

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHÓ THỊ THÚY HẰNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE LỤC LẠP
VÀ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ
LOÀI DƯƠNG ĐỒNG (*Adinandra* spp.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NĂM 2024

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHÓ THỊ THÚY HẰNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE LỤC LẠP
VÀ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ
LOÀI DƯƠNG ĐỒNG (*Adinandra* spp.)

Ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Nguyễn Hữu Quân

TS. Nguyễn Thị Thu Nga

NĂM 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Nguyễn Hữu Quân và TS. Nguyễn Thị Thu Nga. Các kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trong các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả; phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về nội dung và các số liệu đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2024

TÁC GIẢ

Phó Thị Thúy Hằng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS Nguyễn Hữu Quân và TS. Nguyễn Thị Thu Nga đã trực tiếp hướng dẫn và thường xuyên chia sẻ, động viên khích lệ để tôi có được sự tự tin và lòng đam mê khoa học giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Nguyễn Thành và các cán bộ, nghiên cứu viên phòng Công nghệ Hóa dược, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành một số thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của thầy cô và các cán bộ Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Được học tập và sinh hoạt chuyên môn tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, tôi đã nhận được nhiều góp ý quý báu, được trang bị thêm những phương pháp nghiên cứu và có những hiểu biết sâu sắc hơn về các vấn đề của Sinh học hiện đại.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô, cán bộ của Khoa Sinh học và cán bộ Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng tri ân đối với những người thầy, những đồng nghiệp, gia đình và bạn bè là những điểm tựa tinh thần vững chắc, đã giúp đỡ, động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn và luôn đồng hành cùng tôi trong quá trình học tập của mình.

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2024

TÁC GIẢ

Phó Thị Thúy Hằng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Nội dung nghiên cứu	3
4. Những đóng góp mới của luận án	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. Chi <i>Adinandra</i> và hệ gene lục lạp.....	6
1.1.1. Đặc điểm của chi <i>Adinandra</i>	6
1.1.2. Nghiên cứu về hệ gene lục lạp	12
1.2. Phân tích di truyền tiến hóa phân tử.....	20
1.2.1. Cơ sở di truyền của sự tiến hóa phân tử.....	20
1.2.2. Phân tích tiến hóa phân tử dựa trên hệ gene lục lạp.....	21
1.2.3. Nghiên cứu về mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật dựa trên hệ gene lục lạp	32
1.3. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi <i>Adinandra</i>	32
1.3.1. Thành phần hóa học của chi <i>Adinandra</i>	36
1.3.2. Hoạt tính sinh học của chi <i>Adinandra</i>	36
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. Vật liệu nghiên cứu	41
2.1.1. Vật liệu thực vật	41
2.1.2. Chủng vi khuẩn kiểm định	41
2.1.3. Các dòng tế bào thử nghiệm.....	42
2.1.4. Dữ liệu nghiên cứu	42

2.2. Hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu.....	42
2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	42
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	44
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	44
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp.....	44
2.3.2. Phương pháp phân tích di truyền tiến hóa phân tử	46
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học.....	53
2.3.4. Nhóm phương pháp xử lý số liệu và phân tích kết quả	56
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	57
3.1. Đặc điểm hệ gene lục lạp của loài <i>A. bockiana</i>	57
3.1.1. Cấu trúc và thành phần hệ gene lục lạp của loài <i>A. bockiana</i>	57
3.1.2. Bộ dữ liệu về trình tự lặp lại ở loài <i>A. bockiana</i>	68
3.1.3. Số lượng và tần suất sử dụng codon của gene mã hóa protein trong hệ gene lục lạp ở loài <i>A. bockiana</i>	83
3.1.4. So sánh hệ gene lục lạp của loài <i>A. bockiana</i> với <i>A. megaphylla</i> , <i>A. millettii</i> và <i>A. angustifolia</i>	83
3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền và phát sinh chủng loại của chi <i>Adinandra</i>	91
3.2.1. Phân mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh.....	92
3.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene <i>matK</i> , <i>trnL</i> và <i>rbcL</i> ..	97
3.3. Kết quả phân tích thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của ba loài nghiên cứu ..	97
3.3.1. Cấu trúc hóa học của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu.....	103
3.3.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu.....	106
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	108
1. Kết luận	108
2. Kiến nghị	108
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	109
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	111
PHỤ LỤC.....	130

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Diễn giải tiếng Việt
ACE	Angiotensin-converting enzyme	Enzyme chuyển angiotensin
APG. III	Angiosperm phylogeny group III	Nhóm phát sinh loài Thực vật hạt kín III
BLAST	Basic local alignment search tool	Công cụ tìm kiếm đối chiếu cục bộ cơ bản
bp	Base pairs	Cặp base nitơ
¹³ C-NMR	Nuclear magnetic resonance carbon-13	Cộng hưởng từ hạt nhân 13 cacbon
cs		Cộng sự
CC	Column chromatography	Sắc ký cột
COSY	Correlation Spectroscopy	Quang phổ tương quan
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	
2D-LC	Two-dimensional liquid chromatography	Sắc ký lỏng 2 chiều
1D-NMR	Nuclear magnetic resonance one-dimensional	Cộng hưởng từ hạt nhân một chiều
2D-NMR	Nuclear magnetic resonance two-dimensional	Cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
EC ₅₀	Effective concentration 50%	Nồng độ hiệu quả 50%
ESI-MS	electrospray ionization - Mass spectrometry	Khối phổ ion hóa phun điện tử
EST	Extraction Shiyacha tea	Chiết xuất trà Shiyacha
GC-MS	Gas Chromatography/Mass Spectroscopy	Sắc ký khí ghép khối phổ
¹ H-NMR	Nuclear magnetic resonance proton (1H)	Cộng hưởng từ hạt nhân proton (1H)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Tương quan dị hạt qua nhiều liên kết
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Khối phổ ion hóa phun điện tử độ phân giải cao

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Diễn giải tiếng Việt
HSCCC	High speed countercurrent chromatography	Sắc ký phân bố ngược dòng tốc độ cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Sự kết hợp lượng tử đơn hạt nhân
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
IR	Infrared spectroscopy	Quang phổ hồng ngoại
IRs	Pair of inverted repeats	Cặp vùng lặp lại đảo được
ITS	Internal transcribed spacers	Vùng đệm phiên mã nội bộ
kb	Kilo base	
KH		Kí hiệu
KL		Khối lượng
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Sắc ký lỏng - khối phổ
LSC	Large single copy	Sao chép đơn lớn
MEGA	Molecular evolutionary genetics analysis	Phân tích di truyền tiến hóa phân tử
MeOH	Methanol	
MS	Mass spectrometry	Khối phổ
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ hiệu ứng hạt nhân Overhauser
SSC	Small single copy	Sao chép đơn nhỏ
SSR	Simple sequence repeat	Trình tự lặp lại đơn giản
Taq DNA polymerase	Thermus aquaticus DNA polymerase	DNA polymerase chịu nhiệt
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký bản mỏng
TLTK		Tài liệu tham khảo
UV/VIS	ultraviolet - visible	Phổ tử ngoại - khả kiến

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sự phân bố các loài thuộc chi <i>Adinandra</i> ở Việt Nam	10
Bảng 1.2. Tác dụng chống ung thư của dịch chiết chứa nhóm hợp chất phenolic trên hai dòng tế bào HepG2 và MCF-7	33
Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu	42
Bảng 2.2. Các thiết bị sử dụng trong thí nghiệm.....	43
Bảng 3.1. Các nhóm gene trong hệ gene lục lạp loài <i>A. bockiana</i>	59
Bảng 3.2. Số lượng và tần suất sử dụng codon của các gene mã hóa protein ở loài <i>A. bockiana</i>	63
Bảng 3.3. Sự đa dạng về kích thước và số lượng gene trong hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	64
Bảng 3.4. Đặc điểm các gene <i>matK</i> , <i>trnL</i> và <i>rbcL</i> của loài <i>A. bockiana</i>	70
Bảng 3.5. Kết quả BLAST trình tự gene <i>matK</i> so sánh giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank.....	71
Bảng 3.6. Hệ số sai khác giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene <i>matK</i>	73
Bảng 3.7. Kết quả BLAST trình tự gene <i>trnL</i> so sánh giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank.....	75
Bảng 3.8. Hệ số sai khác giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene <i>trnL</i>	77
Bảng 3.9. Kết quả Blast trình tự gene <i>rbcL</i> so sánh giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank.....	79
Bảng 3.10. Hệ số sai khác giữa loài <i>A. bockiana</i> với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene <i>rbcL</i>	81
Bảng 3.11. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài <i>A. megaphylla</i>	84
Bảng 3.12. Dữ liệu ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (150 MHz) của hợp chất AHL15	85
Bảng 3.13. Dữ liệu ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (150 MHz) của hợp chất WAM11.587	

Bảng 3.14. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài <i>A. bockiana</i>	91
Bảng 3.15. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài <i>A. glischroloma</i>	93
Bảng 3.16. Sự phân bố của các hợp chất (4), (11), (16), (22), (26)-(29) và (31) ở các loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	96
Bảng 3.17. Sự phân bố của các hợp chất (23)-(25) và (30) ở thực vật.....	96
Bảng 3.18. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu	99
Bảng 3.19. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất	105
Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất	107

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh loài <i>A. megaphylla</i> Hu	7
Hình 1.2. Hình ảnh loài <i>Adinandra bockiana</i> E. Pritzel.....	9
Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát	44
Hình 2.2. Sơ đồ chiết mẫu lá khô của ba loài nghiên cứu.....	47
Hình 3.1. Bản đồ hệ gene lục lạp của loài <i>A. bockiana</i>	57
Hình 3.2. Dữ liệu về trình tự lặp lại trong hệ gene lục lạp của loài <i>A. bockiana</i>	61
Hình 3.3. Biểu đồ so sánh hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	66
Hình 3.4. Phân tích so sánh các giá trị đa dạng nucleotide (Pi) giữa các trình tự gene lục lạp của bốn loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	66
Hình 3.5. So sánh các vị trí tiếp giáp của LSC, IR và SSC trong hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	67
Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài <i>A. bockiana</i> và các loài khác liên quan	69
Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene <i>matK</i> của loài <i>A. bockiana</i> và các loài khác liên quan.....	74
Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene <i>trnL</i> của loài <i>A. bockiana</i> và các loài liên quan.....	78
Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene <i>rbcL</i> của loài <i>A. bockiana</i> và các loài liên quan.....	82
Hình 3.10. Các tín hiệu chính của HMBC và NOESY của hợp chất AHL15.....	87
Hình 3.11. Tương tác ^1H - ^1H trong phổ COSY và HMBC của hợp chất WAM11.5 ...	89
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài <i>A. megaphylla</i>	90
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài <i>A. bockiana</i>	92
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài <i>A. glischroloma</i>	94
Hình 3.15. Hoạt tính kháng khuẩn của hợp chất ursolic acid và isoquercetine.	102

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Chi Dương đồng (*Adinandra*) là một chi nhỏ trong họ Ngũ liệt (*Pentaphylacaceae*) [23], được phát hiện có khoảng 85 loài trên thế giới và khoảng 17 loài phân bố ở Việt Nam [16], [97], [159]. Theo Sách đỏ Việt Nam, một số loài thuộc chi *Adinandra* là nguồn gene quý, hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng, hiện đang được xếp vào mức đánh giá "Nguy cấp" (VU) như loài Sum lá lớn (*Adinandra megaphylla* Hu) [2]. Do đó, việc nhận diện đúng loài để bảo tồn và phát triển nguồn gene các loài quý hiếm này là việc làm cần thiết.

Cùng với phương pháp phân loại dựa trên kết quả so sánh đặc điểm hình thái theo truyền thống thì phương pháp sinh học phân tử với việc sử dụng các mã vạch DNA hỗ trợ định danh cho hiệu quả nhận diện và phân biệt loài cao hơn khi chỉ sử dụng phương pháp hình thái so sánh. Lục lạp (*chloroplast - cp*) là bào quan quan trọng và thiết yếu trong quá trình quang hợp của thực vật. Hệ gene lục lạp di truyền theo dòng mẹ và phân tử DNA có cấu trúc vòng kép [67]. Cấu trúc và thành phần gene của hệ gene lục lạp có tính bảo thủ cao hơn so với hệ gene nhân và hệ gene ti thể [25]. Mỗi gene của hệ gene lục lạp là một đơn vị tiến hóa duy nhất [50], [52], [67]. Mặc dù, hệ gene lục lạp có tính bảo thủ cao nhưng trong đó vẫn có những vùng dễ biến đổi. Chính sự sai khác trong trình tự nucleotide của các vùng gene có mức biến đổi cao là cơ sở để phân biệt loài này với loài khác, xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài ở mức độ phân tử. Ngoài ra, thông tin của hệ gene lục lạp còn được sử dụng để phục vụ việc chuyển gene, nhân giống và thuần hóa cây trồng [42]. Hiện nay, hệ gene lục lạp đã được nghiên cứu khá rộng rãi ở thực vật. Tuy nhiên, hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* có rất ít thông tin, chỉ có bốn loài trong tổng số 85 loài được giải trình tự hoàn toàn hệ gene lục lạp.

Cho đến nay, những công bố về sử dụng và đề xuất mã vạch DNA cho nhận diện các loài thuộc chi *Adinandra* rất hạn chế và chỉ có gene *matK* được đề xuất làm mã vạch DNA hỗ trợ nhận diện loài *A. megaphylla*, *A. lienii* [13], [102]. Do vậy, nghiên cứu về đặc điểm của hệ gene lục lạp và phát hiện những vùng gene tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA phục vụ nhận diện loài và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài của chi *Adinandra* là rất cần thiết.

Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đang là một trong những lĩnh vực được các nhà khoa học trên toàn thế giới quan tâm. Những hợp chất được phân lập từ thực vật đã và đang được sử dụng rộng rãi trong đời sống để dùng làm mỹ phẩm, hương liệu, thực phẩm, cũng như sử dụng trong y học. So với các hợp chất được tạo thành bằng phương pháp tổng hợp, các hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên thường không gây độc hoặc ít gây độc. Với ưu điểm nổi trội trên đã tạo động lực thúc đẩy các nhà khoa học nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên.

