9997	180,60	$y = -0,001x^2 + 0,5311x + 6,3881$	0,9998	86,33
Cao nước	$y = -0,00002x^2 + 0,0853x + 8,5554$	0,9911	559,18	$y = -0,00004x^2 + 0,1027x + 16,918$	0,9942	377,68
Quercetin	$y = -0,0518x^2 + 11,252x - 4,35$	0,9994	4,94			

So sánh giữa rễ và thân cho thấy cao cloroform từ rễ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* mạnh hơn cao cloroform từ thân, trong khi các cao còn lại (cao *n*-hexan, cao ethylacetat, cao nước) thu được từ thân thể hiện hoạt tính oxy hóa *in vitro* mạnh hơn các cao phân đoạn tương ứng từ rễ.

Nghiên cứu sử dụng quercetin làm chất đối chiếu với giá trị EC₅₀ là 4,94 µg/ml.

3.2.2.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp định lượng MDA

Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử bằng phương pháp định lượng MDA được trình bày trong **Bảng 3.7.** và xem **Phụ lục 19, 20, 21.**

Đối với rễ, cao *n*-hexan, cao cloroform và cao ethyl acetat thể hiện khả năng chống oxy hóa, ngăn peroxyd hóa lipid màng tế bào, làm giảm lượng MDA gấp 26-35 lần cao nước (EC₅₀ của 3 cao 325,91-442,57 µg/ml so với cao nước 11435,16 µg/ml).

Kết quả của các cao phân đoạn từ thân tương tự như các cao phân đoạn từ rễ; tác dụng làm giảm lượng MDA sinh ra từ phản ứng peroxyd hóa lipid của các cao phân đoạn theo thứ tự giảm dần: Cao *n*-hexan > cao cloroform > cao ethyl acetat > cao nước. Cao *n*-hexan, cloroform và ethyl acetat từ rễ thể hiện tác động chống oxy hóa tốt hơn so với cao phân đoạn tương ứng từ thân, ngược lại với tác dụng cao nước.

Bảng 3.7. Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao phân đoạn bằng phương pháp định lượng MDA

Mẫu thử	Rễ			Thân		
	Phương trình hồi quy	R ²	EC ₅₀ (µg/ml)	Phương trình hồi quy	R ²	EC ₅₀ (µg/ml)
Cao <i>n</i> -hexan	$y = -0,00001x^2 + 0,0764x + 26,163$	0,9971	325,91	$y = -0,00003x^2 + 0,0914x + 19,38$	0,9993	383,21

Cao cloroform	$y = -0,00003x^2 + 0,0981x + 14,037$	0,9974	420,73	$y = -0,00002x^2 + 0,0803x + 19,218$	0,9951	429,22
Cao ethyl acetat	$y = -0,00001x^2 + 0,0599x + 25,449$	0,9978	442,57	$y = -0,000004x^2 + 0,046x + 23,438$	0,9960	653,98
Cao nước	$y = -0,0000001x^2 + 0,0049x + 7,044$	0,9935	11435,16	$y = -0,00000008x^2 + 0,006x + 4,6399$	0,9982	8530,21
Quercetin	$y = 0,1807x^2 + 1,948x - 9,0147$	0,9934	13,47			

Trong phương pháp định lượng MDA nghiên cứu sử dụng quercetin làm chất đối chiếu với giá trị EC_{50} là 13,47 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.3. Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao phân đoạn

Kết quả khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư tế bào HepG2 *in vitro* của cao phân đoạn tử rễ ở các nồng độ 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/ml}$ và chất đối chiếu doxorubicin (DOX) được trình bày ở **Bảng 3.8.** và xem **Phụ lục 22.**

Kết quả cho thấy cao ethyl acetat và cao nước không thể hiện hoạt tính độc tế bào; cao *n*-hexan và cao cloroform thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư HepG2, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 10-87%.

Phương trình hồi quy biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ và hoạt tính độc tế bào, giá trị IC_{50} của cao *n*-hexan và cao cloroform được trình bày ở **Bảng 3.9.**

Bảng 3.8. Tác động của cao phân đoạn lên tế bào gan HepG2

Mẫu thử	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	$OD_{570\text{nm}} \pm SD$	% ức chế
Cao <i>n</i> -hexan	100	$0,058 \pm 0,001$	87,1
	50	$0,114 \pm 0,015^{**}$	75,5
	25	$0,393 \pm 0,006^{**}$	16,2
	12,5	$0,464 \pm 0,011$	1,0
Cao cloroform	100	$0,058 \pm 0,001^{**}$	86,7
	50	$0,114 \pm 0,015^{**}$	62,4
	25	$0,393 \pm 0,006^{**}$	24,7
	12,5	$0,464 \pm 0,011$	9,8
Cao ethyl acetat	100	$0,487 \pm 0,006$	-8,1
	50	$0,474 \pm 0,013$	-1,8

	25	$0,538 \pm 0,019^{**}$	-14,8
	12,5	$0,523 \pm 0,016^{**}$	-11,6
Cao nước	100	$0,477 \pm 0,013$	-5,9
	50	$0,495 \pm 0,023$	-6,4
	25	$0,541 \pm 0,021$	-15,4
	12,5	$0,523 \pm 0,023$	-11,6
	100	$0,450 \pm 0,007$	-
Mẫu chứng	50	$0,465 \pm 0,009$	-
	25	$0,469 \pm 0,009$	-
	12,5	$0,469 \pm 0,009$	-
	100	$0,469 \pm 0,009$	-
DOX	10	$0,062 \pm 0,001$	86,8

Bảng 3.9. Hoạt tính độc tế bào gan HepG2 của cao phân đoạn của rễ

Cao thử	Phương trình hồi quy	R²	IC₅₀ (µg/ml)
Cao <i>n</i> -hexan	$y = -0,019x^2 + 3,1921x - 41,674$	0,9709	36,76
Cao cloroform	$y = -0,0101x^2 + 2,0368x - 16,199$	0,9941	40,73

Kết quả cho thấy giá trị IC₅₀ của cao *n*-hexan và cao cloroform sau 72 giờ xử lý với tế bào HepG2 lần lượt là 36,76 µg/ml và 40,73 µg/ml.

3.3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng

Từ kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH cho thấy cả 3 cao ethanol 96% của rễ, thân và lá Xáo tam phân đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa. Tuy nhiên cao thân có khả năng bắt gốc tự do mạnh nhất thể hiện qua việc làm giảm màu của gốc tự do DPPH tốt hơn so với 2 cao còn lại. Vì vậy thân Xáo tam phân được chọn để chiết xuất khối lượng lớn, chiết tách các phân đoạn và phân lập các hợp chất trong phân đoạn có tác dụng sinh học theo hướng chống oxy hóa.

Về hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 và ung thư gan người HepG2, kết quả cho thấy trên cả 2 dòng tế bào, cao ethanol 96% từ rễ Xáo tam phân có hoạt tính độc tế bào ung thư mạnh nhất vì vậy rễ Xáo tam phân được lựa chọn để

chiết xuất khối lượng lớn, chiết tách các phân đoạn và phân lập các hợp chất theo hướng tác dụng gây độc tế bào.

Từ kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và hoạt tính độc tế bào ung thư HepG2 của các cao phân đoạn *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, nước từ thân, rễ theo hướng các cao phân đoạn kém phân cực (*n*-hexan, cloroform) thể hiện hoạt tính mạnh hơn, tốt hơn các cao phân cực (ethyl acetat, nước) nên cao phân đoạn *n*-hexan, cloroform được lựa chọn để phân lập các hợp chất.

3.3.1. Phân lập các hợp chất từ rễ Xáo tam phân

Từ 4,5 kg bột rễ Xáo tam phân được chiết nóng với ethanol 96% (35 lít $\times$ 4 lần), lọc, cô thu hồi dung môi thu được 1,6 L cao lỏng. Cao lỏng được lắc phân bố với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat. Các dịch sau khi lắc phân bố được cô áp suất giảm cho tủa H₀ (82 g, từ phân đoạn *n*-hexan) và các cao *n*-hexan (N₀, 86 g), cao cloroform (C₀, 200 g), cao ethyl acetat (E₀, 40 g) và cao nước (330 g).

Tủa H₀ (82 g) kết tinh trong hệ dung môi *n*-hexan - CHCl₃ (7:3) lọc lấy tủa H₁ (54 g) và cô thu hồi dung môi được cặn H₂.

Tủa H₁ (15 g) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển SKC-1 với pha động *n*-hexan - cloroform (65:35), thu được 3 phân đoạn ký hiệu là SKC-1.1 đến SKC-1.3. Phân đoạn SKC-1.3 (8 g) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong *n*-hexan - ethyl acetat (4:1), lọc và rửa MeOH lạnh thu được tinh thể không màu. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm, đặt tên là **PT-1** (520 mg).

Cặn H₂ (28 g) được tiến hành phân lập sắc ký cột cổ điển SKC-2 pha động *n*-hexan - ethyl acetat (10:1), thu được 11 phân đoạn ký hiệu là SKC-2.1 đến SKC-2.11. Phân đoạn SKC-2.7 (7 g) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong cloroform, lọc và rửa MeOH lạnh thu được tinh thể hình kim, không màu. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm, đặt tên là **PT-2** (300 mg). Phân đoạn SKC-2.10 được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong cloroform, lọc và rửa bằng MeOH lạnh thu được chất bột vô

định hình, màu trắng ngà. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm, đặt tên là **PT-3** (55 mg).

Cao cloroform toàn phần (Co, 25 g) được tiến hành phân lập sắc ký cột chân không VLC-1 với pha động *n*-hexan - ethyl acetat (9:1) → (8:2) → (7:3) → (6:4) → (5:5). Kết quả thu được 11 phân đoạn ký hiệu là VLC-1.1 đến VLC-1.11.

Phân đoạn VLC-1.7 (400 mg): Tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển SKC-3 thu được 5 phân đoạn ký hiệu là SKC-3.1 đến SKC-3.5. Phân đoạn SKC-3.3 (50 mg) được thu hồi dung môi và thu rửa màu đỏ gạch. Kết tinh lại trong cloroform, lọc và rửa bằng MeOH lạnh thu được 10 mg chất bột vô định. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất, đặt tên là **PT-4**. Phân đoạn SKC-3.5 (160 mg) được thu hồi dung môi và thu rửa hình khối màu vàng tươi. Kết tinh lại trong cloroform, lọc và rửa MeOH lạnh thu được 25 mg tinh thể hình kim, màu vàng. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất, đặt tên là **PT-5**.

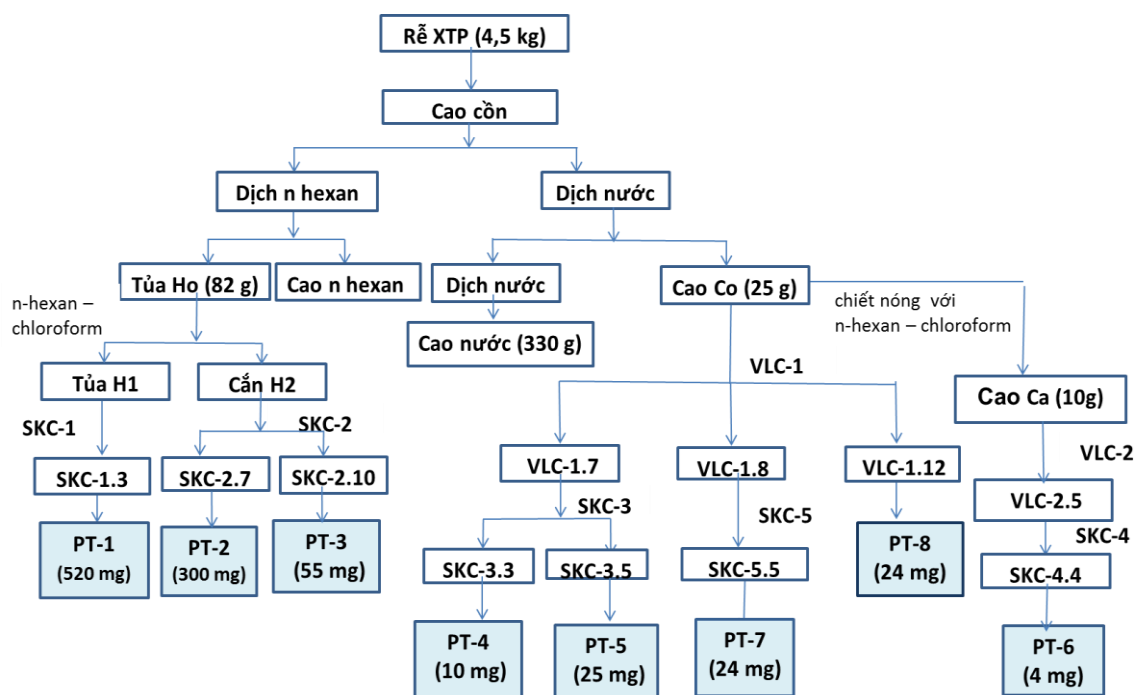
Phân đoạn VLC-1.8 (800 mg) được thu hồi dung môi và thu rửa màu vàng tươi. Rửa phân đoạn VLC-1.8 (110 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển SKC-5 thu được 4 phân đoạn ký hiệu là SKC-5.1 đến SKC-5.4. Phân đoạn SKC-5.4 (50 mg) được thu hồi dung môi và thu kết tinh hình kim, màu vàng nhạt, kết tinh lại trong dung môi *n*-hexan - ethyl acetat (7:3), lọc và rửa MeOH lạnh thu được 24 mg tinh thể. Kiểm tra trên SKLM cho một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm, đặt tên là **PT-7**.

Phân đoạn VLC-1.12 (200 mg) được thu hồi dung môi và thu rửa vô định hình, có màu trắng ngà. Kết tinh lại trong *n*-hexan lạnh, lọc và rửa MeOH lạnh thu được bột vô định hình, không màu. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm và đặt tên là hợp chất **PT-8** (24 mg).

Từ 18 g cao cloroform (Co, 18 g), chiết nóng bằng hỗn hợp dung môi *n*-hexan - cloroform (1:1), lọc và thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu cao Ca (10 g). Cao Ca được phân lập bằng sắc ký cột chân không VLC-2 thu được 11 phân đoạn ký hiệu là VLC-2.1 đến VLC-2.11. Phân đoạn VLC-2.5 (550 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển SKC-4 thu được 7 phân đoạn SKC-4.1 đến SKC-4.7.

Phân đoạn SKC-4.4 (40 mg) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong ethyl acetat, lọc và rửa MeOH lạnh. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm và đặt tên là hợp chất **PT-6** (4 mg).

Sơ đồ phân lập các hợp chất trong rễ Xáo tam phân được trình bày ở **Sơ đồ 3.1**.



Sơ đồ 3.1. Sơ đồ phân lập hợp chất từ rễ Xáo tam phân

3.3.2. Phân lập các hợp chất từ thân Xáo tam phân

Từ 5,3 kg bột thân Xáo tam phân được chiết ngấm kiệt với ethanol 96% thu 90 L dịch chiết. Dịch chiết được cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu 4,3 L cao lỏng. Cao lỏng được lắc phân bố với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần gồm: *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat. Các dịch sau khi lắc phân bố được cô áp suất giảm cho cao *n*-hexan (36 g), cao cloroform (19 g), cao ethyl acetat (39,7 g), cao nước (92 g).

Cao cloroform toàn phần (Co, 17 g) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột chân không VLC-3 với pha động: hệ *n*-hexan - cloroform (5:5), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9), (0:10), thu được 11 phân đoạn ký hiệu là VLC-3.1 đến VLC-3.11.

Phân đoạn VLC-3.5 (200 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC-6) với pha động *n*-hexan - ethyl acetat (6:4) thu được 5 phân đoạn ký hiệu là SKC-6.1 đến SKC-6.5. Phân đoạn SKC-6.5 (50 mg) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong ethyl acetat, lọc và rửa bằng MeOH lạnh thu được tinh thể màu vàng xanh. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất và đặt tên là **PT-9** (12 mg).

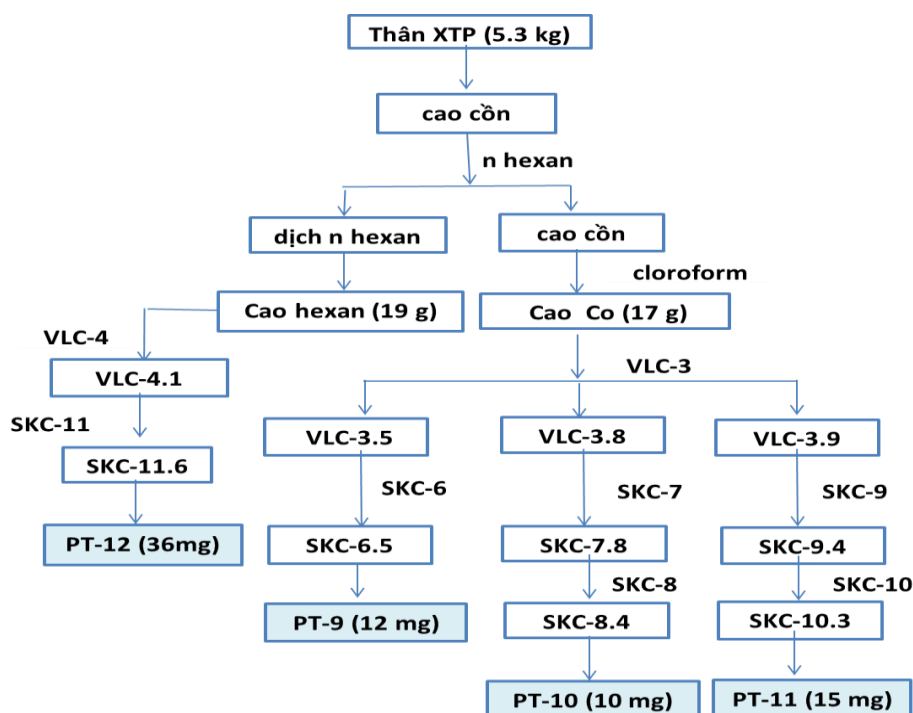
Phân đoạn VLC-3.8 (400 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC-7) với pha động: *n*-hexan - ethyl acetat (6:4) thu được 7 phân đoạn ký hiệu là SKC-7.1 đến SKC-7.7. Phân đoạn SKC-7.4 (80 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC-8) với pha động cloroform - ethyl acetat (8:2) thu được 5 phân đoạn ký hiệu là SKC-8.1 đến SKC-8.5. Phân đoạn SKC-8.4 (20 mg) được thu hồi dung môi và thu rửa. Kết tinh lại trong ethyl acetat, lọc và rửa bằng MeOH lạnh thu được tinh thể vô định hình, màu vàng nhạt. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm và đặt tên là **PT-10** (10 mg).

Phân đoạn VLC-3.9 (350 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC 9) với pha động cloroform - ethyl acetat (9:1) thu được 7 phân đoạn ký hiệu là SKC-9.1 đến SKC-9.7. Phân đoạn SKC-9.4 (90 mg) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC 10) với pha động *n*-hexan - EtOAc (6:4) thu được 7 phân đoạn SKC-10.1 đến SKC-10.7. Phân đoạn SKC-10.3 (30 mg) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong ethyl acetat, lọc và rửa bằng MeOH lạnh thu được dạng dầu, màu vàng nhạt. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất khi phát hiện bằng UV 254 và 365 nm và đặt tên là **PT-11** (15 mg).

Cao *n*-hexan toàn phần (H₀, 30 g) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột chân không VLC-4 với hệ dung môi *n*-hexan - cloroform (100:0), (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (6:4), (7:3), thu được 9 phân đoạn ký hiệu là VLC-4.1 đến VLC-4.9. Phân đoạn VLC-4.1 (5 g) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột cổ điển (SKC-11) với pha động *n*-hexan - cloroform (85:15) thu được 8 phân đoạn ký hiệu là SKC-11.1 đến SKC-11.8. Phân đoạn SKC-11.6 (56 mg) được thu hồi dung môi và thu tinh thể. Kết tinh lại trong *n*-hexan, lọc và rửa MeOH lạnh thu được tinh thể

hình kim, không màu. Kiểm tra trên SKLM cho thấy chỉ có một vết duy nhất và đặt tên là **PT-12** (36 mg).

Quá trình phân lập các hợp chất từ thân Xáo tam phân trình bày ở **Sơ đồ 3.2**.



Sơ đồ 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ thân Xáo tam phân

3.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập

3.4.1. Các dẫn xuất 7-hydroxy coumarin

3.4.1.1. Hợp chất PT-1

PT-1 là tinh thể hình khối không màu, tan trong cloroform, ethyl acetat, methanol, kém tan trong *n*-hexan. **PT-1** cho vết tắt quang dưới UV 254 nm và phát quang màu vàng dưới UV 365 nm, tăng màu trong môi trường kiềm dưới ánh sáng tử ngoại.

Phổ UV (MeOH) của **PT-1** cho cực đại hấp thu tại 200 và 332 nm.

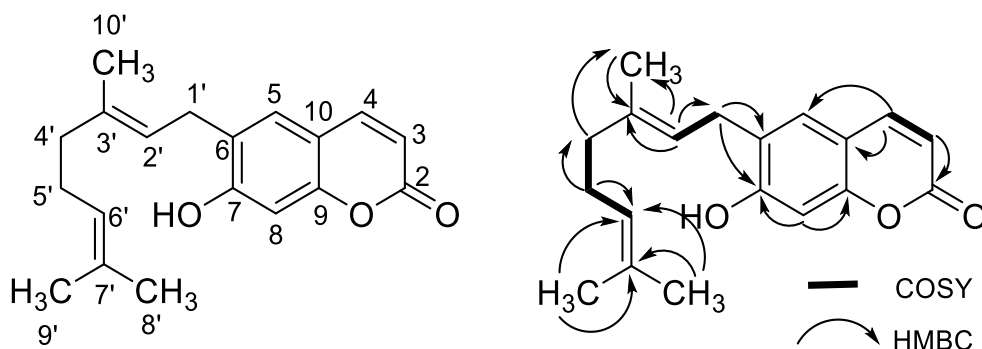
Phổ MS (ES^-) của **PT-1** cho mảnh m/z 297,13 phù hợp với ion $[M-H]^-$. Phổ MS (ES^+) của **PT-1** cho mảnh m/z 299,13 phù hợp với ion $[M + H]^+$ và mảnh m/z 321,13 phù hợp với ion $[M + Na]^+$. Suy ra số khối của **PT-1** là 298,13 tương ứng với công thức phân tử $C_{19}H_{22}O_3$.

Phổ NMR của **PT-1** cho thấy sự hiện diện của 19 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm $-\text{CH}_3$ (δ_{C} 16,2; 17,7 và 25,7 ppm), 3 nhóm $>\text{CH}_2$ (δ_{C} 26,4; 28,4 và 39,7 ppm), 6 nhóm $=\text{CH}-$ (δ_{C} 103,3; 112,4; 120,8; 123,8; 128,3 và 144,1 ppm), 7 carbon bậc 4, trong đó: 6 nhóm $\text{C}_{\text{IV}} \text{ sp}^3$ (δ_{C} 112,3; 125,6; 131,9; 138,9; 154,2; 158,6 ppm) và một nhóm $>\text{C}=\text{O}$ (δ_{C} 162,2 ppm).

Trên phổ ^1H NMR của **PT-1** có 2 tín hiệu doublet có hằng số tương tác $J = 9,5$ Hz ở δ_{H} 6,24 (H-3) và 7,64 (H-4), 2 tín hiệu singlet ở δ_{H} ở 7,2 (H-5) và 7,0 (H-8), cho thấy đây là coumarin bị thế ở vị trí C-6 và C-7. Ngoài ra, trên phổ ^1H NMR của **PT-1** xuất hiện các tín hiệu proton của một mạch nhánh có 3 nhóm vinyl methyl ở δ_{H} 1,61 (H-9'), 1,69 (H-8') và 1,75 (H-10'), hai proton methylen δ_{H} 2,13 (t, 6Hz, H-5') và 2,09 (t, 6 Hz, H-4'), hai triplet của 2 proton olefin ở δ_{H} 5,33 (H-2') và 5,09 (H-6')

Cấu trúc của mạch nhánh và vị trí các nhóm thế của **PT-1** được xác định dựa trên phân tích dữ kiện phổ 2 chiều HSQC, HMBC và COSY. Phổ HMBC cho thấy tương tác giữa các proton methylen của mạch nhánh ở δ_{H} 3,39 (H-1') với cacbon C-6 và C-7, C-2' và C-3', giữa proton H-2' với C-6, C-1', C-4' và C-9' cho phép khẳng định mạch nhánh geranyl (C_{10}) gắn với C-6 của vòng coumarin. Nhóm OH được xác định ở vị trí C-7 do tương tác HMBC giữa H-1' với cacbon C-7 của vòng coumarin ở δ_{C} 158,6.

Các dữ liệu về phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của **PT-1** của ostruthin⁶ cho thấy hoàn toàn phù hợp và có thể khẳng định **PT-1** chính là ostruthin. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-1** so sánh với ostruthin được trình bày ở **Bảng 3.10.**, **Hình 3.1.** và xem **Phụ lục 1.**



Hình 3.1. Cấu trúc của **PT-1** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của **PT-1** so sánh với ostruthin

C	DEPT	PT-1 (CDCl ₃ , 500 MHz)				Ostruthin (CDCl ₃ , 500 MHz)	
		δ_c	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_c	δ_H (J, Hz)
2	C=O	162,2	–	–		162,2	
3	=CH	112,4	6,24 d (9)	2	4	112,4	6,24 d (9,6)
4	=CH	144,1	7,64 d (9,5)	2, 5, 9	3	144,1	7,64 d (9,6)
5	CH	128,3	7,20 s	4, 6, 7, 9		128,3	7,20 s
6	C	125,6	–	–		125,5	
7	C	158,6	–	–		158,5	
8	=CH	103,3	7,00 s	6, 7, 9, 10		103,3	6.97 s
9	C	154,2	–	–		154,2	
10	C	112,3	–	–		112,3	
1'	>CH ₂	28,5	3,40 d (7)	5, 6, 7, 2', 3'	2'	28,5	3,40 d (7,2)
2'	=CH	120,8	5,33 t (5,5)	6, 1', 4', 10'	1'	120,8	5,30 m
3'	C	138,9	–	–		138,9	
4'	>CH ₂	39,7	2,09 m	2', 3', 5', 10'		39,7	2,08 m
5'	>CH ₂	26,4	2,13 m	4', 5, 6', 7'	6'	26,4	2,14 m
6'	=CH	123,8	5,09 t (5,5)	4', 5', 9'	5'	123,8	5,1 m
7'	C	131,9				131,9	
8'	-CH ₃	25,7	1,69 s	6', 7', 9'		25,8	1,69 s
9'	-CH ₃	17,7	1,61 s	6', 7', 8'		17,7	1,61 s
10'	-CH ₃	16,2	1,75 s	2', 3', 4'		16,2	1,75 s

3.4.1.2. Hợp chất PT-2

PT-2 là tinh thể hình kim không màu, tan trong methanol, ethyl acetat, cloroform. **PT-2** cho vết tắt quang dưới UV 254 nm và phát quang màu vàng dưới UV 365 nm, tăng màu trong môi trường kiềm dưới ánh sáng tử ngoại.

Phổ MS (ES⁻) của **PT-2** cho mảnh m/z 327,17 phù hợp với ion [M-H]⁻. Phổ MS (kỹ thuật ES⁺) của PT-2 cho mảnh m/z 329,13 phù hợp với ion [M + H]⁺ và mảnh m/z 351,11 phù hợp với ion [M + Na]⁺. Suy ra số khối của **PT-2** là 328,11 tương ứng với công thức phân tử C₂₀H₂₄O₄.

Phổ UV của **PT-2** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 204 và 332 nm. Phổ NMR của **PT-2** cho thấy sự hiện diện của 20 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm -CH₃ (δ_c 16,2; 17,7 và 25,7 ppm), 3 nhóm >CH₂ (δ_c 26,6; 27,6 và 39,7 ppm), 5 nhóm =CH- (δ_c 112,5; 120,9; 122,4; 124,2 và 144,3 ppm) 8 carbon bậc 4, trong đó: 7 nhóm C_{IV} sp³

(δ_c 112,4; 125,2; 131,5; 133,2; 137,6; 145,3 và 150,0 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_c 160,5 ppm), 1 nhóm $-OCH_3$ (δ_c 61,7 ppm).

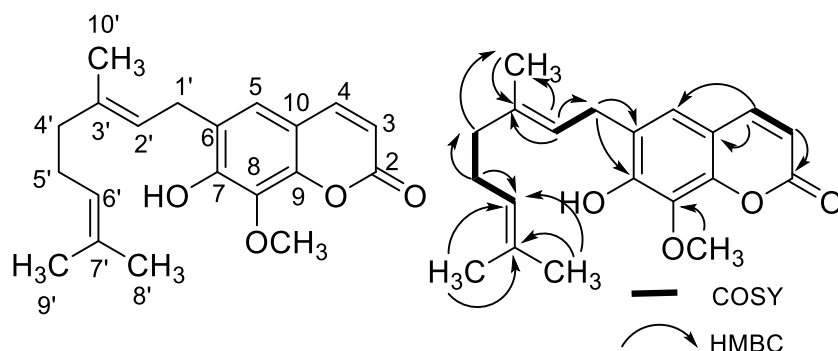
Trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất **PT-2**, tín hiệu cacbon của vòng thơm ở δ_c 133,2 ppm (C-8) chuyển về phía trường thấp hơn so với chất **PT-1** δ_c 103,3 ppm (C-8), đồng thời phổ HMBC của **PT-2** có tương tác 8- OCH_3 /C-8, khẳng định nhóm methoxy được gắn với khung coumarin ở vị trí C-8. Trên phổ HMBC cho phép xác định vị trí mạch nhánh geranyl của hợp chất **PT-2** thông qua các tương tác giữa proton methyl H-1' và H-2' với cacbon C-6, giữa H-1' với C-5 và C-7. Các dữ liệu về phổ 1H NMR và ^{13}C NMR của PT-2 với ostruthin⁵ gần như tương tự nhau, chỉ khác về giá trị δ_c ở C-8 vì có thêm một nhóm thế methoxy và điều này khẳng định qua dữ liệu phổ HSQC, HMBC, COSY và cấu trúc của **PT-2** được xác định là 8-methoxyostruthin. Và các dữ liệu phổ 1H NMR và ^{13}C NMR của **PT-2** cũng phù hợp với hợp chất ninhvanin⁵ đã được công bố trước đây.

Các dữ liệu phổ NMR của **PT-2** so sánh với ostruthin và 8-methoxyostruthin được trình bày ở **Bảng 3.11.**, **Hình 3.2.** và xem **Phụ lục 2.**

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của **PT-2** so sánh với ostruthin, 8-methoxyostruthin

C	DEPT	PT -2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				ostruthin (CDCl ₃ 500 MHz)		8-methoxyostruthin (metanol- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
		δ_c	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_c	δ_H (J, Hz)	δ_c	δ_H (J, Hz)
2	C=O	160,5	—	—		162,2		163,1	
3	=CH	112,5	6,22 d (9)	2	4	112,4	6,24 d (9,6)	112,0	6,14 (1H, d, 9,5)
4	=CH	144,3	7,58 d (9,5)	2, 3	3	144,1	7,64 d (9,6)	146,5	7,74 (1H, d, 9,5)
5	=CH	122,4	6,95 s	7, 9, 1'		128,3	7,20 s	123,7	6,98 (1H, s)
6	C	125,2	—	—		125,5		127,8	
7	C	150,0	—	—		158,5		153,1	
8	C	133,2	—	—		103,3	6,97 s	135,1	
9	C	145,3	—	—		154,2		147,5	
10	C	112,4	—	—		112,3		113,1	
1'	>CH ₂	27,6	3,37 d (7)	5, 6, 7, 2', 3'	2'	28,5	3,40 d (7,2)	28,8	3,31 (2H, d, 7,0)
2'	=CH	120,9	5,33 t (6)	1', 4', 10'	1'	120,8	5,30 m	122,8	5,29 (1H, dt, 1,5, 7,5 Hz)
3'	C	137,6	—	—		138,9		137,7	
4'	>CH ₂	39,7	2,07 m	2', 3', 5', 10'		39,7	2,08 m	40,8	2,02 (2H, t, 7,0)
5'	>CH ₂	26,6	2,11 m	4', 6' 7'	6'	26,4	2,14 m	27,6	2,08 (2H, t,

6'	=CH	124,2	5,10 t (5,5)	8', 9'	5'	123,8	5,1 m	125,3	7,0) 5,07 (1H, m)
7'	C	131,5	—	—		131,9		132,2	
8'	-CH ₃	25,7	1,68 s	6', 7', 9'		25,8	1,69 s	25,9	1,63 (3H, s)
9'	-CH ₃	17,7	1,59 d (9)	6', 7', 8'		17,7	1,61 s	16,2	1,69 (3H, s)
10'	-CH ₃	16,2	1,71 s	2', 3', 4'		16,2	1,75 s	17,8	1,56 (3H, s)
	-OCH ₃	61,7	4,12 s	9				61,8	3,95 (3H, s)



Hình 3.2. Cấu trúc của **PT-2** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.1.3. Hợp chất **PT-7**

PT-7 là tinh thể hình kim vàng nhạt, tan tốt trong cloroform, ethyl acetat, methanol, kém tan trong *n*-hexan. **PT-7** cho vết tắt quang màu xanh nhạt dưới UV 254 nm, phát quang màu xanh da trời dưới UV 365 nm. Tác dụng với thuốc thử VS không cho màu.