Trong dự án sàng lọc hoạt tính sinh học của thực vật ở Việt Nam, dịch chiết của một số loài thuộc chi *Adinandra*, họ Pentaphylacaceae được xác định có hoạt tính chống ung thư [14], [108], [136]. Ngoài ra, một số công trình nghiên cứu cho thấy, các loài thuộc chi *Adinandra* có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa cũng như điều trị bong gân, rắn cắn [3], [6], [38], [106]. Qua các nghiên cứu có thể nhận thấy tác dụng sinh dược học của các loài thuộc chi *Adinandra* có ý nghĩa rất lớn với sức khỏe con người. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học của chi *Adinandra* tập trung chủ yếu ở loài *A. nitida*, còn nhiều loài khác thuộc chi *Adinandra* chưa được quan tâm nghiên cứu. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về chi *Adinandra* chủ yếu tập trung vào thống kê danh sách thành phần loài, đặc điểm hình thái, nghiên cứu tạo cao chiết và xác định hoạt tính sinh học của cao chiết [9], [14], [59], [103]. Những nghiên cứu về phân lập và thử hoạt tính sinh học của các hợp chất mới được thực hiện ở loài *Adinandra hainanensis*, *Adinandra poilanei*, *Adinandra lienii* trong tổng số 17 loài được phát hiện [5], [134], [135]. Do đó, cần tiếp tục phân lập và xác định hoạt tính sinh học của các hợp chất từ những loài khác thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam.

Xuất phát từ những lý do trên, luận án được thực hiện với tên đề tài: “**Nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp và hợp chất có hoạt tính sinh học của một số loài Dương đồng (*Adinandra* spp.)**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Phân tích được đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *Adinandra bockiana*
- Phân tích được mối quan hệ di truyền giữa các loài và đề xuất ứng viên mã vạch DNA hỗ trợ định danh loài thuộc chi *Adinandra*.
- Xác định được thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ ba loài thuộc chi *Adinandra*.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*.

- Phân tích chi tiết đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*.
- So sánh hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* với một số loài khác thuộc chi *Adinandra* trên GenBank.

Nội dung 2: Nghiên cứu sự phát sinh chủng loại của chi *Adinandra*, tìm kiếm gene tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA lục lạp.

- Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lạp và trình tự các gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của các loài thuộc chi *Adinandra*.
- Phân tích các sơ đồ cây phát sinh chủng loại và tìm kiếm ứng viên mã vạch DNA để nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

Nội dung 3: Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ ba loài nghiên cứu.

- Phân lập các hợp chất bằng các phương pháp sắc ký.
- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được trên cơ sở các phép xác định thông số vật lý, các phương pháp đo phổ đồng thời kết hợp với phân tích và tra cứu tài liệu tham khảo.
- Đánh giá một số hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, gây độc tế bào ung thư, ức chế α -glucosidase) của một số hợp chất phân lập được từ ba loài nghiên cứu.

4. Những đóng góp mới của luận án

(1) Luận án là công trình nghiên cứu mới ở Việt Nam và trên thế giới, đã phân tích chi tiết và đầy đủ đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*; đề xuất vùng gene *matK* và *rbcL* là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng giúp nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

(2) Luận án là nghiên cứu đầu tiên đã phân lập được 37 hợp chất từ lá của loài *A. megaphylla*, *A. bockiana*, *Adinandra glischroloma*; trong đó có hai hợp chất mới (debutyldorycnic acid và adinanquercetiside được phân lập từ lá của loài *A. megaphylla*).

(3) Lần đầu tiên phát hiện hợp chất 23-hydroxyursolic acid từ loài *A. glischroloma* có khả năng ức chế α -glucosidase và gây độc dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7); hợp chất ursolic acid từ các loài *A. megaphylla*, *A. bockiana*, *A. glischroloma* có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*; hợp chất isoquercetine (từ loài *A. megaphylla*, *A. glischroloma*) ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *Citrobacter freundii* và *Streptococcus milleri*.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Về mặt khoa học

Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ là cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng những mã vạch DNA đã được đề xuất để nhận diện loài và phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*.

Luận án đã xác định được thành phần hóa học có trong lá của ba loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam, từ đó cho thấy sự khác biệt so với các loài *Adinandra* ở Trung Quốc. Cụ thể, các loài *Adinandra* ở Việt Nam giàu hợp chất triterpenoid, trong khi các loài *Adinandra* ở Trung Quốc giàu hợp chất flavonoid.

Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được làm cơ sở khoa học để giải thích cho hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào ung thư của cao chiết cũng như cách dùng một số loài thuộc chi *Adinandra* trong điều trị ung thư ở Việt Nam.

Các bài báo được đăng tải trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế, cùng với các trình tự gene công bố trên GenBank là những tư liệu có giá trị tham khảo trong nghiên cứu và giảng dạy.

Về mặt thực tiễn

Phát hiện khả năng ức chế α -glucosidase và gây độc dòng tế bào ung thư HepG2, MCF-7 của hợp chất 23-hydroxyursolic acid có thể cung cấp cơ sở và mở ra cơ hội cho việc phát triển các phương pháp điều trị mới cho bệnh đái tháo đường, ung thư gan và ung thư vú.

Phát hiện hợp chất ursolic acid có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn *P. aeruginosa*, isoquercetine ức chế sự phát triển của vi khuẩn *C. freundii*, *S. milleri* có thể mở ra cơ hội cho việc sử dụng các hợp chất từ thực vật trong chữa trị một số bệnh do những vi khuẩn này gây ra.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Chi *Adinandra* và hệ gene lục lạp

1.1.1. Đặc điểm của chi *Adinandra*

1.1.1.1. Phân loại chi *Adinandra*

Từ thế kỷ 20 đã có những nghiên cứu sâu về sinh học phân tử và chủng loại phát sinh loài. Hiện nay, việc phân loại họ Chè (Theaceae) có hai quan điểm: theo nghĩa rộng và theo nghĩa hẹp. Theo nghĩa rộng, họ Chè bao gồm các phân họ Theoideae, Ternstroemioideae, Asteropeioideae và Sladenioideae. Chi *Adinandra* thuộc phân họ Ternstroemioideae trong họ Chè [41]. Theo nghĩa hẹp, họ Chè chỉ còn một phân họ là Theoideae, với các tông (chi) là *Camellieae* (tên khác là *Theaceae*), *Gordonieae*, *Stewartieae*, *Pyrenarieae*, *Schimeae*; còn các đại diện của phân họ Ternstroemioideae (theo nghĩa rộng) chuyển qua họ Ternstroemioideae [33], [73]. Như vậy, theo nghĩa hẹp thì chi *Adinandra* không thuộc họ Chè mà thuộc họ Ternstroemiaceae, đây là một họ độc lập với họ Chè và Pentaphylacaceae, các họ này cùng thuộc bộ Đỗ quyên (Ericales).

Hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại (Angiosperm Phylogeny Group - APG.III) ủng hộ quan điểm phân loại theo nghĩa hẹp nhưng có những thay đổi về vị trí phân loại của các họ [23]. Trước đây, theo quan điểm nghĩa hẹp thì họ Pentaphylacaceae chỉ có một chi là *Pentaphylax* [73]. Hiện nay, họ Ternstroemiaceae được chuyển vào trong họ Pentaphylacaceae. Theo hệ thống APG.III, trong bộ Đỗ quyên (Ericales) có họ Pentaphylacaceae, bao gồm cả họ Ternstroemiaceae và họ Chè (Theaceae). Trong họ Pentaphylacaceae có 11 chi trong đó có chi *Adinandra*. Như vậy, Theo hệ thống APG.III, chi *Adinandra* thuộc họ Ngũ liệt (Pentaphylacaceae), bộ Đỗ quyên (Ericales), lớp Hai lá mầm (Eudicots), ngành Hạt kín (Angiosperms), giới Thực vật (Plantae) [23].

Hiện nay, quan điểm phân loại theo nghĩa hẹp, nghĩa rộng hay hệ thống APG.III vẫn được chấp nhận. Trong nghiên cứu này sử dụng hệ thống phân loại theo APG.III, chi *Adinandra* thuộc họ Ngũ liệt (Pentaphylacaceae), bộ Đỗ Quyên (Ericales).

1.1.1.2. Đặc điểm hình thái của chi *Adinandra*

Chi *Adinandra* có khoảng 85 loài trên thế giới và 17 loài ở Việt Nam đã được ghi nhận [16], [97], [159]. Hầu hết các loài thuộc chi *Adinandra* là cây bụi và gỗ nhỏ, thường xanh, nhánh non có lông nhung. Lá đơn, mọc so le, có kích thước trung bình hay lớn [15], [3], [6]. Hoa mọc đơn hay thành cặp ở nách lá, lưỡng tính, hoa mẫu 5. Lá đài có lông mềm hoặc lông ráp dính ở gốc của các lá đài. Cánh hoa không lông hay chỉ có lông ở mặt ngoài. Nhị nhiều từ 15-60, trung bình có khoảng 25 nhị xếp thành 1-5 vòng dính trên đế hoa. Bao phấn hình sợi có mũi nhọn, có lông ngắn hoặc dài. Bộ nhụy có 1 vòi nhụy, phần đầu nhụy chia thành 3-5 thùy. Bầu trên không lông hoặc có lông mềm. Bầu có từ 3-5 ô, noãn nhiều (có từ 20-100 noãn trên mỗi ô). Quả khô không tự mở. Hạt nhiều, nhỏ, màu nâu, nội nhũ nhiều và có hai lá mầm [15], [3], [6], [16], [97].



Hình 1.1. Hình ảnh loài *A. megaphylla* Hu

A. Dạng sống; B. Cành mang lá (mặt trước); C. Cành mang lá (mặt sau); D: Nụ hoa. (Nguồn: Nguyen Huu Quan và cs (2021)) [102]

Loài *Adinandra megaphylla* Hu có tên gọi khác là Sum Petelot, *A. petelotii* Gagnep; *A. serrulata* Li [97]. Tên thường gọi là Sum lá lớn [2] (Hình 1.1). Loài *A. megaphylla* là nguồn gene hiếm. Ở Việt Nam, loài này được tìm thấy tại huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai và đã được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam (2007) với phân hạng: VU A1c, d [2]. Điều này cho thấy, loài *A. megaphylla* đang đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng và cần được bảo tồn.

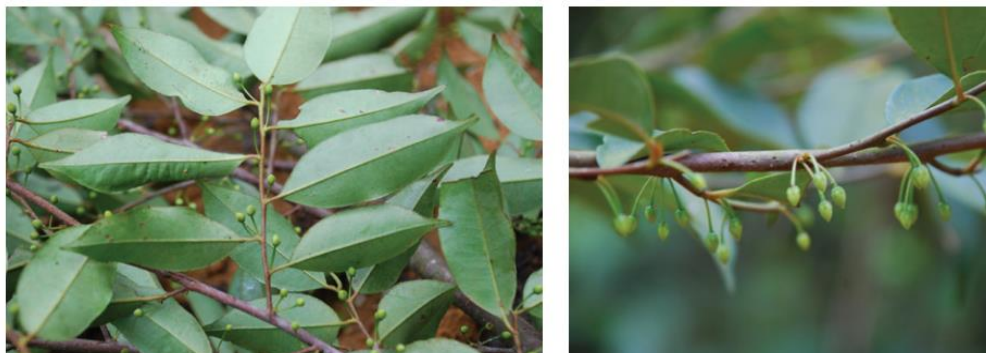
Loài *A. megaphylla* Hu là cây gỗ cao từ 10-20 m. Cành non hình trụ, mập, có lông, màu rỉ sắt, về sau cành nhẵn, màu nâu đen. Búp non có nhiều lông màu rỉ sắt.

Lá dai, hình giáo thuôn, cỡ 16-24 cm x 4-7 cm, ban đầu lá có lông rải rác màu xanh vàng ở mặt dưới, về sau trở nên nhẵn và có màu nâu, chóp lá nhọn; gốc lá tròn đến hình nêm rộng; mép lá có răng cưa mảnh, đầu răng có tuyến; gân giữa lõm ở mặt trên và mặt lá nhẵn dọc theo rãnh gân giữa; gân bên có 20-24 đôi, mảnh, hơi cong, lồi trên hai mặt; gân cấp 3 dạng mạng thưa; cuống lá dài từ 1,2-1,5 cm, mảnh nhưng dày dần về phía đầu, có lông màu rỉ sắt. Hoa màu trắng hoặc màu xanh vàng, mọc đơn độc ở nách lá gần đầu cành; cuống hoa dài từ 2-4 cm, dài hơn cuống lá, cong xuống, có lông vàng, rậm. Lá bắc 2 nhỏ, mọc xen, hình thuôn, dài cỡ 6-7 mm, rộng 3 mm, hai mặt đều có lông, sớm rụng. Lá đài 5, không đều nhau, xếp lợp, dai, hình trứng rộng, dài 11-14 mm, rộng 8-10 mm, có lông vàng ở giữa mặt dưới. Tràng hoa 5, không đều nhau, hình trứng thuôn, dài 13 mm, rộng 7 mm, dính nhau ở gốc, có 3 - 4 răng cưa ở phần trên mép tràng hoa, có lông mặt lưng trừ ven mép. Nhị 40-45, bao phấn hình thuôn, dài 4 mm, có lông, chóp bao phấn có phần phụ nhọn; chỉ nhị nhẵn, dài 2 mm, hơi dính nhau ở gốc. Bầu 5 ô, có lông; vòi đơn dài 9 mm, có lông rậm; núm không xẻ thùy hoặc hơi xẻ 5 thùy nông; noãn nhiều. Quả nạc gần hình cầu nhọn đường kính 1-2 cm, màu tím đen, có lông trừ ở chóp, vách quả dày. Hạt hình thận lệch, dài khoảng 1,3 mm, màu nâu đỏ nhạt, nhẵn bóng, mặt hạt có vân (Hình 1.1). Quả ra vào tháng 8-10 hàng năm. Cây ưa ẩm, có thể chịu bóng tốt; thường mọc rải rác dưới tán rừng, ven bờ khe suối, độ cao 1200-1800 m [2], [97].

Loài *Adinandra bockiana* E.Pritz. ex Diela gồm hai thứ là *A. bockiana* var. *tonkinensis* Kobuski và *A. bockiana* var. *acutifolia* (Hand.-Mazz.) Kobuski. Tên gọi khác là *A. acutifolia* Hand.-Mazz. Tên thường gọi là Dương đồng bóc; Hồng đạm Tam Đảo; Dương đồng bóc lá nhọn; Hồng đạm lá nhọn; Dương đồng bóc Bắc; Hồng đạm Bắc bộ [3], [16].

Loài *A. bockiana* E. Pritz. ex Diela là cây bụi hoặc gỗ, cao 2-9 m. Cành non hơi đen nâu. Cuống lá dài 5-7 mm, phiến lá thuôn dài đến hình trứng thuôn dài từ 9-13x3-4 cm. Mặt trên lá màu xanh lục nhạt và sáng bóng. Mặt dưới lá xanh lục đậm. Gân phụ từ 11-12 ở mỗi bên của đường gân chính giữa và không dễ nhìn thấy trên cả hai bề mặt. Hoa ở nách lá, đơn độc. Hoa màu trắng, tràng hoa hình trứng, nhị 25-

30, bao phấn hình mác tuyến tính dài 1,5-2 mm. Bầu 3 ô, có nhiều noãn trong mỗi ô. Quả màu đen tía khi chín, hạt màu nâu đỏ và bóng [3], [6], [97] (Hình 1.2).



A **B**
Hình 1.2. Hình ảnh loài *A. bockiana* E. Pritzel

A. Cành mang lá, nụ; B. Nụ hoa

Nguồn: Nguyễn Hữu Quân và cs (2021) [14]

Loài *Adinandra glischroloma* Hand-Maz. var *hirta* (Gagn) Kob có tên gọi khác là *A. hirta* Gagnep. Loài này gồm hai thứ là *A. glischroloma* var. *glischroloma* (tên khác *A. chinensis* Merrill & F. P. Metcalf) và *A. glischroloma* var. *macrosepala* (tên khác *A. macrosepala* F.P. Metcalf) [16], [97]. Tên thường gọi là Sum lông hay Hồng đậm lông. Loài *Adinandra glischroloma* Hand-Maz. var *hirta* (Gagn) Kob là cây bụi hoặc gỗ, cao 3-8 m. Chồi non có nhiều lông vàng. Cành non có màu nâu xám, các cành nhỏ có màu vàng nâu hoặc màu lông nhung. Cuống lá dày, chiều dài khoảng 8-10 mm, có nhiều lông. Phiến lá dày, hình elip thuôn dài kích thước 8-13×2,5-4,5 cm; mặt dưới của lá có nhiều lông, màu xanh lục hơi vàng hoặc nâu vàng đến gần đen với các lông màu vàng nhô ra ngoài rìa; mặt trên có màu xanh đậm, hơi bóng và không có lông; gân phụ từ 10-12 đôi ở mỗi mặt của gân giữa và dễ thấy trên cả hai mặt. Hoa mọc ở nách lá, có 2 hay 3 chùm, ít khi đơn độc. Cuống nhỏ từ 0,6-1,5 cm thường uốn cong, rậm rạp; lá bắc có nhiều lông; đài hoa dày, hình trứng kích thước 5-14 mm, đỉnh hình chóp nhọn. Tròng hoa 5, màu trắng, không lông, thuôn dài khoảng 8-15×4-6 mm. Nhụy nhiều lông, noãn sào và có nhiều lông dài. Quả màu đen khi chín, hình cầu, kích thước 0,8-1,3 cm, quả đóng [6].

1.1.1.3. Sự phân bố các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam

Chi *Adinandra* có khoảng 85 loài phân bố ở các nước Châu Phi, Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Srilanka, Banglades và một số nước Đông Nam Á [97], [159]. Ở Việt Nam, theo các tài liệu trong nước chi *Adinandra* đã được tìm thấy và ghi nhận có 17 loài, phân bố ở các tỉnh: Lào Cai, Cao Bằng, Quảng Ninh, Vĩnh Phúc, Quảng Trị, Kon Tum, Lâm Đồng và Gia Lai (Bảng 1.1) [3], [6], [16], [59], [97]. Trong đó, loài Sum liên (*A. lienii*) là loài bản địa được tìm thấy năm 1986. Loài Sum Hòn Giao (*A. hongiaoensis*) mới được phát hiện ở Hòn Giao, Lâm Đồng năm 2014 [59]. Theo Thực vật chí Trung Quốc, Việt Nam còn có *A. lancipetala* phân bố ở phía Bắc Việt Nam [97]. Tuy nhiên, hiện nay các tài liệu thực vật trong nước chưa ghi nhận loài này [3], [6], [16], [59], [97].

Bảng 1.1. Sự phân bố các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam
[3], [6], [16], [59], [97].

TT	Tên loài	Tên thường gọi	Phân bố
1	<i>A. annamensis</i> Gagnep	Dương đồng, Súm đỏ, Xúm, Hồng đậm trung bộ	Lào Cai (Sa Pa), Quảng Ninh (Tiên Yên), Quảng Trị
2	<i>A. bockiana</i> Pritz. ex Diels	Dương đồng bóc, Hồng đậm tam đảo	Vĩnh Phúc (Tam Đảo), Lào Cai (Văn Bàn)
3	<i>Adinandra</i> var. <i>acutifolia</i> (Hand.-Mazz.) Kobuski	Dương đồng bóc lá nhọn, Hồng đậm lá nhọn	Vĩnh Phúc (Tam Đảo)
4	<i>Adinandra</i> var. <i>tonkinensis</i> Kobuski	Dương đồng bóc bắc, Hồng đậm bắc bộ	Lào Cai (Sa Pa), Vĩnh Phúc (Tam Đảo)
5	<i>A. caudata</i> Gagnep	Dương đồng đuôi, Sum đuôi, Sô lô, Ko sa num, Hồng ạm đuôi	Hoà Bình (Chợ Bờ), Thanh Hoá, Huế (Bạch Mã), Khánh Hoà (Nha Trang)
6	<i>A. dongnaiensis</i> Gagnep	Sum đồng nai, Sa lô, Hồng đậm đồng nai	Lâm Đồng, Bình Phước, Bình Dương, Đồng Nai
7	<i>A. glischroloma</i> Hand.-Mazz. var. <i>hirta</i> (Gagnep.) Kobuski	Sum lông, Hồng đậm lông	Lào Cai (Sa Pa, Ô Quy Hồ, Y Tý (Bát Xát))
8	<i>A. grandifolia</i> N. H. Hien & Yakovl	Dương đồng lá to, Hồng đậm lá to	Mới thấy ở Lào Cai (An Khê)
9	<i>A. hainanensis</i> Hayata	Sum đỏ, Dương đồng hải nam, Thạch đàn lá nhỏ, Sum điểm đỏ, Hồng đậm hải nam	Quảng Ninh (Tiên Yên), Quảng Trị (Động Cô Pat), Kon Tum (Đác Glây, Mường Hoong), Gia Lai (Kon Hà Nừng), Lâm Đồng (Đà Lạt; Bảo Lộc, Lộc Thắng)

10	<i>A. integerrima</i> T. Anders. ex Dyer in Hook. f	Sum nguyên, Sum lông, Sum, Hồng đạm lá nguyên	Lào Cai (Sa Pa), Đà Nẵng (Bà Nà), Kon Tum, Lâm Đồng, Kiên Giang (Phú Quốc)
11	<i>A. lienii</i> N. H. Hien & Yakovl	Sum liên, Hồng đạm liên	Hà Giang (Bắc Quang), Lào Cai (Văn Bàn)
12	<i>A. megaphylla</i> Hu	Sum lá lớn, Hồng đạm sa pa	Lào Cai (Vườn Quốc gia Hoàng Liên)
13	<i>A. microcarpa</i> A. Chev. ex Gagnep	Sum trái nhỏ, Hồng đạm quả nhỏ	Khánh Hoà (Nha Trang, Hòn Bà)
14	<i>A. millettii</i> (Hook. & Arn.) Benth. & Hook. f. ex Hance	Dương đồng millett, Hoàng thụ, Sum millett	Lào Cai (Sa Pa), Vĩnh Phúc (Tam Đảo)
15	<i>Adinandra</i> var. <i>dalatensis</i> N. H. Hien & Yakovl	Dương đồng đà lạt, Hồng đạm đà lạt	Lâm Đồng (Đà Lạt)
16	<i>A. phlebophylla</i> Hance	Dương đồng lá, Hồng đạm lá gân	Lâm Đồng (Đà Lạt)
17	<i>A. poilanei</i> Gagnep	Sum poilane, Hồng đạm bảo lộc	Lâm Đồng (Pnom Sapoum, Bảo Lộc)

1.1.2. Nghiên cứu về hệ gene lục lạp

1.1.2.1. Hệ gene lục lạp của thực vật bậc cao

Hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài là cơ sở để phân tích, tìm kiếm các thông tin hữu ích như đánh giá độ đa dạng của các vùng trình tự tiềm năng làm mã vạch DNA, phân tích các vùng trình tự lặp lại (repeat) và các vùng vi vệ tinh (microsatellite) hiện diện trong hệ gene lục lạp để phục vụ đánh giá đa dạng di truyền, nhận diện loài và phân tích phát sinh chủng loại.

Trên thế giới, hệ gene lục lạp đã được nghiên cứu rộng rãi ở thực vật. Trước đây, việc giải trình tự hệ gene lục lạp gặp nhiều khó khăn khi áp dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger, do chỉ thu được các đoạn trình tự ngắn. Tuy nhiên, nhờ sự ra đời của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (*Next Generation Sequencing* - NGS) có khả năng xử lý khối lượng dữ liệu khổng lồ với tốc độ nhanh và chi phí giải trình tự ngày càng giảm mà việc giải trình tự toàn bộ hệ gene của một loài sinh vật ngày càng phổ biến [120]. Công nghệ giải trình tự gene thế hệ mới bằng phương pháp tổng hợp Illumina (phương pháp Illumina), sử dụng phần mềm lắp ráp HGAP4 de

no-vo và kết hợp tham chiếu với các trình tự trên GenBank đã giúp cho hệ gene lục lạp của nhiều loài thực vật được lắp ráp hoàn chỉnh và sáng tỏ về đặc điểm cấu trúc.

Zhou và cs (2018) đã giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp của hai loài Anh túc đỏ (*Papaver rhoeas* và *Papaver orientale*) bằng phương pháp Illumina. Kết quả cho thấy, hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *P. rhoeas* và *P. orientale* là phân tử DNA mạch vòng kép, kích thước lần lượt là 152799 bp và 152905 bp, có cấu trúc bốn vùng điển hình, có tổng số 130 gene được xác định trong mỗi hệ gene, bao gồm 85 gene mã hóa protein, 37 gene mã hóa RNA vận chuyển (tRNA) và 8 gene mã hóa RNA ribosome (rRNA) [158].

Năm 2019, Alwadani và cs đã phân tích hệ gene lục lạp của bốn loài Bạch đàn *Eucalyptus* thuộc chi Bạch đàn L'Hérit (*Myrtaceae*) ở thảm thực vật thân gỗ ở miền Đông Australia. Nhóm nghiên cứu đã công bố bốn hệ gene lục lạp hoàn chỉnh mới của *Eucalyptus*. Các cpDNA của các loài *E. albens*, *E. conica*, *E. crebra* và *E. melliodora* được chứng minh là phần lớn giống hệt nhau, có kích thước và cấu trúc tương tự như các cpDNA của *Eucalyptus* đã được công bố trước đây. Tổng cộng 132 gene (trong đó có 114 gene thuộc vùng sao chép đơn (LSC và SSC), 18 gene trong vùng lặp lại đảo được (Irs)) đã được xác định và được bảo tồn cao về thứ tự, thành phần và tổ chức gene. Tiến hành so sánh tham chiếu hệ gene lục lạp của loài *Eucalyptus* với trình tự lục lạp của 35 cá thể khác đại diện cho 12 loài thuộc chi Bạch đàn L'Hérit (*Myrtaceae*). Tỷ lệ nucleotide khác nhau giữa các gene mã hóa protein, với 17 gene có sự sai khác và 29 gene bất biến [26].

Gu và cs (2019) đã công bố sáu hệ gene lục lạp của sáu loài Bèo lã (*Lythraceae*) mới được giải trình tự (*Duabanga grandiflora*, *Trapa natans*, *Lythrum salicaria*, *Lawsonia inermis* L., *Woodfordia fruticosa* và *Rotala rotundifolia*) và so sánh chúng với 16 hệ gene lục lạp của các loài khác thuộc chi *Lythraceae*. Hệ gene lục lạp của 22 loài thuộc chi *Lythraceae* có chiều dài dao động từ 152049 bp đến 160769 bp. Ở mỗi loài thuộc chi *Lythraceae*, hệ gene lục lạp chứa 112 gene bao gồm 78 gene mã hóa protein, 4 gene mã hóa rRNA và 30 gene mã hóa tRNA. Hơn

nữa, nhóm tác giả đã phát hiện 211-332 trình tự lặp (SSR) và 7-27 trình tự lặp lại song song [52].

Năm 2021, Yang và cs đã giải trình tự hệ gene lục lạp của loài *Camellia fluviatilis* bằng phương pháp Illumina. Kết quả cho thấy, hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *C. fluviatilis* có kích thước 157041 bp, hàm lượng GC chiếm tỉ lệ là 37,29%, bao gồm vùng LSC có kích thước 86718 bp, vùng SSC có kích thước 18293 bp và một cặp vùng IRs có 26015 bp ở mỗi vùng. Hệ gene lục lạp của loài *C. fluviatilis* có 128 gene, bao gồm 83 gene mã hóa protein, 8 gene rRNA và 37 gene tRNA [156].

Camellia chekiangoleosa Hu là một loài cây Trà dầu có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao ở miền nam Trung Quốc. Nhằm góp phần vào các nghiên cứu sâu hơn về phát sinh loài, bảo tồn loài *C. chekiangoleosa* và mối quan hệ di truyền giữa các loài trong họ Hoa trà, Yin và cs (2021) đã giải trình tự hệ gene lục lạp của loài này bằng phương pháp Illumina. Toàn bộ hệ gene lục lạp của loài *C. chekiangoleosa* có chiều dài 156971 bp, chứa vùng LSC dài 86673 bp, vùng SSC dài 18394 bp và một cặp vùng IRs (IRa và IRb) dài 25952 bp ở mỗi vùng. Trong hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *C. chekiangoleosa* có tổng số 113 gene, trong đó có 19 gene lặp lại ở vùng IRs [157].

Eurya alata là một loài thuộc chi *Eurya* (họ Pentaphylacaceae). Hệ gene lục lạp của loài *E. alata* có kích thước 157190 bp và bao gồm 4 vùng, trong đó vùng LSC (87230 bp) và vùng SSC (18216 bp) được phân tách bằng vùng IRa và IRb (51744 bp/mỗi vùng). Hệ gene lục lạp có 136 gene gồm: 8 gene mã hóa rRNA, 39 gene mã hóa tRNA và 89 gene mã hóa protein. Ngoài ra, trong hệ gene lục lạp của loài *E. alata* đã tìm thấy 35 SSR và 49 trình tự lặp lại, vùng mã hóa ít biến đổi hơn vùng không mã hóa [152].

Ở Việt Nam còn ít công trình giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp của các loài thực vật, đặc biệt của các loài cây dược liệu. Năm 2018, Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamsis*) là loài đầu tiên được giải mã trình tự hệ gene lục lạp dựa trên bốn mẫu (hai mẫu thuộc loài *P. vietnamsis*, một mẫu thuộc loài *P. bipinnatifidus* và một

mẫu thuộc loài *P. stipuleanatus*). Kết quả giải trình tự cho thấy, hệ gene lục lạp có cấu trúc vòng kép dài 155992 bp với bốn vùng điển hình gồm: một vùng LSC (86177 bp), một vùng SSC (17935 bp) và một cặp vùng IR (25940 bp/mỗi vùng). Hệ gene lục lạp có 79 gene mã hóa protein, 29 gene tRNA và 4 gene rRNA [101].