Phổ UV (MeOH) của **PT-7** cho cực đại hấp thu tại 206 và 332 nm.

Phổ MS (ACPI) $[M-H]^-$ của **PT-7** cho mảnh m/z 229,11. Do đó **PT-7** có số khối là 230,11, tương ứng với công thức phân tử $C_{14}H_{14}O_3$.

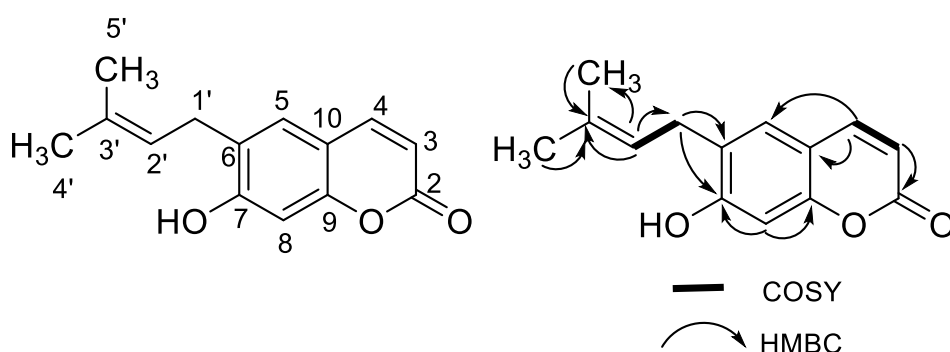
Phổ ^{13}C MNR của **PT-7** cho 14 tín hiệu carbon, trong đó có 1 tín hiệu δ_C 160,5 ppm đặc trưng cho nhóm carbonyl của coumarin. Phổ 1H NMR cho 1 tín hiệu cộng hưởng ở δ_H (10,54 ppm; s) của OH phenol tại C-7, 4 tín hiệu proton của methin thơm trong vùng δ_H 6 – 8 ppm, trong đó có 2 tín hiệu proton δ_H (7,90 ppm; d) và δ_H (6,16 ppm; d) ghép nhau tạo hằng số ghép 9,5 Hz đặc trưng cho H-3 và H-4 vòng α -pyron của coumarin, vì vậy tín hiệu proton δ_H (7,33 ppm; s) và δ_H (6,74 ppm; s) phải là của H-5 và H-8 trên vòng benzo coumarin. Với cấu trúc và tính chất đã nêu, **PT-7** là một coumarin có 1 nhóm thế $-C_5H_9$ tại vị trí C-6 và 1 nhóm -OH tại C-7.

Tín hiệu δ_H (1,67 ppm; 3H; s) và δ_H (1,71 ppm; 3H; s) cho thấy có 2 nhóm $-\text{CH}_3$ trong thành phần nhóm thế $-\text{C}_5\text{H}_9$. Dựa vào phổ DEPT, HSQC, HMBC cho thấy δ_C 39,0 ppm là một carbon bậc II và gắn trực tiếp với coumarin tại C-6. Do đó, nhóm thế được xác định là nhóm prenyl ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

Cấu trúc của **PT-7** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (^1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-7** và demethylsuberosin¹³ đã được công bố trong các tài liệu thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-7** là phù hợp với demethylsuberosin. Như vậy, **PT-7** chính là demethylsuberosin. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-7** được trình bày ở **Bảng 3.12.**, **Hình 3.3.** và xem **Phụ lục 7.**

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của **PT-7** so sánh với demethylsuberosin

No	DEPT	PT-7/ DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz)				Demethylsuberosin/ CDCl ₃ (300 MHz)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_C	δ_H (J, Hz)
2	C	160,5	-	-	-	162,9	-
3	CH	111,2	6,16 d (9,5)	2, 10	4	112,0	6,24 d (9,3)
4	CH	144,5	7,90 d (9,5)	2, 3, 5, 9, 10	3	144,7	7,67 d (9,3)
5	CH	128,3	7,33 s	4, 7, 8, 9, 1'	-	128,1	7,21 s
6	C	125,5	-	-	-	126,4	-
7	C	158,9	-	-	-	158,9	-
8	CH	101,5	6,74 s	6, 7, 9, 10	-	102,8	7,00 s
9	C	153,6	-	-	-	155,6	-
10	C	111,0	-	-	-	112,0	-
1'	CH ₂	27,3	3,24 d (7,0)	5, 6, 7, 2'	2'	28,0	3,38 d (7,2)
2'	CH	122,0	5,29 m	1', 4', 5'	1', 4	121,2	5,31 d (7,2)
3'	C	132,0	-	-	-	134,3	-
4'	CH ₃	25,5	1,71 s	2', 3'	1', 2'	25,8	1,79 s
5'	CH ₃	17,6	1,67 s	2', 3'	-	17,8	1,75 s



Hình 3.3. Cấu trúc của **PT-7** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.1.4. Hợp chất **PT-9**

PT-9 là tinh thể hình kim có màu vàng xanh, tan tốt trong cloroform, tan được trong ethyl acetat, tan vừa trong methanol, không tan trong *n*-hexan.

Dưới UV 254/365 nm; **PT-9** cho vết phát quang màu xanh da trời. **PT-9** không cho màu với thuốc thử VS. Phổ UV của **PT-9** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 202,2 và 332,9 nm.

Phổ MS (ESI) của **PT-9** cho mảnh m/z 245,38 tương ứng với ion $[M-H]^-$. Suy ra số khối của **PT-9** là $M = 246,38$, tương ứng với công thức phân tử $C_{14}H_{14}O_4$.

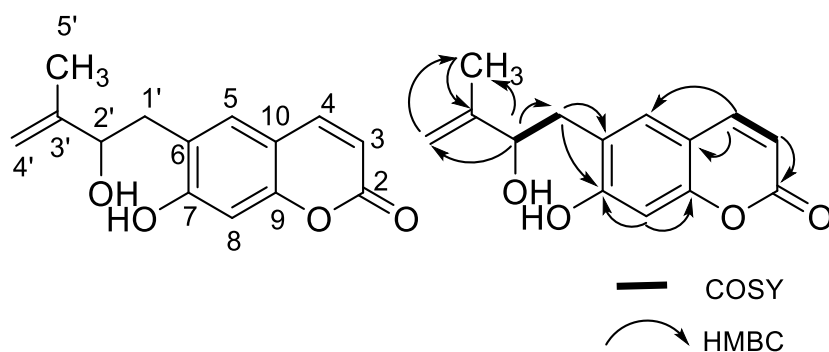
Phổ ^{13}C NMR của **PT-9** cho thấy sự hiện diện của 14 tín hiệu carbon, trong đó có: 1 nhóm $-CH_3$ (δ_c 17,7 ppm), 2 nhóm $>CH_2$ (δ_c 35,8; 110,1 ppm), 5 nhóm $=CH-$ (δ_c 73,4; 101,5; 111,2; 130,5 và 144,6 ppm), 6 carbon bậc 4, trong đó: 5 nhóm C_{IV} sp^3 (δ_c 110,8; 123,6; 147,9; 153,8; 159,4 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_c 160,6 ppm).

Dữ liệu phổ 1H NMR của **PT-9** là 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin)¹⁴⁴ phân lập từ *Boronia lanceolata* F.Muell. Rutaceae được trình bày ở **Bảng 3.13.**, **Hình 3.4.** và xem **Phụ lục 9**. ^{13}C NMR của **PT-9** được so sánh với 6-(2'-hydroxy-3'-hydroxymethylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin phân lập từ *Aegle marmelos*¹⁴⁵.

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của **PT-9** so sánh với 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin và 6-(2'-hydroxy-3'-hydroxymethylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin

C	DEPT	PT-9 (DMSO- d_6)				6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin (DMSO- d_6))	6-(2'-hydroxy-3'-hydroxymethylbut-3'-enyl-7-hydroxycoumarin (CDCl $_3$))
		δ_c	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_H (J, Hz)	δ_c

2	C	160,6	–	–	–	–	162,5
3	CH	111,2	6,16 d (9,5)	2, 10	4	6,23 d (9,4)	111,5
4	CH	144,6	7,89 d (9,5)	2, 9, 5, 10	3	7,59 d (9,4)	144,3
5	CH	130,5	7,39 s	7, 9, 4, 8, 1'	–	7,13s	130,2
6	C	123,6	–	–	–	–	123,6
7	C	159,4	–	–	–	–	159,8
8	CH	101,5	6,72 s	7, 9, 6, 10	–	6,88 s	103,1
9	C	153,8	–	–	–	–	154,1
10	C	110,8	–	–	–	–	111,6
1'	CH ₂	35,8	2,79 dd (13,5; 5) 2,61 dd (13,5; 7,5)	7, 3', 5, 6, 2'	2'	3,01 dd (14,9; 7,8) 2,89 dd (14,9; 2,0)	37,4
2'	CH	73,4	4,18 m	3', 4', 1', 5', 6	1'	4,45 m	73,4
3'	C	147,9	–	–	–	–	149,5
4'	CH ₂	110,1	4,77 m 4,68 m	2', 5'	–	5,01 m 5,01 m	111,3
5'	CH ₃	17,7	1,72 s	3', 4', 2'	–	1,72 s	62,8



Hình 3.4. Cấu trúc của **PT-9** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.1.5. Hợp chất PT-10

PT-10 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng nhạt, tan tốt trong cloroform, tan vừa trong methanol và ethylacetat, không tan trong *n*-hexan.

Dưới UV 254/365 nm; **PT-10** cho vết phát quang màu xanh da trời. **PT-10** cho màu xanh lục nhạt với thuốc thử VS.

Phổ UV của **PT-10** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 203,4 và 334,1 nm.

Phổ MS (ESI) của **PT-10** cho mảnh m/z 313,29 tương ứng với ion $[M-H]^-$. Suy ra số khối của **PT-10** là $M = 314,29$ tương ứng với công thức phân tử $C_{19}H_{22}O_4$.

Phổ NMR của **PT-10** cho thấy sự hiện diện của 19 tín hiệu carbon, trong đó: 2 nhóm $-CH_3$ (δ_c 16,1; 17,6 ppm) 4 nhóm $>CH_2$ (δ_c 27,3; 33,3; 35,3; 109,9 ppm), 6 nhóm $=CH-$ (δ_c 73,5; 101,6; 111,2; 121,5; 128,4 và 144,6 ppm), 7 carbon bậc 4, trong đó: 6 nhóm $C_{iv} sp^3$ (δ_c 111; 125,6; 136; 148,2; 153,7; 159 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_c 160,6 ppm).

Trên phổ 1H NMR xuất hiện hai tín hiệu duplet tương ứng với hai proton của vòng thơm H-4 [δ_H 7,9 (1H, d, 9,5)] và H-3 [δ_H 6,16 (1H, d, 9)]. Hai singlet ở δ_H 6,74 (H-8) và 7,33 (H-5), cho thấy đây là một coumarin thế hai lần ở vị trí C-6 và C-7. Ngoài ra, trên phổ 1H NMR còn xuất hiện các tín hiệu của mạch nhánh dạng axyclic terpen (monoterpen không vòng) được tạo thành từ bộ khung hai đơn vị *iso*-C5, với tín hiệu hai nhóm methyl CH_3-9' (δ_H 1,62, s), CH_3-10' (δ_H 1,66, s), proton nhóm hydroxylmetin H-6' (δ_H 3,84, m), hai proton olefin H-8' (δ_H 4,83; 4,71), H-2' (δ_H 5,28).

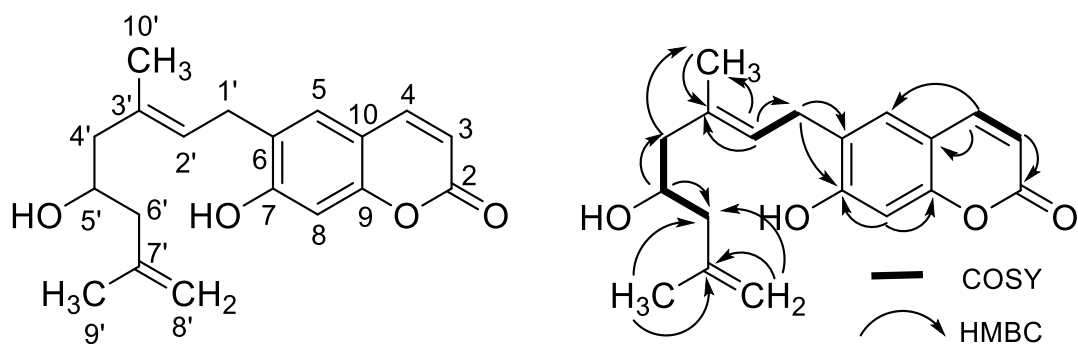
Trên phổ HMBC xuất hiện các tương tác trong vòng coumarin ở H-4/C-2, C-9, C5, H-8/ C-7, C-6, C-9, C-10, H-5/C-7, C-9. Vị trí thế 6 của vòng coumarin được khẳng định nhờ tương tác giữa H-1' (δ_H 3,24) và C-5, C-6, C-7. Mạch nhánh (*iso*-C5)₂ còn cho thấy các tương tác trên phổ hai chiều HMBC ở H-4'/C-9', H-2'/C-9', H-1'/C-3', H-5'/C-3'. Vị trí proton olefin và nhóm hydroxyl hay các nhóm metylen, methyl phù hợp với các tương tác ở H-1'/H-2', H-4'/H-5' (COSY).

Cấu trúc của **PT-10** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-10** và 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin⁸ đã được công bố trong các tài liệu thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-10** là phù hợp với 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin. Như vậy, **PT-10** chính là 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-

hydroxycoumarin. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-10** được trình bày ở **Bảng 3.14.**, **Hình 3.5.** và xem **Phụ lục 10.**

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của **PT-10** so sánh với 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin)

C	DEPT	PT-10 (DMSO- <i>d</i> ₆)				6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin (CDCl ₃ (100 MHz)	
		δ _c	δ _H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ _c	δ _H (J, Hz)
2	C	160,6	–	–	–	162,2	
3	CH	111,2	6,16 d (9)	2, 10	4	112,3	6,26 d (9,3)
4	CH	144,6	7,9 d (9,5)	2, 9, 5	3	144,1	7,67 d (9,3)
5	CH	128,4	7,33 s	7, 9, 4, 1'	–	128,4	7,38 s
6	C	125,6	–	–	–	125,6	
7	C	159,0	–	–	–	158,5	
8	CH	101,6	6,74 s	7, 9, 6, 10	–	103,1	6,97 s
9	C	153,7	–	–	–	154,1	
10	C	111,0	–	–	–	112,2	
1'	CH ₂	27,3	3,24 d (7,5)	2', 3', 5, 6, 7	2'	28,6	3,65 d (7,4)
2'	CH	121,5	5,28 m	1', 4', 10'	1'	121,7	5,72 m
3'	C	136,0	–	–	–	137,9	
4'	CH ₂	35,3	2,03 m 1,93 m	2', 3', 5', 10'	5'	35,8	2,38 (2H, m)
5'	CH ₂	33,3	1,51 m	4', 6'	4'; 6'	32,9	1,95 (2H, m)
6'	CH	73,5	3,84 m	8'	–	75,9	
7'	C	148,2	–	–	–	147,1	
8'	CH ₂	109,9	4,83 m 4,71 s	6', 9'	–	111,3	4,37 (t, 6,7)
9'	CH ₃	17,6	1,62 s	6', 7', 8'	–	17,7	1,86 (3H, brs)
10'	CH ₃	16,1	1,66 s	2', 3', 4'	–	16,2	1,82 (3H, d, 1,3)
–	-OH		4,68 d (4)	6'	–		
–	-OH		10,61 s	–	–		



Hình 3.5. Công thức **PT-10** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.1.6. Hợp chất **PT-11**

PT-11 thu được dưới dạng dầu, màu vàng nhạt, tan tốt trong cloroform, tan được trong methanol và ethyl acetat, không tan trong *n*-hexan. Dưới UV 254/365 nm; **PT-11** cho vết phát quang xanh da trời. **PT-11** cho màu xanh lục nhạt với thuốc thử VS.

Phổ UV của **PT-11** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 203,4 và 332,3 nm.

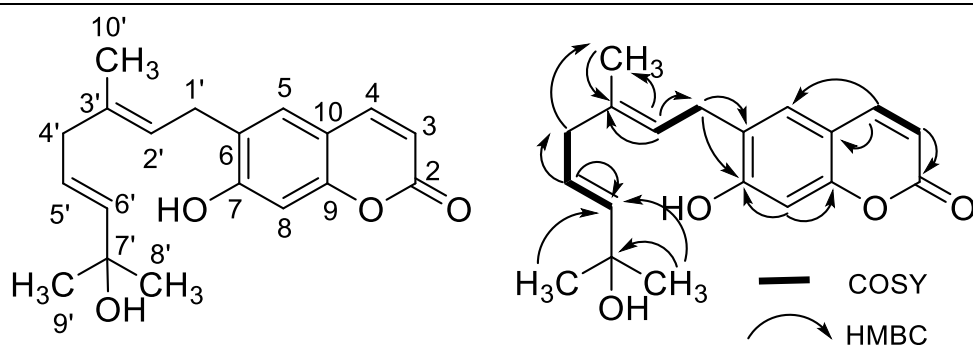
Phổ MS (ESI) của **PT-11** cho mảnh m/z 313,19 tương ứng với ion $[M-H]^-$. Suy ra số khối của **PT-11** là $M = 314,19$ tương ứng với công thức phân tử $C_{19}H_{22}O_4$.

Phổ ^{13}C NMR của **PT-11** cho thấy sự hiện diện của 19 tín hiệu carbon, trong đó có: 3 nhóm $-CH_3$ (δ_C 15,9; 30,1 ppm), 2 nhóm $>CH_2$ (δ_C 27,4; 41,9 ppm), 7 nhóm $=CH-$ (δ_C 101,6; 111,3; 123,3; 123; 128,4; 140,8 và 144,6 ppm), 7 carbon bậc 4, trong đó: 6 nhóm $C_{IV} sp^3$ (δ_C 68,8; 111; 125,5; 135,1; 153,7; 159 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_C 160,6 ppm).

Cấu trúc của **PT-11** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-11** và 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin¹⁹ đã được công bố trong các tài liệu thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-11** là phù hợp với 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin. Như vậy, **PT-11** chính là 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-11** được trình bày ở **Bảng 3.15.**, **Hình 3.6.** và xem **Phụ lục 11.**

Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của **PT-11** so sánh với 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin

C	DEP T	PT-11 (DMSO-d ₆)				6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin/ (CDCl ₃ , 100 MHz)	
		δ_c ppm	δ_H ppm, m (J, Hz)	HMBC	CO SY	δ_c ppm	δ_H ppm, m (J, Hz)
2	C	160,6	—	—	—	162,2	
3	CH	111,3	6,16 d (9,5)	2, 10	4	112,2	6,21 d (9,4)
4	CH	144,6	7,88 d (9,5)	2, 9, 5	3	144,1	7,62 d (9,4)
5	CH	128,4	7,33 s	7,9, 4,1'	—	128,3	7,17 s
6	C	125,5	—	—	—	125,6	
7	C	159,0	—	—	—	154,1	
8	CH	101,6	6,74 s	6,7, 9, 10	—	103,1	6,95 s
9	C	153,7	—	—	—	154,1	
10	C	111,0	—	—	—	112,2	
1'	CH ₂	27,4	3,25 d (7)	2', 3', 5, 6, 10	2'	28,4	3,37 d (7,4)
2'	CH	122,3	5,32 m	1', 4', 10'	1'	122,0	5,34 (1H, brt)
3'	C	135,1	—	—	—	137,0	
4'	CH ₂	41,9	2,65 d (7)	2', 3', 5', 6'	5'	42,3	2,38 (2H, m)
5'	CH	123,0	5,47 m	4', 6', 7'	4'	124,8	5,65 (1H,dt)
6'	CH	140,8	5,56	4', 5', 7', 8', 9'	—	139,6	5,67 (1H, t)
7'	C	68,8	—	—	—	71,1	
8', 9'	2 CH ₃	30,1	1,15 s	6', 7'	—	29,8	1,34 (3H,s)
10'	CH ₃	15,9	1,65 s	2', 3',4'	—	16,3	1,71 (3H,br,s)
	-OH		10,62 s	6, 7, 8	—		
—	-OH		4,44 d (4)	6'	—		

**Hình 3.6.** Cấu trúc của **PT-11** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.2. Các dẫn xuất pyranocoumarin

3.4.2.1. Hợp chất PT-3

PT-3 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng ngà, tan tốt trong methanol, tan được trong ethyl acetat, cloroform, không tan trong *n*-hexan. **PT-3** phát huỳnh quang sáng dưới UV 254 nm và 365 nm, tăng màu trong môi trường kiềm dưới ánh sáng tử ngoại.

Phổ MS (ES^-) của **PT-3** cho mảnh m/z 227,18 phù hợp với ion $[M - H]^-$. Phổ MS (ES^+) của **PT-3** cho mảnh m/z 229,05 phù hợp với ion $[M + H]^+$ và mảnh m/z 251,03 phù hợp với ion $[M + Na]^+$. Suy ra số khối của **PT-3** là 228,05 tương ứng với công thức phân tử $C_{14}H_{12}O_3$.

Phổ UV của **PT-3** đo trong MeOH cho λ_{max} ở 225, 267, 348 nm.

Phổ ^{13}C NMR của **PT-3** cho thấy sự hiện diện của 14 tín hiệu carbon, trong đó có: 2 nhóm $-CH_3$ (δ_C 27,9 ppm), 6 nhóm $=CH-$ (δ_C 131,3; 144,2; 125,5; 120,4; 112,6 và 103,3 ppm), 6 carbon bậc 4, trong đó: 5 nhóm $C_{iv} sp^3$ (δ_C 118,1; 156,1; 112,2; 77,6 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_C 160,1 ppm).

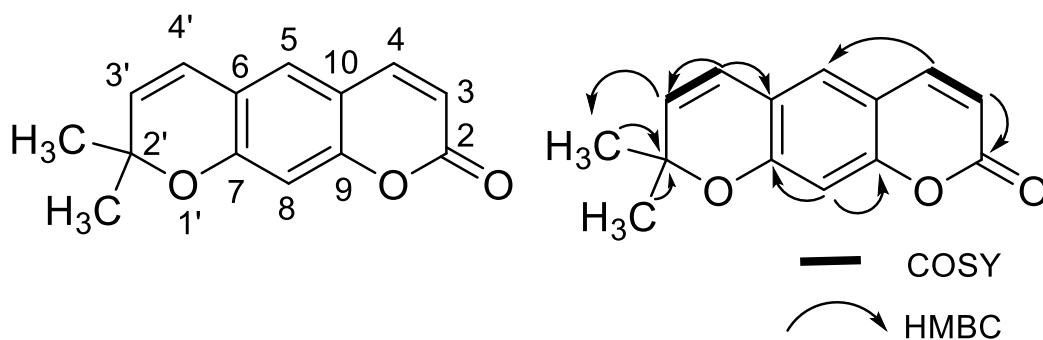
Trong phổ HMBC, cho thấy hai tín hiệu hydro tại δ_H 7,40 (H-5) được liên kết với các tín hiệu carbon tại δ_C 156,1 (C-7), 154,8 (C-9), 144,2 (C-4) và 120,4 (C-8). Tín hiệu hydro ở δ_H 6,76 (H-8) được liên kết với tín hiệu carbon ở δ_C 156,1 (C-7), 112,6 (C-10) và 118,1 (C-6). Tín hiệu hydro tại δ_H 6,48 (H-4') được liên kết với tín hiệu carbon tại δ_C 156,1 (C-7), 118,1 (C-6), 125,5 (C-5) và 77,6 (C-2'). Tín hiệu hydro ở δ_H 6,20 (H-3) được liên kết với tín hiệu carbon ở δ_C 160,1 (C-2) và 112,6 (C-10). Tín hiệu hydro tại δ_H 5,84 (H-3') được liên kết với các tín hiệu carbon tại δ_C 118,1 (C-6), 77,6 (C-2') và 27,9 (C-5'/ 6'). Tín hiệu hydro ở δ_H 1,41 (H- 5'/ 6') được liên kết với tín hiệu carbon ở δ_C 131,3 (C-3 ') và 77,6 (C-2').

Cấu trúc của **PT-3** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-3** và xanthyletin¹³⁵ đã được công bố trong các tài liệu thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-3** là phù hợp với xanthyletin. Như vậy, **PT-3** chính là xanthyletin. Dữ

liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-3** được trình bày ở **Bảng 3.16.**, **Hình 3.7.** và xem **Phụ lục 3.**

Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của **PT-3** so sánh với xanthyletin

C	DEPT	PT -3 (DMSO- d_6)				xanthyletin (CD $_3$ OD)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ Cn)	COSY (H $\rightarrow$ Hn)	δ_C	δ_H (J, Hz)
2	C=O	160,1	—	—		158,6	
3	CH	131,3	6,26 d (9,5)	2, 10	4	129,9	6,21 d (9,6)
4	CH	144,2	7,92 d (9,5)	2, 10, 5, 9	3	142,3	7,85 d (9,6)
5	CH	125,5	7,40 s	4, 8, 7, 3', 9'		124,2	7,34 s
6	C	118,1	—	—		117,2	
7	C	156,1	—	—		155,4	
8	CH	120,4	6,76 s	10, 6, 7		119,4	6,49 s
9	C	154,8	—	—		154,3	
10	C	112,6	—	—		111,6	
2'	C	77,6	—	—		76,3	
3'	CH	103,3	5,84 d (10)	5', 2', 6	4'	102,3	5,85, d (9,6)
4'	CH	112,6	6,48 d (10)	2', 6, 5, 7	3'	111,6	6,67, s
5', 6'	2CH $_3$	27,9	1,41 s	2', 3		26,3	1,47, s



Hình 3.7. Cấu trúc của **PT-3** và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.2.2. Hợp chất **PT-6**

PT-6 là tinh thể hình khối, màu vàng, tan trong cloroform, rất kém tan trong ether dầu hỏa. **PT-6** cho vết tắt quang dưới UV 254 nm, phát quang màu xanh dương với UV 365 nm và cho màu với thuốc thử VS. **PT-6** cho kết quả dương tính với phản ứng định tính coumarin.

Phổ MS (ESI) cho mảnh ion $[M+Na]^+$ ở m/z 337,13. Suy ra số khối của **PT-6** là 314,13, tương ứng với công thức phân tử, công thức phân tử của **PT-6** là $C_{19}H_{22}O_4$.

Phổ 1H NMR cho các mũi cộng hưởng với sự hiện diện của 3 nhóm methyl $\{[\delta_H$ 1,33 (3H, s, -Me)], $[\delta_H$ 1,63 (3H, s, -Me)], $[\delta_H$ 1,69 (3H, s, -Me)] $\}$, 3 nhóm CH_2 $\{[\delta_H$ 3,28 (ddd); 3,15 (ddd)]; $[\delta_H$ 1,58 (m); 1,50 (m)]; $[\delta_H$ 2,17 (m); 2,10 (m)] $\}$ và các tín hiệu proton vòng thơm $[\delta_H$ 7,58 (1H, d; $J=9,5$ Hz), δ_H 7,21 (s), δ_H 6,20 (1H, d; $J=9,5$ Hz), δ_H 6,73 (s)]. Phổ 1H NMR cũng cho thấy sự hiện diện của một nhóm C-prenyl tại $[\delta_H$ 2,17 (H-2'', m); 2,10 (H-2'', m)], δ_H 5,13 (H-3'', ttt, $J=1,0$ Hz; 6,0 Hz và 7,0 Hz), δ_H 1,69 (H-5'', s) và δ_H 1,63 (H-6'', s).

Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ DEPT 90 và DEPT 135 cho các mũi cộng hưởng ứng với sự hiện diện của 19 tín hiệu, tương ứng với 19 carbon bao gồm 3 nhóm CH_2 , 3 nhóm CH_3 , 6 nhóm CH và 7 carbon bậc IV.

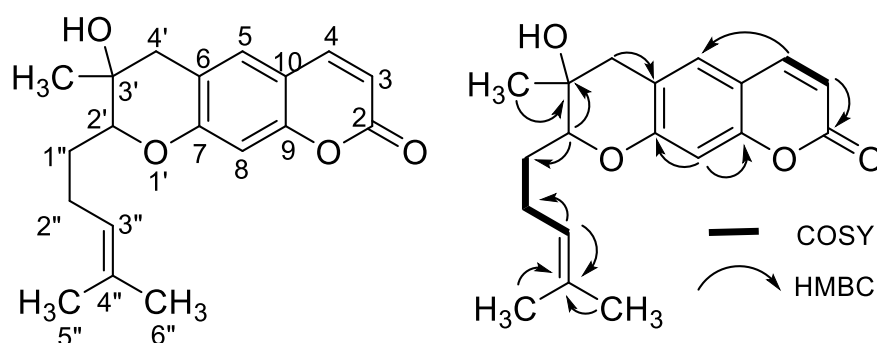
Trong phổ HMBC, tín hiệu proton của nhóm methyl δ_H 1,69, δ_H 1,63 cho tương quan với cùng một carbon ở δ_C 132,4 ppm (C-4''), xác định được vị trí hai nhóm methyl H₃-5'' (δ_H 1,69, s); H₃-6'' (δ_H 1,63, s) gắn vào C-4''. Thêm vào đó, proton ở δ_H 5,13 (1H, ttt, $J=1$; 6 và 7, H-3'') cho tương quan với δ_C 37,2; δ_C 22,0 cho phép ta dự đoán hai carbon này lần lượt C-1''; C2'' và phần C-prenyl gắn vào C-1'' (δ_C 37,2). Ngoài ra, phổ HMBC cũng cho tín hiệu giao giữa proton δ_H 1,33 và carbon ở δ_C 73,6 (C-3'). Bên cạnh đó, C-3' có δ_C 73,6 ppm có thể dự đoán có nhóm OH ở vị trí carbon này, C-2'' có δ_C 90,6. So sánh đối chiếu tài liệu có thể xác nhận vị trí của hai carbon này¹³⁶. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-6** và paramicoumarin B¹⁵⁸ đã được công bố trong các tài liệu thì PT-6 và paramicoumarin B gần như tương tự nhau, chỉ khác là PT-6 có thêm 1 nhóm OH và khác biệt về giá trị δ_C ở C3 vì có thêm một nhóm thế hydroxy.

Căn cứ vào các phân tích trên, hợp chất **PT-6** thuộc nhóm pyranocoumarin công thức được đề nghị là 3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin.

Phổ NMR của **PT-6** được tóm tắt theo **Bảng 3.17**. và xem **Phụ lục 6**.

Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của **PT-6** so sánh với paramicoumarin B

C	DEPT	PT6 (DMSO- <i>d</i> ₆)			paramicoumarin B	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (J, Hz)
2	=C=	161,4			160,7	
3	=CH-	112,3	6,20 (d; 9,5Hz)	10, 2	113,7	6,20 (d; 9,5Hz)
4	=CH-	143,7	7,58 (d; 9,5 Hz)	2, 9, 5, 10	144,5	7,58 (d; 9,5 Hz)
5	=CH-	123,4	7,21(s)	7, 9, 4, 4',10	124,6	7,21(s)
6	=C=	125,1			120,7	
7	=C=	163,2			156,3	
8	=CH-	97,9	6,73(s)	7, 9, 6, 10	104,2	6,73(s)
9	=C=	155,7			155,0	
10	=C=	112,8			113,7	
2'	=CH-	90,6	4,76 (dd; 8,5 Hz)	4', 1''	81	4,76 (dd; 8,5 Hz)
3'	=C=	73,6			130,9	
4'	-CH ₂ -	29,2	3,28 (ddd); 3,15 (ddd)		122,2	3,28 (ddd); 3,15 (ddd)
1''	-CH ₂ -	37,2	1,58 (m); 1,50 (m)		42,3	1,58 (m); 1,50 (m)
2''	-CH ₂ -	22,0	2,17 (m); 2,10 (m)		23,4	2,17 (m); 2,10 (m)
3''	=CH-	123,9	5,13 (ttt; 1;6;7 Hz)	5'', 2'', 6'', 1''.	124,8	5,13 (ttt; 1;6;7 Hz)
4''	=C=	132,4			132,2	
5''	-CH ₃	25,7	1,69 (s)	4'', 3''	25,8	1,69 (s)
6''	-CH ₃	17,7	1,63 (s)	4'', 3''	17,7	1,63 (s)
3'-Me	-CH ₃	22,9	1,33 (s)	3', 2', 1''	22,9	1,33 (s)

**Hình 3.8.** Cấu trúc của **PT-6** (3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin) và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

Kiểm tra trên cơ sở dữ liệu của Reaxys và Scifinder ngày 30/7/2022, thì cấu trúc hợp chất **PT-6** (là 3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin) chưa được công bố. Do đó, hợp chất **PT-6** được xem là chất mới, lần đầu được phân lập, xác định cấu trúc.