Hệ gene lục lạp của loài lan Hải hồng (*Paphiopedilum delenatii*) đã được giải trình tự và lắp ráp hoàn chỉnh. Sau khi được lắp ráp hệ gene lục lạp của loài lan Hải hồng có chiều dài 160955 bp, gồm một vùng LSC, một vùng SSC và được phân tách bởi cặp vùng lặp lại đảo được (IRa và IRb). Hệ gene lục lạp của loài lan Hải hồng thể hiện cấu trúc điển hình với bốn vùng riêng biệt, bao gồm vùng LSC, vùng SSC và một cặp vùng IRs. Tổng cộng có 130 gene đã được chú thích trong hệ gene lục lạp, bao gồm 77 gene mã hóa protein, 39 gene tRNA, 8 gene rRNA và 6 gene giả, hàm lượng GC chiếm tỉ lệ là 35,6%. Kết quả nghiên cứu không chỉ cung cấp các thông tin về hệ gene lục lạp nhằm hỗ trợ công tác bảo tồn loài lan Hải hồng đặc hữu của Việt Nam mà còn có ý nghĩa trong việc hỗ trợ hướng nghiên cứu lắp ráp hệ gene lục lạp, có thể áp dụng trên nhiều đối tượng khác [4], [132].

1.1.2.2. Hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Adinandra*

Chi *Adinandra* là một trong số 11 chi thuộc họ Pentaphylacaceae. Hiện nay, các nghiên cứu về hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* có rất ít. Trên thế giới có 85 loài thuộc chi *Adinandra*, tuy nhiên mới có một số loài được giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp và một số mã vạch DNA từ các loài được xác định. Hiện nay, chỉ có bốn loài thuộc chi *Adinandra* đã được giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp và đăng ký trên GenBank, đó là loài *A. megaphylla* (mã số MW697901.1), loài *A. millettii* (mã số MF179492.1), loài *A. bockiana* (mã số MW699853.1) và loài *A. angustifolia* (mã số MF179491.1) [104], [105], [145], [146].

Các nghiên cứu về giải trình tự hệ gene lục lạp các loài thuộc chi *Adinandra* cho thấy, hệ gene lục lạp đều có cấu trúc điển hình với bốn vùng gồm: một vùng LSC có kích thước khoảng 86 kb, một vùng SSC có kích thước khoảng 18 kb và một cặp vùng IRs (IRa và IRb) có kích thước hơn 26 kb mỗi vùng. Kích thước hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* dao động từ 156-156,5 kb. Hệ gene

lục lập có từ 129-132 gene, bao gồm các gene mã hóa protein, các gene không mã hóa protein gồm các gene mã hóa tRNA, gene mã hóa rRNA,... Hàm lượng GC trong hệ gene lục lập của các loài thuộc chi *Adinandra* trung bình khoảng 37,4% [104], [145], [146]. Số lượng trình tự lặp SSR khác nhau ở các loài trong cùng chi *Adinandra*. Đặc điểm hệ gene lục lập của một số loài thuộc chi *Adinandra* đã được mô tả và công bố.

Năm 2021, Nguyen và cs đã giải mã hoàn toàn hệ gene lục lập của loài *A. megaphylla* Hu và đã được công bố trên GenBank với mã số MW697901.1. Kích thước hệ gene lục lập từ loài *A. megaphylla* là 156298 bp, có cấu trúc gồm bốn vùng: một vùng LSC dài 85688 bp, một vùng SSC dài 18424 bp và một cặp vùng IRs có kích thước 26093 bp ở mỗi vùng. Hệ gene lục lập của loài *A. megaphylla* chứa 131 gene, trong đó có 86 gene mã hóa tổng hợp protein, 37 gene mã hóa tRNA, 8 gene mã hóa rRNA và hàm lượng GC trong hệ gene lục lập chiếm tỉ lệ 37,4% [102].

Hệ gene lục lập của loài *A. millettii* đã giải trình tự và công bố trên GenBank năm 2023 với mã số MF179492.1. Hệ gene lục lập của loài *A. millettii* có kích thước 156311 bp, có cấu trúc bốn vùng điển hình gồm một vùng LSC dài 85698 bp (từ nucleotide 1 đến 85698), một vùng SSC dài 18421 bp (từ nucleotide 111795 đến 130215), một cặp vùng IRs có kích thước 26096 bp ở mỗi vùng. Hệ gene lục lập của loài *A. millettii* gồm 132 gene, trong đó có 87 gene mã hóa protein, 37 gene mã hóa tRNA, 8 gene mã hóa rRNA [146].

Hệ gene lục lập của loài *A. angustifolia* đã được Yu và cs (2023) giải trình tự thành công và công bố trên GenBank với mã số MF179491.1. Hệ gene lục lập của loài *A. angustifolia* có kích thước 156344 bp, có cấu trúc 4 vùng điển hình gồm một vùng LSC dài 85743 bp (từ nucleotide 1 đến 85743), một vùng SSC dài 18419 bp (từ nucleotide 111835 đến 130253), một cặp vùng IRs có kích thước 26091 bp ở mỗi vùng. Hệ gene lục lập của loài *A. angustifolia* gồm 132 gene, trong đó có 87 gene mã hóa protein, 37 gene mã hóa tRNA, 8 gene mã hóa rRNA [145].

Mặc dù, các nghiên cứu giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* còn ít, tuy nhiên một số gene riêng lẻ trong hệ gene lục lạp thuộc chi này đã được nghiên cứu giải trình tự và công bố trên GenBank như: Gene *matK* đã được giải trình tự ở loài *A. glischroloma*, *A. nitida*, *A. integerrima* và *A. dumosa* với mã số lần lượt trên GenBank là OL537803.1 [125], KP093833.1 [88], KJ708801.1 [46] và MH332592.1 [44]. Gene *rbcL* của loài *A. formosana* đã được giải trình tự và đăng ký trên GenBank với mã số AF089713.1 [129]. Ngoài ra, một số nghiên cứu ứng dụng mã vạch DNA là các gene trong hệ gene lục lạp để nhận diện các loài thuộc chi *Adinandra* đã được thực hiện như: nghiên cứu của Nguyễn Hữu Quân và cs (2019) đã sử dụng mã vạch DNA gene *matK* để định danh mẫu Sum liên (*A. lienii*) thu tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam. Đồng thời, nghiên cứu đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *matK* và xác định được mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*. Kết quả cho thấy, loài *A. lienii* có mối quan hệ di truyền gần với loài *A. nitida* (Mã số trên GenBank KP093833.1) [13]. Gene *matK* được đề xuất làm mã vạch DNA để nhận diện loài Sum lá lớn (*A. megaphylla*) và nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài trong chi *Adinandra* [102].

Hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* đã được Nguyen và cs giải trình tự năm 2021, tuy nhiên chưa có những phân tích sâu, chi tiết về đặc điểm của hệ gene này [105]. Do đó, phạm vi đề tài sẽ nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* và so sánh với hệ gene lục lạp của các loài khác để thấy được sự bảo tồn và biến đổi trong hệ gene lục lạp của chi *Adinandra*.

1.2. Phân tích di truyền tiến hóa phân tử

1.2.1. Cơ sở di truyền của sự tiến hoá phân tử

Phân tích di truyền tiến hóa phân tử dựa trên dữ liệu DNA, RNA và protein. Lĩnh vực nghiên cứu này kết hợp các nguyên tắc di truyền, sinh học tiến hóa và sinh học phân tử để hiểu cơ chế thay đổi di truyền theo thời gian, dẫn đến sự biến đổi trong và giữa các loài. Bằng cách kiểm tra trình tự phân tử, các nhà khoa học có thể theo dõi mối quan hệ tiến hóa giữa các sinh vật, khám phá lịch sử sự sống trên Trái đất [100].

Sự tiến hóa phân tử hoạt động thông qua một số cơ chế chính: (1) Đột biến là những thay đổi ngẫu nhiên trong trình tự nucleotide của DNA. Chúng là nguồn biến thể di truyền chính, rất quan trọng cho quá trình tiến hóa. Đột biến có thể xảy ra do lỗi trong quá trình sao chép DNA, tiếp xúc với chất gây đột biến hoặc thông qua các quá trình như tái tổ hợp và chuyển đổi gene. (2) Dịch chuyển di truyền (genetic drift) là sự biến động ngẫu nhiên của tần số alen trong quần thể. Sự dịch chuyển di truyền có tác động rõ rệt hơn ở các quần thể nhỏ, nơi các sự kiện ngẫu nhiên có thể làm thay đổi đáng kể tần số alen từ thế hệ này sang thế hệ tiếp theo [100]. (3) Chọn lọc tự nhiên tác động lên sự biến đổi di truyền trong quần thể, ưu tiên các alen mang lại lợi thế sinh tồn hoặc sinh sản. Theo thời gian, các alen có lợi trở nên phổ biến hơn trong quần thể, thúc đẩy quá trình tiến hóa thích nghi. (4) Dòng gene hoặc sự chuyển giao các alen giữa các quần thể, có thể tạo ra vật liệu di truyền mới và làm giảm sự khác biệt di truyền giữa các quần thể. Dòng gene đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sự đa dạng di truyền. (5) Tái tổ hợp là quá trình vật liệu di truyền bị xáo trộn trong quá trình phân bào, tạo ra sự kết hợp mới của các alen. Điều này làm tăng sự biến đổi di truyền và có thể dẫn đến những đặc điểm mới có thể chịu sự chọn lọc tự nhiên [115].

Sự tiến hóa phân tử thường được nghiên cứu bằng cách sử dụng đồng hồ phân tử và cây phát sinh chủng loại. Đồng hồ phân tử ước tính thời gian phân kỳ giữa các loài dựa trên tốc độ thay đổi phân tử. Bằng cách so sánh trình tự di truyền, các nhà khoa học có thể xây dựng cây phát sinh chủng loại mô tả sự tiến hóa và mối quan hệ di truyền giữa các loài. Những công cụ này giúp tìm hiểu lịch sử tiến hóa của sự sống, từ sự khác biệt của các nhóm phân loại đã xác định được sự tiến hóa của các gene và protein cụ thể [51], [76].

Sự tiến hóa phân tử có ý nghĩa sâu sắc trên nhiều lĩnh vực khác nhau: Trong nghiên cứu y học, hiểu được sự tiến hóa phân tử của mầm bệnh có thể giúp ích cho việc phát triển vắc xin và phương pháp điều trị. Ví dụ, việc theo dõi sự tiến hóa của các loại virus như HIV và cúm giúp dự đoán và chống lại các đợt bùng phát [77]. Trong sinh học bảo tồn, tiến hóa phân tử cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự đa dạng di

truyền và lịch sử tiến hóa của các loài có nguy cơ tuyệt chủng, hỗ trợ phát triển các chiến lược bảo tồn [68]. Trong lĩnh vực sinh học phát triển tiến hóa (Evo-Devo), tiến hóa phân tử giúp xem xét mối liên hệ giữa những biến đổi gene và biểu hiện gene trong sự hình thành các đặc điểm hình thái và loài mới [30].

Sự tiến hóa phân tử mở ra cánh cửa nhìn vào các quá trình biến động hình thành nên sự đa dạng di truyền và thúc đẩy sự tiến hóa của sự sống. Bằng cách tích hợp dữ liệu từ các chuỗi phân tử, các nhà sinh học tiến hóa có thể tái tạo lại lịch sử sự sống, làm sáng tỏ các cơ chế biến đổi gene và áp dụng kiến thức này để giải quyết các thách thức trong y học và bảo tồn nguồn gene.

1.2.2. Phân tích tiến hóa phân tử dựa trên hệ gene lục lạp

Hệ gene lục lạp (cpDNA) ở thực vật là nguồn tài nguyên quý để nghiên cứu quá trình tiến hóa phân tử do cấu trúc tương đối được bảo tồn, tính di truyền từ mẹ và vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp [42], [141].

Các khía cạnh chính của phân tích di truyền tiến hóa phân tử dựa trên hệ gene lục lạp bao gồm: (1) Cấu trúc và chức năng của hệ gene lục lạp: Phân tử DNA lục lạp có cấu trúc dạng vòng kép và có kích thước từ 120 đến 160 kb, chứa các gene cần thiết cho quá trình quang hợp và các chức năng khác. (2) Các vùng được bảo tồn và biến đổi: Các phân tích so sánh giữa các vùng được bảo tồn và các vùng biến đổi của hệ gene lục lạp có thể cung cấp những hiểu biết sâu sắc về mối quan hệ tiến hóa. (3) Nghiên cứu phát sinh chủng loại: Hệ gene lục lạp được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát sinh chủng loại để giải quyết các mối quan hệ tiến hóa ở các cấp độ phân loại khác nhau, từ loài đến bậc phân loại cao. (4) Đồng hồ phân tử: Tốc độ đột biến tương đối ổn định trong DNA lục lạp khiến nó phù hợp cho việc phân tích đồng hồ phân tử để ước tính thời gian phân kỳ. (5) Sự sắp xếp lại và tiến hóa hệ gene: Những thay đổi về cấu trúc như đảo ngược, sao chép và mất gene trong hệ gene lục lạp cung cấp thông tin về sự tiến hóa và thích nghi của thực vật. (6) Hệ gene so sánh: So sánh hệ gene lục lạp giữa các loài thực vật khác nhau giúp xác định mô hình tiến hóa, gene được bảo tồn và các yếu tố chức năng [42], [141].

Hiểu được mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật là điều cần thiết để làm sáng tỏ lịch sử tiến hóa, đa dạng sinh học và chiến lược nhân giống cây trồng. Những tiến bộ gần đây về hệ gene lục lạp và tin sinh học đã nâng cao đáng kể khả năng nghiên cứu các mối quan hệ di truyền thông qua các phương pháp khác nhau như: Giải trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp, so sánh hệ gene để xác định các khu vực được bảo tồn và phân kỳ, sử dụng trình tự DNA lục lạp cụ thể để xây dựng cây phát sinh chủng loại giúp nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài.

1.2.2.1. Nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật dựa trên hệ gene lục lạp

Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của bốn loài Bạch đàn *Eucalyptus* thuộc chi L'Hérit (*Myrtaceae*) ở miền Đông Australia cho thấy, có sự khác xa về mối quan hệ di truyền với 12 loài tham chiếu thuộc chi Bạch đàn L'Hérit (*Myrtaceae*) [26].

Gu và cs (2019) đã xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên 42 hệ gene lục lạp hoàn chỉnh từ sáu loài Bàng lã (*Lythraceae*) được giải trình tự trong nghiên cứu, một số loài thuộc bộ Sim (*Myrtales*) và tám loài thuộc bộ Mỏ hạc (*Geraniales*). Nghiên cứu đã cung cấp nguồn dữ liệu quan trọng để làm sáng tỏ sự tiến hóa và mối quan hệ di truyền giữa các loài trong chi Bàng lã và trong bộ Sim (*Myrtales*) [52].

Sau khi giải trình tự, hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *Eurya alata* được so sánh và thiết lập cây phát sinh chủng loại với bảy hệ gene lục lạp của các loài khác trong họ Pentaphylacaceae. Kết quả phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy, *Euryodendron excelsum* là loài có mối quan hệ di truyền gần nhất với loài *E. alata* [152].

Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Panax* và các loài khác trong họ Araliaceae. Kết quả cho thấy, bốn loài *Panax* được nhóm lại trong cùng một nhánh với loài *P. vietnamensis*. Trong đó, loài *P. vietnamensis* có quan hệ gần nhất với loài *P. japonicus*; có quan hệ di truyền gần hơn với loài *P. notoginseng* so với *P. Ginseng* và *P. quonquefolius* [92].

Ngoài ra, một số nghiên cứu khi phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Camellia* cho thấy, loài *C. fluviatilis* có quan hệ họ hàng gần với loài *C. laceoleosa* [156], loài *C. chekiangoleosa* gần nhất với loài *C. japonica* [157].

Hội nghị Thực vật học không biên giới (2008) đã chỉ ra rằng, hệ gene lục lạp chứa nhiều thông tin giống như trình tự mã vạch ty thể ngấn được sử dụng ở động vật. Do đó, hệ gene lục lạp hoàn chỉnh được đề xuất là một siêu mã vạch [37], kết quả nghiên cứu của những công trình trên đã cung cấp thêm các dẫn liệu chứng minh cho đề xuất này. So với mã vạch truyền thống, siêu mã vạch tăng cường khả năng xác định các nhóm có liên quan chặt chẽ, bao gồm phân biệt chính xác các phân loài. Một số nghiên cứu đã đề xuất sử dụng hệ gene lục lạp hoàn chỉnh dưới dạng một mã vạch duy nhất ở thực vật [110]. Phương pháp này được Kane và cs (2012) đề xuất, khi so sánh chín kiểu hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *Theobroma cacao* và một kiểu gene có liên quan đến loài *Theobroma grandiflorum* với các trình tự dữ liệu gene lục lạp trên GenBank [71]. DNA lục lạp hoàn chỉnh hoàn toàn có thể tách biệt tất cả các loài được kiểm tra trong nghiên cứu. Cách tiếp cận này hứa hẹn những ứng dụng hiệu quả mới trong việc xác định ở cấp độ loài và dưới loài. *Fritillaria* là một chi thảo dược phổ biến ở Trung Quốc, đã trải qua một loạt các nghiên cứu trong việc mô tả các loài có quan hệ họ hàng gần bằng cách sử dụng các chỉ thị phổ biến (ITS, *trnL-trnF*...) nhưng không thể phân biệt hoàn toàn [131], [74]. Bi và cs (2018) đã giải quyết được vấn đề này khi sử dụng các hệ gene lục lạp hoàn chỉnh để phân tích sự phát sinh loài của các loài thuộc chi *Fritillaria* [29]. Các nghiên cứu khác cho thấy, thậm chí trong hệ gene lục lạp không có vùng tiềm năng nào nhưng bản thân trình tự toàn bộ hệ gene lục lạp hoàn chỉnh có khả năng phân biệt các mẫu như một mã vạch [37]. Đặc biệt, từ hệ gene lục lạp hoàn chỉnh có thể phát triển các mã vạch riêng lẻ tiềm năng có khả năng biến đổi cao phục vụ cho nghiên cứu.

1.2.2.2. Nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài thực vật dựa trên mã vạch DNA lục lạp

Mã vạch DNA

Theo phương pháp truyền thống, việc phân loại hay giám định sinh vật chủ yếu dựa trên chỉ thị về hình thái hoặc các đặc tính sinh lý, sinh hóa bên trong nhờ vào bảng hướng dẫn định danh có sẵn. Phương pháp phân loại truyền thống này trong nhiều trường hợp còn gặp khó khăn và hạn chế như: nhiều sinh vật có hình thái giống nhau nhưng thực tế lại khác nhau trong hệ thống phân loại (hệ gene rất khác nhau). Ngược lại nhiều sinh vật có hình thái khác nhau nhưng lại rất gần nhau trong hệ thống phân loại (hệ gene giống nhau). Mặt khác, phương pháp phân loại truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái rất khó phân biệt được sự khác biệt giữa các biến dị dưới loài. Đặc biệt, đối với những mẫu vật có nguồn gốc sinh vật đã bị biến đổi về hình thái như: mẫu sinh vật đã chết, bị chôn vùi dưới đất, ở các công trình xây dựng, mẫu vật đã qua chế biến thì không thể xác định được bằng chỉ thị hình thái.

Phân loại học phân tử là phương pháp mới đang được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả trong lĩnh vực phân loại học. Phương pháp này dùng để định danh loài dựa trên các dữ liệu thông tin về hệ gene nhân hoặc ngoài nhân hay các sản phẩm của chúng. Phương pháp phân tử cho độ chính xác cao và đặc biệt hữu dụng với các loài gần gũi, thậm chí giữa các cá thể cùng loài hoặc dưới loài. Do đó, các kỹ thuật sinh học phân tử được xem là công cụ hỗ trợ có hiệu quả cho việc nhận diện loài và xác định mối quan hệ di truyền giữa các cá thể, quần thể hay xuất xứ. Trong đó, mã vạch DNA là chỉ thị phân tử để giám định sinh vật và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài [78].

Năm 2003, Hebert và cs đã đưa ra khái niệm đầu tiên về mã vạch DNA nhằm giúp nhận diện các mẫu vật. Mã vạch DNA là một trình tự DNA ngắn nằm trong hệ gene của sinh vật như một chuỗi kí tự duy nhất giúp phân biệt hai loài sinh vật với nhau. Mã vạch DNA gồm những vùng DNA bảo thủ (ít bị đột biến, ít thay đổi) [56]. Căn cứ vào mức độ thay đổi trong trình tự DNA này có thể xác định được mối quan hệ gần hay xa giữa các đối tượng nghiên cứu.

Một mã vạch DNA lý tưởng dùng để định danh loài cần có những yêu cầu sau: (i) Đoạn DNA phải đủ độ biến thiên để phân biệt giữa các loài nhưng cũng phải không khác nhau quá mức giữa các cá thể trong cùng loài; (ii) Hệ thống định danh bằng DNA phải được chuẩn hóa, với cùng một vùng DNA có thể được sử dụng cho các nhóm phân loại khác nhau; (iii) Đoạn DNA cần chứa đủ thông tin phát sinh loài để có thể dễ dàng định danh loài vào các nhóm phân loại (chi, họ,...); (iv) Có khả năng áp dụng với các mẫu vật thô, với vị trí cặp mỗi nhân gene có độ bảo thủ cao, dễ dàng thực hiện phản ứng khuếch đại và đọc trình tự DNA, điều này đặc biệt quan trọng khi DNA tách chiết từ mẫu phân tích là một hỗn hợp DNA của nhiều loài cần nhận dạng trong cùng một thời điểm; (v) Đoạn DNA cần có chiều dài vừa phải (khoảng 400-800 bp) để có thể được khuếch đại từ DNA khuôn là các DNA bị đứt gãy [78].

Đến nay, các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra, có nhiều đoạn DNA đặc trưng được sử dụng làm DNA mã vạch, các đoạn DNA mã vạch có thể là những đoạn DNA nằm ở trong nhân (gene mã hóa rRNA loại 18S; 5,6S; 26S; 5S và vùng ITS); nằm ở ty thể (gene *Cytb* và vùng kiểm soát (control region)); nằm ở lục lạp (gene *matK*, *rbcL*, *atpβ*, *ndhF*, *rrn16S*, *trnL*) [32], [78].

Nghiên cứu mối quan hệ di truyền và nhận diện loài bằng mã vạch DNA lục lạp

Trong hệ gene lục lạp có rất nhiều gene được sử dụng trong phân tích mối quan hệ di truyền và phân loại thực vật (gene *rrn16S*, *rbcL*, *atpβ*, *ndhF*, *trnL*, *matK*,...) trải rộng từ phân loại cấp bộ cho đến mức loài. Vùng gene *rrn16S* phù hợp để phân loại ở mức độ bộ. Trong khi đó, gene *rbcL*, *atpβ*, *ndhF* phù hợp phân loại ở mức độ bộ đến mức loài. Gene *trnL* và *matK* có thể áp dụng trong một biên độ rộng từ bộ cho đến dưới loài. Trước đây, chúng thường được sử dụng để phân loại từ mức họ cho đến mức loài; hiện nay chúng thường được sử dụng từ mức họ đến mức phụ loài. Vùng *atpβ* - *rbcL* có thể được sử dụng từ mức chi đến mức loài nhưng chúng cũng được sử dụng từ mức chi đến mức phụ loài [32], [78].

Trong hệ gene lục lạp, có bảy vùng DNA được chọn làm ứng cử viên mã vạch DNA cho thực vật trên cạn gồm: gene *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, vùng đệm *psbK*-

psbI, *atpF-atpH* và vùng đệm *trnH-psbA*. Trong đó, có bốn vùng là các phần gene mã hóa (gene *matK*, *rbcL*, *rpoB* và *rpoC1*) và ba vùng đệm không mã hóa protein (*atpF-atpH*, *trnH-psbA* và *psbK-psbI*) [32], [60].

Gene *matK* trở thành gene chỉ thị quan trọng để giúp phân loại hầu hết các loài thực vật trên Trái đất. Gene *matK* có kích thước khoảng 1500 bp, nằm trong hệ gene lục lạp. Gene *matK* mã hóa cho protein maturaseK được phát hiện lần đầu tiên bởi Sugita và cs (1985) trên cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*). Gene *matK* có sự tiến hoá nhanh nhất và có tính đa dạng hơn so với các gene lục lạp khác [57]. Gene *matK* khác nhau giữa những loài thực vật nhưng lại có độ tương đồng cao ở những cây cùng loài [32], [60]. Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng gene *matK* để định danh một số loài như Cỏ biển, Bạch tật lê (*Tribulus terrestris*), *Aerva javanica*, *Haplophyllum robustum*, *Tribulus pentandrus*, *Tamarix aucherana*,... [32], [60]. Ngoài ra, gene *matK* còn được sử dụng làm mã vạch DNA để phân tích sự đa dạng di truyền của cây rau bina (*Spinacia oleracea*) địa phương. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trình tự nucleotide của gene *matK* từ mẫu nghiên cứu có sự tương đồng tối đa (100%) với củ cải đường từ Bồ Đào Nha (mã số trên GenBank là HM850762) [93]. Aristya và cs (2020) đã sử dụng gene *matK* làm mã vạch DNA để nghiên cứu sự phát sinh loài của 24 giống mía Indonesia. Gene *matK* được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu có kích thước 1531 bp. Sau đó, gene *matK* được giải trình tự và so sánh với các trình tự gene *matK* trên cơ sở dữ liệu GenBank. Kết quả cho thấy, các mẫu nghiên cứu có độ tương đồng từ 98,87 - 99,44% so với mẫu *matK* ở loài *Saccharum officinarum*, giống mía lai và loài *Saccharum spontaneum* [24].

Gene *rpoC1* có chiều dài trung bình 520 bp, mã hóa hai trong bốn tiểu đơn vị của enzyme RNA polymerase, đây là enzyme có trách nhiệm trong quá trình tổng hợp RNA từ DNA lục lạp [32], [60], [78]. Manzoor và cs (2022) đã phân tích sự đa dạng di truyền của cây rau bina (*Spinacia oleracea*) địa phương bằng mã vạch DNA là *rpoC1*. Gene *rpoC1* được phân lập từ mẫu rau bina, được giải trình tự và so sánh với các trình tự nucleotide của gene *rpoC1* tương ứng trên GenBank. Kết quả nghiên

cứu cho thấy, trình tự nucleotide của gene *rpoC1* của mẫu nghiên cứu có sự tương đồng với trình tự gene *rpoC1* của rau bina (mã số trên GenBank là AJ400848) và củ cải đường (mã số trên GenBank là EF534108) [93].

Gene *rbcL* mã hóa protein rbcL, protein này cấu tạo nên tiểu đơn vị lớn (tiểu đơn vị oxygenase) của enzyme rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase). Rubisco là enzyme quan trọng nhất trong quá trình quang hợp vì xúc tác cho phản ứng cố định CO₂ để tạo nên các phân tử đường. Gene *rbcL* được sử dụng nhiều để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Tuy nhiên, đối với mối quan hệ di truyền ở mức dưới loài thì sự phân tích gene này gặp nhiều hạn chế [32], [60], [78]. Loera-Sánchez và cs (2020) đã sử dụng gene *rbcL* làm mã vạch DNA để phân biệt các loài cỏ và cây họ đậu. Kết quả cho thấy, mã vạch *rbcL* có khả năng nhận biết 93,3% các cây họ đậu và 46,4% các loài cỏ *Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata*, *Trisetum flavescens* [89]. Nguyen và cs (2023) đã sử dụng một số mã vạch trong đó có *rbcL* để phân biệt hai loài Lan (*Paphiopedilum hangianum* và *Paphiopedilum emersonii*) của Việt Nam [107].

Vùng đệm *trnH-psbA* là khu vực nằm giữa gene *trnH* (gene mã hóa tRNA phụ trách vận chuyển amino acid loại histidine) và gene *psbA* (gene mã hóa cho phần D1 của protein Photosystem II (PSII) trong hệ gene lục lạp, có kích thước xấp xỉ 450 bp. Vùng này thường có mức độ biến đổi nucleotide cao giữa các loài nên được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phân loại và phát sinh loài ở thực vật. Vùng đệm *trnH-psbA* có xác suất nhân bản thành công rất cao (100% với các loài đã được nghiên cứu). Mức độ khác biệt trình tự nucleotide giữa các loài là 1,24% và sự khác biệt bên trong loài rất thấp từ 0,00-0,08% [32], [60], [78]. Vùng đệm *trnH-psbA* đã được sử dụng làm mã vạch DNA với nhiều loài khác nhau thuộc thực vật Hạt trần, dương xỉ, rêu và rêu tản [32], [78]. Nguyen và cs (2023) đã so sánh khả năng phân biệt hai loài *P. hangianum* và *P. emersonii* của bốn trình tự là gene *matK*, *rbcL*, *rpoC1* và *trnH-psbA*. Kết quả cho thấy, trình tự vùng *trnH-psbA* có khả năng phân biệt hai loài nghiên cứu tốt nhất và được đề xuất làm mã vạch DNA để phân biệt hai loài *P. hangianum* và *P. emersonii* ở giai đoạn chưa ra hoa [107]. Nguyễn Thị Hải Yến và cs

(2021) đã sử dụng vùng *trnH-psbA* để nhận dạng Lan hài đuôi công (*Paphiopedilum gratrixianum*) có nguồn gốc tại Lào Cai, Việt Nam. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu *P. gratrixianum* có quan hệ họ hàng gần gũi với loài Lan hài Trần liên của Việt Nam (*P. tranlienianu*, mã GenBank MW794124.1), loài *P. barbigerum* (loài Lan hài được tìm thấy lần đầu ở Trung Quốc, mã GenBank MN153814.1, NC_050870.1) và loài *P. spicerianum* (loài đặc hữu Ấn Độ, mã GenBank NC_502702.1) [17].