3.4.3. Các dẫn xuất acridon alkaloid

3.4.3.1. Hợp chất **PT-4**

PT-4 là bột vô định hình, màu vàng tươi, tan tốt trong methanol, tan được trong ethyl acetat, tan vừa trong cloroform, không tan trong *n*-hexan.

Trên bản mỏng silica gel F₂₅₄; **PT-4** cho vết tắt quang dưới UV 254 nm và phát quang màu tối dưới UV 365 nm. Phổ UV của **PT-4** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 409, 338, 267 nm.

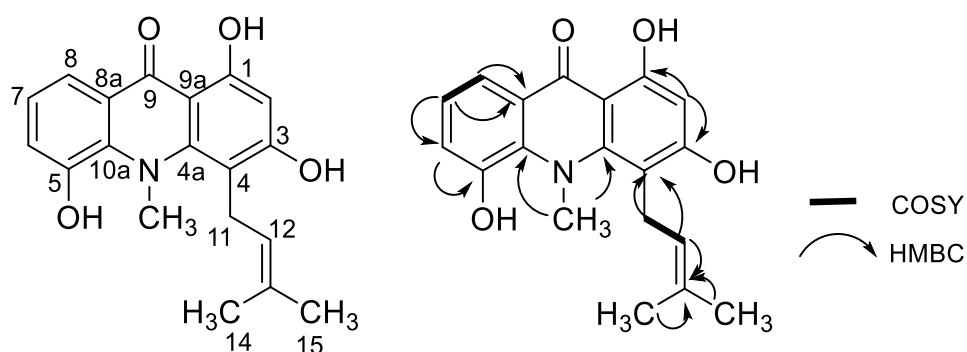
Phổ MS (ES⁻) của **PT-4** cho mảnh m/z 324,20 tương ứng với ion [M-H]⁻. Phổ MS (ES⁺) của **PT-4** cho mảnh m/z 348,00 tương ứng với ion [M+Na]⁺ và mảnh m/z 326,07 tương ứng với ion [M+H]⁺. Suy ra số khối của **PT-4** là $M = 325,07$ tương ứng với công thức phân tử C₁₉H₁₉NO₄.

Phổ NMR của **PT-4** cho thấy sự hiện diện 19 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm -CH₃, (δ_C 47,6; 17,8 và 25,4 ppm), 1 nhóm methylen (δ_C 25,5 ppm) 5 nhóm =CH-sp² (δ_C 96,8; 119,6; 122,9; 115,1 và 123,7 ppm); 10 carbon bậc 4 trong đó 9 nhóm C_{IV} sp³ (δ_C 161,5; 163,8; 107,2; 148,5; 106,1; 150,4; 137,6; 124,1 và 130,7 ppm) và 1 nhóm >C=O (δ_C 181,6 ppm). Với các dữ liệu phổ như trên có thể khẳng định hợp chất **PT-4** là dẫn xuất của alkaloid nhân acridon. Ngoài ra phổ ¹H NMR có sự hiện diện của nhóm γ,γ -dimethylallyl ở δ_H 1,66 (3H, s); 1,72 (3H, s); 3,39 (2H, t); 5,29 (1H, t). Một nhóm hydroxyl ở δ_H 14,10 (1H, s) được gán cho vị trí C₁, (do liên kết hydrogen với oxy ở C₉ (C=O), 2 nhóm hydroxid còn lại với δ_H 10,31 (1H, s) và 10,68 (1H, s) được cho là liên kết với C₃ (δ_C 163,8 ppm) và C₅ (δ_C 148,6 ppm). Các proton thơm với δ_H 7,21 (d; 7,5); 7,16 (t; 8,0); 7,61 (d; 7,5); 6,23 (s) và một nhóm N-methyl δ_H 3,57 (s). Proton δ_H 6,23 (s) được gán cho vị trí C₂, nhóm prenyl liên kết với C₄.

Cấu trúc của **PT-4** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (^1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-4** và oriciacridon đã được công bố trong các tài liệu¹⁴⁹ thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-4** là phù hợp với oriciacridon. Như vậy, **PT-4** chính là oriciacridon. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-4** được trình bày ở **Bảng 3.18.**, **Hình 3.9.** và xem **Phụ lục 4.**

Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của **PT4** so sánh với ociriacridon

C	DEPT	PT-4 (DMSO- d_6)				Ociriacridon (CD $_3$ OD)	
		δ_c	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_c	δ_H (J, Hz)
1	1-C	161,6	—	—	—	162,1	
2	2-CH	96,8	6,23s	9a, 4,1, 3	—	96,7	6,17 (1H, s)
3	3-C	163,8	—	—	—	164,3	
4	4-C	107,2	—	—	—	107,9	
5	C (4a)	150,4	—	—	—	151,1	
6	5-C	148,6	—	—	—	148,7	
7	6-CH	119,6	7,21 d (8)	8, 10a	—	119,2	7,08 (1H, d, 7,6)
8	7-CH	123,0	7,16 t	8a, 5	7,61	122,7	7,04 (1H, t, 7,8)
9	8-CH	115,1	7,61 d (7,5)	6, 10a, 9	7,16	115,7	7,62 (1H, d, 7,6)
10	C (8a)	124,1	—	—	—	124,6	
11	9-C	181,6	—	—	—	182,5	
12	C (9a)	106,1	—	—	—	106,7	
13	10-N-CH $_3$	47,6	3,57 s	10a, 4a	—	46,5	3,56 (3H, s)
14	C (10a)	137,6	—	—	—	138,2	
15	11-CH $_2$	25,6	3,39 t	4, 16, 17, 4a, 4	5,29	25,9	3,41 (2H, d, 7,8)
16	12-CH	123,7	5,29 t	18, 19	3,39	124,8	5,30 (1H, m)
17	13-C	130,6	—	—	—	131,0	
18	14-CH $_3$	17,8	1,66 s	16, 17,19		17,0	1,66 (3H, s)
19	CH $_3$	25,4	1,72 s	16, 17,18		24,7	1,73 (3H, s)
	1-OH		14,1 s				
	3-OH		10,31 s				
	5-OH		10,68 s				



Hình 3.9. Cấu trúc của PT-4 (ociriacrison) và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

3.4.3.2. Hợp chất PT-5

PT-5 là bột vô định hình, màu đỏ gạch, tan tốt trong methanol, tan được trong ethyl acetat, tan vừa cloroform, không tan trong *n*-hexan.

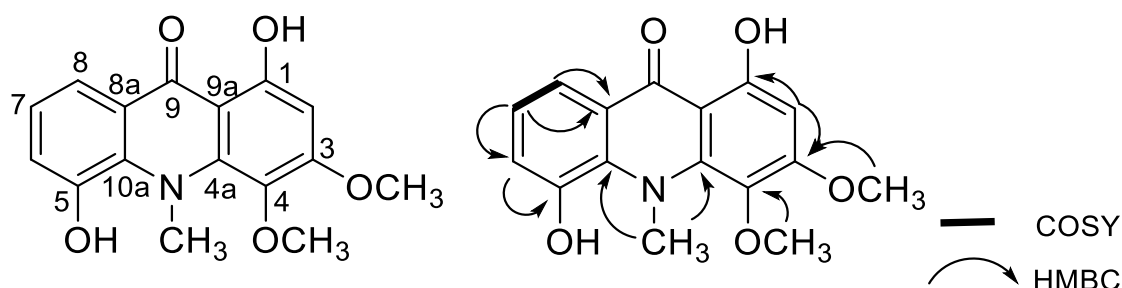
Phổ UV của **PT-5** đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 413, 319, 265 nm.

Phổ MS (ES^-) của **PT-5** cho mảnh m/z 300,19 tương ứng với ion $[M-H]^-$. Phổ MS (ES^+) của **PT-5** cho mảnh m/z 324,02 tương ứng với ion $[M+Na]^+$ và mảnh m/z 302,05 tương ứng với ion $[M+H]^+$. Suy ra số khối của **PT-5** là $M = 301,19$ tương ứng với công thức phân tử $C_{16}H_{15}NO_5$.

Phổ NMR của **PT-5** cho thấy sự hiện diện 16 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm $-CH_3$, (δ_C 59,9; 56,2 và 46,1 ppm), 4 nhóm $=CH-$ (δ_C 93,8; 120,0; 122,9 và 115,3 ppm); 9 carbon bậc 4 trong đó 8 nhóm $C_{IV} sp^3$ (δ_C 159,6; 159,4; 129,7; 148,2; 105,3; 141,6; 136,9; 123,7 ppm) và 1 nhóm $>C=O$ (δ_C 181,6 ppm); 2 nhóm $-OCH_3$ (δ_C 59,9 và 56,2 ppm) liên kết lần lượt với các carbon ở vị trí C_3 và C_4 . Một nhóm hydroxyl ở δ_H 14,15 (1H, s) được gán cho vị trí C_1 , (do liên kết hydrogen với oxy ở C_9 ($C=O$), nhóm hydroxid còn lại với δ_H 10,40 (1H, s) được cho là liên kết với C_5 (δ_C 148,2 ppm). Các proton thơm với δ_H 7,25 (d; 7,5); 7,17 (t; 7,5); 7,65 (d; 7,5); 6,46 (s) và một nhóm N-methyl δ_H 3,71 (s). Proton δ_H 6,46 (s) được gán cho vị trí C_2 .

Cấu trúc của **PT-5** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-5** và citrussin-1 đã được công bố trong các tài liệu¹⁴⁹ thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất

phân lập **PT-5** là phù hợp với citrussin-1. Như vậy, **PT-5** chính là citrussin-1. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-5** được trình bày ở **Bảng 3.19.**, **Hình 3.10.** và xem **Phụ lục 5.**



Hình 3.10. Cấu trúc của **PT-5** (citrussin-1) và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của **PT-5** so sánh với citrussin-I

C	DEPT	PT-5 (DMSO- d_6)				Citrussin-I (CD $_3$ OD)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_C	δ_H (J, Hz)
1	1-C	159,6	—	—	—	160,0	
2	2-CH	93,8	6,46s	9a, 4, 3, 1	—	93,7	6,29 (s)
3	3-C	159,4	—	—	—	159,4	
4	4-C	129,7	—	—	—	128,9	
5	C (4a)	141,6	—	—	—	141,1	
6	5-C	148,2	—	—	—	120,1	
7	6-CH	120,0	7,21 d (8)	9, 14	—	148,0	
8	7-CH	122,9	7,17 t	6, 8a	7,65	120,1	7,06 (1H, d, 7,8)
9	8-CH	115,3	7,65 d (7.5)	7, 10a, 9	7,17	122,9	7,03 (1H, t, 7,8)
10	C (8a)	123,7	—	—	—	116,7	7,74 (1H, d, 7,8)
11	9-C	181,6	—	—	—	124,7	
12	C (9a)	105,3	—	—	—	182,7	
13	10-N-CH $_3$	46,1	3,70 s	10a, 4a	—	106,5	
14	C (10a)	136,9	—	—	—	46,3	3,71 s
15	11-CH $_2$	59,9	3,91 s	3		137,6	
16	12-CH	56,2	3,69 s	4		59,9	3,85 s
	OH		14,15 s	2, 9a, 1		56,3	3,75 s
	OH		10,40 s				

3.4.4. Các hợp chất khác

3.4.4.1. Hợp chất PT-8

PT-8 là bột vô định hình, không màu, tan tốt trong cloroform, kém tan trong ethyl acetat, methanol, kém tan trong *n*-hexan. **PT-8** không tắt quang dưới UV 254 nm, không phát quang với UV 365 nm và cho màu tím hoa cà với thuốc thử VS.

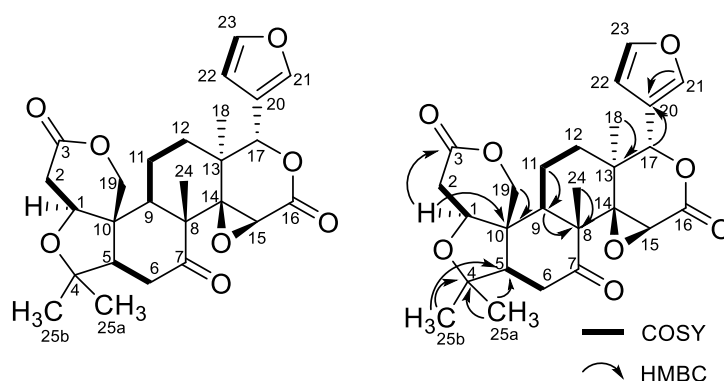
Phổ MS (ES⁻): PT-8 cho mảnh m/z 469,16 ứng với ion $[M-H]^-$. Suy ra số khối của **PT-8** là $M = 470,16$ tương ứng với công thức phân tử $C_{26}H_{30}NO_8$.

Phổ ^{13}C NMR và DEPT của **PT-8** cho thấy sự hiện diện của 26 tín hiệu carbon, trong đó có: 4 nhóm $-CH_3$ (δ_C 17,6; 20,7; 21,4 và 30,2 ppm), 5 nhóm $>CH_2$ (δ_C 18,9; 30,8; 35,7; 36,4 và 65,4 ppm), 8 nhóm $=CH-$ (δ_C 48,1; 54,0; 60,6; 77,8; 79,2; 109,7; 141,1 và 143,2 ppm), 9 carbon bậc 4, trong đó: 6 C_{IV} (δ_C 38,0; 46,0; 51,4; 65,7; 80,3 và 120,0 ppm) và 3 nhóm $>C=O$ (δ_C 166,6; 169,1 và 206,1 ppm).

Phổ 1H NMR cho thấy sự hiện diện của 30 tín hiệu proton, trong đó có 3 tín hiệu proton đều cho đỉnh singlet (với δ_H 7,41; 7,40 và 6,34 ppm) đặc trưng của khung furan, 12 proton của 4 nhóm $-CH_3$ cho tín hiệu vùng δ_H 1-1,30 ppm, 15 tín hiệu H còn lại xuất hiện ở vùng δ_H 1,4 – 6 ppm.

Phổ ^{13}C NMR cho thấy tín hiệu của ceton (C-7) xuất hiện tại vùng trường thấp δ_C 206,1 ppm, tín hiệu của 2 lacton cacbon tại δ_C 169,10 (C-3) và 166,6 ppm (C-16). Tín hiệu của các cacbon olefinic của vòng furan xuất hiện tại δ_C 141,4 ppm (C-23), 143,2 ppm (C-21), 120,0 ppm (C-20) và 109,7 ppm (C-22). Tín hiệu của cacbon mang nhóm chứa oxi xuất hiện tại δ_C 80,3 ppm (C-4), 79,2 ppm (C-1) và 77,8 ppm (C-17). Hai cacbon của vòng epoxy có tín hiệu tại δ_C 65,7 ppm (C-14) và 54,0 ppm (C-15).

Cấu trúc của **PT-8** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh dữ liệu phổ (1H NMR và ^{13}C NMR) của **PT-8** và limonin¹³⁷ đã được công bố trong các tài liệu thì dữ liệu phổ NMR của hợp chất phân lập **PT-8** là phù hợp với limonin. Như vậy, **PT-8** chính là limonin. Dữ liệu phổ và tương tác HMBC, COSY của **PT-8** được trình bày ở **Bảng 3.20.**, **Hình 3.11.** và xem **Phụ lục 8.**



Hình 3.11. Cấu trúc của **PT-8** (limonin) và các tương tác chính quan sát trên phổ COSY và HMBC

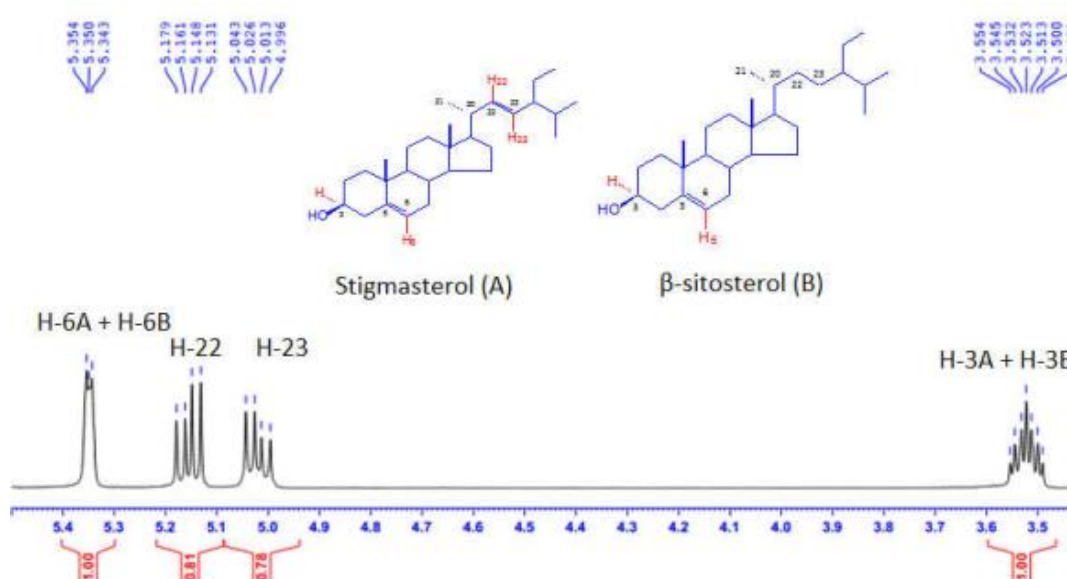
Bảng 3.20. Dữ liệu phổ NMR của **PT-8** so sánh với limonin

C	DEPT	PT-8/ CDCl ₃ (500 MHz)				Limonin/ CDCl ₃ (400 MHz)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC	COSY	δ_C	δ_H (J, Hz)
1	CH	79,2	4,03 s	3,19	2b	79,2	4,03 m
2	CH ₂	35,7	2,97 m 2,68 d (17)	1, 3, 10	1	35,7	2,98 dd (16,8; 4,0) 2,67 dd (16,8; 2,0)
3	C	169,1	-	-	-	169,0	-
4	C	80,3	-	-	-	80,3	-
5	CH	60,6	2,23 d (15,5)	4, 6, 7, 9, 10, 19	6a, 6b	60,7	2,22 dd (15,8; 3,4)
6	CH ₂	36,4	2,85 t (15)	5, 7, 10	5	36,4	2,85 dd (15,8; 14,6)
7	C	206,1	-	-	-	206,1	-
8	C	51,4	-	-	-	51,4	-
9	CH	48,1	2,56 d (12,5)	8,10,19,24	-	48,2	2,55 dd (12,2; 3,0)
10	C	46,0	-	-	-	46,0	-
11	CH ₂	18,9	1,84 -1,95 m 1,73 -1,85 m	9,12, 13, 17	12	19,0	1,72 - 1,95 m
12	CH ₂	30,8	1,48 - 1,56 m 1,73 - 1,85 m	9, 11, 13, 14, 18	11	30,9	1,46 - 1,58 m
13	C	38,0	-	-	-	38,0	-
14	C	65,7	-	-	-	65,7	-
15	CH	54,0	4,05 s	14, 16	-	53,9	4,05 s
16	C	166,6	-	-	-	166,5	-
17	CH	77,8	5,47 s	12, 13, 14,18,20, 22	-	77,8	5,47 s
18	CH ₃	20,7	1,18 s	12, 13, 14, 17	-	20,7	1,18 s
19	CH ₂	65,4	4,76 d (13) 4,47 d (13)	1, 3, 5, 9, 10	-	65,4	4,76 d (13) 4,46 d (13)
20	C	120,0	-	-	-	120,1	-
21	CH	143,2	7,40 s	20, 22, 23	-	143,3	7,40 s
22	CH	109,7	6,34 s	20, 21, 23	23	109,7	6,34 s
23	CH	141,4	7,41 s	20, 21, 22	22	141,2	7,41 s
24	CH ₃	17,6	1,08 s	7, 8, 9, 14	-	17,7	1,08 s
25a	CH ₃	30,2	1,29 s	4, 5, 25b	-	30,2	1,29 s
25b	CH ₃	21,4	1,18 s	1, 4, 5, 25a	-	21,4	1,18 s

3.4.4.2. Hợp chất PT-12

PT-12 tinh thể hình kim, không màu, dễ tan trong *n*-hexan, cloroform. **PT-12** không tắt quang dưới UV 254 nm, không phát quang với UV 365 nm và hiện màu tím với thuốc thử VS.

Tiến hành đo phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR. Từ kết quả phổ, có thể sơ bộ kết luận **PT-12** là hỗn hợp của 2 chất thuộc nhóm phytosterol là stigmasterol (A, có Δ^{22}) và β -sitosterol (B, không có Δ^{22}).



Hình 3.12. Phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) của **PT-12**

Từ phổ ^1H NMR (CDCl_3) có thể dự đoán được phần trăm của từng chất trong hỗn hợp nhờ so sánh số tích phân của 2 tín hiệu chung (H-6A + H-6B) với 2 số tích phân của 2 tín hiệu riêng (2-H olefin ở 22-A và 23-A):

- (H-3A + H-3B) $\rightarrow$ 1 tín hiệu 3,53m với số tích phân = 1,00
- (H-6A + H-6B) $\rightarrow$ 1 tín hiệu 5,35 br với số tích phân = 1,00
- (H-22A, *dd*) và (H-22B, *dd*) ở bên cạnh (δ 5,0 – 5,2) với số tích phân là 0,81 và 0,78 (trung bình là 0,80).

Như vậy, stigmasterol (A) chiếm khoảng 80% và β -sitosterol (B) chiếm khoảng 20% trong hỗn hợp **PT-12**.

3.5. Sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào *in vitro* của các hợp chất tiềm năng

Trong các chất phân lập được, ostruthin và 8-methoxyostruthin là các hợp chất phân lập được từ cao phân đoạn có hoạt tính sinh học tiềm năng với khối lượng lớn, quy trình phân lập đơn giản nên ostruthin và 8-methoxyostruthin được chọn để đánh giá hoạt tính độc tế bào *in vitro* và sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào *in vitro*.

3.5.1. Đánh giá hoạt tính độc tế bào *in vitro* của ostruthin và 8-methoxyostruthin

Hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của ostruthin và 8-methoxyostruthin ở các nồng độ 100; 75, 50; 25; 12,5 μM được khảo sát trên dòng tế bào HAK1B và MDA-MB-231. Kết quả được thể hiện qua tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào (%), trình bày trong **Bảng 3.21.** và xem **Phụ lục 23, Phụ lục 24.**

Bảng 3.21. Hoạt tính độc tế bào của ostruthin và 8-methoxyostruthin

Mẫu thử	Nồng độ (μM)	Tế bào HAK1B				Tế bào MDA-MB-231			
		OD _{trung bình}	SD	% so với mẫu chứng	Tỷ lệ ức chế (%)	OD _{trung bình}	SD	% so với mẫu chứng	Tỷ lệ ức chế (%)
DMSO		0,187	0,010	100,0	0,0	0,578	0,029	100,0	0,0
Sorafenib	25	0,070	0,001	37,2	62,8	0,053	0,003	9,2	90,8
	12,5	0,074	0,005	39,3	60,7	0,077	0,004	13,3	86,7
	6,25	0,085	0,005	45,2	54,8	0,271	0,025	46,9	53,1
	3,13	0,156	0,004	83,1	16,9	0,564	0,013	97,5	2,5
	1,56	0,161	0,011	85,9	14,1	0,661	0,022	114,4	-14,4
	0,78	0,160	0,005	85,6	14,4	0,540	0,013	93,4	6,6
Ostruthin	100	0,060	0,015	32,0	68,0	0,052	0,003	9,0	91,0
	75	0,065	0,004	34,7	65,3	0,048	0,006	8,3	91,7
	50	0,065	0,018	34,7	65,3	0,051	0,006	8,9	91,1
	25	0,104	0,016	55,5	44,5	0,323	0,038	55,9	44,1
	12,5	0,167	0,005	89,1	10,9	0,605	0,032	104,6	-4,6
8-methoxyostruthin	100	0,077	0,010	41,1	58,9	0,051	0,002	8,8	91,2
	75	0,065	0,001	34,5	65,5	0,083	0,008	14,4	85,6
	50	0,109	0,015	58,4	41,6	0,312	0,011	53,9	46,1
	25	0,161	0,009	85,8	14,2	0,585	0,004	101,1	-1,1
	12,5	0,171	0,013	91,1	8,9	0,672	0,002	116,1	-16,1

Trên dòng tế bào ung thư gan người HAK1B, ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào ở các nồng độ khảo sát 12,5-100 μM . So với mẫu chứng, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 10-70%.

Trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào ở các nồng độ khảo sát 25-100 μM . So với mẫu chứng, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 45-90%.

Kết quả cho thấy ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào tốt hơn trên dòng tế bào MDA-MB-231 so với dòng tế bào ung thư HAK1B.

Phương trình tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và tỷ lệ ức chế, IC_{50} của mẫu thử trình bày trong **Bảng 3.22**.

Bảng 3.22. Phương trình biểu diễn mối liên quan giữa nồng độ mẫu thử và tỷ lệ ức chế, IC_{50} của mẫu thử

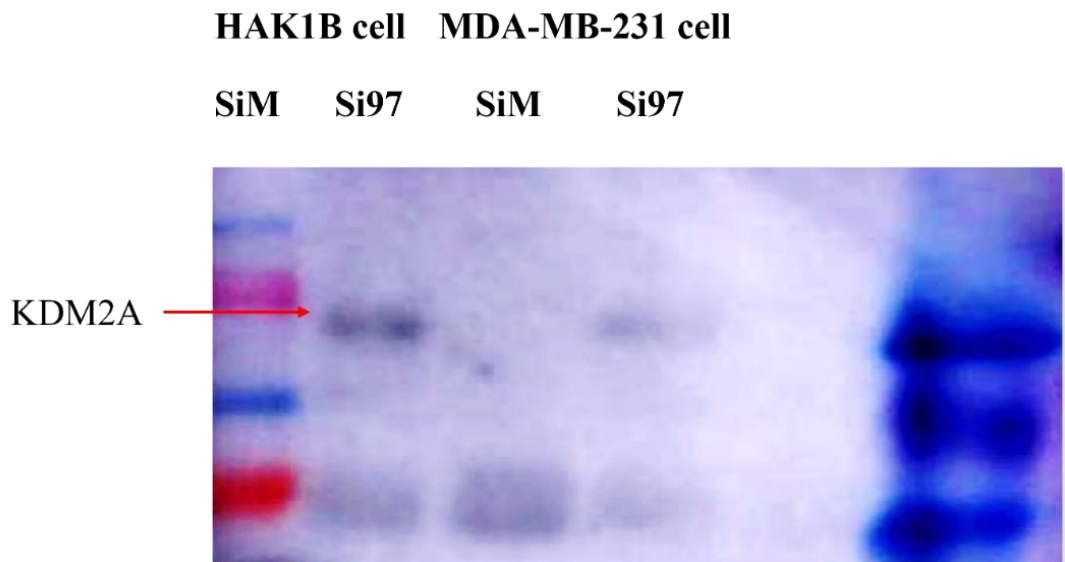
Mẫu thử	Phương trình	Giá trị R^2	Giá trị IC_{50} (μM)
Tế bào HAK1B			
Sorafenib	$y = -0,2028x^2 + 7,3547x + 5,1147$	0,9127	8,222
Ostruthin	$y = -0,0138x^2 + 2,0958x - 7,2283$	0,9294	40,095
8-methoxyostruthin	$y = -0,0083x^2 + 1,5987x - 14,557$	0,9517	60,112
Tế bào MDA-MB-231			
Sorafenib	$y = -0,2885x^2 + 11,371x - 12,51$	0,9352	6,099
Ostruthin	$y = -0,0191x^2 + 2,9502x - 15,475$	0,9391	32,416
8-methoxyostruthin	$y = -0,0158x^2 + 3,2092x - 70,7$	0,9923	47,805

Trên dòng tế bào ung thư HAK1B, giá trị IC_{50} của ostruthin (40,095 μM) và 8-methoxyostruthin (60,112 μM) lần lượt gấp 4,9 lần và 7,3 lần IC_{50} của chất đối chiếu sorafenib (8,222 μM).

Trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, giá trị IC_{50} của ostruthin (32,416 μM) và 8-methoxyostruthin lần lượt là (47,805 μM) gấp 5,3 lần và 7,83 lần IC_{50} của chất đối chiếu sorafenib (6,099 μM).

3.5.2. Mức độ biểu hiện của protein KDM2A

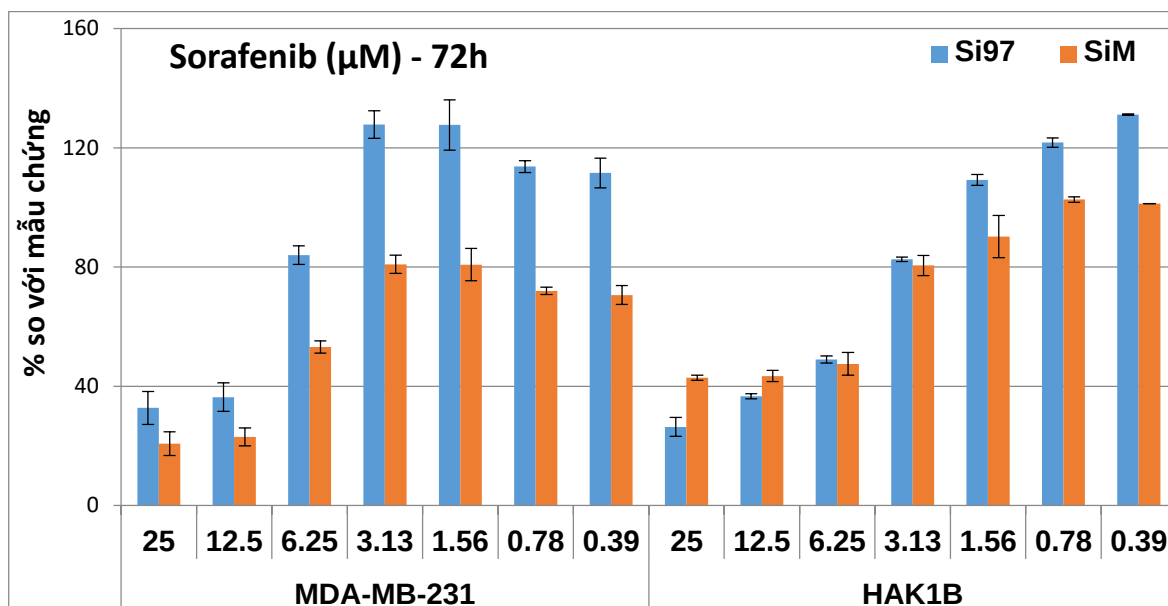
Đề tài tiến hành kiểm tra và so sánh mức độ biểu hiện của protein KDM2A trong tế bào nhóm bất hoạt và tế bào nhóm chứng bằng Western blot, kết quả thu được như **Hình 3.13**.



Hình 3.13. Kết quả Western blot biểu hiện của protein KDM2A

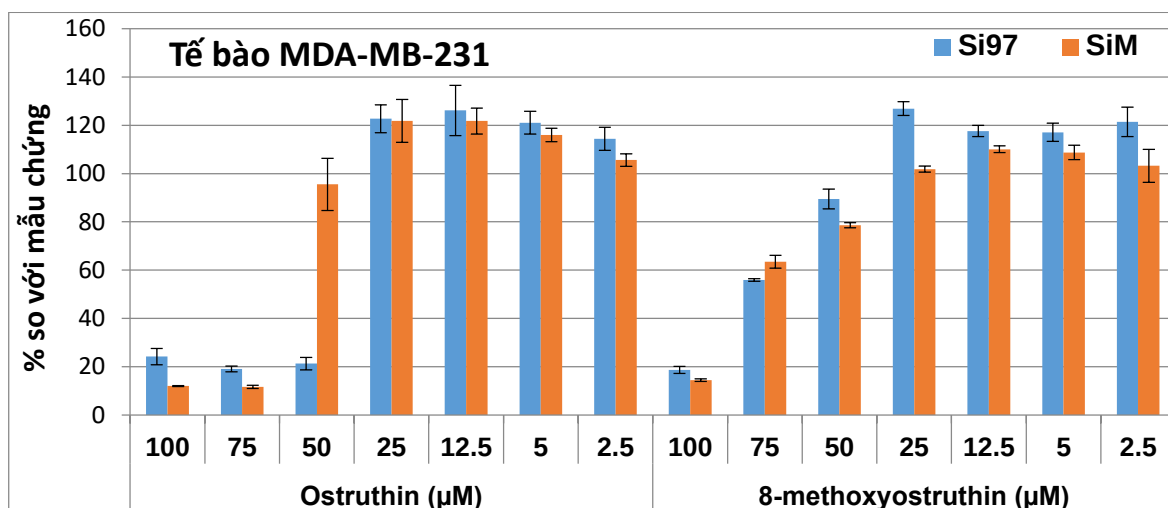
Kết quả trên hình ảnh Western blot cho thấy sau khi đưa phân tử KDM2A-siRNA vào tế bào HAK1B và tế bào MDA-MB-231, biểu hiện protein KDM2A đã bị bất hoạt gần như hoàn toàn so với nhóm chứng (control siRNA).