Trong hệ gene lục lạp ngoài bảy vùng gene đã được đề xuất thì còn rất nhiều vùng tiềm năng chưa được nghiên cứu. Do đó, việc tìm kiếm các vùng tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA vẫn được nhiều nhà khoa học quan tâm.

Từ kết quả giải trình tự sáu hệ gene lục lạp của sáu loài Bàng lẵng (*Lythraceae*), nghiên cứu đã chọn ra được 10 chỉ thị phân tử tiềm năng (gồm các gene *ndhF*, *matK*, *ycf1*, *rpl22*, *rpl32*, *trnK-rps16*, *trnR-atpA*, *rpl32-trnL*, *trnH-psbA* và *trnG-trnR*) trong 22 loài thuộc chi *Lythraceae* để làm mã vạch DNA nhằm nhận diện các loài thuộc chi *Lythraceae* [52]. Các vùng tiềm năng (gene *trnC-rps16*, *trnS-trnG* và *trnE-trnM*) được đề xuất làm mã vạch DNA để nhận diện và phân loại các loài trong chi *Panax* [92]. Zhou và cs (2018) sau khi giải trình tự hệ gene lục lạp của hai loài *P. rhoeas* và *P. orientale* đã phân tích so sánh với hai loài khác *Papaveraceae* để xác định sự tiến hóa phân tử và xác định mã vạch DNA. Kết quả cho thấy, các vùng *ycf1*, *rpoB-trnC*, *trnD-trnT*, *petA-psbJ*, *psbE-petL* và *ccsA-ndhD* là các vùng siêu biến, có thể được sử dụng làm mã vạch DNA để xác định mối quan hệ di truyền và nghiên cứu sự phát sinh loài của họ *Papaveraceae* [158]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã đề xuất gene *trnL* làm ứng viên mã vạch DNA tiềm năng để nhận diện loài và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài. Huỳnh Thị Thu Huệ và cs (2021) đã sử dụng hai trình tự gene *rbcL* và *trnL* để xác định mối quan hệ di truyền cho bốn mẫu Bách bộ thu tại miền Bắc, Việt Nam. Bước đầu, các kết quả nghiên cứu khoảng cách di truyền và cây phát sinh chủng loại cho thấy, các mẫu Bách bộ có mối quan hệ gần gũi với loài *Stemona tuberosa* Lour. Gene *trnL* có kích thước 1100 bp cho khả năng phân biệt các loài Bách bộ tốt hơn so với vùng gene

rbcL (có kích thước 600 bp) [7]. Gene *trnL* từ loài *Hoya parasitica* đã được phân lập và giải trình tự nucleotide cho kích thước là 829 bp. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên 32 trình tự *trnL* cho thấy, các loài phân bố trong năm nhóm, loài *H. parasitica* phân bố cùng một nhóm và có mối quan hệ di truyền rất gần với loài *H. pubicalyx*. Gene *trnL* được đề xuất là ứng cử viên mã vạch DNA lục lập tiềm năng phục vụ nhận dạng loài *H. parasitica* [130].

Như vậy, trong hệ gene lục lập có khá nhiều gene và vùng đệm được đề xuất và sử dụng làm mã vạch DNA để nhận diện loài, nghiên cứu phát sinh chủng loại và phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài. Tuy nhiên, với mỗi loài, mỗi chi sẽ có những mã vạch phù hợp. Do đó, việc tìm kiếm gene tiềm năng trở thành mã vạch DNA cho đối tượng nghiên cứu của mình là rất cần thiết. Nghiên cứu mã vạch DNA trong chi *Adianandra* vẫn còn khá mới mẻ và đang trong quá trình phát triển. Hiện nay, dữ liệu mã vạch DNA của chi *Adinandra* rất hạn chế, ngoài nghiên cứu đề xuất và sử dụng gene *matK* để nhận diện loài *A. megaphylla* và *A. lienii* thì chưa có nghiên cứu nào đề xuất ứng viên mã vạch mới, mặc dù trong hệ gene lục lập của chi *Adinandra* còn rất nhiều gene tiềm năng [13], [102]. Do đó, trong nghiên cứu này sẽ tìm kiếm các vùng gene tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA và xem xét hệ gene lục lập hoàn chỉnh có phải là siêu mã vạch giúp nhận diện các loài thuộc chi *Adinandra* hay không.

1.3. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Adinandra*

1.3.1. Thành phần hóa học của chi *Adinandra*

Nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Adinandra* đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới và ở Việt Nam thực hiện. Trong các loài thuộc chi *Adinandra* thì loài *A. nitida* được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn cả. Ở Trung Quốc, lá khô của loài *A. nitida* được sử dụng rộng rãi làm trà để uống (trà Shiyacha, Shiya), được sử dụng trong thực phẩm, y học và đã được chứng minh là mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe [34], [39]. Chen và cs (1996) đã phân tích thành phần dinh dưỡng và thành phần dược liệu trong cây trà Shiyacha hoang dã. Kết quả cho thấy các chất dinh dưỡng của Shiyacha rất giàu amino acid, vitamin và khoáng chất. Hàm lượng

flavonoid trong trà Shiyacha là 28,4% và cao hơn so với các loại trà khác [34]. Theo Liu và cs (2010), hàm lượng flavonoid chiếm hơn 45% trong dịch chiết ethanol từ lá của loài *A. nitida* [86]. Chen và cs (2015) đã nghiên cứu về thành phần phenolic của 4 loài thuộc chi *Adinandra* ở Trung Quốc là *A. nitida*, *A. glischroloma* var. *jubata*, *A. millettii* và *A. latifolia*. Hàm lượng các hợp chất phenolic trong loài *A. nitida* cao nhất đạt 140,54 mg/g, tiếp đến là loài *A. millettii* (125,96 mg/g), loài *A. glischroloma* var. *jubata* (84,14 mg/g). Loài *A. latifolia* có hàm lượng phenolic thấp nhất đạt 71,29 mg/g. Tương tự, hàm lượng flavonoid cao nhất ở loài *A. nitida* (88,72 mg/g), tiếp đến là loài *A. glischroloma* var. *jubata* (44,74 mg/g), loài *A. millettii* (43,54mg/g) và thấp nhất là loài *A. latifolia* (19,13 mg/g) [38].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Adinandra* vẫn còn khá hạn chế. Một số tác giả sử dụng phương pháp định tính đã xác định được trong cao chiết của loài *A. megaphylla*, *A. lienii*, *A. bockiana* có chứa một số nhóm hợp chất như polyphenol, flavonoid và coumarin [106], [108], [14]. Nghiên cứu sâu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Adinandra* mới chỉ có một số công bố khoa học thuộc nhóm nghiên cứu của Vũ Thị Kim Oanh. Các nghiên cứu của nhóm tác giả này cho thấy, thành phần hợp chất chính trong các cao chiết thu được từ một số loài *Adinandra* ở Việt Nam chủ yếu thuộc nhóm saponin triterpenoid, flavonoid, triterpenoid, ... [10], [11], [133], [134], [135], [136].

Như vậy, trên thế giới và ở Việt Nam đã có khá nhiều nghiên cứu về thành phần hợp chất có trong các loài thuộc chi *Adinandra*. Đa số các nghiên cứu đều thống nhất, các loài thuộc chi *Adinandra* chứa các nhóm hợp chất chủ yếu như: flavonoid, phenolic, triterpenoid, saponin triterpenoid, aldehyde, coumarin.... Trong đó, flavonoid và triterpenoid là thành phần chủ yếu [84], [85], [86], [138], [153].

Bằng các phương pháp phân lập như: Sắc kí cột (CC), sắc ký bản mỏng (TLC), sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký phân bố ngược dòng tốc độ cao (HSCCC); kết hợp với các phương pháp đo quang phổ như: Khối phổ ion hóa phun điện tử (ESI-MS), phổ tử ngoại – khả kiến (UV/VIS), phổ hồng ngoại (IR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) đã phân lập

và tinh sạch được các hợp chất có trong cao chiết của một số loài thuộc chi *Adinandra* [5], [10], [11], [49], [84], [85], [86], [87], [133], [134], [135], [136], [138], [140], [147], [150], [153], [154].

Tám hợp chất phân lập được từ chi *Adinandra* thuộc nhóm flavonoid gồm Apigenein [84], [85], [87], [138], [150], [153], [154]; camellianin A [49], [84], [85], [86], [87], [138], [149], [150], [153], [154]; quercitrin [138], [154]; epicatechin [5], [153], [154]; rhoifolin [153], [154]; camellianin B [85], [86], [150], [153], [154]; megastigmane [134]; epiafzelechin [5]. Các hợp chất được phân lập chủ yếu từ lá của loài *A. nitida*, riêng epicatechin, epiafzelechin được phân lập từ lá của loài *A. lienii* [5] và megastigmane được phân lập từ lá của loài *A. poilanei* [134] (Hình P1.1 - Phụ lục 1).

Kết quả của các nghiên cứu cho thấy, từ một số loài thuộc chi *Adinandra* đã phân lập được tám hợp chất thuộc nhóm saponin triterpenoid gồm: Kajiichigoside F1 [134], [138], nigaichigoside F2 [138], peduncloside [138], sericoside [140], glucosyl tormentate [140], nigaichigoside F1 [140], arjunglucoside I [140], 2α , 3α , 19α -trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid-28-O- β -D-glucopyranoside [140]. Tất cả các hợp chất này đều được phân lập từ lá của loài *A. nitida* [138], [140], [147], riêng kajiichigoside F1 còn được phân lập từ lá của loài *A. poilanei* [134] (Hình P1.2 - Phụ lục 1).

Từ chi *Adinandra* đã phân lập được 17 hợp chất thuộc nhóm triterpenoid gồm: Uvaol [11]; ursolic acid [5], [11], [134], [135], [136]; 3β -hydroxy-urs-11-en-13 β ,28-olide [11]; betulinic acid [5], [11], [135], [136]; 3β , 20-dihydroxy-28-carbaldehyde [135], [136]; lupeol [10], [133], [135], [136]; betulin [135], [136], [139]; 2β -hydroxypomolic acid [10], [133]; 3β ,30-dihydroxy-18H α -oleane-28 β ,19 β -olide [134], platanic acid [134], arjunetin [140], pomolic acid [134], betulinal [134], [135], [136]; acetyl ursolic acid [135], [136]; massagenic acid I [134], oleanderolide [134], diospyrolide [134] (Hình P1.3 - Phụ lục 1). Hầu hết các hợp chất này đều được phân lập từ các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam như: *A. hainanensis*, *A. poilanei* và *A. lienii* trừ arjunetin được phân lập từ lá của loài *A. nitida* [140].

Bốn hợp chất thuộc nhóm sterol gồm: Stigmas-3-one [135],[136]; sitoindoside I [5], [134]; γ -sitosterol [85], stigmasterol [85] (Hình P1.4 - Phụ lục 1). Trong đó, stigmas-3-one được phân lập từ thân của loài *A. hainanensis*, sitoindoside I từ lá của loài *A. lienii*, *A. poilanei* và γ -sitosterol, stigmasterol từ lá của *A. nitida* [5], [85], [134], [135], [136].

Các hợp chất thuộc nhóm phenolic phân lập được từ chi *Adinandra* gồm: Vanillin [135], [136]; tyrosol [10], [133]; 4-hydroxybenzoic acid [135], [136] (Hình P1.5 - Phụ lục 1). Trong đó, vanillin và 4-hydroxybenzoic acid được phân lập từ thân của loài *A. hainanensis*; tyrosol từ thân của loài *A. poilanei*.

Ngoài ra, từ một số loài thuộc chi *Adinandra* đã phân lập được một số hợp chất thuộc các nhóm khác như: Ent-17-nor-atrisane-16 β -hydroxy-18-oic acid β -D-glucopyranosyl ester (nhóm diterpenoid) [135]; scopoletin (nhóm coumarin) [10], [133], [135], [136]; 3,4-dihydroxybenzaldehyde (nhóm aldehyde) [135], [136]; 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (quinone) [10], [133]; syringersinol (lignan) [134]; γ -tocopherol (tocopherol) [85]; 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (phytol) [85] (Hình P1.6 - Phụ lục 1).

Từ các công trình đã công bố cho thấy, thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Adinandra* khá đa dạng và phong phú, gồm các nhóm hợp chất flavonoid, triterpenoid, saponin triterpenoid, phenolic, coumarin và sterol. Trong đó, các nhóm thường gặp là flavonoid và triterpenoid, với các hợp chất như apigenin, camellianin A, camellianin B, ursolic acid, betulinic acid, lupeol... Những nghiên cứu về thành phần hóa học này đã góp phần tạo cơ sở khoa học lý giải cho việc sử dụng các loài thuộc chi *Adinandra* để chữa bệnh trong y học cổ truyền.

Hiện nay, các nghiên cứu về phân lập các hợp chất mới chỉ được thực hiện ở một số loài như: *A. nitida*, *A. lienii*, *A. poilanei*, *A. hainanensis* trong tổng số 85 loài thuộc chi *Adinandra*. Như vậy, còn rất nhiều loài thuộc chi *Adinandra* khác chưa được làm sáng tỏ về thành phần hóa học. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các hợp chất và tìm kiếm chất mới từ một số loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam.

1.3.2. Hoạt tính sinh học của chi *Adinandra*

1.3.2.1. Hoạt tính sinh học của cao chiết và nhóm hợp chất từ một số loài thuộc chi *Adinandra*

Theo y học cổ truyền, một số loài thuộc chi *Adinandra* được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư vòm họng, đau dạ dày, rắn cắn [3], [6]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh loài *A. nitida* có tác dụng kháng khuẩn, giảm đau, giảm huyết áp, chống oxy hóa và ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư [84], [85], [86], [138], [153]. Các loài khác thuộc chi *Adinandra*, nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư là những hướng nghiên cứu chủ yếu.

Trên thế giới, Liu và cs (2010) đã chứng minh tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết ethanol từ lá của loài *A. nitida*. Kết quả nhận thấy, tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết ethanol là 14,74 mg/mL; hợp chất flavonoid có hoạt tính kém hơn nhiều (khoảng 100 lần) so với dịch chiết ethanol khi sử dụng phương pháp DPPH và Rancimat. Nghiên cứu cũng cho rằng, tác dụng chống oxy hóa của các hợp chất trong lá của loài *A. nitida* có thể phụ thuộc vào các thành phần hóa học khác [86]. Liu và cs (2013) đã chứng minh dịch chiết flavonoid thu được từ lá của loài *A. nitida* là một chất loại bỏ hiệu quả các gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) với IC_{50} là 0,02 mg/mL [81].

Chen và cs (2015) đã nghiên cứu về thành phần phenolic của bốn loài thuộc chi *Adinandra* ở Trung Quốc là *A. nitida*, *A. glischroloma* var. *jubata*, *A. millettii*, *A. latifolia*, đồng thời chỉ ra tác dụng chống oxy hóa và so sánh khả năng chống ung thư của bốn loài này trên các dòng ung thư HepG-2 và MCF-7. Trong đó, tác dụng chống oxy hóa và chống ung thư của loài *A. nitida* và *A. millettii* tốt hơn so với loài *A. jubata* và *A. latifolia*. Dịch chiết của bốn loài nghiên cứu chứa nhóm hợp chất phenolic có khả năng ức chế quá trình nhân lên của tế bào HepG2 với giá trị EC_{50} từ 1,05 - 6,44 mg/mL và tế bào MCF-7 với giá trị EC_{50} đạt từ 2,26 - 8,02 mg/mL (Bảng 1.2) [38].

Bảng 1.2. Tác dụng chống ung thư của dịch chiết chứa nhóm hợp chất phenolic trên hai dòng tế bào HepG2 và MCF-7 [38]

TT	Loài	EC ₅₀ (mg/mL)	
		HepG2	MCF-7
1	<i>A. nitida</i>	1,49 ± 0,023	2,26 ± 0,19
2	<i>A. millettii</i>	1,05 ± 0,089	2,43 ± 0,23
3	<i>A. jubata</i>	1,85 ± 0,056	8,02 ± ,32
4	<i>A. latifolia</i>	6,44 ± 0,460	4,01 ± 0,12

Chen và cs (2017) đã nghiên cứu hoạt động chống oxy hóa và chống tăng sinh tế bào ung thư của dịch truyền trà *A. nitida* trong điều kiện *in vitro* ở đường tiêu hóa. Kết quả cho thấy, trong đường tiêu hóa, dịch truyền trà *A. nitida* thể hiện hoạt động chống tăng sinh mạnh mẽ đối với tế bào Caco-2 (tế bào ung thư ruột kết) và ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu caspase 3/9 (caspase là một enzyme có vai trò tối quan trọng đối với việc chết theo chương trình của tế bào). Cảm ứng chết theo chương trình có thể đóng vai trò là cơ chế cơ bản cho hoạt động chống tăng sinh tế bào khối u. Nghiên cứu cho rằng, dịch truyền trà *A. nitida* có thể hoạt động như một chất chống oxy hóa nội bào tiềm năng và chất ức chế tăng sinh tế bào ung thư ruột kết [39].

Ở Việt Nam, Nguyen và cs (2020, 2021) đã đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của cao chiết ethanol từ lá, thân của loài *A. megaphylla*. Nghiên cứu đã sử dụng ba dòng tế bào ung thư là ung thư phổi (A549), ung thư dạ dày (AGS) và ung thư vú (MDA-MB-231). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết ethanol từ lá có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư A549, AGS và MDA-MB-231 với giá trị EC₅₀ lần lượt là 77,02; 67,76; 84,46 µg/mL [103]. Cao chiết từ thân có khả năng gây độc trên ba dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị EC₅₀ lần lượt là 43,52; 56,24; 58,24 µg/mL [108]. Cao chiết ethanol từ lá của loài *A. bockiana* có khả năng ức chế dòng tế bào A549, AGS và MDA-MB-231 với giá trị IC₅₀ lần lượt đạt 48,73 µg/mL, 58,62 µg/mL và 43,15 µg/mL [14].

Cao chiết ethanol, ethyl acetate và dichloromethane từ lá của loài *A. megaphylla* đã được sử dụng để nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả thu

được, cao ethanol và ethyl acetate có hoạt tính chống gốc tự do DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là 33,2 và 30,3 $\mu\text{g/mL}$. Cao dichloromethane không thể hiện hoạt tính chống gốc tự do với giá trị $EC_{50} > 128 \mu\text{g/mL}$ [103]. Kết quả thu được tương tự khi nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của các cao chiết từ thân của loài *A. megaphylla*. Cao ethyl acetate và ethanol có hoạt tính khử gốc tự do DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là 28,9 và 32,0 $\mu\text{g/mL}$. Trong đó, cao ethyl acetate có hoạt tính mạnh nhất. Ngược lại, cao chiết dichloromethane không thể hiện hoạt tính khử gốc tự do với giá trị EC_{50} lớn hơn 128 $\mu\text{g/mL}$ [108]. Cao chiết ethanol, ethyl acetate và dichloromethane từ lá của loài *A. bockiana* có hoạt tính khử gốc tự do DPPH mạnh với giá trị EC_{50} lần lượt đạt 0,2; 5,7 và 0,47 $\mu\text{g/mL}$ [14].

Nguyen và cs (2020, 2021) đã bước đầu khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết (ethanol, ethyl acetate và dichloromethane) từ lá và thân của loài *A. megaphylla* với các nồng độ 20; 60 và 200 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả ba loại cao chiết từ lá đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Lactobacillus plantarum* và *Escherichia coli* ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$. Đặc biệt, hoạt tính kháng vi khuẩn của cao dichloromethane tốt hơn so với cao ethanol và ethyl acetate [103]. Cả ba loại cao chiết từ thân đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis*, *L. plantarum*, *E. coli* ở ba nồng độ khảo sát và không có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *S. marcescens*. Với vi khuẩn *S. lutea*, cao dichloromethane ở nồng độ 60 và 200 $\mu\text{g/mL}$ mới có khả năng ức chế. Như vậy, khả năng ức chế sự phát triển vi khuẩn của các cao chiết từ thân của loài *A. megaphylla* xếp theo thứ tự giảm dần là cao dichloromethane, ethyl acetate và ethanol [108]. Cả ba loại cao chiết ethanol, ethyl acetate và dichloromethane từ lá của loài *A. bockiana* đã được chứng minh có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis*, *L. plantarum* và *S. marcescens* ở nồng độ 20; 60 và 200 $\mu\text{g/mL}$ [14].

Ngoài các hoạt tính như kháng khuẩn, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư thì các cao chiết và hợp chất trong chi *Adinandra* còn có các hoạt tính sinh học khác như chống dị ứng, ức chế sự tích tụ lipid máu, giảm huyết áp, bảo vệ gan, bảo vệ dạ

dày....[35], [86], [148]. Liu và cs (2010) đã so sánh và đánh giá tác dụng làm giảm huyết áp, ức chế enzyme chuyển angiotensin (ACE) của dịch chiết ethanol và các hợp chất flavonoid từ lá *A. nitida*. Kết quả cho thấy, các hợp chất flavonoid có tác dụng làm giảm huyết áp, ức chế ACE tốt hơn dịch chiết ethanol. Ở nồng độ 500 µg/mL, tác dụng ức chế ACE của dịch chiết ethanol là 29,7%. Hoạt tính ức chế ACE của dịch chiết ethanol phụ thuộc nhiều vào các hợp chất flavonoid [86]. Yuan và cs (2022) đã nghiên cứu tác động của chiết xuất nước trà Shiyacha (EST) trong loét dạ dày cấp tính do HCl và ethanol gây ra ở chuột. Cho chuột mô hình sau khi kích thích bằng HCl/EtOH uống EST liên tục đã giảm đáng kể sự suy giảm tổn thương niêm mạc dạ dày, biểu hiện hạ thấp chỉ số tổn thương mô bệnh học, tổng chỉ số niêm mạc dạ dày, chỉ số stress oxy hóa, Kết quả nghiên cứu cho thấy, EST có tác dụng chống oxy hóa và chống viêm ở chuột bị loét dạ dày. Từ đó, nhóm tác giả đã đề xuất loài *A. nitida* nên được phát triển thành thực phẩm chức năng tự nhiên cho bệnh nhân loét dạ dày cấp tính dựa trên tác dụng bảo vệ dạ dày của EST [148]. Chen và cs (2022) đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của EST ở chuột bị tổn thương gan cấp tính do carbon tetrachloride (CCl₄). Hai nồng độ EST khác nhau đã được cung cấp cho chuột mô hình bằng ống thông trong 3 ngày. Kết quả phân tích các chỉ số gan cho thấy, EST đã làm giảm sự gia tăng chỉ số gan do CCl₄ gây ra điểm tổn thương mô bệnh học gan, alanine aminotransferase (ALT) và aspartate aminotransferase (AST) đều giảm. Kết quả đã chứng minh, EST có khả năng bảo vệ gan khỏi tác động của CCl₄ [35].

Như vậy, các cao chiết và hợp chất có trong các loài thuộc chi *Adinandra* có các hoạt tính như: kháng khuẩn, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư, chống dị ứng, ức chế sự tích tụ lipid máu, giảm huyết áp, bảo vệ gan, bảo vệ dạ dày...Đặc biệt, cao chiết của các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam như *A. bockiana*, *A. megaphylla* đã được nghiên cứu khá kỹ về tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa và gây độc tế bào ung thư.

1.3.2.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ một số loài thuộc chi *Adinandra*

Trên thế giới, những nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ các loài thuộc chi *Adinandra* cũng chủ yếu tập trung vào hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào ung thư. Yuan và cs (2008) đã phân lập camellianin A từ lá của loài *A. nitida* và thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa của camellianin A bằng các phương pháp thử nghiệm khác nhau. Kết quả cho thấy, camellianin A có thể ức chế đáng kể quá trình peroxide hóa lipid trong hệ nhũ tương acid linoleic và loại bỏ gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) với giá trị IC_{50} là 2,37 mg/mL; và ức chế các gốc hydroxyl tùy thuộc vào liều lượng sử dụng [149]. Năm 2010, Liu và cs đã thử tác dụng chống oxy hóa của các hợp chất camellianin A, camellianin B và apigenein phân lập từ lá của loài *A. nitida*. Kết quả cho thấy, tác dụng chống oxy hóa của camellianin A, camellianin B và apigenein với giá trị IC_{50} tương ứng lần lượt là 1,62; 1,8 và 0,95 mg/mL [86].

Yuan và cs (2009) đã nghiên cứu tác dụng ức chế dòng tế bào ung thư biểu mô (A431) ở người của ba chất thuộc nhóm flavone được tách chiết từ lá của loài *A. nitida* bằng phương pháp đánh giá khả năng gây độc và tăng sinh tế bào (xét nghiệm MTT). Kết quả cho thấy, ba chất thuộc nhóm flavone ức chế đáng kể sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô ở người tùy vào nồng độ. Sau 48 giờ điều trị, tác dụng chống lại các tế bào A431 của camellianin A, camellianin B và apigenin với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,09; 12,5 và 21,0 μ M [150]. Ở Trung Quốc, lá của loài *A. nitida* được sử dụng để làm trà uống với tác dụng chống ung thư. Hợp chất chính được xác nhận là camellianin A (chiếm 19,25% bằng phân tích HPLC) có khả năng ức chế dòng tế bào ung thư gan HepG2 (8,7%) và ung thư vú MCF-7 (33,8%) ở nồng độ 200 μ M. Trong nghiên cứu về chu trình tế bào, camellianin A làm tăng mật độ tế bào ở giai đoạn G0/G1. Việc tăng mật độ các tế bào HepG-2 và MCF-7 trong giai đoạn đầu của quá trình chết tế bào đã được phát hiện. Như vậy, camellianin A không chỉ ảnh hưởng đến quá trình nhân lên của tế bào ung thư mà còn thúc đẩy các tế bào đi vào chu trình chết tế bào (apoptosis) [49].

Ngoài các hoạt tính cơ bản như chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư thì các loài *Adinandra* còn thể hiện hoạt tính sinh học khác như: chống dị ứng, ức chế sự tích tụ lipid máu, giảm huyết áp, bảo vệ gan, ức chế α -glucosidase ...[3], [11], [86], [134], [147], [148]. Năm 2019, Yuan và cs đã sử dụng tiền bạch cầu 3T3-L1 như một mô hình để xác định các hợp chất có khả năng giảm lipid máu và chống dị ứng ở trà Shiya. Kết quả thử hoạt tính chống dị ứng cho thấy, chất 2 α , 3 α -dihydroxyursolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester là thành phần chống dị ứng chính với giá trị IC₅₀ là 27,6 μ g/mL. Kết quả nghiên cứu tác dụng ức chế sự tích tụ lipid trong quá trình biệt hóa tế bào mỡ 3T3-L1 cho thấy, các triterpenoid không có nhóm đường làm giảm đáng kể, trong khi flavonoid cũng không có nhóm đường cho thấy hoạt động ức chế tích tụ lipid máu tăng lên rõ rệt [147]. Liu và cs (2010) đã đánh giá tác dụng làm giảm huyết áp, ức chế ACE của các chất camellianin A, camellianin B, apigenein phân lập được từ lá của loài *A. nitida*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nồng độ 500 μ g/mL, tác dụng ức chế ACE của camellianin A, camellianin B và apigenein lần lượt là 30,16; 40,68 và 30,27% [86].

Camellianin A là thành phần flavonoid chủ yếu có trong dịch chiết trà Shiyacha. Yuan và cs (2022) đã nghiên cứu tác động của camellianin A trong bệnh loét dạ dày cấp tính do HCl và ethanol (EtOH) gây ra ở chuột. Sử dụng camellianin A trong hai ngày liên tục cho chuột sau khi kích thích bằng HCl/EtOH đã làm giảm đáng kể sự suy giảm tổn thương niêm mạc dạ dày bằng cách hạ thấp tổng chỉ số niêm mạc dạ dày, chỉ số tổn thương mô bệnh học, stress oxy hóa, biểu hiện của các cytokine gây viêm TNF- α và IL-6, và sự biểu hiện của các chất trung gian gây viêm iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase-enzyme cảm ứng nitric oxide synthase) và COX-2 (Cyclooxygenase-2, một enzyme quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp các prostaglandin). Kết quả phân tích hóa mô miễn dịch và Western Blot cho thấy, camellianin A đã điều chỉnh mức protein đường truyền tín hiệu viêm của I κ B- α và NF- κ B. Từ kết quả nghiên cứu đã xác định rằng, camellianin A có tác dụng chống oxy hóa và chống viêm ở chuột bị loét dạ dày [148]. Chen và cs (2022) đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của camellianin A ở chuột bị tổn thương gan cấp tính do

carbon tetrachloride (CCl₄). Điều trị trong ba ngày với hai nồng độ camellianin A khác nhau đã làm giảm sự gia tăng chỉ số gan do CCl₄ gây ra, điểm tổn thương mô bệnh học gan, alanine aminotransferase (ALT) và aspartate aminotransferase (AST) đều giảm. Đồng thời, nghiên cứu cũng đưa ra bằng chứng cho thấy sự kết hợp dịch chiết trà Shiyacha và camellianin A có thể bảo vệ gan, chống lại tổn thương gan do CCl₄ gây ra bằng cách tăng cường khả năng chống oxy hóa, chống viêm và chết theo chương trình [35].