3.5.3. Khảo sát vai trò của protein KDM2A



Hình 3.14. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của sorafenib

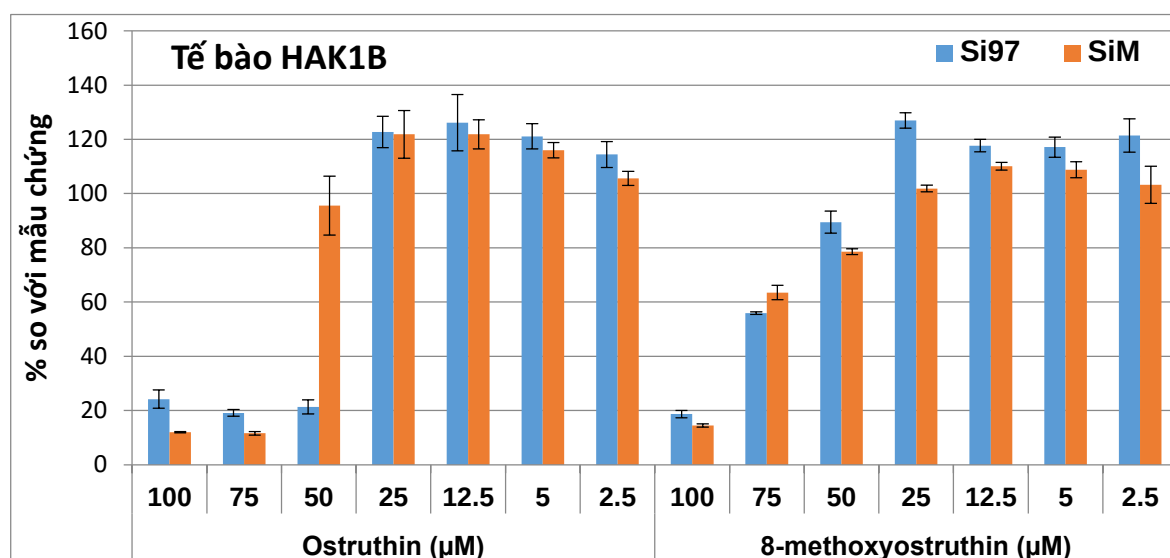
Sau khi xử lý với đối chứng sorafenib trong 72 giờ ở các nồng độ 0,39-25 μM , so với nhóm tế bào MDA-MB-231 đối chứng (SiM), thì nhóm tế bào bất hoạt KDM2A (Si97) có tỷ lệ tế bào sống so với mẫu chứng cao hơn, kết quả cho thấy có sự khác biệt rõ giữa nhóm bất hoạt KDM2A và nhóm chứng.



Hình 3.15. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của ostruthin và 8-methoxyostruthin lên dòng tế bào MDA-MB-231

Sau khi xử lý tế bào MDA-MB-231 với ostruthin hoặc 8-methoxyostruthin trong 72 giờ ở các nồng độ 2,5 - 100 μM , so với nhóm tế bào MDA-MB-231 đối chứng (SiM), thì nhóm tế bào bất hoạt KDM2A (Si97) có tỷ lệ tế bào sống so với mẫu

chúng cao hơn ở đa số các nồng độ của 8-methoxyostruthin; tuy nhiên sự khác biệt rõ giữa nhóm bất hoạt KDM2A và nhóm chứng không đáng kể 5-25%, trong đó cao nhất ở nồng độ 25 μM . Đối với mẫu thử ostruthin, tỷ lệ tế bào MDA-MB-231 bất hoạt KDM2A sống cao hơn so với tỷ lệ sống của tế bào chứng ở 2 nồng độ 75 μM và 100 μM với sự khác biệt lần lượt là 7,5% và 12,2%; ở nồng độ 50 μM , kết quả khác biệt đáng kể so với xu hướng của các nồng độ còn lại.



Hình 3.16. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng protein KDM2A đến tác động của ostruthin và 8-methoxyostruthin lên dòng tế bào HAK1B

Sau khi xử lý tế bào HAK1B với ostruthin hoặc 8-methoxyostruthin trong 72 giờ ở các nồng độ 2,5-100 μM , so với nhóm tế bào đối chứng, thì nhóm tế bào bất hoạt KDM2A có tỷ lệ tế bào sống so với mẫu chứng cao hơn ở đa số các nồng độ của 8-methoxyostruthin; tuy nhiên sự khác biệt rõ giữa 2 nhóm không đáng kể, sự khác biệt rõ ở nồng độ 25 μM . Đối với ostruthin, tỷ lệ tế bào bất hoạt KDM2A không khác biệt hoặc thấp hơn so với tỷ lệ sống của tế bào chứng ở các nồng độ khảo sát.

Trên hai dòng tế bào MDA-MB-231 và HAK1B, protein KDM2A ảnh hưởng đến tác động của 8-methoxyostruthin lên quá trình tăng trưởng của tế bào trong thời gian xử lý 72 giờ.

3.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC

3.6.1. Xây dựng bộ dữ liệu chuẩn, đánh giá chất chuẩn 8-methoxyostruthin và ostruthin

Trong các chất phân lập được, ostruthin và 8-methoxyostruthin là các hợp chất

đáp ứng đầy đủ yêu cầu đề ra về thiết lập chất đối chiếu từ dược liệu.

3.6.1.1. Xây dựng bộ dữ liệu chuẩn 8-methoxyostruthin

Mô tả: Bột tinh thể hình kim, không màu.

Tính chất: Tan trong methanol, ethyl acetat, cloroform.

Nhiệt độ nóng chảy: 81,2 °C (Đo bằng kỹ thuật DSC) xem **Phụ lục 25**.

Định tính

Định tính bằng SKLM: Mẫu pha trong methanol, nồng độ 0,1 mg/ ml. Lượng mẫu chấm: khoảng 10 µl. Bản mỏng silica gel tráng sẵn của Merck. Thuốc thử phát hiện: Acid sulfuric 10 % trong ethanol 96%, sấy 5 phút ở 110 °C. Kết quả: 8-methoxyostruthin cho vết màu xanh, có $R_f = 0,51$.

Định tính bằng HPLC

Tiến hành phân tích mẫu trong điều kiện giống với điều kiện định lượng.

Sắc ký đồ cho một pic chính của 8-methoxyostruthin. Phổ UV cho 2 cực đại hấp thu ở bước sóng 204 nm và 332 nm. Sắc ký đồ 3D không cho các pic tạp ở các bước sóng khác xem **Phụ lục 34**.

Định tính bằng các phương pháp phổ nghiệm

Phổ UV: Phổ UV cho 2 cực đại hấp thu ở bước sóng 204 nm và 332 nm.

Phổ IR: Phổ IR (KBr) có $\nu_{\max}$: 3212, 1692, 1569 cm^{-1} .

Phổ MS: Phổ MS (ES^+) của 8-methoxyostruthin cho mảnh m/z 329,13 phù hợp với ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ và mảnh m/z 351,11 phù hợp với ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Phổ NMR: Phổ ^{13}C NMR của 8-methoxyostruthin cho thấy sự hiện diện của 20 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm $-\text{CH}_3$ (δ_{C} 16,2; 17,7 và 25,7 ppm), 3 nhóm $>\text{CH}_2$ (δ_{C} 26,6; 27,6 và 39,7 ppm), 5 nhóm $=\text{CH}-$ (δ_{C} 112,5; 120,9; 122,4; 124,2 và 144,3 ppm) 8 carbon bậc 4, trong đó: 7 nhóm $\text{C}_{\text{IV}} \text{ sp}^3$ (δ_{C} 112,4; 125,2; 131,5; 133,2; 137,6; 145,3 và 150,0 ppm) và 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$ (δ_{C} 160,5 ppm), 1 nhóm $-\text{OCH}_3$ (δ_{C} 61,7 ppm).

Phổ ^1H NMR của 8-methoxyostruthin có 2 tín hiệu doublet có hằng số tương tác $J = 9,5 \text{ Hz}$ ở δ_{H} 6,22 (H-3) và 7,58 (H-4), 1 tín hiệu singlet ở δ_{H} ở 6,95 (H-5), cho thấy đây là một coumarin bị thế ở vị trí C-6, C-7 và C-8.

Độ tinh khiết và tạp chất liên quan

Tiến hành tiêm 3 lần mẫu thử theo điều kiện định lượng. Ghi nhận thời gian lưu và hàm lượng tạp theo phương pháp quy về 100% diện tích đỉnh. Hàm lượng tạp trong 8-methoxyostruthin là $2,2\% < 3\%$.

Định lượng

Tiến hành định lượng với 3 lần tiêm mẫu, lấy giá trị hàm lượng trung bình của 8-methoxyostruthin (Tính theo phương pháp quy về 100% diện tích pic). Hàm lượng trung bình của 8-methoxyostruthin là 97,7% tính theo nguyên trạng.

Kết quả đánh giá 8-methoxyostruthin

Bảng 3.23. Kết quả đánh giá 8-methoxyostruthin

STT	Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
1	Cảm quan	Bột tinh thể hình kim màu trắng	Đúng
2	Phổ UV-Vis	Phổ UV-Vis mẫu thử cho phổ đặc trưng, có hai cực đại hấp thu tại 204 nm và 332 nm	Đúng
3	Phổ IR	Phổ IR mẫu thử phải trùng với phổ IR trong tài liệu đối chiếu	Đúng
4	Điểm chảy	Khoảng 79-83 °C	Đúng
5	Độ ẩm	Độ ẩm dưới 10%	Đạt (5,1%)
6	Phổ MS	Cho pic ion phù hợp với công thức phân tử $C_{20}H_{24}O_4$ của 8-methoxyostruthin	Đúng
7	Phổ NMR	Phải cho phổ 1H NMR và ^{13}C NMR phù hợp với công thức cấu tạo của 8-methoxy ostruthin hoặc TLTK	Đúng
8	SKLM	Trên sắc ký đồ, dung dịch thử phải có chủ yếu một vết Không được phép có 1 vết rõ rệt nào khác	Đúng
9	Thử tạp chất	Tổng hàm lượng của các pic tạp phải $\leq 3\%$	Đạt (2,2%)
10	Định lượng	Hàm lượng 8-methoxyostruthin tính theo nguyên trạng phải $\geq 95\%$	Đạt (97,7%)

3.6.1.2. Thiết lập chất chuẩn 8-methoxyostruthin

Đóng gói

Đóng gói trong điều kiện như trong phương pháp nghiên cứu. Khối lượng ban đầu: 270 mg. Khối lượng đóng lọ: 5 mg/ lọ. Số lọ đóng được (N): 53 lọ. Khối lượng còn lại: 0,5 g

Đánh giá đồng nhất lọ trong quá trình đóng lọ

Chọn phòng thí nghiệm của khoa Nghiên cứu phân tích và khoa Thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu, Viện Kiểm Nghiệm thuốc TP. HCM để tiến hành kiểm tra

đồng nhất lọ trong quá trình đóng lọ (xem **Phụ lục 27**)

Tiến hành: Số lọ cần lấy: 6 lọ. Lấy ngẫu nhiên các lọ, mỗi lọ kiểm tra hàm lượng 2 lần. Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA.

Bảng 3.24. Bảng phân tích ANOVA kết quả đánh giá đồng nhất lô

Biến thiên	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	F	P-value	F _{0,05}
Giữa các nhóm	0,001083	1	0,001083	1,1264041	0,31350319	4,96460274
Trong cùng nhóm	0,00961467	10	0,000961467			
Tổng cộng	0,01069767	11				

Nhận xét: $F = 1,1264 < F_{0,05} = 4,9646$

Như vậy hàm lượng giữa các lọ khác nhau không ý nghĩa. Các lọ 8-methoxyostruthin đồng nhất trong quá trình đóng lọ.

Đánh giá chất chuẩn thông qua liên phòng thí nghiệm

Chọn 2 phòng thí nghiệm đạt chuẩn GLP để tiến hành đánh giá chất chuẩn: Khoa Nghiên cứu phân tích (PTN-1) và Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN-2) thuộc Viện kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh.

Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.25** và **Bảng 3.26**.

Bảng 3.25. Kết quả định lượng (%) 8-methoxyostruthin tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	1	2	3	4	5	6	Trung bình
PTN1	97,66	97,76	97,71	97,72	97,75	97,69	97,71
PTN2	97,67	97,67	97,73	97,69	97,72	97,69	97,69

Phân tích phương sai.

Bảng 3.26. Bảng phân tích kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm

	PTN 1	PTN 2
Mean	97,71	97,69
Variance	0,0011308	0,0018816
Observations	6	6
Pooled Variance	0,0015062	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	

t Stat	1,02647208
P(T<=t) one-tail	0,16442898
t Critical one-tail	1,81246112
P(T<=t) two-tail	0,32885796
t Critical two-tail	2,22813885

Nhận xét: So sánh t start nhỏ hơn t Critical, giá trị trung bình 2 phòng thí nghiệm giống nhau. Kết quả trung bình của hai phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, phương pháp phân tích có độ lặp lại cao, hàm lượng 8-methoxyostruthin không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Xác định giá trị ấn định

Phương pháp Robust analysis: Algorithm A (ISO 13528 (2005)).

Bảng 3.27. Kết quả giá trị ấn định hàm lượng (%) 8-methoxyostruthin (n = 12)

	Chu kỳ 0		Chu kỳ 1	Chu kỳ 2	Chu kỳ 3	Chu kỳ 4
	DL gốc (%)	$x_i - x^*$	x_i^*1	x_i^*2	x_i^*3	x_i^*4
$x^* - \delta$	97,64		97,64	97,64	97,64	
$x^* + \delta$	97,76		97,77	97,77	97,77	
x^*	97,70		97,70	97,70	97,70	97,70
s^*	0,04		0,03	0,03	0,03	0,03
δ	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05

Nhận xét

Sau hai lần thay đổi, giá trị s^* không thay đổi, khi đó giá trị x^* mới được chọn là 97,7%. Từ kết quả trên, tính z – score. Không có giá trị nào có $|z| > 2$. Tính trung bình các kết quả còn lại, thu được kết quả như sau: Hàm lượng trung bình: 97,7% (n = 12). Độ lệch s: 0,03. Độ không đảm bảo đo μ : 2,1%

Kết luận

Chất 8-methoxyostruthin đủ điều kiện chuẩn gốc (primary), có thể đăng ký chất chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định là 97,7% tính theo nguyên trạng (n = 12, s = 0,03, μ = 2,1%).

Công bố chuẩn

Lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm (xem Phụ lục 29).

Bảo quản

Bảo quản ở 2-8 °C, nơi khô ráo, tránh ánh sáng.

3.6.1.3. Xây dựng bộ dữ liệu chuẩn ostruthin

Mô tả: Bột tinh thể hình khối, không màu.

Tính chất: Dễ tan trong cloroform, ethyl acetat, methanol, kém tan trong *n*-hexan.

Nhiệt độ nóng chảy: 118.3 °C (đo bằng kỹ thuật DSC) (xem **Phụ lục 26**).

Định tính

Định tính bằng SKLM: Mẫu pha trong methanol, nồng độ 0,1 mg/ml. Lượng mẫu chấm: khoảng 10 µl. Bản mỏng silica gel tráng sẵn của Merck. Thuốc thử phát hiện: Acid sulfuric 10% trong ethanol 96%, sấy 5 phút ở 110 °C. Kết quả: ostruthin cho vết màu xanh, có $R_f = 0,51$.

Định tính bằng HPLC

Đề tài tiến hành phân tích mẫu trong điều kiện giống với điều kiện định lượng. Sắc ký đồ cho một pic chính của ostruthin. Phổ UV cho 2 cực đại hấp thu ở bước sóng 200 nm và 332 nm. Sắc ký đồ 3D không cho các pic tạp ở các bước sóng khác xem **Phụ lục 33**.

Định tính bằng các phương pháp phổ nghiệm

Phổ UV: Phổ UV cho 2 cực đại hấp thu ở bước sóng 200 nm và 332 nm.

Phổ IR: Phổ IR (KBr) có $\nu_{\max}$: 3160, 1678, 1568 cm^{-1} .

Phổ MS: Phổ MS (ES^+) của ostruthin cho mảnh m/z 299,13 phù hợp với ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ và mảnh m/z 321,13 phù hợp với ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Phổ NMR

Phổ ^{13}C NMR của ostruthin cho thấy sự hiện diện của 19 tín hiệu carbon, trong đó có 3 nhóm $-\text{CH}_3$ (δ_{C} 16,2; 17,7 và 25,7 ppm), 3 nhóm $>\text{CH}_2$ (δ_{C} 26,4; 28,4 và 39,7 ppm), 6 nhóm $=\text{CH}-$ (δ_{C} 103,3; 112,4; 120,8; 123,8; 128,3 và 144,1 ppm), 7 carbon bậc 4, trong đó: 6 nhóm $\text{C}_{\text{IV}} \text{ sp}^3$ (δ_{C} 112,3; 125,6; 131,9; 138,9; 154,2; 158,6 ppm) và 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$ (δ_{C} 162,2 ppm).

Phổ ^1H NMR của ostruthin có 2 tín hiệu doublet có hằng số tương tác $J = 9,5 \text{ Hz}$ ở δ_{H} 6,24 (H-3) và 7,64 (H-4), 2 tín hiệu singlet ở δ_{H} ở 7,2 (H-5) và 7,0 (H-8), cho thấy đây là một coumarin bị thế ở vị trí C-6 và C-7. Ngoài ra, trên phổ ^1H NMR

xuất hiện các tín hiệu proton của một mạch nhánh có 3 nhóm vinyl metyl ở δ_H 1,61 (H-9'), 1,69 (H-8') và 1,75 (H-10'), hai proton metylen δ_H 2,13 (t, 6 Hz, H-5') và 2,09 (t, 6 Hz, H-4'), hai triplet của 2 proton olefin ở δ_H 5,33 (H-2') và 5,09 (H-6').

Độ tinh khiết và tạp chất liên quan

Tiến hành tiêm 3 lần mẫu thử theo điều kiện định lượng. Ghi nhận thời gian lưu và hàm lượng tạp theo phương pháp quy về 100% diện tích đỉnh. Hàm lượng tạp trong ostruthin là $1,01\% < 3\%$.

Định lượng

Định lượng với 3 lần tiêm mẫu, lấy giá trị hàm lượng trung bình của 8-methoxy ostruthin (tính theo phương pháp quy về 100% diện tích pic). Hàm lượng trung bình của ostruthin là 99,0% tính theo nguyên trạng.

Kết quả đánh giá ostruthin

Bảng 3.28. Kết quả đánh giá ostruthin

STT	Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
1	Cảm quan	Bột tinh thể hình khối màu trắng	Đúng
2	Phổ UV-Vis	Phổ UV-Vis mẫu thử cho phổ đặc trưng, có hai cực đại hấp thu tại 200 nm và 332 nm	Đúng
3	Phổ IR	Phổ IR mẫu thử phải trùng với phổ IR trong tài liệu đối chiếu	Đúng
4	Điểm chảy	Khoảng 116-119 °C	Đúng
5	Độ ẩm	Độ ẩm dưới 10%	Đạt (4,5%)
6	Phổ MS	Cho pic ion phù hợp với công thức phân tử $C_{19}H_{22}O_3$ của ostruthin	Đúng
7	Phổ NMR	Phải cho phổ 1H NMR và ^{13}C NMR phù hợp với công thức cấu tạo của ostruthin hoặc TLTK	Đúng
8	SKLM	Trên sắc ký đồ, dung dịch thử phải có chủ yếu một vết Không được phép có 1 vết rõ rệt nào khác	Đúng
9	Thử tạp chất	Tổng hàm lượng của các pic tạp phải $\leq 3\%$	Đạt (1,01%)
10	Định lượng	Hàm lượng ostruthin tính theo nguyên trạng phải $\geq 95\%$	Đạt (99,0%)

3.6.1.4. Thiết lập chất chuẩn ostruthin

Đóng gói

Đóng gói trong điều kiện như trong phương pháp nghiên cứu: Khối lượng ban

đầu: 500 mg. Khối lượng đóng lọ: 5 mg/ lọ. Số lọ đóng được (N): 100 lọ.

Đánh giá đồng nhất lọ trong quá trình đóng lọ

Chọn phòng thí nghiệm của khoa Nghiên cứu phân tích và khoa Thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu, Viện Kiểm Nghiệm thuốc TP. HCM để tiến hành kiểm tra đồng nhất lọ trong quá trình đóng lọ.

Tiến hành: Số lọ cần lấy: 6 lọ. Lấy ngẫu nhiên các lọ, mỗi lọ kiểm tra hàm lượng 2 lần. Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA (xem **Phụ lục 28**).

Bảng 3.29. Bảng phân tích ANOVA kết quả đánh giá đồng nhất lô

Biến thiên	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	F	P-value	F _{0,05}
Giữa các nhóm	2,08333E-06	1	2,08333E-06	0,667557	0,93649418	4,96460274
Trong cùng nhóm	0,003120833	10	0,000312083			
Tổng cộng	0,003122917	11				

Nhận xét: $F = 0,6675 < F_{0,05} = 4,9646$. Như vậy hàm lượng giữa các lọ khác nhau không ý nghĩa. Các lọ ostruthin đồng nhất trong quá trình đóng lọ.

Đánh giá chất chuẩn thông qua liên phòng thí nghiệm

Chọn 2 phòng thí nghiệm đạt chuẩn GLP để tiến hành đánh giá chất chuẩn. Khoa Nghiên cứu phân tích (PTN-1) và Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN-2) thuộc Viện kiểm nghiệm thuốc TP.HCM.

Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.30.** và **Bảng 3.31.**

Bảng 3.30. Kết quả định lượng (%) ostruthin tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	1	2	3	4	5	6	Trung bình
PTN1	98,98	98,995	99,02	99,015	99,01	98,985	99,0
PTN2	98,975	98,98	99,02	99,015	99,01	99	99,0

Phân tích phương sai.

Bảng 3.31. Bảng phân tích kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm

	PTN 1	PTN 2
Mean	99,00083333	99
Variance	0,000274167	0,00035
Observations	6	6
Pooled Variance	0,000312083	
Hypothesized Mean Difference	0	

df	10
t Stat	0,081704146
P(T<=t) one-tail	0,46824709
t Critical one-tail	1,812461123
P(T<=t) two-tail	0,93649418
t Critical two-tail	2,228138852

Nhận xét: So sánh t stat nhỏ hơn t Critical, giá trị trung bình 2 phòng thí nghiệm giống nhau. Kết quả trung bình của hai phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, phương pháp phân tích có độ lặp lại cao, hàm lượng ostruthin không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Xác định giá trị ấn định

Phương pháp Robust analysis: Algorithm A (ISO 13528 (2005)).

Bảng 3.32. Kết quả giá trị ấn định hàm lượng (%) ostruthin (n = 12)

	Chu kỳ 0		Chu kỳ 1	Chu kỳ 2	Chu kỳ 3	Chu kỳ 4
	DL gốc (%)	$x_i - x^*$	x_i^*1	x_i^*2	x_i^*3	x_i^*4
$x^* - \delta$	98,98		98,97	98,97	98,97	
$x^* + \delta$	99,03		99,03	99,03	99,03	
x^*	99,01		99,00	99,00	99,00	99,00
s^*	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02
δ	0,03		0,03	0,03	0,03	0,03

Nhận xét: Sau ba lần thay đổi, giá trị s^* không thay đổi, khi đó giá trị x^* mới được chọn là 99%. Từ kết quả trên, tính z – score. Không có giá trị nào có $|z| > 2$. Tính trung bình các kết quả còn lại, thu được kết quả như sau: Hàm lượng trung bình: 99,0% (n = 12). Độ lệch s: 0,02 . Độ không đảm bảo đo μ : 2,1%.

Kết luận

Chất Ostruthin đủ điều kiện chuẩn gốc (primary), có thể đăng ký chất chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định là 99,0% tính theo nguyên trạng (n = 12, s = 0,04, $\mu = 2,1$).

Công bố chuẩn

Lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm (xem Phụ lục 30).

Bảo quản: Bảo quản ở 2 – 8 °C, nơi khô ráo, tránh ánh sáng.

3.6.2. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC

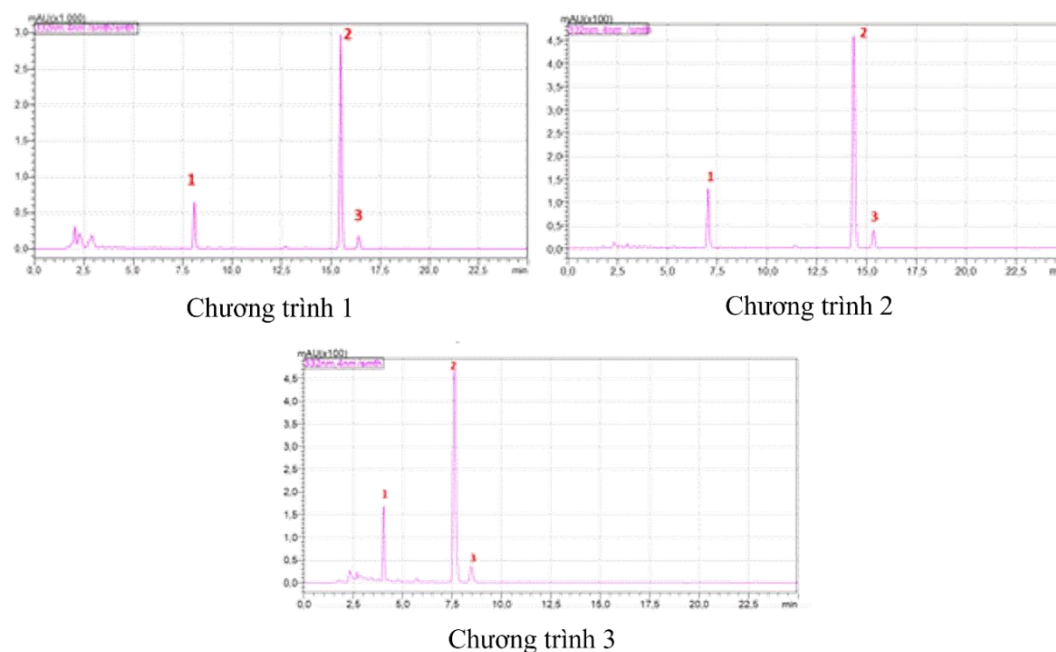
Qua khảo sát hóa học và phân lập các hợp chất có trong Xáo tam phân có nhiều nhóm hợp chất coumarin đặc biệt là các hợp chất có khung 7-hydroxycoumarin. Vì vậy, việc xây dựng quy trình định lượng đồng thời 3 coumarin và sử dụng demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin như là chất đối chiếu là cần thiết cho kiểm nghiệm nguyên liệu này.

Khảo sát quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC

Khảo sát điều kiện dung môi rửa giải

Điều kiện phân tích: Hệ thống HPLC LC-2030C 3D, đầu dò PDA (Shimadzu, Nhật Bản). Cột: Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4,6 × 250 mm, 5 μm. Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. Bước sóng phát hiện: 331 nm. Thể tích tiêm mẫu: 10 μL. Thời gian phân tích: 25 phút. Pha động: Acetonitril – nước

Tiến hành khảo sát với chương trình rửa giải với 3 chương trình rửa giải khác nhau. Kết quả được trình bày trong **Hình 3.17**.



Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC thẩm dò chương trình rửa giải

Nhận xét:

Chương trình 1 và 2 có thời gian lưu của pic demethylsuberosin lần lượt là 8,1

phút và 7,0 phút, ostruthin lần lượt là 16,0 phút và 14,4 phút, 8-methoxyostruthin là 16,5 phút và 15,3 phút. Cả ba pic đều có thời gian lưu dưới 20 phút. Các pic tách tốt và không bị trùng pic, đạt độ tinh khiết pic hơn 99,9%.

Chương trình 3 có thời gian lưu của pic demethylsuberosin là 4,0 phút, ostruthin là 7,6 phút và 8-methoxyostruthin là 8,5 phút. Thời gian xuất hiện của ba pic ngắn lại so với chương trình 1 và 2, hai pic ostruthin và 8-methoxyostruthin tách tốt với các pic còn lại trong mẫu. Tuy nhiên pic demethylsuberosin không tách tốt, vẫn còn bị trùng pic với các pic phía trước và phía sau.

Vì vậy chọn chương trình 2 làm chương trình rửa giải vì chương trình rửa giải này các pic tách tốt và có thời gian lưu ngắn hơn chương trình 1.

Điều kiện HPLC định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin

Dựa vào phổ UV của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin chọn bước sóng phát hiện là 332 nm.

Điều kiện phân tích được chọn như sau: Hệ thống Shimadzu LC-2030C 3D. Cột: Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4,6 × 250 mm, 5 µm. Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. Đầu dò: PDA. Bước sóng phát hiện: 332 nm. Thể tích tiêm mẫu: 10 µL. Thời gian phân tích: 25 phút. Pha động: Acetonitril – nước

Bảng 3.33. Chương trình rửa giải gradient

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)
0	55	45
15-20	80	20
20-25	100	0

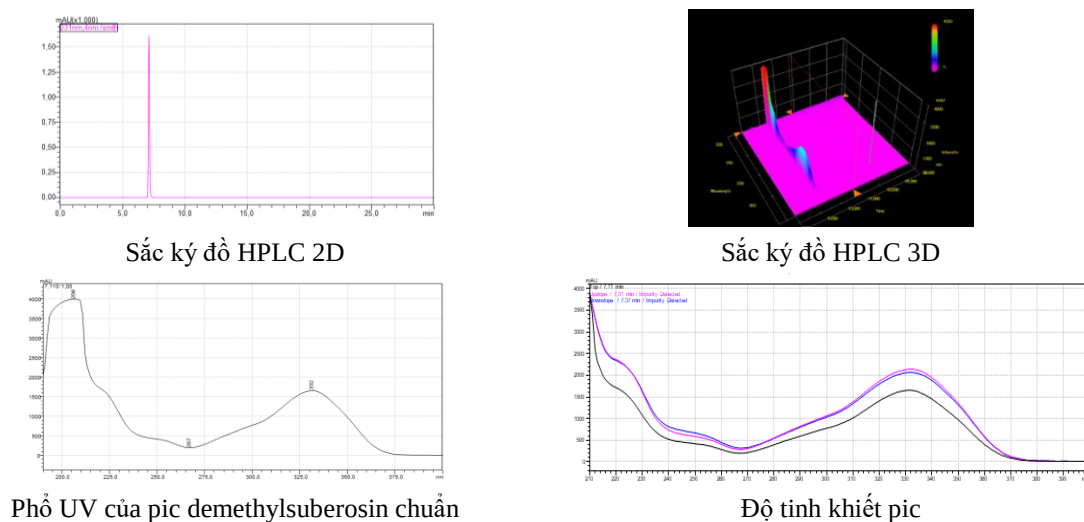
Kiểm tra độ tinh khiết của chất chuẩn

Ostruthin và 8-methoxyostruthin đã được thiết lập chất đối chiếu nên không tiến hành kiểm tra độ tinh khiết.

Kiểm tra độ tinh khiết của chuẩn demethylsuberosin

Trên sắc ký đồ 2D chỉ cho một pic chính và trên sắc ký đồ 3D không xuất hiện các pic khác ở các bước sóng khác nhau. Phổ UV cho 2 điểm cực đại hấp thụ 206 và 332 nm tương ứng với phổ UV của demethylsuberosin. Độ tinh khiết pic của pic

demethylsuberosin đạt 99,97 %. Kết quả kiểm tra chất chuẩn demethylsuberosin được trình bày ở **Hình 3.18**.



Hình 3.18. Kết quả kiểm tra chất chuẩn demethylsuberosin

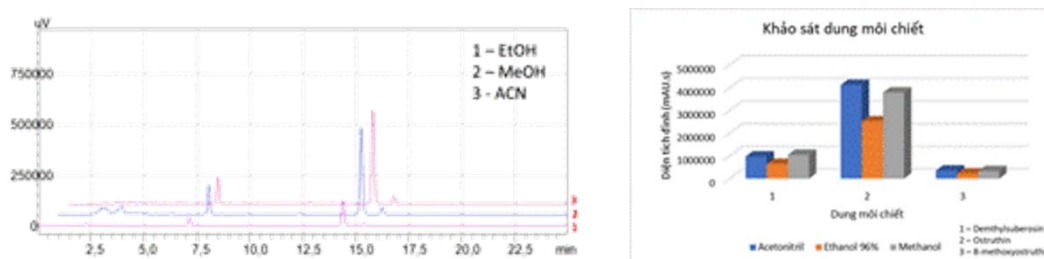
Chuẩn bị mẫu

Khảo sát dung môi chiết

Tiến hành theo mục 2.8.6.2. Kết quả khảo sát được trình bày tại **Bảng 3.34**.

Bảng 3.34. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Dung môi chiết	Diện tích đỉnh (mAU.s)		
	Demethylsuberosin	Ostruthin	8-methoxyostruthin
Acetonitril	970770	4125551	351545
Ethanol 96 %	644303	2519863	223040
Methanol	1045593	3785637	326725



Hình 3.19. Sắc ký đồ khảo sát dung môi chiết

Nhận xét: Trong ba dung môi tiến hành khảo sát, lượng demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin thu được khi chiết với methanol và acetonitril lớn

hơn so với ethanol 96 %. Không có sự khác biệt lớn giữa dung môi methanol và acetonitril. Vậy chọn methanol là dung môi chiết.

Khảo sát phương pháp chiết

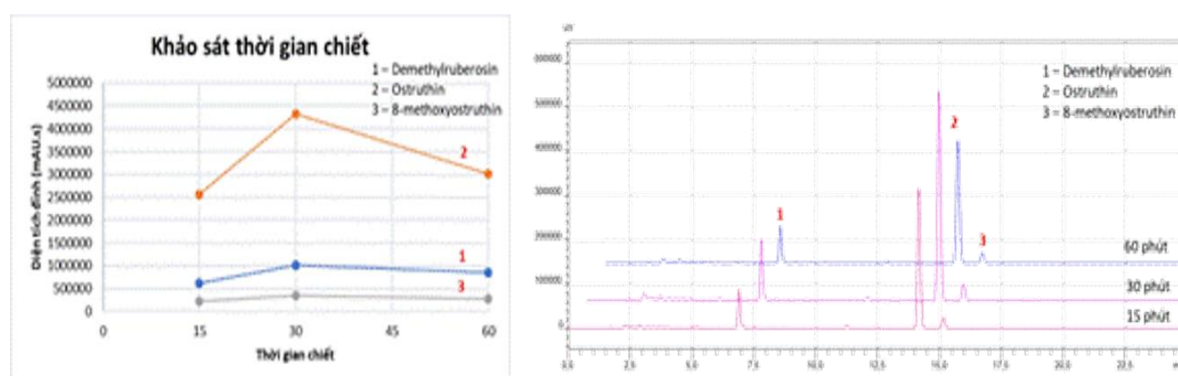
Dựa vào kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả đã thực hiện chọn chiết mẫu bằng siêu âm với methanol cho định lượng do có hiệu suất chiết cao nhất và phương pháp đơn giản.

Khảo sát thời gian chiết

Tiến hành theo mục 2.8.6.2. Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.35**.

Bảng 3.35. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Thời gian chiết (phút)	Diện tích đỉnh (mAU.s)		
	Demethylsuberosin	Ostruthin	8-methoxyostruthin
15	626873	2563152	219618
30	1021598	4321463	354200
60	855234	3009542	273474



Hình 3.20. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Nhận xét: Siêu âm 30 phút, hàm lượng của các chất demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin tăng lên rõ rệt. Tuy nhiên, nếu tiếp tục siêu âm thì demethylsuberosin và ostruthin bị giảm hàm lượng trong dịch chiết, đặc biệt là ostruthin. Điều này có thể thời gian siêu âm dài dẫn đến sinh nhiệt làm hư hoạt chất. Do đó, chọn thời gian siêu âm là 30 phút.

Khảo sát số lần chiết

Kết quả khảo sát số lần chiết được trình bày trong **Bảng 3.36**.

Bảng 3.36. Kết quả khảo sát số lần chiết

Lần chiết	Diện tích đỉnh (mAU.s)		
	Demethylsuberosin	Ostruthin	8-methoxyostruthin
1	1021598	4321463	354200
2	1017	9076	1206

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy sau một lần chiết bằng phương pháp siêu âm trong 30 phút với 20 ml methanol gần như đã chiết được hoàn toàn lượng demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin từ dược liệu. Do đó, chọn số lần chiết dung môi là một lần.

Kết quả quy trình xử lý mẫu: Cân 100 mg bột dược liệu Xáo tam phân. Tiến hành chiết siêu âm với 20 ml methanol ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm 15 phút (4000 rpm), gạn dịch vào bình định mức 20 ml, bổ sung thể tích vừa đủ. Lọc qua màng lọc cỡ 0,45 μ m. Dịch lọc được dùng làm mẫu dung dịch thử.

3.6.3. Đánh giá quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC

3.6.3.1. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành theo mục 2.8.6.3. Tiêm 6 lần mẫu thử. Kết quả thu được trình bày tại **Bảng 3.37.**, **Bảng 3.38.** và **Bảng 3.39.**

Bảng 3.37. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng demethylsuberosin

Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối A_s	Độ phân giải R_s
1	6,99	1040474	14755	1,14	1,71
2	7,00	1035862	14779	1,15	1,79
3	7,02	1050378	15020	1,13	1,73
4	6,90	1038742	15123	1,16	1,75
5	7,00	1042101	14945	1,12	1,75
6	6,99	1039762	14874	1,17	1,72
Trung bình	6,98	1041219,8	14916,00	1,15	1,74
SD	0,04	4943,20	142,10	0,02	0,03
RSD%	0,61	0,47	0,95	1,63	1,64

Bảng 3.38. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng ostruthin

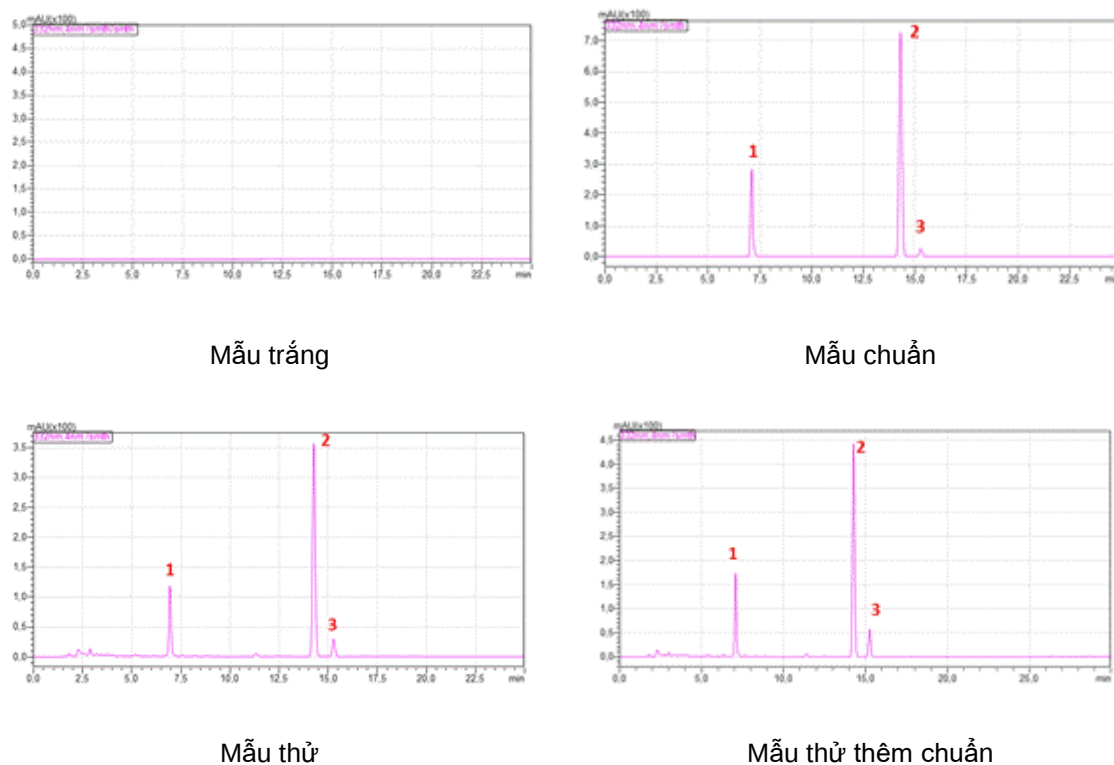
Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối A_s	Độ phân giải R_s
1	14,37	4377668	38674	1,04	1,78
2	14,45	4408021	37610	1,06	1,82
3	14,15	4379001	38055	1,03	1,79
4	14,40	4370144	38172	1,04	1,82
5	14,37	4439821	37354	1,04	1,81
6	14,42	4490101	37213	1,02	1,78
Trung bình	14,36	4410792,7	37846,33	1,04	1,80
SD	0,11	46691,34	553,89	0,01	0,02
RSD	0,75	1,06	1,46	1,28	1,05

Bảng 3.39. Kết quả tính tương thích hệ thống quy trình định lượng 8-methoxyostruthin

Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối A_s	Độ phân giải R_s
1	15,37	369700	37054	1,03	1,88
2	15,44	370210	36611	1,07	1,92
3	15,44	371091	37162	1,05	1,89
4	15,37	369832	38321	1,02	1,82
5	15,41	360112	38213	1,04	1,85
6	15,40	367991	36953	1,03	1,88
Trung bình	15,41	368156,0	37385,67	1,04	1,87
SD	0,03	4068,4	708,05	0,02	0,03
RSD	0,20	1,11	1,89	1,72	1,84

Nhận xét: RSD của các thông số thời gian lưu, diện tích đỉnh, số đĩa lý thuyết, hệ số bất đối, độ phân giải $< 2\%$. Hệ số bất đối $0,8 \leq A_s \leq 1,5$. Độ phân giải $R_s \geq 1,5$. Số đĩa lý thuyết $N \geq 5000$. Vậy quy trình phân tích đạt tính tương thích hệ thống.

3.6.3.2. Độ đặc hiệu



Hình 3.21. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu

(1 – Demethylsuberosin; 2 – Ostruthin; 3 – 8-methoxyostruthin)

Nhận xét: Trong mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện ba pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong mẫu chuẩn (thời gian lưu lần lượt là 7,0; 14,5 và 15,3 phút), đồng thời mẫu trắng không có pic trùng với pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin. Khi thêm chất chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích đỉnh của pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin tăng lên rõ rệt so với trước khi thêm chất chuẩn. Pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin tách hoàn toàn với các pic còn lại trong sắc ký đồ. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết cho thấy pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin không có các thành phần khác. Độ tinh khiết pic đạt trên 99,0%.

Vậy quy trình phân tích đạt tính đặc hiệu.

3.6.3.3. Tính tuyến tính

Tiến hành theo mục 2.8.6.3. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.40.**, **Bảng 3.41.**

Bảng 3.40. Kết quả xử lý thống kê tính tuyến tính

Kết quả xử lý thống kê	Giá trị của demethylsuberosin	Giá trị của ostruthin	Giá trị 8-methoxyostruthin
R^2	0,9995	0,9996	0,9992
Hệ số B	-7187,3	-27399	5423,3
Giá trị t của hệ số B	-0,64	-1,28	0,61
Hệ số B_0	21362	13756	11864
Giá trị t của hệ số B_0	91,74	94,06	72,65
Giá trị F	8416,29	9017,61	5378,1
Giá trị $F_{0,05}$	6,61	6,61	6,61
Giá trị $t_{0,05}$	2,57	2,57	2,57
Phương trình hồi qui	$\hat{y} = 21362x - 7187,3$	$\hat{y} = 13756x - 27399$	$\hat{y} = 11864x + 5423,3$
Khoảng xác định	5,0-100,0 $\mu\text{g/ml}$	10-300 $\mu\text{g/ml}$	10-300 $\mu\text{g/ml}$

Bảng 3.41. Ý nghĩa các hệ số trong phương trình hồi qui

	Tính tuyến tính của demethylsuberosin	Tính tuyến tính của ostruthin	Tính tuyến tính của 8-methoxyostruthin
So sánh F và $F_{0,05}$	$F = 8416,29 > F_{0,05} = 6,61$ nên phương trình hồi qui tương thích	$F = 9017,61 > F_{0,05} = 6,61$ nên phương trình hồi qui tương thích	$F = 9017,61 > F_{0,05} = 6,61$ nên phương trình hồi qui tương thích.
Hệ số chặn B	$t = -0,64 < t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B không có ý nghĩa thống kê.	$t = -1,28 < t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B không có ý nghĩa thống kê.	$t = 0,61 < t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B không có ý nghĩa thống kê.
Hệ số tung độ gốc B_0	$t = 91,74 > t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B_0 có ý nghĩa thống kê	$t = 94,06 > t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B_0 có ý nghĩa thống kê.	$t = 72,65 > t_{0,05} = 2,57$ nên hệ số B_0 có ý nghĩa thống kê.
Phương trình hồi qui	$\hat{y} = 21362x - 7187,3$ $R^2 = 0,9995$	$\hat{y} = 13756x - 27399$ $R^2 = 0,9996$	$\hat{y} = 11864x + 5423,3$ $R^2 = 0,9992$

3.6.3.4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Tính theo mục 2.8.6.3. Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.42.**

Bảng 3.42. LOD và LOQ của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin

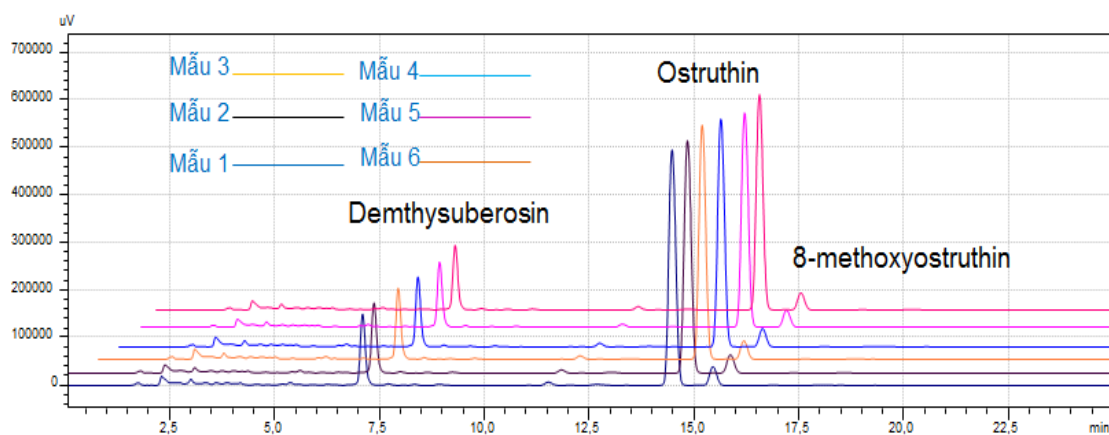
Giới hạn	Demethylsuberosin	Ostruthin	8-methoxyostruthin
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	2,84	8,00	3,82
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	8,60	24,23	11,56

3.6.3.5. Độ lặp lại

Tiến hành theo mục 2.8.6.3. Kết quả thu được trình bày tại **Bảng 3.43.**

Bảng 3.43. Kết quả đánh giá độ lặp lại quy trình định lượng

Dung dịch	Demethylsuberosin		Ostruthin		8-methoxyostruthin	
	t_R (phút)	S (mAU.s)	t_R (phút)	S (mAU.s)	t_R (phút)	S (mAU.s)
1	7,00	1040474	14,35	4417373	15,37	369700
2	7,17	984047	14,45	4412500	15,45	344334
3	7,16	1050023	14,15	4377851	15,44	353541
4	7,11	990508	14,36	4318934	15,42	367585
5	6,99	1039074	14,43	4437803	15,43	348558
6	7,00	1030811	14,39	4508265	15,37	358231
$\bar{X}$	7,07	1022489,50	14,36	4412121,00	15,41	356991,50
SD	0,08	28023,10	0,11	62911,38	0,04	10183,39
RSD %	1,20	2,74	0,75	1,43	0,23	2,85

**Hình 3.22.** Sắc ký đồ HPLC khảo sát độ lặp lại

Nhận xét: Thời gian lưu của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin đều có RSD < 2%. Diện tích đỉnh của ostruthin có RSD < 2%. Diện tích đỉnh của demethylsuberosin và 8-methoxyostruthin đều có RSD < 3,7%. Vậy quy trình phân tích đạt tính lặp lại.

3.6.3.6. Độ chính xác trung gian

Tiến hành theo mục 2.8.6.3. Kết quả thu được trình bày tại **Bảng 3.44**.

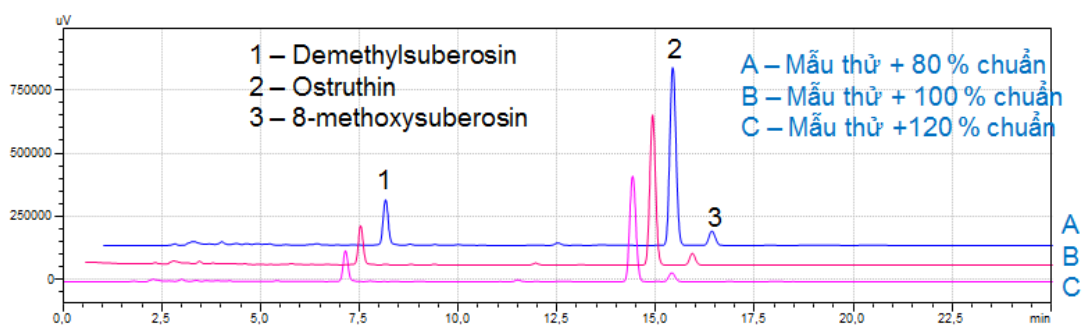
Bảng 3.44. Kết quả độ chính xác trung gian

Ngày	Demethylsuberosin		Ostruthin		8-methoxyostruthin	
	t_R (phút)	S (mAU.s)	t_R (phút)	S (mAU.s)	t_R (phút)	S (mAU.s)
1	7,00	1040474	14,35	4417373	15,37	369700
2	6,99	1016820	14,40	4373769	15,35	350589
3	7,00	1020854	14,30	4298908	15,30	361932
$\bar{X}$	7,00	1026049,33	14,35	4363350,00	15,34	360740,33
SD	0,01	12653,91	0,05	59915,82	0,04	9611,07
RSD %	0,08	1,23	0,35	1,37	0,24	2,66

Nhận xét: Thời gian lưu của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin đều cho kết quả RSD < 2 %. Diện tích pic của demethylsuberosin và ostruthin đều cho kết quả RSD < 2 %, của 8-methoxyostruthin cho RSD < 3,7 %. Vậy quy trình phân tích đạt độ chính xác trung gian.

3.6.3.7. Độ đúng

Tiến hành theo mục 2.8.6.3. Kết quả thu được trình bày tại **Bảng 3.45**.



Hình 3.23. Sắc ký đồ HPLC khảo sát độ đúng

Bảng 3.45. Kết quả độ đúng quy trình định lượng

Tỉ lệ chất đối chiếu thêm vào	Lượng chất đối chiếu thêm vào (μg)	Diện tích đỉnh (mAU.s)	Lượng chất đối chiếu thu hồi (μg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Số liệu thống kê
Demethylsuberosin					
	780	1827223	741.34	95.04	TB = 97,70 %
80%	780	1857250	769.63	98.67	SD = 2,33
	780	1863245	775.28	99.40	RSD = 2,39 %

	980	2100507	998.85	101.92	TB= 100,21 %
100%	980	2078732	978.33	99.83	SD = 1,5
	980	2108943	1006.80	102.73	RSD = 1,48 %
	1180	2271284	1159.77	98.29	TB = 98,73 %
120%	1180	2254843	1144.28	96.97	SD = 2,01
	1180	2304321	1190.90	100.92	RSD = 2,04 %
Ostruthin					
	5150	8007123	5226.77	101.49	TB = 100,57 %
80%	5150	7902891	5075.00	98.54	SD = 1,75
	5150	8013210	5235.63	101.66	RSD = 1,74 %
	6400	8953928	6605.34	103.21	TB= 101,24 %
100%	6400	8902120	6529.90	102.03	SD = 2,47
	6400	8745631	6302.05	98.47	RSD = 2,44 %
	7720	9876321	7948.37	102.96	TB = 100,57 %
120%	7720	9582130	7520.02	97.41	SD = 2,85
	7720	9790012	7822.70	101.33	RSD = 2,84 %
8-methoxyostruthin					
	480	640213	466.75	97.24	TB = 99,40 %
80%	480	651200	485.10	101.06	SD = 1,96
	480	647891	479.57	99.91	RSD = 1,97 %
	600	719504	599.17	99.86	TB= 99,89 %
100%	600	728342	613.93	102.32	SD = 2,42
	600	710987	584.95	97.49	RSD = 2,42 %
	720	802189	737.26	102.40	TB = 99,38 %
120%	720	776321	694.06	96.40	SD = 3,00
	720	789021	715.27	99.34	RSD = 3,02 %

Nhận xét: Với tỉ lệ 80%, 100% và 120%, tỉ lệ phục hồi của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin nằm trong khoảng 95-105%. Vậy độ đúng của quy trình phân tích đạt.

Quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ Xáo tam phân trồng bằng phương pháp HPLC

Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch thử: Cân 0,1 g bột dược liệu. Tiến hành chiết siêu âm với 20 ml

methanol ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm 15 phút (4000 rpm), gạn dịch vào bình định mức 20 ml, bổ sung thể tích vừa đủ. Lọc qua màng lọc cỡ 0,45 μm . Dịch lọc được dùng làm mẫu dung dịch thử.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan chất chuẩn demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong methanol để thu được dung dịch hỗn hợp chất đối chiếu có nồng độ chính xác 0,05 mg/ml. Siêu âm và lọc qua màng lọc cỡ 0,45 μm

Điều kiện sắc ký: Hệ thống HPLC LC-2030C 3D, đầu dò PDA (Shimadzu, Nhật Bản). *Cột*: C_{18} , $4,6 \times 250$ mm, 5 μm . *Nhiệt độ cột*: 35 °C. *Tốc độ dòng*: 1,0 ml/phút. *Bước sóng phát hiện*: 332 nm. *Thể tích tiêm mẫu*: 10 μl . *Thời gian phân tích*: 25 phút. *Pha động*: Acetonitril - nước, chương trình rửa giải gradient.

Cách tiến hành: Tiêm riêng biệt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Dựa vào diện tích pic (hay chiều cao) pic thu được của dung dịch thử, dung dịch chuẩn, nồng độ demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin của dung dịch chuẩn, tính hàm lượng demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong dược liệu.

Kết quả định lượng cho thấy, rễ Xáo tam phân chứa 1,04% demethylsuberosin, 6,55% ostruthin và 0,64% 8-methoxyostruthin (tính theo dược liệu khô kiệt).

3.6.4. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu rễ Xáo tam phân trên thị trường bằng phương pháp HPLC

Tiến hành: Chiết xuất một số mẫu rễ Xáo tam phân thu mua (xem **Phụ lục 31**) theo quy trình đã đề nghị, thực hiện 3 lần cho mỗi mẫu rễ và triển khai trên HPLC theo điều kiện đã đề nghị (xem **Phụ lục 32**).

Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.46**.

Bảng 3.46. Kết quả định lượng mẫu Xáo tam phân thu mua

Mẫu	Hàm lượng*		
	Demethylsuberosin (%)	Ostruthin (%)	8-Methoxyostruthin (%)
M1	1,04	6,55	0,64
M 2	0,68	11,43	-
M 3	-	4,12	-
M 4	-	0,39	-
M 5	-	0,07	-

M 6	0,01	0,54	-
M 7	0,10	1,15	-
M 8	0,04	1,03	-
M 9	-	0,09	-
M 10	0,37	2,19	0,26

* Tính theo dược liệu khô kiệt

Nhận xét: Mẫu M1 (mẫu nghiên cứu), M10 có chứa demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin. Trong khi đó mẫu M2, M6, M7, M8 chỉ chứa demethylsuberosin và ostruthin. Mẫu M3, M4, M5, M9 chỉ chứa ostruthin.

Tại thời gian lưu 7,1 phút của mẫu M3 có 1 pic trùng với thời gian lưu của demethylsuberosin, tuy nhiên khi kiểm tra phổ UV, phổ UV của pic này không trùng với phổ UV của demethylsuberosin. Do đó, pic tại thời gian lưu 7,1 phút trong mẫu M3 không phải là demethylsuberosin.

Chương 4. BÀN LUẬN

Xáo tam phân có ở một số quốc gia ở Châu Á như: Thái Lan, Malaysia, Ấn Độ, Indonesia³³. Theo Phạm Hoàng Hộ, Xáo tam phân trước đây được tìm thấy ở núi Lấp Vò, tỉnh Bình Dương². Ở Việt Nam, do bị khai thác quá mức nên Xáo tam phân tự nhiên ngày càng cạn kiệt. Do đó, việc nghiên cứu dược liệu này là cần thiết nhằm chứng minh giá trị để có chính sách bảo tồn phù hợp. Viện Dược liệu lần đầu tiên nghiên cứu, công bố thành phần hóa học của Xáo tam phân thu hái ở Hòn Hèo, Khánh Hòa và báo cáo hoạt tính độc tế bào trên 5 dòng tế bào ung thư: Ung thư gan người HepG2, ung thư đại tràng người HTC116, ung thư vú người MDA-MB-231, ung thư buồng trứng người OVCAR-8 và ung thư cổ tử cung người Hela, trong đó hoạt tính mạnh nhất trên tế bào HepG2, Hela³. Năm 2018, Nguyễn Thị Huyền Lâm và cộng sự báo cáo cao methanol từ rễ Xáo tam phân ức chế tăng trưởng và gây chết tế bào ung thư vú MCF-7³⁶. Hoạt tính độc tế bào ung thư của cao rễ Xáo tam phân được khẳng định trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Tăng và cộng sự (2018) trên các dòng tế bào ung thư MiaPaCa-2 (tuyến tụy), HT29 (ruột kết), A2780 (buồng trứng), H460 (phổi), A431 (da), Du145 (tuyến tiền liệt), BE2-C (nguyên bào thần kinh), MCF-7 (vú) và U87, SJ-G2, SMA (nguyên bào thần kinh đệm) với IC₅₀ khoảng 15 - 32 µg/ml³⁷.

Những báo cáo nêu trên cho thấy Xáo tam phân là một dược liệu tiềm năng có thể nghiên cứu và phát triển sản phẩm từ dược liệu này ứng dụng trong phòng và/hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư. Việc nghiên cứu hóa học, phân lập các chất mới cũng như tác dụng sinh học nói riêng và hoạt tính độc tế bào của dược liệu này là cần thiết nhằm cung cấp cơ sở khoa học, góp phần xác định giá trị của dược liệu cũng như cung cấp nguồn dữ liệu tham khảo cho những nghiên cứu tiếp theo về Xáo tam phân.

4.1. Phân tích thành phần hoá học, thử tính khiết nguyên vật liệu nghiên cứu

4.1.1. Về phân tích sơ bộ thành phần hoá thực vật

Đến nay, các nghiên cứu báo cáo hóa thực vật của những bộ phận khác nhau (rễ, thân, vỏ thân, lá, cành, quả) của 4 loài *P. trimera*, *P. scandens*, *P. griffithii*, *P. monophylla*. Thành phần hoá học của chi *Paramignya* là coumarin, coumarin glycosid, tirucallan saponin, acridon alkaloid, flavonoid, phenol, chromen và megastigman²⁵.

Nghiên cứu này phân tích sơ bộ thành phần hoá thực vật của rễ, thân, lá Xáo tam phân cho thấy dược liệu chứa nhiều coumarin, triterpenoid, saponin và alkaloid. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Nguyễn Văn Tăng và cộng sự (2017)³⁷ cho thấy Xáo tam phân chứa nhiều chất chống oxy hóa mạnh thuộc nhóm phenolic, flavonoid và proanthocyanidin, đặc biệt là các hợp chất nhóm coumarin. Các nhóm chất này và dẫn xuất của chúng được báo cáo các hoạt tính sinh học như chống đông máu, kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, kháng vi rút..., được ứng dụng trong phòng ngừa, điều trị và/hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về thần kinh, tim mạch, ung thư và một số bệnh khác. Đa số các tác dụng này được giải thích là do cơ chế kháng viêm, chống oxy hóa, trung hòa gốc tự do. Kết quả gợi ý các hợp chất nhóm coumarin, phenolic, flavonoid và proanthocyanidin có thể đóng vai trò quan trọng trong tác dụng sinh học của dược liệu Xáo tam phân. Do đó, trong luận án này, quá trình phân lập các chất và thử nghiệm sinh học được tập trung ưu tiên đối với những phân đoạn cao chiết có nhóm hợp chất này.

4.1.2. Về thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết

Nghiên cứu đã thực hiện thử một số chỉ tiêu độ tinh khiết của nguyên liệu (rễ, thân, lá lần lượt có độ ẩm 7,61%, 7,25%, 8,81%; độ tro toàn phần 3,30%, 4,31%, 3,25%; độ tro không tan trong acid hydrocloric 0,36%, 0,30%, 0,27%).

Hàm lượng chất chiết được từ rễ, thân, lá Xáo tam phân với dung môi nước lần lượt là 17,8%, 1,74% và 1,53% cho thấy hàm lượng chất chiết được từ rễ có kết quả cao nhất. Từ các kết quả này giúp thiết lập các tiêu chuẩn cơ sở cũng như xây dựng

chuyên luận Dược điển cũng như dựa vào đặc điểm hàm lượng chất chiết được góp phần định hướng cao chiết cho việc nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất.

4.1.3. Định tính, định lượng polyphenol

Các hợp chất polyphenol được chứng minh thể hiện nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, giúp bảo vệ tim mạch, kháng ung thư, chống lão hóa nhờ cơ chế tác động kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa giúp loại bỏ các gốc tự do, ức chế quá trình oxy hóa lipid, giảm sự hình thành hydroperoxid¹³⁸. Theo nghiên cứu của Bowyer và cộng sự (2015), các polyphenol có trong Xáo tam phân đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng kháng ung thư của dược liệu này¹²⁵. Do đó, nghiên cứu này đã tiến hành định tính và định lượng polyphenol trong các cao chiết ethanol 96% từ rễ, thân, lá Xáo tam phân. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong các cao chiết giảm dần theo thứ tự: thân (154,45 mg pyrogallol/g cao) > rễ (108,05 mg pyrogallol/g cao) > lá (52,01 mg pyrogallol/g cao). Kết quả này có thể giải thích cho hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao giảm dần theo thứ tự cao thân > cao rễ > cao lá với giá trị EC₅₀ khi khảo sát bằng phương pháp DPPH lần lượt là 158,14 µg/ml, 274,36 µg/ml và 593,94 µg/ml. Điều này cho thấy có mối liên hệ tương quan thuận giữa hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao chiết Xáo tam phân với hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*.

Trên cơ sở kết quả cao chiết từ thân thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* mạnh nhất, luận án chọn tiếp tục chuẩn bị các cao phân đoạn từ cao toàn phần của thân để phân lập các chất.

4.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và các cao phân đoạn

4.2.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

DPPH là phương pháp được sử dụng rộng rãi để kiểm tra khả năng loại bỏ gốc tự do và định lượng các chất oxy hóa^{55, 56} với ưu điểm thao tác đơn giản có thể thực hiện đồng thời số lượng mẫu thử lớn, sử dụng lượng mẫu ít, cho kết quả nhanh và chi phí thấp. Vì vậy, luận án chọn phương pháp DPPH để khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao toàn phần cũng như các cao chiết phân đoạn nhằm nghiên

cứu phân lập các chất trong dược liệu Xáo tam phân theo định hướng tác dụng sinh học. Bên cạnh đó, đề tài cũng dùng phương pháp định lượng MDA sử dụng dịch đồng thể gan⁶⁷ cho kết quả về hoạt tính chống oxy hóa của các cao phân đoạn tương quan thuận gần với kết quả trên cơ thể động vật, giúp chọn cao phân đoạn tiềm năng để phân lập các chất có ý nghĩa thực tế cao.

Kết quả thu được cho thấy hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao toàn phần Xáo tam phân giảm dần theo thứ tự thân > rễ > lá với giá trị EC₅₀ lần lượt là 158,14 µg/ml, 274,36 µg/ml và 593,94 µg/ml so với 5,27 µg/ml của đối chứng acid ascorbic. Đối với các cao phân đoạn từ rễ, thân Xáo tam phân, kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp bắt giữ gốc tự do DPPH và định lượng MDA cho thấy các cao phân đoạn kém phân cực (n-hexan, cloroform) từ rễ hoặc thân Xáo tam phân thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn cao phân cực (ethyl acetat, nước); các cao phân đoạn từ rễ thể hiện tác dụng chống oxy hóa *in vitro* tốt hơn các cao từ thân. Sự khác biệt về hoạt tính của các cao có thể do sự khác biệt về thành phần hóa học cũng như thành phần các chất kém phân cực, thân lipid dễ qua màng tế bào để thể hiện tác động. Kết quả này có thể giải thích do trong Xáo tam phân, hầu hết các hợp chất có độ phân cực trung bình đến kém phân cực, nên các hợp chất chủ yếu tan trong dung môi cloroform và ethyl acetat.

Theo Nguyễn Văn Tăng và cộng sự (2017), các hợp chất polyphenol trong Xáo tam phân là một trong những thành phần quan trọng quyết định hoạt tính chống oxy hóa, giúp hạn chế sự hình thành các gốc tự do trên cơ chế nhường hydro nhờ sự hiện diện của các nhóm hydroxyl và khả năng khử ion kim loại³⁷. Các cao toàn phần và cao phân đoạn Xáo tam phân cũng đã được báo cáo hoạt tính chống oxy hóa trong một số nghiên cứu trước đây. Ngoài khả năng đánh bắt gốc tự do, các hợp chất polyphenol còn thể hiện khả năng phá vỡ chuỗi phản ứng peroxyd hóa lipid màng tế bào nhờ đặc điểm cấu trúc và khả năng tương tác với phospholipid màng, giúp các hợp chất này trở thành chất ổn định màng và có khả năng ức chế quá trình peroxyd hóa lipid hiệu quả; sự cho điện tử hoặc hydro của các hợp chất polyphenol góp phần vào quá trình bẻ gãy chuỗi phản ứng và ức chế peroxyd hóa lipid¹³⁸. Điểm

khác biệt của luận án này so với các báo cáo trước đây về hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao toàn phần, cao phân đoạn và các hợp chất phân lập được là đã tiến hành đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, ức chế peroxyd hóa lipid của các cao toàn phần từ rễ, thân, lá và các cao phân đoạn từ thân, rễ bằng phương pháp định lượng malonyl dialdehyd (MDA) để có định hướng nghiên cứu thành phần hóa học phù hợp với tác dụng trên cơ thể động vật và người khi phát triển sản phẩm ứng dụng trong thực tế.

Một số hợp chất phân lập từ dược liệu Xáo tam phân như paramitrimerol, paratrimerin C, ninvhanin B, acid parabacunoic, citrussinine-I, limonin, umbelliferon, acid gallic, acid protocatechuic, acid ellagic, rutin và quercetin được báo cáo hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ ADN tế bào khỏi tổn thương oxy hóa^{37,157,158}. Hoạt tính này phù hợp với tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan của cao chiết từ thân Xáo tam phân phòng ngừa tác hại của paracetamol trên chuột nhắt đã báo cáo trước đây^{17,18}. Chính hoạt tính chống oxy hóa là tiền đề cho các tác dụng dược lý kháng viêm, bảo vệ gan, ức chế enzym α -glucosidase, độc tế bào ung thư của dược liệu này; từ đó được sử dụng trong các bài thuốc thảo dược điều trị các bệnh như đái tháo đường, viêm gan, tác dụng giải nhiệt, mát gan cũng như phòng ngừa, hỗ trợ điều trị một số bệnh ung thư¹²⁵.

Kết quả này cùng với kết quả khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của ba bộ phận khác nhau (rễ, thân, lá) trên cùng một cây và cùng vị trí địa lý là cơ sở để phát triển nghiên cứu hóa thực vật các bộ phận dùng của Xáo tam phân theo định hướng tác dụng sinh học của luận án cũng như đánh giá tiềm năng ứng dụng của các bộ phận dùng của dược liệu trong phòng và/hoặc hỗ trợ điều trị bệnh nói chung và các bệnh ung thư nói riêng.

4.2.2. Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro*

Một số nghiên cứu đã chứng minh các gốc tự do gây stress oxy hóa là một trong những nguyên nhân gây ung thư do cơ chế gây tổn thương ADN, thúc đẩy quá trình chết theo chu kỳ của tế bào (apoptosis) và gia tăng đột biến trong tế bào. Từ đó, các

chất hoặc dược liệu chứa hợp chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa đã thể hiện khả năng kháng ung thư¹³⁸.

Năm 2017, Nguyễn Văn Tăng và cộng sự cũng chứng minh tác động ức chế sự tăng trưởng của các tế bào ung thư khá đáng kể, rất có thể có liên quan đến nồng độ cao của các hợp chất hoá học trong Xáo tam phân³⁷. Chính kết quả này đã tạo ra một bước phát triển mới trong việc nghiên cứu khả năng điều trị ung thư từ cao chiết Xáo tam phân. Năm 2018, Nguyễn Văn Tăng và cộng sự công bố các nghiên cứu cho thấy cao chiết rễ Xáo tam phân và cao chiết từ lá thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh trên các dòng tế bào ung thư khác nhau bao gồm MiaPaCa-2 (tuyến tụy), HT29 (ruột kết), A2780 (buồng trứng), H460 (phổi), A431 (da), Du145 (tuyến tiền liệt), BE2-C (u nguyên bào thần kinh), (MCF) -7 (vú), MCF-10A (vú bình thường), U87, SJ-G2 và SMA (u nguyên bào thần kinh đệm)¹⁷.

Nghiên cứu này đã khảo sát tác động của các cao chiết Xáo tam phân đối với sự tăng trưởng của 2 dòng tế bào khác nhau bao gồm: Ung thư vú người MDA-MB-231 và tế bào ung thư gan người HepG2 vì ung thư gan và ung thư vú là hai trong ba loại ung thư có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất tại Việt Nam và các nước đang phát triển [ung thư gan (14,5%), phổi (14,4%), vú (11,8%)]¹. Ngoài ra, hiện nay, dược liệu Xáo tam phân đang được truyền miệng, sử dụng nhiều trong hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư gan, ung thư phổi³. Dòng tế bào ung thư gan người như HepG2 đã được đề xuất trong các mô hình *in vitro* thay thế cho tế bào gan người bình thường nhờ lợi thế tiềm năng của tế bào ung thư có thể kể đến như là một dòng tế bào bất tử, có sẵn với số lượng lớn, dễ duy trì vì có thể bảo quản lạnh và hoạt động của enzym chuyển hóa thuốc không giảm trong quá trình nuôi cấy, như đã xảy ra trong nuôi cấy tế bào gan nguyên phát ở người. Dòng tế bào HepG2 sở hữu nhiều đặc điểm sinh hóa và hình thái của tế bào gan bình thường. Tế bào HepG2 cũng cho thấy tỷ lệ tương đồng khoảng 81,3% so với tế bào gan người mới phân lập⁷⁴. Dòng tế bào MDA-MB-231 được sử dụng làm đại diện cho ung thư vú không biểu hiện ER α , PR, HER's-2, đây là phân nhóm ung thư vú ác tính nhất và có khả năng di căn cao; từ đó, được dùng rộng rãi trong các nghiên cứu về phát triển và xâm lấn của ung thư vú⁷⁹.

Đối với dòng tế bào ung thư MDA-MB-231: Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị IC_{50} của cao rễ và lá lần lượt là 29,57 $\mu\text{g/ml}$ và 58,35 $\mu\text{g/ml}$, hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 của cao rễ mạnh gấp hai lần so với cao lá. Lần đầu tiên, cao lá Xáo tam phân được khảo sát và báo cáo về tác động đối với dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231. Kết quả thu được từ luận án này phù hợp với báo cáo của Ninh Thế Sơn (2018) cho thấy cao chiết methanol từ rễ, lá Xáo tam phân được báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MCF-7 ở nồng độ khảo sát 100 $\mu\text{g/ml}$, trong đó cao methanol từ rễ có giá trị IC_{50} trên dòng tế bào MCF-7 là 23 $\mu\text{g/ml}$ ²⁵. Tuy nhiên, kết quả này khác biệt so với báo cáo trước đây của Nguyễn Minh Khởi và cộng sự (2013)¹⁷, trong đó, cao methanol từ Xáo tam phân thể hiện hoạt tính độc tế bào kém trên dòng tế bào MDA-MB-231. Sự khác biệt này có thể giải thích là do khác biệt về nguồn gốc của dược liệu, dung môi chiết xuất dẫn đến thành phần hóa học có thể khác nhau nên hoạt tính sinh học nói chung và hoạt tính độc tế bào nói riêng sẽ khác nhau. Hoạt tính độc tế bào ung thư vú người của Xáo tam phân có thể giải thích nhờ tác động của một số hợp chất trong dược liệu nhóm coumarin. Bên cạnh ostruthin – hợp chất chính trong Xáo tam phân thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 với giá trị IC_{50} là 48,74 $\mu\text{M/ml}$ so với 1,21 $\mu\text{M/ml}$ của mẫu đối chứng adriamycin (doxorubicin), các hợp chất paramignylol A và paramignylol B trong dược liệu này đã được báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MCF-7 với giá trị IC_{50} lần lượt là $7,22 \pm 0,23 \mu\text{M}$ và $5,98 \pm 0,09 \mu\text{M}$ so với $1,87 \pm 0,20 \mu\text{M}$ của mẫu đối chứng dương ellipticin²⁵. Hợp chất β -caryophyllene, α -humulene, isocaryophyllene có trong lá của Xáo tam phân cũng được báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư trên dòng tế bào MCF-7. Kết quả thu được bước đầu gợi ý Xáo tam phân có thể là một dược liệu tiềm năng trong nghiên cứu phát triển sản phẩm ứng dụng trên lâm sàng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư vú.

Đối với dòng tế bào ung thư HepG2: Kết quả xác định giá trị IC_{50} cho thấy hoạt tính độc tế bào của các cao chiết toàn phần từ Xáo tam phân giảm dần theo thứ tự: cao rễ (24,91 $\mu\text{g/ml}$) > cao lá (86,86 $\mu\text{g/ml}$) > cao thân (> 100 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả này

phù hợp với báo cáo của Nguyễn Văn Khởi và cộng sự (2018) cho thấy cao chiết methanol từ Xáo tam phân thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HepG2³. Tuy nhiên, giá trị IC₅₀ thu được từ nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Trường Sinh và cộng sự (2020)⁴¹, trong đó giá trị IC₅₀ của cao chiết Xáo tam phân trên tế bào HepG2 là $582,533 \pm 16,521$ µg/ml. Nghiên cứu này là một trong những báo cáo đầu tiên hoạt tính độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan người HepG2 của cao lá Xáo tam phân. Kết quả bước đầu cung cấp cơ sở khoa học, gợi ý có thể tận dụng nguồn nguyên liệu lá Xáo tam phân so với hai bộ phận thường dùng hiện nay là rễ, thân trong nghiên cứu phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư gan.

Nghiên cứu này đã khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HepG2 *in vitro* của các cao phân đoạn từ cao ethanol 96% toàn phần của rễ, thân Xáo tam phân. Kết quả cho thấy các cao phân đoạn phân cực từ rễ và các cao phân đoạn từ thân Xáo tam phân không thể hiện hoạt tính độc tế bào HepG2. Kết quả này phù hợp với báo cáo trước đây của Viện Dược liệu (2013)³, theo đó các phân đoạn phân cực n-butanol, ethyl acetat của thân Xáo tam phân không làm giảm tỷ lệ tế bào HepG2 sống xác định bằng phương pháp MTT. Các cao phân đoạn kém phân cực (n-hexan, cloroform) từ rễ thể hiện hoạt tính độc tế bào HepG2 tốt phù hợp với báo cáo của Viện Dược liệu (2013)³ về tác động làm giảm mạnh tỷ lệ tế bào HepG2 sống ở nồng độ 100 µg/ml của cao n-hexan. Tác động này được giải thích là do trong dược liệu Xáo tam phân có một số hợp chất có khả năng ức chế sự tăng trưởng của tế bào HepG2, cụ thể 2 hợp chất nhóm coumarin (ostruthin và dẫn xuất 8-methoxyostruthin), 4 acridon alkaloid (citrusinine-I, glycocitrine-III, oriciacridon và 5-hydroxynoracronycin) ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư gan người HepG2 với giá trị IC₅₀ lần lượt là $30,53 \pm 0,61$ µM/ml, $62,90 \pm 2,58$ µM/ml, $51,40 \pm 1,19$ µM/ml, $31,66 \pm 0,46$ µM/ml, $52,50 \pm 5,25$ µM/ml và $32,81 \pm 0,87$ µM/ml so với $0,051 \pm 0,007$ µM/ml của mẫu đối chứng dương camptothecin²⁵. Kết quả thu được trong đề tài này cho thấy ostruthin và 8-

methoxyostruthin thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HAK1B với giá trị IC_{50} lần lượt là 40,095 μ M và 60,112 μ M.

Kết quả thu được từ đề tài về hoạt tính độc tế bào ung thư gan HepG2 của các cao phân đoạn từ rễ Xáo tam phân giảm dần theo thứ tự cao n-hexan > cao cloroform > cao ethylacetat $\sim$ cao nước tương tự như thứ tự giảm dần của hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* trong phương pháp định lượng MDA của các cao phân đoạn: n-hexan > cao cloroform > cao ethylacetat > cao nước. Điều này gợi ý mối quan hệ giữa hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* trong phương pháp định lượng MDA (sử dụng dịch đồng thể gan) với hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HepG2: hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh thì khả năng ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư càng tốt. Kết quả này phù hợp với các báo cáo về vai trò của hoạt tính oxy hóa đối với những tác dụng sinh học của các hợp chất/dược liệu¹²⁵.

Những kết quả thu được là tiền đề để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học theo định hướng tác dụng chống oxy hóa, độc tế bào ung thư gan của Xáo tam phân và định hướng sử dụng bộ phận dùng thích hợp (rễ tốt hơn thân) trong nghiên cứu, phát triển sản phẩm ứng dụng phòng và điều trị bệnh.

4.3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng

Hiện nay, mới có 4 loài được nghiên cứu về thành phần hóa học ở các mức độ khác nhau. Trong đó, có 01 loài thu ở Sri Lanka (*P. monophylla*), 01 loài ở Thái Lan (*P. griffithii*) và 02 loài ở Việt Nam (*P. trimera*, *P. scandens*). Cho đến nay có khoảng 85 hợp chất tự nhiên đã được phân lập ra từ chi *Paramignya*, bao gồm 18 coumarin, 15 tirucallan và tirucallan saponin, 9 alkaloid, 11 flavanon và một số hợp chất khác²⁵. Thân và rễ Xáo tam phân đã phân lập được 57 hợp chất, trong đó có 16 hợp chất coumarin, 10 alkaloid, 6 flavonoid và 25 hợp chất khác.

Trong nghiên cứu này, qua quá trình phân lập bằng các kỹ thuật khác nhau bao gồm lắc phân bố, sắc ký cột chân không, sắc ký cột cổ điển từ dược liệu là rễ và thân Xáo tam phân đã phân lập được 12 hợp chất tinh khiết, trong đó 8 hợp chất phân lập từ rễ và 4 hợp chất phân lập từ thân. Các phương pháp sử dụng là những

phương pháp nghiên cứu phân lập thường quy và đơn giản, một số hợp chất thu được từ kết tinh từ các phân đoạn giàu hợp chất. Do đó, các quy trình này hoàn toàn có thể lặp lại khi cần thiết để thu các hợp chất tiềm năng hoặc ứng dụng trong phân lập chất chuẩn phục vụ nghiên cứu được lý *in vivo* và công tác kiểm nghiệm khi cần thiết.

4.4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập

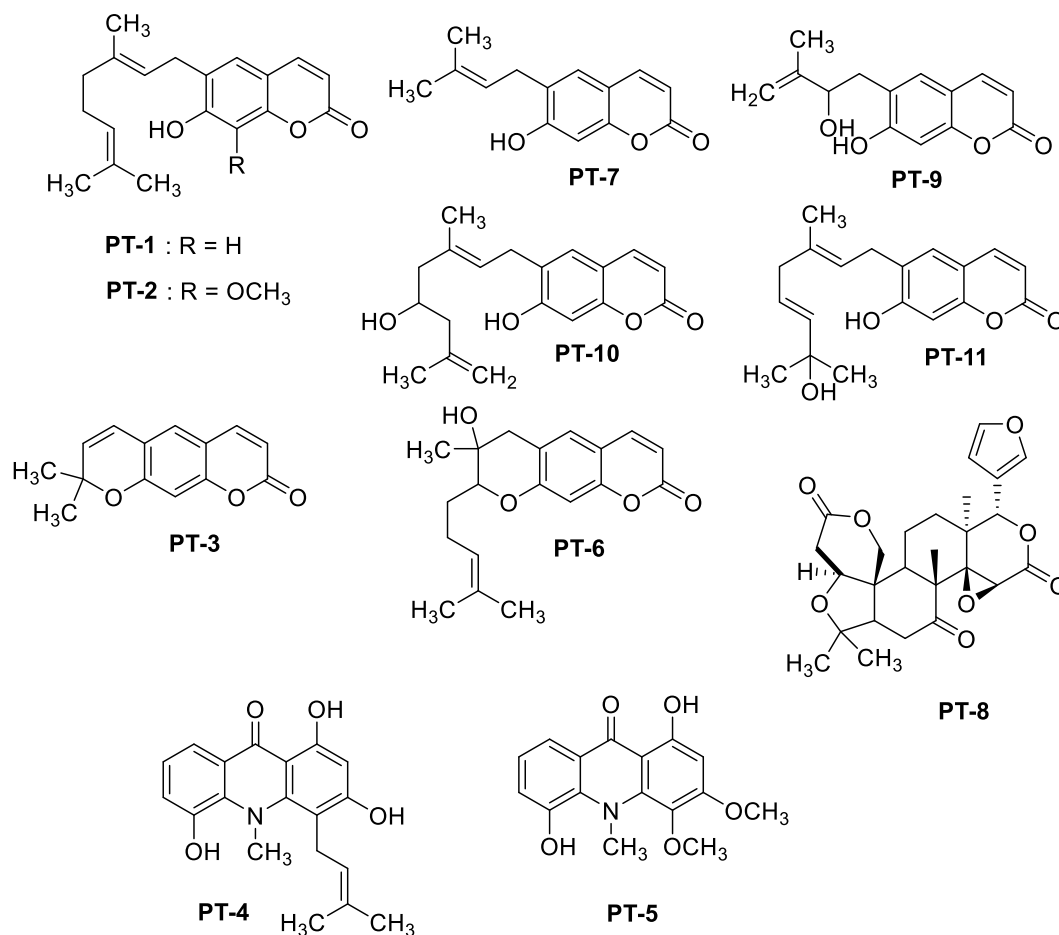
Trong 12 hợp chất phân lập có 5 hợp chất lần đầu công bố trong loài Xáo tam phân (xanthyletin, oriciacridon, citrussin-1, limonin và 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin) và 1 chất mới trong thiên nhiên (3'-hydroxy-3'methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin).

Trong 12 hợp chất tinh khiết đã phân lập được có 6 hợp chất coumarin thuộc nhóm 7-hydroxycoumarin (ostruthin, 8-methoxyostruthin, demethylsuberosin, 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin, 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin, 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin), 2 hợp chất nhóm pyranocoumarin (xanthyletin, 3'-hydroxy-3'methyl-2'-(4''-isoprenyl)-pyranocoumarin), 2 acridon alkaloid (oriciacridon, citrussin-1).

Các coumarin **PT-1**, **PT-2**, **PT-7**, **PT-9**, **PT-10**, **PT-11** thu được từ Xáo tam phân có khung cơ bản 7 hydroxycoumarin. Kiểm tra trên cơ sở dữ liệu của Reaxys và Scifinder ngày 30/7/2022, thì cấu trúc hợp chất **PT-6** 3'-hydroxy-3'methyl-2'-(4''-isoprenyl)-pyranocoumarin chưa có dữ liệu. Do đó, hợp chất **PT-6** được xem là chất mới.

7-hydroxycoumarin (umbelliferon) là một chất chuyển hóa phenolic được tìm thấy trong nhiều loại thực vật. Các dẫn xuất của nó đã được chứng minh là có nhiều tác dụng dược lý và phòng ngừa hóa học đối với sức khỏe con người^{139,140}. 7-hydroxycoumarin chống lại các dòng tế bào khối u ở người lần đầu tiên được phát triển trong các mô hình động vật khác nhau. Ngoài ra, 7-hydroxycoumarin và các chất tương tự thay thế đã cho thấy làm giảm sự tăng sinh tế bào ở vú, ức chế sự phát triển của tế bào trong pha G1 bằng cách gây ra sự bất giữ chu kỳ tế bào trong tất cả

các tế bào ung thư biểu mô phổi và ức chế sự tăng sinh tế bào trong các tế bào ung thư biểu mô dạ dày¹⁵⁰.



Hình 4.1. Các hợp chất phân lập từ rễ và thân của Xáo tam phân

PT-1 (Ostruthin) là một coumarin đặc trưng có trong Xáo tam phân cũng như các loài trong chi *Paramignya*. Trong Xáo tam phân ostruthin chiếm một khối lượng lớn và dễ phân lập từ dược liệu bằng các phương pháp phân lập thường quy và đơn giản. **Ostruthin** là 7-hydroxycoumarin được thay thế ở vị trí 6 bởi nhóm dây nhánh geranyl. Nghiên cứu của Dadak và cộng sự năm 1966 cho thấy sự hiện diện của nhóm dây nhánh geranyl tạo tác dụng kháng khuẩn mạnh so với umbelliferone không có tác dụng kháng khuẩn¹⁴⁸. **Ostruthin** được chứng minh có tác dụng kháng viêm trên tế bào BV2¹⁹, tác dụng ức chế alpha-glucosidase¹¹, tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm¹⁶³, ức chế sự tăng sinh tế bào cơ tron¹⁶², ức chế sự biệt hóa tế bào¹⁶⁴, gây độc tế bào đối với hai dòng tế bào tuyến tụy của con người ung thư PANC-1 và

PSN-1¹⁹. Ostruthin có hoạt tính kích hoạt kênh TREK-1 (EC_{50} 5,3 μ M), đã kích hoạt dòng kênh TREK-2 ở nồng độ cao hơn (EC_{50} 3,7 mM) so với TREK-1 và ostruthin cho thấy tác dụng chống trầm cảm trên chuột thí nghiệm trong cả hai bài kiểm tra buộc phải bơi và treo đuôi¹⁶⁵. Ostruthin cho thấy tác dụng giải lo âu trong các thử nghiệm trên trường mở, trên cao cộng với mê cung và hộp sáng/tối ở liều thấp (5 mg/kg)¹⁶⁵. Hạt nano vàng (AuNP) được tổng hợp bằng phương pháp xanh từ ostruthin có hoạt động như chất chống ung thư chống lại dòng tế bào ung thư vú (MCF-7), dòng tế bào ung thư gan ở người (HepG2) và phổi không phải tế bào nhỏ (NCI-H460)¹⁶⁶.

PT-2 (8- methoxyostruthin) với ostruthin gần như tương tự nhau, chỉ khác là có thêm một nhóm thế methoxy ở C8. **8-methoxyostruthin** cũng có tác dụng kháng viêm trên tế bào BV2¹⁹, ức chế alpha-glucosidase (Đặng và cộng sự, 2017)¹¹

PT-7 (Demethylsuberosin) là 7-hydroxycoumarin được thay thế ở vị trí 6 bởi nhóm 3-metylbut-2-en-1-yl. **Demethylsuberosin** đã được chứng minh là có hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn và chống oxy hóa¹²⁶. Demethylsuberosin cũng đã được chứng minh là có hoạt tính kháng nấm *in vitro* chống lại *Candida albicans* và *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra, demethylsuberosin ức chế sự phát triển của tế bào HL-60 trong ống nghiệm bằng cách ức chế tổng hợp acid *p*-hydroxybenzoic (pHBA). Hoạt tính sinh học của demethylsuberosin là do nó có khả năng ức chế hoạt động của các enzym như ADN polymerase, ARN polymerase và tổng hợp protein. Các hoạt tính dược lý của hợp chất này là do khả năng xúc tác thành acid malonic và khả năng hoạt động như một chất điều hòa chuyển hóa năng lượng.

PT-9 (6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin) trước đây được phân lập từ *Angelica gigas* có tác dụng kháng enzym AchE, $IC_{50} = 1.0 \times 10^{-4}$ M¹⁴³, nghiên cứu lần đầu công bố phân lập được **(6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin)** từ Xáo tam phân.

PT-10 (6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin được phân lập từ *Eriostemon tomentellus* (1992)¹⁵¹ và *Ligusticum involucratus* (2005)¹⁵²

đến năm 2015 được Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự phân lập từ Xáo tam phân⁸ nhưng đến nay vẫn chưa được thử tác dụng dược lý của hợp chất này.

PT-11 (6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin) được phân lập từ *Eriostemon tomentellus* (1992)¹⁵¹ đến năm 2017 được Lê Hoàng Tuấn Anh và cộng sự phân lập từ Xáo tam phân¹⁹ nhưng đến nay vẫn chưa được thử tác dụng dược lý của hợp chất này.

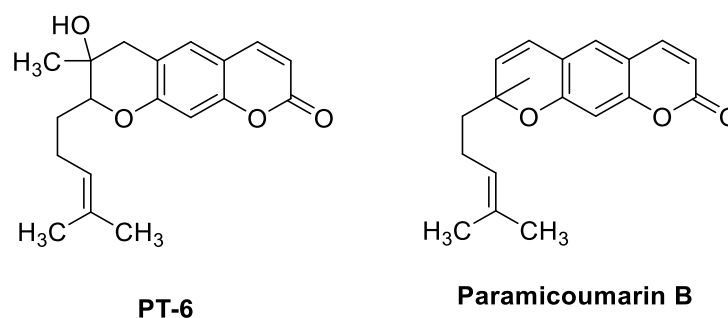
Các dẫn xuất acridon alkaloid đã thể hiện các hoạt tính sinh học như kháng viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, chống sốt rét, kháng virus và các hoạt động diệt nấm¹⁵³. Nghiên cứu đã phân lập và xác định được 2 acridon alkaloid **PT-4 (ociriacrison)** và **PT-5 (citrusinin-1)**. Sau khi đề tài công bố các acridon alkaloid đơn giản phân lập từ rễ Xáo tam phân thì các nhóm nghiên cứu cũng công bố thêm các acridon alkaloid mới bổ sung vào dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ Xáo tam phân như Trịnh Hoàng Dương và cộng sự đã phân lập 5 acridon alkaloid glycocitrin-III, oriciacrison E, 5-hydroxynoracronycin, paratrimerin C, paratrimerin D^{9,13}. Năm 2017, Đặng Hoàng phú và cộng sự đã phân lập 2 acridon paratrimerin C, paratrimerin D¹¹. Năm 2020, Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự đã phân lập được một acridon alkaloid mới, paratrimerin I từ phân đoạn CHCl₃ của rễ cây Xáo tam phân¹⁵. **Ociriacrison** và **citrusinin-1** đã được khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 bằng phương pháp sulforhodamine B (SRB) với giá trị IC₅₀ là 51,4 và 52,5 µg/mL⁹.

PT-3 (Xanthyletin) là một hợp chất thuộc nhóm pyranocoumarin, trong đó vòng pyran được hợp nhất trực tiếp với thành phần benzen của nhân coumarin. Xanthyletin được phân lập từ *Stauranthus perforatus*¹⁵⁴, có hoạt tính chống khối u và kháng khuẩn. Xanthyletin cũng ức chế nấm cộng sinh ức chế nấm cộng sinh (*Leucoagaricus gongylophorus*) của kiến cắt lá (*Atta sexdens rubropilosa*)¹³⁵. Nghiên cứu lần đầu công bố phân lập được **Xanthyletin** từ Xáo tam phân.

Hợp chất PT-6 (chất mới) 3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(3''-isoprenyl)-pyranocoumarin

Năm 2018, Trịnh Hoàng Dương và cộng sự công bố hợp chất mới paramicoumarin B được phân lập từ chiết xuất n-hexan của rễ Xáo tam phân. Khi so

sánh dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR và cấu trúc của **PT-6** và paramicoumarin B gần như tương tự nhau, chỉ khác là **PT-6** có thêm 1 nhóm OH và khác biệt về giá trị δ_{C} ở C3 vì có thêm một nhóm thế hydroxy. Hai hợp chất PT-6 và paramicoumarin B¹⁵⁸ đều là hợp chất mới trong tự nhiên và có khung cơ bản của pyranocoumarin, chỉ khác nhau vị trí thế $-\text{CH}_3$ và nhóm $-\text{OH}$ ở vị trí C-2' và C-3'. Quá trình phân lập được khối lượng ít nên đề tài chưa thực hiện được khảo sát tác dụng sinh học của hợp chất **PT-6**.



Hình 4.2. Cấu trúc của **PT-6** và paramicoumarin B

Nghiên cứu lần đầu công bố phân lập được **PT-8 (limonin)** từ Xáo tam phân. **Limonin** là một furanolacton được tìm thấy trong các loài thuộc họ Cam quýt có nhiều đặc tính thúc đẩy sức khỏe¹³⁷ đặc biệt là trong điều trị chống ung thư, chống viêm và giảm đau, kháng khuẩn và kháng virus, có tiềm năng ứng dụng lâm sàng rất lớn. Nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* cho thấy limonin có thể điều chỉnh sự biểu hiện của các gen và protein liên quan, bao gồm BCL2/Bax, MCP-1, p53, p21, miR-216a-3p, các sản phẩm cuối glycation nâng cao (AGEs), TNF- α , iNOS, IL-1 β , IL-2, IFN- γ và HIV-1 gag. Ngoài ra, limonin cũng ảnh hưởng đến các đường dẫn tín hiệu Wnt5 / beta-catenin, TLR4 / NF- κ B, OST và TLR^{155, 156, 157}.

4.5. Sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào *in vitro* của ostruthin và 8-methoxyostruthin

4.5.1. Về đánh giá hoạt tính độc tế bào của ostruthin và 8-methoxyostruthin

Đến nay, các nghiên cứu về hóa thực vật của Xáo tam phân cho thấy ostruthin và 8-methoxyostruthin là hai hợp chất có trong dược liệu với hàm lượng cao. Hai hợp chất này cũng được cho là đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng sinh học của

được liệu Xáo tam phân. Hợp chất ostruthin và các dẫn xuất đã được báo cáo thể hiện tác dụng sinh học đa dạng gồm hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase, kháng khuẩn, chống sốt rét, chống ung thư và chống viêm¹⁶⁶. Trong đó, hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm là cơ chế tác động quan trọng đối với các tác dụng sinh học. Các nghiên cứu cho thấy mối liên hệ mật thiết giữa tình trạng stress oxy hóa và hiện tượng viêm trong cơ chế bệnh sinh. Mối liên hệ này diễn ra đồng thời và tăng ảnh hưởng lẫn nhau tại vị trí tổn thương. Khi nồng độ các gốc oxy hoạt động (ROS) tăng trong các tế bào sẽ dẫn đến stress oxy hóa đồng thời kích hoạt yếu tố phiên mã hạt nhân kappa B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B), điều hòa quá trình sao chép ADN và các chất trung gian gây viêm. NF- κ B được hoạt hóa nhằm tăng khả năng chống viêm và chống apoptosis do ROS gây ra³⁰. Hợp chất ostruthin (6-geranyl-7-hydroxycoumarin) thuộc nhóm coumarin với nhiều tác dụng sinh học khác nhau nhờ cơ chế chống oxy hóa. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự (2016)⁴² cho thấy hợp chất 8-methoxyostruthin ở liều 50 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm chỉ số ALT và hạn chế một phần tổn thương gan gây ra bởi paracetamol liều 400 mg/kg trên chuột nhắt. Hợp chất ostruthin ở liều 50 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm chỉ số AST, ALT, hạn chế tổn thương gan gây ra bởi paracetamol và có tác dụng bảo vệ gan tương tự với silymarin ở mức liều 50 mg/kg/ngày. Nhóm nghiên cứu của Lê Hoàng Tuấn Anh và cộng sự (2017)¹⁹ báo cáo ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động làm giảm nồng độ NO lần lượt ở nồng độ 9,8 μ M và 12,3 μ M; giảm mức độ PGE2 lần lượt ở nồng độ 9,4 μ M và 13,4. ngăn chặn sự biểu hiện của protein iNOS và cyclooxygenase-2 trong quá trình viêm do LPS (1 μ g/mL) gây ra sau 24 giờ xử lý tế bào thần kinh đệm chuột BV-2. Gần đây, ostruthin được báo cáo thể hiện tác dụng ức chế hoạt động của NF- κ B do TNF- α gây ra tế bào biểu mô phôi thận người HEK293¹⁶⁶.

Hiện nay, Xáo tam phân và các chất phân lập được từ dược liệu này được quan tâm nghiên cứu về tác dụng điều trị ung thư. Kết quả thu được từ luận án này cho thấy tác động độc tế bào ung thư của ostruthin và 8-methoxyostruthin trên dòng tế bào ung thư gan người HAK1B (giá trị IC₅₀ lần lượt là 40,095 μ M và 60,112 μ M so

với 8,222 μM của chất đối chiếu sorafenib) và dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 (IC_{50} lần lượt là 32,416 μM và 47,805 μM so với 6,099 μM của chất đối chiếu sorafenib). Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây. Ostruthin đã được Nguyễn Văn Khởi và cộng sự (2013)³ báo cáo hoạt tính độc tế bào *in vitro* trên 5 dòng tế bào ung thư (ung thư gan người HepG2, ung thư đại tràng người HTC116, ung thư vú người MDA-MB-231, ung thư buồng trứng người OVCAR-8 và ung thư cổ tử cung người Hela), đặc biệt, thể hiện hoạt tính ức chế mạnh sự tăng trưởng của tế bào HepG2 và Hela với giá trị IC_{50} lần lượt là 39,61 $\mu\text{g/ml}$ và 5,36 $\mu\text{g/ml}$. Theo nghiên cứu của Li và cộng sự (2012), ostruthin thể hiện hoạt tính độc tế bào, ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư tuyến tụy¹⁴⁷. Trịnh Hoàng Dương và cộng sự¹³ khảo sát hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2 cho thấy các hợp chất ostruthin và 8-methoxyostruthin có hoạt tính với IC_{50} lần lượt là 30,53 $\mu\text{g/ml}$ và 62,90 $\mu\text{g/ml}$ so với 0,05 $\mu\text{g/ml}$ của mẫu chứng dương camptothecin. Báo cáo của Ninh Thế Sơn (2018), theo đó hợp chất chính ostruthin phân lập được từ Xáo tam phân đã được báo cáo thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 với giá trị IC_{50} là 48,74 $\mu\text{M/ml}$ so với 1,21 $\mu\text{M/ml}$ của mẫu đối chứng adriamycin (doxorubicin)²⁵.

Trong các thử nghiệm khảo sát hoạt tính độc tế bào *in vitro*, các đối chứng dương được sử dụng khác nhau phụ thuộc tính sẵn có cũng như kinh nghiệm sử dụng của các phòng thí nghiệm khác nhau và cơ chế tác động dự kiến, nguồn gốc của hợp chất tiềm năng so với các chứng dương (paclitaxel, doxorubicin, sorafenib) liên quan đến cơ chế bệnh sinh của ung thư (sự thay đổi của các gen do đột biến có thể dẫn tới những thay đổi trong chu kỳ tế bào)¹⁶⁹. Paclitaxel là thuốc hóa trị ung thư với cơ chế ngăn chặn sự phân chia và nhân lên của tế bào ung thư, làm khối ung thư không thể phát triển và lan rộng¹⁷⁰. Paclitaxel thường dùng làm chất đối chứng dương trong thử nghiệm sàng lọc ban đầu hoạt tính độc tế bào *in vitro* của cao chiết dược liệu. Doxorubicin là kháng sinh kháng ung thư nhóm anthracyclin được phát hiện lần đầu tiên từ *Streptomyces peucetius* vào những năm 1960. Doxorubicin có thể sử dụng một mình hoặc phối hợp để điều trị một số loại ung thư ác tính gồm

sarcoma, ung thư hạch, bệnh bạch cầu và ung thư vú¹⁶⁸. Nghiên cứu sử dụng doxorubicin làm thuốc chuẩn để so sánh các cao phân đoạn vì cơ chế tác dụng của doxorubicin chủ yếu thông qua việc tác dụng lên quá trình nhân bản của các phân tử ADN trong chu kỳ sinh trưởng của tế bào ung thư một chất tác dụng lên ADN ức chế topoisomerase I và II, gây tổn thương ADN và hình thành các loại oxy phản ứng (ROS) thúc đẩy hoạt hóa caspase và do đó dẫn đến apoptosis¹⁶⁷. Gần đây, trong điều trị ung thư, điều trị đích với các thuốc nhắm vào một số gen và protein chuyên biệt ở riêng tế bào ung thư hoặc những tế bào có liên quan đến sự phát triển của khối u. Sorafenib ức chế multikinase, ngăn tăng sinh và hình thành khối u, đồng thời gây apoptosis tế bào khối u bằng cách ức chế serine/threonine kinase (c-RAF, BRAF), ức chế thụ thể tyrosine kinase VEGFR2, VEGFR3, thụ thể yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu β (PDGFR- β), FLT3 và c-KIT¹⁷¹.

4.5.2. Vai trò của protein KDM2A đối quá trình tăng trưởng của tế bào ung thư gan HAK1B và tế bào ung thư vú MDA-MB-231

Một số cơ chế tác động liên quan đến hoạt tính độc tế bào ung thư của ostruthin và dẫn xuất đã được báo cáo như thúc đẩy quá trình vận chuyển của ty thể trong tế bào ung thư làm tăng hoạt tính độc tế bào với tác động kháng viêm qua đường dẫn tín hiệu NF- κ B, cụ thể: Ostruthin và dẫn xuất ngăn chặn đường truyền tín hiệu NF- κ B và ức chế sự liên kết của tiểu đơn vị NF- κ B RelA với bộ khởi động ICAM-1 đồng thời ức chế quá trình phosphoryl hóa I κ B α , RelA và ERK do TNF- α gây ra.

Nghiên cứu này khảo sát cơ chế tác động đối với hoạt tính độc tế bào của ostruthin và 8-methoxyostruthin thông qua cơ chế liên quan đến protein KDM2A.

Zinc-fingers và homeobox (ZHX2) được điều chỉnh các gen gây ung thư AFP, H19 và glypican-3 (GPC3). Một số nghiên cứu đã chứng minh ZHX2 có vai trò như một chất ức chế khối u và biểu hiện của ZHX2 giảm trong các khối u gan, khối u vú. Lysine demethylase 2A (KDM2A) tác động trực tiếp lên ZHX2 thông qua cơ chế khử methyl của histone H3 lysine 36 tại vùng khởi động (promoter) của các yếu tố phiên mã liên quan đến tính gốc của tế bào (stemness-associated transcriptional factors). KDM2A thể hiện tác động kích thích sự tăng sinh của tế bào, KDM2A

tăng biểu hiện trong ung thư gan, ung thư vú, ung thư phổi và ung thư dạ dày; KDM2A thúc đẩy tính gốc (stemness) của tế bào và sự hình thành mạch máu trong ung thư vú¹¹⁹⁻¹²². Một số hạch bạch huyết di căn dương tính với KDM2A, cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức của KDM2A ở vú có thể là dấu hiệu của sự di căn. KDM2A đóng vai trò quan trọng trong việc tái cấu trúc nhiễm sắc thể và phiên mã gen, đồng thời tham gia vào quá trình tăng sinh và biệt hóa tế bào, chuyển hóa tế bào, cân bằng nội môi dị thể và ổn định gen. KDM2A rất quan trọng cho quá trình hình thành và phát triển khối u.

Nghiên cứu đã khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư của ostruthin và 8-methoxyostruthin có liên quan đến KDM2A hay không thông qua thử nghiệm đưa phân tử siRNA vào trong tế bào nhằm bất hoạt gen KDM2A.

Kết quả trên hình ảnh Western blot cho thấy sau khi đưa phân tử KDM2A-siRNA vào tế bào HAK1B và tế bào MDA-MB-231, biểu hiện protein KDM2A đã bị bất hoạt gần như hoàn toàn so với nhóm chứng (control siRNA). Sau khi xử lý với đối chứng sorafenib trong 72 giờ ở các nồng độ 0,39-25 μM , so với nhóm tế bào MDA-MB-231 đối chứng (SiM), thì nhóm tế bào bất hoạt KDM2A (Si97) có tỷ lệ tế bào sống so với mẫu chứng cao hơn, kết quả cho thấy có sự khác biệt rõ giữa nhóm bất hoạt KDM2A và nhóm chứng. Như vậy, trong thí nghiệm này, protein KDM2A tác động đến quá trình tăng trưởng của tế bào ung thư vú MDA-MB-231. Tuy nhiên, đối với tế bào ung thư gan HAK1B, vai trò của KDM2A đối với tác động ức chế tăng trưởng tế bào của sorafenib chỉ thể hiện ở những nồng độ từ 0,39-1,56 μM . Kết quả thu được phù hợp với các nghiên cứu trước đây báo cáo sorafenib ức chế sự tăng trưởng của tế bào thông qua tác động của protein KDM2A.

Nghiên cứu này lần đầu báo cáo mối liên hệ giữa hoạt tính độc tế bào ung thư của ostruthin và 8-methoxyostruthin và biểu hiện của protein KDM2A trên hai dòng tế bào MDA-MB-231 và HAK1B. Kết quả cho thấy protein KDM2A có liên quan đến tác động ức chế tăng trưởng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 và tế bào ung thư gan người HAK1B của 8-methoxyostruthin ở nồng độ 25 μM sau thời gian xử lý tế bào trong 72 giờ. Điều này bước đầu gợi ý cơ chế tác động của hoạt tính

độc tế bào ung thư của 8-methoxyostruthin là ức chế sự biểu hiện của KDM2A, từ đó có thể ức chế quá trình hình thành và phát triển khối u. Kết quả này là tiền đề để tiếp tục nghiên cứu cơ chế tác động kháng ung thư của các chất phân lập từ Xáo tam phân để cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các sản phẩm ứng dụng trong phòng và/hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư của dược liệu Xáo tam phân.

4.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC.

4.6.1. Về xây dựng bộ dữ liệu chuẩn và đánh giá chất chuẩn 8-methoxyostruthin và ostruthin

Việc xây dựng phương pháp kiểm nghiệm cho một chất có tác dụng sinh học trong dược liệu thì yêu cầu cần thiết phải có chất đối chiếu để phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa dược liệu. Nhiều hợp chất tự nhiên trong Xáo tam phân đã được phân lập và đánh giá tác dụng sinh học. Thiết lập chất đối chiếu là cần thiết để tiến hành tiêu chuẩn hóa hợp chất có trong dược liệu Xáo tam phân. Trong các chất phân lập được, các hợp chất coumarin như ostruthin và 8-methoxyostruthin là các hợp chất đáp ứng đầy đủ yêu cầu đề ra về thiết lập chất đối chiếu. Ostruthin và 8-methoxyostruthin được lựa chọn để thực hiện theo tài liệu hướng dẫn của tổ chức ASEAN về thiết lập CDC. Mặc dù ostruthin và 8-methoxyostruthin đã được công bố trên thế giới nhưng tại thời điểm nghiên cứu, CDC ostruthin và 8-methoxyostruthin chưa có sẵn trên thị trường. Trong khi đó, với năng lực và trang thiết bị hiện đại của các cơ sở phân tích kiểm nghiệm ở trong nước thì việc thiết lập CDC phân lập từ dược liệu dựa theo các hướng dẫn là hoàn toàn thực hiện được.

Kết quả của luận án đã đáp ứng được nhu cầu cần thiết tạo ra CDC ostruthin và 8-methoxyostruthin cho việc tiêu chuẩn hóa hợp chất có tác dụng sinh học này trong cây Xáo tam phân.

4.6.2. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC

Việc kiểm soát chất lượng vẫn chưa được nghiên cứu nên tình hình sử dụng dược liệu còn nhiều vấn đề. Tình trạng nhầm lẫn hay cố tình làm nhái, làm giả gây ảnh

hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Do đó, cần thiết phải xây dựng một bộ tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho dược liệu Xáo tam phân.

Hiện nay, chỉ có báo cáo về “Phân lập và định lượng ostruthin trong dược liệu Xáo tam phân thu hái ở Việt Nam bằng HPLC”. Nghiên cứu này đã phân lập được thành phần chính từ thân và rễ là ostruthin. Với phương pháp HPLC sử dụng đầu dò PDA ở bước sóng 340 nm cho thấy hàm lượng ostruthin trong rễ cao hơn nhiều so với ostruthin trong các bộ phận khác. Hàm lượng ostruthin trong các mẫu dao động từ 0,008 đến 5,901 %⁵.

Năm 2015, nhóm nghiên cứu đã báo cáo về “Định lượng đồng thời ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ Xáo tam phân *Paramignya trimeria* (Oliv.) Burkill Rutaceae bằng phương pháp HPLC”. Nghiên cứu này đã xây dựng quy trình định lượng ostruthin và 8-methoxyostruthin thông qua việc khảo sát điều kiện sắc ký, khảo sát điều kiện chiết xuất và đánh giá dựa trên các thông số: Tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng. Ứng dụng quy trình trong mẫu nghiên cứu và 7 mẫu ở Thành phố Hồ Chí Minh, Phú Yên và Khánh Hòa. Kết quả là đã xây dựng được quy trình định lượng đồng thời ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ Xáo tam phân bằng phương pháp HPLC. Quy trình có tính đặc hiệu, chính xác ($RSD \leq 5,3\%$), tin cậy (tỷ lệ hồi phục trong khoảng 85 %-115%) ở khoảng nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. Quy trình đã được ứng dụng để kiểm tra một số mẫu trên thị trường với hàm lượng ostruthin từ 0,280-2,265 % và 8-methoxyostruthin 0,013-0,216% tính theo dược liệu khô.

Trong nghiên cứu năm 2015, nhóm nghiên cứu chỉ định lượng 2 hợp chất chính có hoạt tính sinh học của Xáo tam phân là ostruthin và 8-methoxyostruthin. Trong khi đó demethylsuberosin là trong những hợp chất có hàm lượng cao trong rễ Xáo tam phân cũng có khung cơ bản là 7-hydroxycoumarin, có phổ UV gần như tương tự ostruthin và 8-methoxyostruthin. Do đó, luận án này đã xây dựng quy trình định lượng đồng thời 3 hợp chất chính là demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC để tối ưu hoá quy trình định lượng hợp chất coumarin có trong Xáo tam phân.

Trong quy trình xử lý mẫu, kết quả nghiên cứu cho thấy methanol là dung môi chiết phù hợp khi chiết mẫu, phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây.

Khi khảo sát thời gian chiết, khi siêu âm 30 phút, hàm lượng của các chất demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin tăng lên rõ rệt. Tuy nhiên, nếu tiếp tục siêu âm thì demethylsuberosin và ostruthin bị giảm hàm lượng trong dịch chiết, đặc biệt là ostruthin. Điều này có thể do thời gian siêu âm dài dẫn đến sinh nhiệt làm hư hoạt chất. Đối với nghiên cứu cũ thì chọn thời gian siêu âm mẫu với methanol là 15 phút cho định lượng, rút ngắn thời gian chuẩn bị mẫu nhưng như vậy thì không chiết được hoàn toàn các hợp chất. Do đó, nghiên cứu chọn thời gian thời gian chiết là 30 phút để thu được tối đa hợp chất nhưng hợp chất cũng không bị hư do nhiệt.

Khi khảo sát số lần chiết, kết quả khảo sát cho thấy sau một lần chiết bằng phương pháp siêu âm trong 30 phút với 20 ml methanol gần như đã chiết được hoàn toàn lượng demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin từ dược liệu. Do đó, nghiên cứu chọn số lần chiết dung môi là một lần để giảm thời gian chuẩn bị mẫu.

Đối với quy trình định lượng trước đây, pha động sử dụng là chương trình rửa giải đẳng dòng, acetonitril – nước (75:25) thì khi khảo sát chương trình rửa giải mới nghiên cứu đã thay đổi chương trình rửa giải gradient: Acetonitril – nước theo tỷ lệ 55: 45 (15 phút), 80:20 (phút 15-20), 100: 0 (phút 20-25).

Chương trình rửa giải có thời gian lưu của pic demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin lần lượt là 7,0 phút, 14,4 phút và 15,3 phút. Cả ba pic đều có thời gian lưu dưới 20 phút. Các pic tách tốt và không bị trùng pic, đạt độ tinh khiết pic hơn 99,9%. Đối với chương trình rửa giải này sẽ rút ngắn thời gian định lượng.

4.6.3. Về đánh giá quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC

Quy trình định lượng đã thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu của một quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH và AOAC. Tính tương thích hệ thống: RSD của các thông số thời gian lưu, diện tích đỉnh, số đĩa lý thuyết, hệ số bất đối, độ phân giải < 2 %. Hệ số bất đối $0,8 \leq A_s \leq 1,5$. Độ phân giải $R_s \geq 1,5$. Số đĩa lý thuyết $N \geq 5000$.

Tính đặc hiệu: có thể hiện sự tăng dần diện tích pic của mẫu thử thêm chuẩn và mẫu trắng không xuất hiện pic cần định lượng, độ tinh khiết pic đạt trên 99,0%. Tính tuyến tính: Nồng độ demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin tuyến tính trong khoảng 1-300 μl với $R^2 > 0,99$. LOD của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin là 2,84; 8,0 và 3,82 ppm và LOQ demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin là 8,6; 24,23 và 11,56 ppm. Độ lặp lại: Thời gian lưu của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin đều có $RSD < 2\%$. Độ chính xác trung gian: Thời gian lưu của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin đều cho kết quả $RSD < 2\%$. Độ đúng: tỉ lệ phục hồi của demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin nằm trong khoảng 95-105%.

Nên quy trình có thể được áp dụng cho việc định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong cây Xáo tam phân.

4.6.4. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu rễ Xáo tam phân trên thị trường bằng phương pháp HPLC

Nghiên cứu đã đề nghị mức chỉ tiêu chất lượng cho tiêu chí định lượng. Kết quả định lượng cho thấy, rễ Xáo tam phân trồng chứa 1,04% demethylsuberosin (tính theo dược liệu khô kiệt), hàm lượng ostruthin và 8-methoxyostruthin lần lượt là 6,55% và 0,64 %. Kết quả hàm lượng của ostruthin và 8-methoxyostruthin trong mẫu nghiên cứu này cao hơn rất nhiều so với kết quả từ nghiên cứu trước đây là từ 0,280 - 2,265% (ostruthin), 0,013-0,216% (8-methoxyostruthin) tính theo dược liệu khô. Điểm khác biệt này có thể do thời điểm thu hái mẫu, độ tuổi của cây, vùng trồng ảnh hưởng đến hàm lượng của hoạt chất.

Nghiên cứu đã khảo sát trên 9 mẫu thu được trên thị trường tại các tỉnh thành Đà Lạt-Lâm Đồng, Vĩnh Cửu-Đồng Nai, TP HCM, Tây Ninh, Bình Phước. Mẫu 10 có chứa demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin nhưng thấp hơn so với mẫu 1 (mẫu nghiên cứu). Trong khi đó mẫu 2, 6, 7, 8 chỉ chứa demethylsuberosin và ostruthin. Mẫu 3, 4, 5, 9 chỉ chứa ostruthin. Kết quả cho thấy ít mẫu thu thập được chứa đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin và các

mẫu thu thập được có hàm lượng ostruthin thấp hơn hẳn mẫu nghiên cứu. Kết quả tương tự với kết quả nghiên cứu trước đây.

Quản lý chất lượng dược liệu đang là vấn đề được chú trọng nhằm hiện đại hóa và phát triển tài nguyên cây thuốc tại Việt Nam. Hiện nay Xáo tam phân chưa có tiêu chuẩn trong chuyên luận Dược điển Việt Nam cũng như tiêu chuẩn cơ sở. Hàm lượng hoạt chất chính trong mẫu là tiêu chí quan trọng giúp xác định đúng và kiểm soát chất lượng của mẫu dược liệu. Dựa trên kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy nếu chỉ định lượng mỗi ostruthin trong dược liệu Xáo tam phân thì sẽ không xác định chính xác đúng dược liệu Xáo tam phân, còn có cây khác cũng chứa ostruthin và có đặc điểm gần giống với Xáo tam phân như cây Thần xạ hương *Luvunga scandens* (Roxb). Buch. Ham.

.

.

KẾT LUẬN

Sau quá trình thực hiện nghiên cứu với nguyên liệu là Xáo tam phân, luận án đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và đạt được tất cả các mục tiêu đề ra ban đầu.

1. Phân tích thành phần hoá học, thử tinh khiết nguyên vật liệu nghiên cứu.

Nghiên cứu sơ bộ thành phần hoá thực vật cho thấy thành phần hóa học chính nhóm hợp chất coumarin ngoài ra còn có alkaloid, triterpenoid, flavonoid, tinh dầu, saponin. Nghiên cứu đã thực hiện thử tinh khiết nguyên liệu (độ ẩm rễ, thân, lá cây Xáo tam phân lần lượt là 7,61%, 7,25%, 8,81%, độ tro toàn phần là 3,3%, 4,31%, 3,25%; độ tro không tan trong acid hydrocloric là 0,36%, 0,3%, 0,27%). Hàm lượng chất chiết được từ rễ, thân, lá cây Xáo tam phân với dung môi nước lần lượt là 17,8%, 1,74% và 1,53%. Nghiên cứu tiến hành định tính và định lượng polyphenol trong các cao chiết ethanol 96% từ rễ, thân, lá Xáo tam phân. Hàm lượng polyphenol toàn phần của các cao rễ, thân, lá theo thứ tự là 108,05; 154,45; 52,01 mg pyrogallol/g cao chiết. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao thân lớn nhất, gấp khoảng 1,5 lần cao rễ và gấp khoảng 2,8 lần cao lá.

2. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá, độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần và cao phân đoạn

Hoạt tính chống oxy hóa của cao toàn phần (rễ, thân, lá) bằng phương pháp DPPH được khảo sát sơ bộ ở nồng độ 1000 µg/ml. Ở nồng độ này, cao toàn phần cho hoạt tính chống oxy hóa lần lượt là 90,70% (thân), 88,81% (rễ) và 63,62% (lá). Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao giảm dần theo thứ tự cao thân (158,14) > cao rễ (274,36) > cao lá (593,94). Cao thân có hoạt tính chống oxy mạnh gấp 1,73 lần so với cao rễ và gấp 3,76 lần cao lá. Chất đối chứng được sử dụng là acid ascorbic (vitamin C) với EC₅₀ là 5,27 µg/ml.

Hoạt tính độc tế bào ung thư *in vitro* của cao toàn phần (rễ, thân, lá) ở các nồng độ 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/ml được khảo sát trên dòng tế bào MDA-MB-231 và dòng tế bào HepG2. Đối với hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 *in vitro*, giá trị IC₅₀

của cao rễ và lá lần lượt là 29,57 $\mu\text{g/ml}$ và 58,35 $\mu\text{g/ml}$, cao rễ mạnh gấp hai lần so với cao lá. Đối với hoạt tính độc tế bào ung thư gan HepG2 *in vitro*, giá trị IC_{50} của cao rễ và cao lá lần lượt là 24,91 $\mu\text{g/ml}$ và 86,86 $\mu\text{g/ml}$, cao rễ mạnh gấp khoảng 3,5 lần cao lá. Đối với hoạt tính độc tế bào MDA-MB-231 và HepG2 *in vitro*, cao thân tác động thấp với giá trị $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$.

Các cao phân đoạn n-hexan, cloroform, ethylacetat, nước từ rễ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh theo thứ tự giảm dần: Cao cloroform (133,41 $\mu\text{g/ml}$) > cao ethyl acetat (180,6 $\mu\text{g/ml}$) > cao n-hexan (377,39 $\mu\text{g/ml}$) > cao nước (559,18 $\mu\text{g/ml}$). Đối với cao từ thân, các cao có hoạt tính oxy hóa mạnh theo thứ tự giảm dần: Cao ethyl acetat (86,33 $\mu\text{g/ml}$) > cao cloroform (182,27 $\mu\text{g/ml}$) > cao n-hexan (329,28 $\mu\text{g/ml}$) > cao nước (377,68 $\mu\text{g/ml}$). Quercetin làm chất đối chiếu với giá trị EC_{50} là 4,94 $\mu\text{g/ml}$.

Các cao phân đoạn từ thân tác dụng làm giảm lượng MDA: Cao n-hexan (325,91 $\mu\text{g/ml}$) > cao cloroform (420,73 $\mu\text{g/ml}$) > cao ethyl acetat (422,57 $\mu\text{g/ml}$) > cao nước (11435,16 $\mu\text{g/ml}$). Cao phân đoạn từ rễ: Cao n-hexan (383,21 $\mu\text{g/ml}$) > cao cloroform (429,22 $\mu\text{g/ml}$) > cao ethyl acetat (653,98 $\mu\text{g/ml}$) > cao nước (8530,21 $\mu\text{g/ml}$).

Cao ethyl acetat và cao nước không thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HepG2, cao n-hexan và cao cloroform thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư gan người HepG2, giảm số lượng tế bào sống tỷ lệ thuận với các nồng độ khảo sát.

3. Nghiên cứu chiết xuất và phân lập các hợp chất trong các cao phân đoạn tiềm năng

Quá trình phân lập bằng các kỹ thuật khác nhau bao gồm lắc phân bố, sắc ký cột chân không, sắc ký cột cổ điển từ nguyên liệu là 4,5 kg rễ và 5,3 kg thân Xáo tam phân đã phân lập được 12 hợp chất: 8 hợp chất phân lập từ rễ (**PT-1-PT-8**) với khối lượng từ 4 mg-520 mg trong đó 2 chất có khối lượng lớn là **PT-1** (520 mg) và **PT-2** (300 mg), 4 hợp chất phân lập từ thân (**PT-9-PT-12**) với khối lượng từ 10 mg-36 mg.

4. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập

Xác định cấu trúc được 8 hợp chất phân lập từ rễ: Ostruthin (**PT-1**, 520 mg), 8-methoxyostruthin (**PT-2**, 300 mg), xanthyletin (**PT-3**, 55 mg), oriciacridon (**PT-4**, 10 mg), citrussin-1 (**PT-5**, 25 mg), 3'-hydroxy-3'-methyl-2'-(4''-isoprenyl)-pyranocoumarin (**PT-6**, 4 mg), demethylsuberosin (**PT-7**, 24 mg), limonin (**PT-8**, 24 mg) và 4 hợp chất phân lập từ thân gồm: 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin (**PT-9**, 12 mg), 6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin (**PT-10**, 10 mg), 6-(7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyl)-7-hydroxycoumarin (**PT-11**, 15 mg), hỗn hợp của 2 chất thuộc nhóm phytosterol là stigmasterol và β -sitosterol (**PT-12**, 36 mg).

Hợp chất **PT-6** được xem là chất mới dựa vào kiểm tra dữ liệu trên cơ sở dữ liệu của Reaxys và Scifinder ngày 30/7/2022. Lần đầu tiên công bố 5 hợp chất trong loài Xáo tam phân gồm: Xanthyletin (**PT-3**), oriciacridon (**PT-4**), citrussin-1 (**PT-5**), limonin (**PT-8**), 6-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-hydroxycoumarin (**PT-9**).

5. Về sơ bộ đánh giá cơ chế tác động độc tế bào *in vitro* của ostruthin và 8-methoxyostruthin

Đánh giá hoạt tính độc tế bào ung thư gan HAK1B và tế bào ung thư vú MDA-MB-231 của ostruthin và 8-methoxyostruthin. Trên dòng tế bào HAK1B, ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào ở các nồng độ khảo sát 12,5 - 100 μ M. So với mẫu chứng, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 10% - 70%. Trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào ở các nồng độ khảo sát 25 - 100 μ M. So với mẫu chứng, tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào khoảng 45% - 90%. Ostruthin và 8-methoxyostruthin thể hiện tác động độc tế bào tốt hơn trên dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 so với dòng tế bào ung thư gan người HAK1B.

Nghiên cứu lần đầu báo cáo protein KDM2A liên quan đến hoạt tính độc tế bào ung thư MDA-MB-231 và HAK1B của 8-methoxyostruthin ở nồng độ 25 μ M sau thời gian xử lý tế bào trong 72 giờ; từ đó bước đầu gợi ý cơ chế tác động của hoạt

tính độc tế bào ung thư của 8-methoxyostruthin là ức chế sự biểu hiện của KDM2A, từ đó có thể ức chế quá trình hình thành và phát triển khối u.

6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC

Đã tiến hành kiểm định và thiết lập chuẩn 8-methoxyostruthin và ostruthin đạt tiêu chuẩn chất chuẩn gốc có thể đăng ký chuẩn quốc gia có hàm lượng của 2 CDC từ 97,8% - 99,0% tính theo nguyên trạng.

Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC trong mẫu Xáo tam phân điều kiện như sau: Hệ thống HPLC LC-2030C 3D, đầu dò PDA (Shimadzu, Nhật Bản); cột: Cosmosil 5C18-AR-II, $4,6 \times 250$ mm, 5 μ m; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; bước sóng phát hiện: 332 nm; thể tích tiêm mẫu: 10 μ L; thời gian phân tích: 25 phút; pha động: Acetonitril – nước. Kết quả định lượng cho thấy rõ Xáo tam phân trồng tại Đồng Nai chứa 1,04% demethylsuberosin, 6,55% ostruthin và 0,64% 8-methoxyostruthin (tính theo dược liệu khô kiệt). Nghiên cứu đã khảo sát trên 9 mẫu thu được trên thị trường tại các tỉnh thành Đà Lạt-Lâm Đồng, Vĩnh Cửu-Đồng Nai, TP HCM, Tây Ninh, Bình Phước. Mẫu 10 có chứa demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin nhưng thấp hơn so với mẫu 1 (mẫu nghiên cứu). Mẫu 2, 6, 7, 8 chỉ chứa demethylsuberosin và ostruthin. Mẫu 3, 4, 5, 9 chỉ chứa ostruthin.

KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được trong luận án cung cấp cơ sở khoa học và là tiền đề để thực hiện một số hướng nghiên cứu tiếp theo với dược liệu cũng như áp dụng các kết quả nghiên cứu này trong thực tiễn.

- Tiếp tục nghiên cứu phân lập các hợp chất khác trong rễ, thân và lá Xáo tam phân vì lá cũng được sử dụng khá phổ biến hiện nay; tuy nhiên, các nghiên cứu về thành phần hóa học của bộ phận dùng này còn hạn chế.

- Khảo sát động thái tích lũy demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ Xáo tam phân để xác định vùng trồng và thời gian thu hoạch thích hợp trên cơ sở kết quả đã đạt được về việc xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời demethylsuberosin, ostruthin và 8-methoxyostruthin bằng phương pháp HPLC.

- Tiếp tục khảo sát mối liên quan giữa protein KDM2A với hoạt tính độc tế bào ung thư của 8-methoxyostruthin trên các dòng tế bào ung thư khác (ví dụ: ung thư phổi, ung thư dạ dày) và mở rộng nghiên cứu với các hợp chất khác được phân lập từ Xáo tam phân trên cơ sở kết quả bước đầu khảo sát mối liên quan của KDM2A với hoạt tính độc tế bào của 8-methoxyostruthin trên tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 và tế bào ung thư gan người HAK1B.

- Dựa trên cấu trúc và những kết quả khảo sát tác dụng sinh học của ostruthin, 8-methoxyostruthin cũng như các hợp chất đã được xác định có trong cây Xáo tam phân để áp dụng phương pháp Docking, dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt tính chống ung thư của dược liệu, các hợp chất.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI CỦA TÁC GIẢ

1. Trần Thị Thúy Quỳnh, Lê Thị Kim Thoa, Phạm Đông Phương, Phân lập một số hợp chất coumarin trong rễ Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill, *Tạp chí Dược học*, 2014, **54** (5), tr. 60-66.
2. Trần Thị Thúy Quỳnh, Nguyễn Trung Dũng, Phạm Đông Phương, Phân lập một vài hợp chất acridon alkaloid trong rễ Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill), *Tạp chí Dược học*, 2014, **54** (6), tr. 60-64.
3. Nguyễn Thị Ngọc Dung, Trần Thị Thúy Quỳnh, Phạm Đông Phương, Vĩnh Định, Định lượng đồng thời ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Dược học*, 2015, **55** (12), tr. 45-49.
4. Trần Thị Thúy Quỳnh, Nguyễn Hồng Hạnh, Phan Thị Giang Thuỷ, Phạm Đông Phương, Đỗ Thị Hồng Tươi, Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và độc tế bào ung thư gan người HepG2 *in vitro* của các phân đoạn từ rễ, thân Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill, *Tạp Chí Y Dược học Cần Thơ*, 2023, **56**, tr.1-8.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO. The Global Cancer Observatory. *Viet Nam Globocan*, 2020, pp. 1-2.
2. Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ Việt Nam Quyển 2, NXB Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, 2003, tr. 439.
3. Viện Dược Liệu Quốc Gia, Công văn số 539/VDL-QLKHĐT gửi Sở Y Tế Khánh Hòa. 2012
4. Trần Thị Thu Trang, Trần Trung Thạch, Trần Hợp, Trương Thị Đẹp, Đặc điểm hình thái và vi học Xáo tam phân - *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaumin, họ Rutaceae, *Tạp chí Y học TpHCM*, 2016, (2), tr.333-337
5. Nguyễn Mạnh Cường, Hồ Việt Đức, Nguyễn Văn Tài et al, Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây Xáo tam phân họ Rutaceae, *Tạp chí Hóa học* 51, 2013, trang 292-296
6. Phạm Huy Bách, Vũ Văn Tuấn, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thiên Thương, Phân lập và định lượng ostruthin trong dược liệu Xáo tam phân thu hái tại Việt Nam, *Tạp chí Dược Liệu*. 2013, **18** (3), tr. 173-178.
7. Bùi Trọng Đạt, Nguyễn Thanh Hồng, Lê Tiến Dũng et al, Một coumarin mới và chromene phân lập từ rễ cây Xáo tam phân *Paramignya trimera*, *Tạp chí Hóa học*. 2013, (41B), tr.292-296
8. Nguyen Manh Cuong, Tran Thu Huong, Pham Ngoc Khanh, Kim Youg Ho, Paratrimerins A and B, two new dimeric monoterpene-linked coumarin glycosides from the roots and stems of *Paramignya trimera*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2015, **63** (11), pp. 945-949. doi: 10.1248/cpb.c15-00336.
9. Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly, Nguyễn Thụy Vy, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Diệu Liên Hoa, Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây Xáo tam phân *Paramignya trimera*”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và công nghệ*, 2016, 32(4): 115-123.
10. Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, Nguyễn Trung Nhân, Khảo sát thành phần hóa học cao Chloroform của thân cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) - Họ Rutaceae, *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 2016, **20** (4), tr. 297
11. Dang Hoang Phu, Le Huu Tho, Phan Thi Kim Phuong et al, Two acridones and two coumarins from the roots of *Paramignya trimera*, *Tetrahedron Letters*. 2017, **58** (16), pp. 1553-1557. doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.02.083
12. Nhan T. Nguyen, Phu H. Dang, Ngoc X. T. et al, Quinoliniumolate and 2H-1,2,3-Triazole Derivatives from the Stems of *Paramignya trimera* and Their α -Glucosidase Inhibitory Activities: In Vitro and in Silico Studies, *J. Nat. Prod.*, 2017, 80, 7, 2151–2155, doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00289
13. Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly et al, Chromen và acridon alkaloid từ rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*), *Tạp Chí Khoa học ĐHQGHN: khoa học tự nhiên và công nghệ*, 2017, 20(4), tr.131
14. Nguyen Thi Thanh Mai, Dang Hoang Phu, Nguyen Ngoc Tu, et al, Paratrimerins G and H, two prenylated phenolic compounds from the stems of

- Paramignya trimera*, *Phytochemistry letters*, 2018, **23**, pp. 78-82. doi.org/10.1016/j.phytol.2017.11.014
15. Mai Thanh Thi Nguyen, Phu Hoang Dang, Hai Xuan Nguyen et al, Paratrimerin I, cytotoxic acridone alkaloid from the roots of *Paramignya trimera*, *Nat Prod Res*, 2020, **35**(23), 5042-5047, doi.org/10.1080/14786419.2020.1774760
 16. Khong Trong Quan, Hyun Bong Park, Hanna Yuk, Seung Jin Lee, MinKyun Na, Paratrimerins J–Y, Dimeric Coumarins Isolated from the Stems of *Paramignya trimera*, *Journal of Natural Products*, 2021, **84**, **2**, 310–326 doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00978
 17. Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Đỗ Thị Phương, Nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng bảo vệ gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư của Xáo tam phân, *Tạp chí Dược Liệu*, 2013, **1** (18), tr. 14-20
 18. Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Trần Thu Hường, Phạm Ngọc Khanh, Ninh Thế Sơn, Nguyễn Mạnh Cường, Tác dụng bảo vệ gan của cao rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan bằng paracetamol, *Tạp chí Khoa học và Công Nghệ Việt Nam*, 2015, **1** (2), trang 60-64.
 19. Tuan Anh Hoang Le, Kim Dong-Cheol, Ko Wonmin, et al, Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*, *Pharmaceutical biology*. 2017, **55** (1), pp. 1195-1201, doi.org/10.1080/13880209.2017.1296001
 20. Nguyễn Thị Diệu Thuần, Nguyễn Hữu Toàn Phan, Châu Văn Minh, Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của loài xáo leo (*Paramignya scandens* (Griff.) Craib.) ở Lâm Đồng, Viện Hóa Sinh Biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2015, p. 22
 21. Robert Wight, Illustrations of Indian botany or figures illustrative of each of the natural orders of Indian plants, 1840, *J. B. Pharoah*, doi.org/10.5962/bhl.title.9603
 22. The Plant List, <http://theplantlist.org/>.2013
 23. D. Zhang, T.G. Hartley, *Paramignya* Wight, Ill. Ind. Bot. 1: 108. 1838., Fl China, **11**, 88, 2008
 24. Trần Trung Hiếu, Huỳnh Văn Chung, Bùi Thị Linh Huệ, Lương Thị Mỹ Ngân, Bùi Lan Anh, Bùi Văn Lê, Nhân giống *in vitro* Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.), *Science & Technology Development*, 2017
 25. Ninh The Son, Notes on the genus *Paramignya*: Phytochemistry and biological activity, *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 2018, doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.12.001
 26. Duong H.Trinh, Phuong T.Tran, Binh T.D.Trinh, Coumarins and acridone alkaloids with α -glucosidase inhibitory and antioxidant activity from the roots of *Paramignya trimera*, 2020, *Phytochemistry Letters*, Volume 35, February, Pages 94-98, doi.org/10.1016/j.phytol.2019.10.010
 27. Wattanapiromsakul C., Waterman P. G, Flavanone, triterpene and chromene derivatives from the stems of *Paramignya griffithii*, *Phytochemistry*, 2000, **55** (3), pp. 269-273, doi: 10.1016/s0031-9422(00)00311-3.

28. Bowen I. H., Patel Y. N., Phytochemical analysis of the leaves and stems of *Paramignya monophylla* Wight (Rutaceae), *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998, 50 (S9), pp. 232-232, doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb02432.x
29. I.H. Bowen, J.R. Lewis, *Rutaceous constituents Part 10: A phytochemical and antitumour survey of Malayan Rutaceous plants*, *Planta Med.*, 1978, 34, 129–134. doi: 10.1055/s-0028-1097424
30. Nguyen Huu Toan Phan, Nguyen Thi Dieu Thuan, Ninh Thi Ngoc et al, Anti-inflammatory Tirucallane Saponins from *Paramignya scandens*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 7, pp. 558-564. doi: 10.1248/cpb.c15-00180
31. Nguyen Huu Toan Phan, Nguyen Thi Dieu Thuan, Ninh Thi Ngoc et al. Two tirucallane derivatives from *Paramignya scandens* and their cytotoxic activity, *Phytochemical Society of Europe*, 2014, 9, 78-81 doi.org/10.1016/j.phytol.2014.04.011
32. Doan Quoc Tuan, Ho Viet Duc, Le Trong Nhan, Le Tuan Anh, Nguyen Thi Hoai, Ain Raal, Constituents of Essential Oils from the Leaves of *Paramignya trimera* (Oliv.) *Guillaum from Vietnam*, 2018, 22(2), 391-395, doi.org/10.1080/0972060X.2019.1582362
33. Nguyen Van Tang, Sakoff Jennette A, Christopher Scarlett, Physicochemical Properties, Antioxidant and Anti-proliferative Capacities of Dried Leaf and Its Extract from Xao tam phan (*Paramignya trimera*), *Chemistry biodiversity*, 2017, 14 (6), pp. 23-27. doi: 10.1002/cbdv.201600498
34. C. Wiart, Medicinal Plant of Asia-Pacific-Drugs for the Future, *Library Cataloguing-in-Publication Data (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd)*, 2006, p.380
35. Lưu Hồng Trường, Võ Duân, "Chi *Paramignya* (Rutaceae) và triển vọng dược liệu", Khoa học và công nghệ phục vụ sản xuất nông nghiệp công nghệ cao tỉnh Lâm Đồng, 2013, 97-100.
36. Nguyen Thi Huyen Lam, Nguyen Truong Sinh, Tran Phuong Thao, Pham Van Phuc, Anti-cancer Effect of Xao Tam Phan *Paramignya trimera* Methanol Root Extract on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 in 3D Model, *Springer International Publishing A*, 2018, 1292:13-25, doi: 10.1007/5584_2018_148
37. Van Tang Nguyen, Jennette A. Sakoff, Christopher J. Scarlett, Physicochemical, antioxidant and cytotoxic properties of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root extract and its fractions, *Chem Biodivers*, 2017 Apr;14(4). doi: 10.1002/cbdv.201600396
38. Nhan T. Nguyen, Phu H. Dang, Ngoc X. T. VuTho H. Leand , Mai T. T. Nguyen, Quinoliniumolate and 2H-1,2,3-Triazole Derivatives from the Stems of *Paramignya trimera* and Their α -Glucosidase Inhibitory Activities: In Vitro and in Silico Studies *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 7, 2151–2155, doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00289
39. Khong Trong Quan, Hyun Bong Park, Hanna Yuk, Seung Jin Lee, MinKyun Na, Paratrimerins J–Y, Dimeric Coumarins Isolated from the Stems of *Paramignya*

- trimera*, 2021, *J. Nat. Prod.*, 84, 2, 310–326, doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00978
40. Chow K. U., Nowak D., Kim S. Z. et al, *In vivo* drug-response in patients with leukemic non-Hodgkin's lymphomas is associated with *in vitro* chemosensitivity and gene expression profiling, *Pharmacological research*. 2006, **53**(1), 49-61. doi: 10.1016/j.phrs.2005.09.001.
 41. Sinh Truong Nguyen, Nghia Minh Do, Phuc Hong Vo, Trinh Thi – Tu Nguyen, Kiet Dinh Truong, Phuc Van Pham, Xao Tam Phan (*Paramignya trimera*) methanol extract induced apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cell line in vitro, *Science and Technology Development Journal*, 2020, 23 (1) DOI: <https://doi.org/10.32508/stdj.v23i1.2013>
 42. Nguyen Manh Cuong, Tran Thu Huong, Pham Ngoc Khanh, Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng paracetamol, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 2016, 54 (1)37-45
 43. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:4290–4302. doi: 10.1021/jf0502698.
 44. Apak R., Çapanoğlu E., Shahidi F. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity—Recent Trends and Applications. John Wiley & Sons Ltd.; Hoboken, NJ, USA: 2018. pp. 1–283, DOI:10.1002/9781119135388.
 45. Çekiç S.D., Çetinkaya A., Avan A.N., Apak R. Correlation of Total Antioxidant Capacity with Reactive Oxygen Species (ROS) Consumption Measured by Oxidative Conversion. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61:5260–5270. doi: 10.1021/jf3051297.
 46. Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 2004;219:561–571. doi: 10.1007/s00217-004-1012-4.
 47. Huang D., Boxin O.U., Prior P.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005;55:1841–1856. doi: 10.1021/jf030723c.
 48. Ciz, M., Cizova, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A. & Lojek, A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 2010, 21: 518-523, doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.017
 49. Nikolaos, N., Wang, L.F., Tsimidou, M. and Zhang, H.Y., Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(15): 4669-4674. doi:10.1021/jf0400056
 50. Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64:1028–1045. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04743.

51. Irina Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review, *Int J Mol Sci.* 2021 Apr; 22(7): 3380, doi: 10.3390/ijms22073380
52. Sroka, Z., & Cisowski, W.. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41(6), 753-758, doi: 10.1016/S0278-6915(02)00329-0
53. Wright J.S., Johnson A.E.R., DiLabio G.A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123:1173–1183. doi: 10.1021/ja002455u.
54. Chanda S., Dave R.,. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3 (13), pp. 981-996. DOI:10.5897/AJMR.9000401
55. Sagar B. Kedare, R.P.Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 2011, **48**(4), 412-422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
56. Sharma, O. P. & Bhat, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 2009,113: 1202-1205, doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008
57. Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H., & Tamura, Y. Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern Japan determined using electron spin resonance spectrometry. *International journal of biological sciences*, 2007,3(6), 349 - 455. doi: 10.7150/ijbs.3.349
58. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 2002;127:183–198. doi: 10.1039/b009171
59. Berker, K. I., Gueclue, K., Tor, I., Demirata, B., & Apak, R. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical Methods*, 2010, 3, 154–168, DOI:10.1007/s12161-009-9117-9
60. Pulido R., Bravo L., Calixto F.D.S. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:3396–3402. doi: 10.1021/jf9913458.
61. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K.. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005,53, 4290–4302, doi: 10.1021/jf0502698.
62. Sharma, P.J. & Singh, R.P., 2013. Evaluation of antioxidant activity in foods with special References to TEAC method. *American Journal of Food Technology*, 8: 83-101. doi: 10.3923/ajft.2013.83.101
63. Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S.E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their

- Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:7970–7981. doi: 10.1021/jf048741x.
64. Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* 2009;91:107–110. doi: 10.1016/j.microc.2008.08.011.
 65. Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta.* 2008;160:413–419. doi: 10.1007/s00604-007-0777-0.
 66. Bener M., Özyürek M., Güçlü K., Apak R.A. Development of a Low-Cost Optical Sensor for Cupric Reducing Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts. *Anal. Chem.* 2010;82:4252–4258. doi: 10.1021/ac100646
 67. Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, . Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2009, 2(1), 41-60, doi: 10.1007/s12161-008-9067-7
 68. Nair, V. D., Panneerselvam, R., & Gopi, R., Studies on methanolic extract of Rauvolfia species from Southern Western Ghats of India–In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products*, 2012, 39, 17-25, doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.006
 69. Mirza Hasanuzzaman, M.H.M. Borhannuddin Bhuyan et al, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Journal of botany*, 2020, doi: 10.3390/antiox9080681
 70. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M-L. & Fernández-Mejía, Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions, *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, 2013, pp. 209 – 232. DOI: 10.5772/51788
 71. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., & Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2003 11(9),1995-2000. doi: 10.1016/s0968-0896(03)00067-1.
 72. Chow K. U., Nowak D., Kim S. Z., Schneider B., Komor M., Boehrer S., Mitrou P. S., Hoelzer D., Weidmann E. , Hofmann W. K., *In vivo* drug-response in patients with leukemic non-Hodgkin's lymphomas is associated with *in vitro* chemosensitivity and gene expression profiling, *Pharmacological research.* 2006, 53(1), 49-61, doi: 10.1016/j.phrs.2005.09.001.
 73. Nifang Niu, Liewei Wang, In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs, *Pharmacogenomics.* 2015; 16(3): 273–285, doi: 10.2217/pgs.14.170
 74. María Teresa Donato 1, Laia Tolosa, María José Gómez-Lechón, Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cellsm Methods, *Mol Biol*,2015, 1250:77-93, DOI: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5

75. J. Akiba S., Ogasawara H., Fukushima S., Oie H., Yano, Whole-exome sequencing: 13 primary liver cancer cell lines established in our laboratory, *Annals of Oncology*, 2019, 30,4, doi:10.1093/annonc/mdz155.037
76. R Cailleau MO, QVJ Cruciger: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*, 1978, 14: 911-91
77. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F et al: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006, 10(6):515-527. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008
78. Djeungoue-Petga MA, Lurette O, Jean S, Hamel-Cote G, Martin-Jimenez R, Bou M, Cannich A, Roy P, Hebert-Chatelain E: Intramitochondrial Src kinase links mitochondrial dysfunctions and aggressiveness of breast cancer cells. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12):940, DOI:10.1038/s41419-019-2134-8
79. Lobos-Gonzalez L, Bustos R, Campos A, Silva V, Silva V, Jeldes E, Salomon C, Varas-Godoy M, Caceres-Verschae A, Duran E et al: Exosomes released upon mitochondrial ASncmtRNA knockdown reduce tumorigenic properties of malignant breast cancer cells. *Sci Rep*, 2020, 10(1):343. doi: 10.1038/s41598-019-57018-1
80. Terry L.R., Richard A. M., Andrew L Niles, Sarah Duellman, Hélène A Benink, Tracy J Worzella, Lisa Minor , Cell Viability Assays, *Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 2016, pp. 355-385. DOI:10.1111/cts.12570
81. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I , The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis, *Int J Mol Sci*. 2021, 22 (23): 12827. doi : 10.3390/ijms222312827.
82. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul*. 1995;5(2):69–84.
83. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev*. 2005;11:127–152. doi: 10.1016/s1387-2656(05)11004-7.
84. Stockert J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120:159–167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005
85. Mahshid Ghasemi, Tyron Turnbull, Sonia Sebastian, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis, *Int J Mol Sci*. 2021 Dec; 22(23): 12827. doi: 10.3390/ijms222312827
86. Mishra D, Banerjee D. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2019 May 29;11(6), doi: 10.3390/cancers11060750.

87. Passarella S, Schurr A. l-Lactate Transport and Metabolism in Mitochondria of Hep G2 Cells-The Cori Cycle Revisited. *Front Oncol.* 2018;8:120, doi: 10.3389/fonc.2018.00120
88. Orellana E. A., Kasinski A.L., Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio-protocol*, 2016, 6(21), 1-9. doi:10.21769/Bioprotoc
89. Vanicha Vichai, Kanyawim Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature Protocols*, 2006 1(3), 1112-1116, doi: 10.1038/nprot.2006.179.
90. Guillermo R., Ana del Peso J. L. Z. , Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols*, 2008, 3(7), 1125-1131, doi: 10.1038/nprot.2008.75.
91. Özlem Sultan Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *Intechopen*, 2017, DOI: 10.5772/intechopen.71923.
92. W. Strober, Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, *Current Protocols in Immunology*, 2015, 111, pp. A3 B 1-A3 B 3, doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111
93. Seav-Ly Tran, Andrea Puhar, Maud Ngo-Camus, Nalini Ramarao , Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*, *Plos one*, 2011, 6(9), 1-5. doi.org/10.1371/journal.pone.0022876
94. Kim SI, Kim HJ, Lee HKL, Hong D, Lim H, Cho K, Jong N, Yi YW. Application of non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Analytical Biochemistry*. 2016;492:8-12. DOI: 10.1016/j.ab.2015.09.010
95. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267:5421-5426. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606
96. Niles AL, Moravec RA, Riss T. In vitro viability and cytotoxicity testing and samewell multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomics*. 2009;3:33-41
97. Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J. Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay and Drug Development Technologies*. 2015;13(8):456-465. DOI: 10.1089/adt.2015.669
98. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*. 2004;9:506-515
99. Mueller H. et al.; Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and Calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell

- lines. *Journal of Biomolecular screening*, 2004, 9 (6): 506-515. doi: 10.1177/1087057104265386
100. Garcia O, Massieu L. Glutamate uptake inhibitor L-transpyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: Involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *Journal of Neuroscience Research*. 2003;74:956-966
 101. H Towbin, T Staehelin, J Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, 1979, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350-4, doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
 102. Tahrin Mahmood, Ping-Chang Yang, Western blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, *N Am J Med Sci*. 2012 Sep; 4(9): 429–434. doi: 10.4103/1947-2714.100998
 103. Biji T. Kurien, R. Hal Scofield, Protein blotting and Detection, *Methods and Protocols*, 2009
 104. J. J. Bass, D. J. Wilkinson, D. Rankin et al, An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research, 2016, doi.org/10.1111/sms.12702
 105. Y. Wu et al. A small molecule-controlled Cas9 repressible system, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2020, 19:922-932. doi: 10.1016/j.omtn.2019.12.026.
 106. B. Stillman, Histone modifications: insights into their influence on gene expression, *Cell*, 2018, doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.032
 107. L. Lu et al, Kdm2a/b lysine demethylases regulate canonical wnt signaling by modulating the stability of nuclear β -catenin, *Dev. Cell*, 2015, P 660-674 doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.006
 108. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H et al,. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 2006;439:811–816. doi: 10.1038/nature04433
 109. Blackledge NP, Zhou JC, Tolstorukov MY, Farcas AM, Park PJ, Klose RJ. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell*. 2010;38:179–190. doi: 10.1016/j.molcel.2010.04.009
 110. Lisheng Liu, Jiangnan Liu, Qinghai Lin, Histone demethylase KDM2A: Biological functions and clinical values (Review), *Exp Ther Med*. 2021 Jul; 22(1): 723. doi: 10.3892/etm.2021.10155.
 111. Xianrong Xiong, Xiaojian Zhang, Manzhen Yang et al, Oocyte-Specific Knockout of Histone Lysine Demethylase KDM2a Compromises Fertility by Blocking the Development of Follicles and Oocytes, *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23(19), 12008; doi.org/10.3390/ijms231912008
 112. Fu E, Shen J, Dong Z, Zhang W, Zhang Y, Chen F, Cheng Z, Zhao X, Shuai L, Lu X. Histone demethylase Kdm2a regulates germ cell genes and endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Epigenomics*. 2019;11:751–766. doi: 10.2217/epi-2018-0126.

113. Cheng Z, Cheung P, Kuo AJ, Yukl ET, Wilmot CM, Gozani O, Patel DJ. A molecular threading mechanism underlies Jumonji lysine demethylase KDM2A regulation of methylated H3K36. *Genes Dev.* 2014;28:1758–1771. doi: 10.1101/gad.246561.114.
114. Jian Wang ^{a 1}, Zhi-ya Zhang ^{a 1}, Jie Jiang, KDM2A plays a dual role in regulating the expression of malignancy-related genes in esophageal squamous cell carcinoma, *biochemical-and-biophysical-research-communications*, 2022, Pages 53-58, doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.035
115. Vacik T, Ladinovic D, Raska I. KDM2A/B lysine demethylases and their alternative isoforms in development and disease. *Nucleus.* 2018;9:431–441. doi: 10.1080/19491034.2018.1498707
116. Iuchi S, Green H. Lysine-specific demethylase 2A (KDM2A) normalizes human embryonic stem cell derived keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:9442–9447. doi: 10.1073/pnas.1206176109
117. Dhar SS, Alam H, Li N, Wagner KW, Chung J, Ahn YW, Lee MG. Transcriptional repression of histone deacetylase 3 by the histone demethylase KDM2A is coupled to tumorigenicity of lung cancer cells. *J Biol Chem.* 2014;289:7483–7496. doi: 10.1074/jbc.M113.521625
118. Dhar SS, Alam H, Li N, Wagner KW, Chung J, Ahn YW, Lee MG. Transcriptional repression of histone deacetylase 3 by the histone demethylase KDM2A is coupled to tumorigenicity of lung cancer cells. *J Biol Chem.* 2014;289:7483–7496. doi: 10.1074/jbc.M113.521625
119. Chen JY, Luo CW, Lai YS, Wu CC, Hung WC. Lysine demethylase KDM2A inhibits TET2 to promote DNA methylation and silencing of tumor suppressor genes in breast cancer. *Oncogenesis.* 2017;6(e369) doi: 10.1038/oncsis.2017.71
120. Rizwani W, Schaal C, Kunigal S, Coppola D, Chellappan S. Mammalian lysine histone demethylase KDM2A regulates E2F1-mediated gene transcription in breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9, doi: 10.1371/journal.pone.0100888
121. Chen JY, Li CF, Lai YS, Hung WC. Lysine demethylase 2A expression in cancer-associated fibroblasts promotes breast tumour growth. *Br J Cancer.* 2020;124:484–493. doi: 10.1038/s41416-020-01112-z
122. De Nicola I, Guerrieri AN, Penzo M et al, Combined expression levels of KDM2A and KDM2B correlate with nucleolar size and prognosis in primary breast carcinomas. *Histol Histopathol.* 2020;35:1181–1187. doi: 10.14670/HH-18-248
123. Lin Q, Wu Z, Yue X, et al. ZHX2 restricts hepatocellular carcinoma by suppressing stem cell-like traits through KDM2A-mediated H3K36 demethylation. *Ebiomedicine.* 2020;53(102676) doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102676
124. Bộ Y tế (2018), Dược điển Việt Nam V, NXB Y học PL 9.6, 9.7, 9.8.
125. Bowyer M.C., Van V.Q., Van A.I.A., Scarlett C.J., Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as affected by

- various solvents and extraction methods, *Industrial Crops and Products*., 2015, 67, 192-200, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.051>
126. Ma, Y.-F., Jung, J.-Y., et al, Anti-inflammatory Activities of Coumarins Isolated from *Angelica gigas* Nakai on LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2009, 14(3), 179–187. doi:10.3746/jfn.2009.14.3.179.
 127. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 1979, 95(2): 351-358
 128. Yuji Tanaka, Kengo Okamoto, Kwesi Teye, Toshiyuki Umata, Noriyuki Yamagiwa, Yutaka Suto, Yi Zhang, Makoto Tsuneoka. JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation. *The EMBO Journal*, 2010, 29, 1510-1522. DOI: 10.1038/emboj.2010.56
 129. Committee on Asean Reference Substances. Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean Reference Substances. 2005.
 130. Committee on Asean Reference Substances. SOP for the Production of Asean Reference Substances. 2009.
 131. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedure: Text and methodology. 2005
 132. ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005;
 133. ICH Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology.
 134. Mi-Jeong Ahn 1, Mi Kyeong Lee, Young Choong Kim, Sang Hyun Sung, The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 2008 Jan 22;46(2):258-66, DOI: 10.1016/j.jpba.2007.09.020
 135. Cristiane de Melo Casal, Vanessa de Cássia Domingues, Jaqueline Raquel Batalhão et al, , Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(19), pp. 4307-4312, doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.066
 136. Trenti, F., & Cox, R. J.. Structural Revision and Biosynthesis of the Fungal Phytotoxins Phyllostictines A and B., *Journal of natural products*, 2017, 80(5), 1235-1240. doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00183
 137. Breksa Iii A. P., Dragull K., Wong R. Y., "Isolation and identification of the first C-17 limonin epimer, epilimonin", *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, 56 (14), pp. 5595-5598, doi.org/10.1021/jf800473z
 138. Arts I.C., Hollman P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:317–325.
 139. Basel A. Abdel-Wahab, Saad Ahmed Alkahtani, Abdulsalam A. Alqahtani, Emad H.M. Hassanein, Umbelliferone ameliorates ulcerative colitis induced by acetic acid via modulation of TLR4/NF-κBp65/iNOS and PPARγ/SIRT1 signaling pathways in rats, *Environ Sci Pollut*, 2021 DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-619327/v1>

140. Luan Luong Chu, Ramesh Prasad Pandey, Haet Nim Lim, et al, Synthesis of umbelliferone derivatives in *Escherichia coli* and their biological activities, *Journal of Biological Engineering*, 2017, 5:11:15, DOI: 10.1186/s13036-017-0056-5
141. Dadák V, Zbořil P, Šanek J, Svoboda A. Mode of effect of Ostruthin, a phenolic coumarin on respiration and oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1980;45(2):653–64.
142. Shunming Fan, Chunling Zhang, Ting Luo, Jiaqi Wang, Yu Tang, Zhimin Chen, Lingying Yu: Limonin: A Review of Its Pharmacology, Toxicity, and Pharmacokinetics, *Molecules*, 2019; 24(20): 3679, doi: 10.3390/molecules24203679
143. Patre R. E., Shet J. B., Parameswaran P. S. et al. (2009), "Cascade Wittig reaction-double Claisen and Cope rearrangements: one-pot synthesis of diprenylated coumarins gravelliferone, balsamiferone, and 6, 8-diprenylumbelliferone", *Tetrahedron letters*. 50 (47), pp. 6488-6490. doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.017
144. Monira Ahsan, Alexander I. Gray, Greg Leach, Peter G. Waterman, Novel angular pyranocoumarins from *Boronia lanceolata*, *Phytochemistry*, June 1994, Pages 777-780, doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89816-7.
145. Chakthong, S., Weaaryee, P., Puangphet, P., Mahabusarakam, W., Plodpai, P., Voravuthikunchai, S. P., & Kanjana-Opas, A. (2012). Alkaloid and coumarins from the green fruits of *Aegle marmelos*. *Phytochemistry*, 2011, 75, 108–113. doi:10.1016/j.phytochem.2011.11
146. Kang SY, Lee KY, Sung SH, Park MJ, Kim YC. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J Nat Prod*. 2001;64(5):683-685. doi:10.1021/np000441w
147. Feng Li 1, Yukari Okamura, Dya Fita Dibwe et al., Anti-austerity agents from rhizoma et radix notopterygii (Qianghuo), *Planta Med.*, 2012 May;78(8):796-9. doi: 10.1055/s-0031-1298463
148. Dadák, V., & Hoďák, K. (1966). Some relations between the structure and the antibacterial activity of natural coumarins. *Experientia*, 22(1), 38–39. doi:10.1007/bf01897757
149. Weniger, B., Um, B.-H., Valentin, A., Estrada, A., Lobstein, A., Anton, R., ... Sauvain, M. Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa*. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(9), 1221–1223. doi:10.1021/np0005762
150. Önder, A.. Anticancer activity of natural coumarins for biological targets. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2020, 85–109. doi:10.1016/b978-0-12-817903-1.00003-6
151. Rashid, Mohammad A.; Armstrong, James A.; Gray, Alexander I.; Waterman, Peter G. Novel C-Geranyl 7-Hydroxycoumarins from the Aerial Parts of *Eriostemon tomentellus*, *Zeitschrift für Naturforschung, B: Chemical Sciences*, 1992, vol. 47, # 2, p. 284 – 287

152. Shibano, Makio; Okuno, Ayako; Taniguchi, Masahiko; Baba, Kimiye; Wang, Nian-He, Bisabolane-Type Sesquiterpenes: Liginvolones A–D from *Ligusticum involucratum*, *Journal of Natural Products*, 2005, vol. 68, # 10, p. 1445 – 1449, doi: 10.1021/np050008s
153. Ramesh Kumar and Meena Kumari, Chemistry of Acridone and its analogues: A review, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2011, 3(1):217-230
154. Ana Luisa Anaya 1, Martha Macías-Rubalcava, Rocío Cruz-Ortega, et al, Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico, *Phytochemistry*. 2005 Feb;66(4):487-94. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.12.028.
155. Kim W, Fan YY, Smith R, et al. Dietary curcumin and limonin suppress CD4+ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. *J Nutr*. 2009 May;139(5):1042-8, doi: 10.3945/jn.108.102772
156. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, et al. *Citrus limonin* and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 23;59(6):2314-23. DOI: 10.1021/jf104498p
157. Mahmoud MF, Gamal S, El-Fayoumi HM. Limonin attenuates hepatocellular injury following liver ischemia and reperfusion in rats via toll-like receptor dependent pathway. *Eur J Pharmacol*. 2014 Jun 23. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.010
158. Duong H. Trinh, Phuong T. Tran, Binh Trinh, Hieu T. Nguyen, Coumarins and acridone alkaloids with α -glucosidase inhibitory and antioxidant activity from the roots of *Paramignya trimera*, *Phytochemistry Letters*, 2020, 35:94-98, DOI:10.1016/j.phytol.2019.10.010
159. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 2004;85(4):633-640. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
160. Sylvester P. W., "Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability", *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*, 2011, 157-168. doi: 10.1007/978-1-61779-012-6_9
161. C.I Methodology of Analysis of Vegetable and Drugs (1984) Rumania: Ministry of Chemical Industry, Bucharest.
162. Joa H, Vogl S, Atanasov AG, Zehl M, Nakel T, Fakhrudin N, et al. Identification of ostruthin from *Peucedanum ostruthium* rhizomes as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of natural products*, 2011 Jun 24;74(6):1513-6. doi: 10.1021/np200072a
163. Schinkovitz A, Gibbons S, Stavri M, Cocksedge MJ, Bucar F. Ostruthin: an antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta medica*. 2003 Apr;69(4):369-71. doi: 10.1055/s-2003-38876.
164. Qi J, Ojika M, Sakagami Y. Differentiation in a Rat PC12 Cell Line Induced by Ostruthin and (–)-Bornyl Ferulate, Constituents of a Chinese Herbal

- Medicine. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1999;63(8):1501 – 2. 10.1271/bbb.63.1501
165. Ancy Joseph, Tran Thi Thu Thuy, Le Tat Thanh, Masayoshi Okada, Antidepressive and anxiolytic effects of ostruthin, a TREK-1 channel activator, *PLoS One*. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0201092
 166. An Tran Nguyen Minh, Cuong Nguyen Van, Quang Nguyen Minh, Tri Mai Dinh, Alam Mahboob, Gold Nanoparticles from Ostruthin: Green Synthesis, a Stable Mechanism, Antitumor, and Antibacterial Activity, *Revista de Chimie*, 2020, 71(8):220-232 DOI:10.37358/RC.20.8.8294
 167. Cristina Pérez-Arnaiz, Natalia Busto, José M. Leal, Begoña García, New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction, *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, no. 5, pp. 1288-1295, DOI: 10.1021/jp411429g
 168. Carla Luis, Yuselis Castaño-Guerrero, Raquel Soares, Goreti Sales, Rúben Fernandes, Avoiding the Interference of Doxorubicin with MTT Measurements on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line, *Methods Protoc*. 2019 Jun; 2(2): 29, doi: 10.3390/mps2020029
 169. Otto T, Sicinski P, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 93–115 doi: 10.1038/nrc.2016.138
 170. Weaver BA, How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *MboC*, 2014, 25: 2677–2681 doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916
 171. Wen Yu, Ke Gu, Zhan Yu, et al, Sorafenib potentiates irradiation effect in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo, *journals-and-books*, 2013, 329, 1, P.109-117, doi:10.1016/j.canlet.2012.10.024
 172. Nguyen Thi, K. O., Le, T. H., Nguyen, H. D., Nguyen, Q. H., Do, T. Y., Mai, T. P. N., Le, T. V. A.. Phytochemical composition and potential bioactivities of the essential oil from the peels of *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2022, 25(2), 273-281.
 173. Pal, D., Saha, S.. Coumarins: an important phytochemical with therapeutic potential. *Plant-Derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action*, 2020, 205-222.
 174. Le Tu Hai, Thi Nguyen Lan Anh, Thi Tran Ngoc Bich, Nguyen Din Van, Vu Duyen Thi, Doan Duong Van, Luong Tinh Thanh, Pham Vuong Van. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Paramignya trimera* Roots and Its Anticancer Activity. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2024, 20(2), 330-340.
 175. Takhtajan A. 2009, Flowering Plants, Springer.