Ở Việt Nam, Vu và cs (2019, 2022) đã thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên bốn dòng tế bào: ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU) và ung thư vú (MCF-7) bằng phương pháp MTT của các hợp chất phân lập được từ lá và thân của loài *A. hainanensis*. Kết quả cho thấy, betulinic acid có hoạt tính gây độc tế bào khá tốt trên cả bốn dòng tế bào ung thư thử nghiệm; trong khi ursolic acid và triterpene lupan-3 β , 20-dihydroxy-28-carbaldehyde thể hiện tác dụng gây độc tế bào ung thư yếu hơn betulinic acid. Cụ thể, từ thân của loài *A. hainanensis*, hợp chất triterpene lupan-3 β ,20-dihydroxy-28-carbaldehyde có khả năng gây độc yếu trên các dòng tế bào ung thư KB, HepG-2, LU với giá trị IC₅₀ là 76,78 μ g/mL, 79,49 μ g/mL và 85,61 μ g/mL. Scopoletin có khả năng gây độc dòng tế bào HepG2 và MCF-7 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 32,00 μ g/mL, 43,63 μ g/mL và không có hoạt tính gây độc với dòng tế bào KB và LU [11], [135], [136]. Năm 2021, Vu và cs đã thử hoạt tính chống ung thư của một số hợp chất phân lập được từ lá của loài *A. poilanei*. Kết quả cho thấy, pomolic acid cho khả năng gây độc tế bào mạnh đối với bốn dòng tế bào: ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU) và ung thư vú (MCF-7) trong thử nghiệm [134].

Trong cơ thể, màng tế bào ruột non tiết ra α -glucosidase thủy phân các oligosaccharide thành glucose và thẩm thấu vào máu qua màng ruột non để nuôi các tế bào của cơ thể. Khi cơ thể bị rối loạn chuyển hóa carbohydrate, lượng đường trong máu sẽ tăng cao dẫn đến bệnh đái tháo đường. Bằng cách ức chế hoạt động của α -glucosidase có thể làm chậm quá trình thủy phân carbohydrate và làm giảm lượng đường trong máu [44]. Do đó, kiểm soát bệnh đái tháo đường type 2 bằng

việc ức chế α -glucosidase là một trong những liệu pháp đang được sử dụng góp phần ổn định đường huyết sau bữa ăn [45]. Hướng nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có tác dụng ức chế α -glucosidase đang được các nhà khoa học quan tâm. Ở Việt Nam, Vũ Thị Kim Oanh và cs (2019) đã khảo sát tác dụng ức chế α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ một số loài thuộc chi *Adinandra* dựa trên phản ứng phân cắt cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside bởi α -glucosidase, qua đó giải phóng sản phẩm là p-nitrophenol có màu vàng. Kết quả cho thấy, trong các hợp chất phân lập được từ lá của loài *A. hainanensis* thì betulinic acid thể hiện khá tốt khả năng ức chế α -glucosidase. Hợp chất ursolic acid thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase yếu hơn betulinic acid [11]. Vu và cs (2021) đã đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ lá loài của loài *A. poilanei*. Kết quả cho thấy, các hợp chất massagenic acid I, oleanderolide, platanic acid và pomolic acid có khả năng ức chế mạnh hoạt tính của α -glucosidase với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 1,29-3,13 μ g/mL. Các hợp chất diospyrolide, 4,5-dihydroblumenol A, syringersinol và kajiichigoside F1 có khả năng ức chế đáng kể với các giá trị IC_{50} từ 13,01-16,00 μ g/mL [134]. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất thuộc nhóm triterpenoid phân lập được từ thân của loài *A. hainanensis* cho giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 2,27-12,25 μ g/mL, trong đó triterpene lupan-3 β , 20-dihydroxy-28 carbaldehyde có hoạt tính mạnh nhất [135], [136].

Như vậy, các loài thuộc chi *Adinandra* chứa nhiều hợp chất sinh học quan trọng như camellianin A, camellianin B, apigenein, platanic acid, pomolic acid. Các hợp chất này có khả năng chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư, giảm cholesterol, hỗ trợ điều trị tiểu đường, chống dị ứng và nhiều hoạt tính sinh học khác. Việc nghiên cứu và khai thác các hợp chất có thể mang lại nhiều lợi ích cho con người trong việc điều trị và phòng ngừa các bệnh tật. Tuy nhiên, chỉ có một số hợp chất phân lập được từ một số ít loài như: *A. nitida*, *A. hainanensis*, *A. poilanei* (trong số hơn 85 loài *Adinandra*) được thử hoạt tính sinh học. Do đó, các nghiên cứu phân lập, tìm kiếm hợp chất mới và thử hoạt tính sinh học của các hợp chất từ các loài thuộc chi *Adinandra* cần được quan tâm.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Ba loài thuộc chi *Adinandra* được sử dụng gồm loài *A. megaphylla* Hu và *A. bockiana* E. Pritz. ex Diels thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai (Trong đó, loài *A. megaphylla* được thu ở độ cao 1200-1800 m, tọa độ 21°59'15''N; 104°19'28''E; loài *A. bockiana* thu ở độ cao 800 m, tại tọa độ 21°59'15''N; 104°19'28''E). Loài *A. glischroloma* được thu tại xã Y Tý, huyện Bát Xát, tỉnh Lào Cai ở độ cao 1844m, tại tọa độ 103°37'42''Đ, 22°37'35''B. Lá của ba loài được sử dụng để tạo cao chiết, phân lập các hợp chất và thử hoạt tính sinh học của các hợp chất thu được. Ba loài nghiên cứu được định danh dựa trên các đặc điểm thực vật học do PGS.TS. Sỹ Danh Thường thực hiện trong quá trình tiến hành thu mẫu. Tiêu bản mẫu khô của loài *A. megaphylla*, *A. bockiana* và *A. glischroloma* được nhóm nghiên cứu lưu tại phòng Thực vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Hình ảnh của ba loài nghiên cứu được tác giả chụp trong quá trình thu mẫu ngày 22/8/2022 (Phụ lục 2).

2.1.2. Chủng vi khuẩn kiểm định

Các vi khuẩn kiểm định sử dụng trong nghiên cứu để xác định hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất thu được từ các loài thuộc chi *Adinandra* gồm: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC13709), *Streptococcus milleri*. Các chủng vi khuẩn do Bảo tàng chủng giống vi sinh vật; Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên và bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược - Đại học Thái Nguyên phân lập và cung cấp. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy và lưu giữ tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên để tiến hành thử nghiệm. Đây đều là những vi khuẩn gây bệnh ở người, trong đó vi khuẩn *S. aureus* thuộc nhóm Gram (+), các chủng vi khuẩn còn lại thuộc nhóm Gram (-).

2.1.3. Các dòng tế bào thử nghiệm

Các dòng tế bào thử nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu gồm: Tế bào ung thư biểu mô phổi (SK-LU-1), ung thư biểu mô dạ dày (MKN-7), ung thư biểu mô tế bào gan (HepG2) và ung thư vú (MCF-7), dòng tế bào thận phôi người (HEK-293A) làm đối chứng để xác định hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được từ các loài thuộc chi *Adinandra*. Các dòng tế bào này do GS.TS. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island (Mỹ) và GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan (Italia) cung cấp, được lưu giữ tại Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để tiến hành thử nghiệm.

2.1.4. Dữ liệu nghiên cứu

Sử dụng dữ liệu hệ gene lục lạp của một số loài đã được công bố trên GenBank, gồm loài *A. megaphylla* (Mã số MW697901.1) [104], loài *A. millettii* (Mã số MF179492.1) [146], loài *A. angustifolia* (Mã số MF179491.1) [145] để so với hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* về sự đa dạng di truyền hệ gene lục lạp của chi *Adinandra*. Ngoài ra, dữ liệu của các trình tự gene khác được khai thác trên GenBank theo địa chỉ truy cập <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> [160].

2.2. Hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết và được cung cấp bởi các hãng có uy tín trong và ngoài nước được liệt kê ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

TT	Hóa chất	Hãng/Nước sản xuất
1	Cao nấm enzyme, pepton, NaCl, thạch agar, thuốc thử DMSO	Sigma
2	Ethyl acetate, acetone, n-hexane, methanol, H ₂ SO ₄ .	Trung Quốc
3	Silica gel pha thường (230-400 mesh), silica gel pha đảo RP-18 (150 µm), Sephadex LH-20, nhựa trao đổi ion Diaion HP-20	Nhật Bản

4	Ellipticine, sulforhodamine B, trichloroacetic acid, acetic acid, đệm Tris base, đệm phosphate, enzyme α -glucosidase (CAS No 9001-42-7, Sigma), p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (CAS No 3767-28-0, Sigma), 4-Nitrophenol (CAS No 100-02-7, Sigma), dimethyl sulfoxide (CAS No 67-68-5, Sigma).	Mỹ
---	---	----

Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm đều mới, hiện đại và có độ chính xác cao thuộc các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên; Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gene, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hóa sinh biển thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bảng 2.2).

Bảng 2.2. Các thiết bị sử dụng trong thí nghiệm

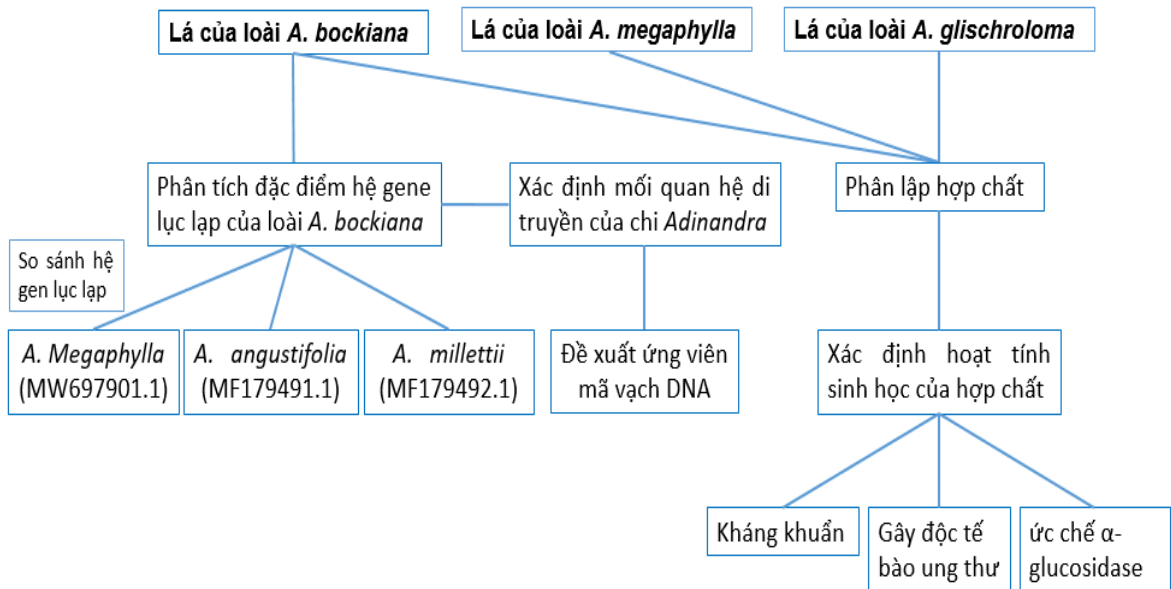
TT	Thiết bị	Nước sản xuất
1	Cân phân tích AB 240, máy chuẩn pH tự động	Thụy Sĩ
2	Tủ ẩm Binder, nồi khử trùng, tủ lạnh	Đức
3	Máy cất nước 1, 2 lần	Anh
4	Tủ cấy vô trùng Holten Safe	Đan Mạch
5	Máy nuôi cấy lắc ổn nhiệt, máy đọc đĩa ELISA 96 giếng (MR-9600), máy quang phổ: Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Bruker AM500 FT-NMR, BIOTEK - USA	Mỹ
6	Pipet, ống eppendorf, ống sinh hàn, phễu chiết, đĩa petri.	Trung Quốc
7	Máy quang phổ UV-1800, máy cất quay chân không, cột sắc ký, bản sắc ký lớp mỏng (bản mỏng DC-Alufolien 60 F ₂₅₄ (0,25 mm, Merck), RP-18 F _{254s} (0,25 mm, Merck), máy đo độ quay cực (JASCO P-2000 Polarimeter)	Nhật Bản

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm - Đại học Thái Nguyên; Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học; Phòng Công nghệ Hóa dược, Viện Hóa sinh biển thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Từ các vật liệu nghiên cứu, đề tài luận án được thực hiện theo sơ đồ thí nghiệm tổng quát hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hệ gene lục lạp

Hệ gene lục lạp của loài *A. angustifolia* (mã số GenBank MF179491) và *A. millettii* (mã số GenBank MF179492) [145], [146] đã được sử dụng để so sánh, đối chiếu với hệ gene lục lạp của loài nghiên cứu về cấu trúc, kích thước, hàm lượng gene và số lần lặp lại. Toàn bộ chuỗi DNA lặp lại của ba hệ gene lục lạp được căn chỉnh với máy chủ MAFFT và được hiển thị trực quan bằng chế độ LAGAN trong mVISTA [94]. Đối với biểu đồ mVISTA, hệ gene lục lạp đã được chú thích của loài *A. megaphylla* (mã số GenBank MW697901.1) được sử dụng làm tài liệu tham khảo. Kính Irscope được sử dụng để hiển thị trực quan và so sánh đường viền của các vùng LSC, SSC và vùng IR giữa ba hệ gene lục lạp nghiên cứu. Sự biến đổi của các codon và sự sai lệch trình tự giữa ba hệ gene lục lạp được xác định thông qua thuật toán phân tích của sổ trượt pi giữa các hệ gene lục lạp trong DnaSP phiên bản 6.12.03 [116]. Đối với phân tích sai lệch trình tự, áp dụng kích thước khoảng hở là 600 bp với kích thước bước nhảy là 200 bp.

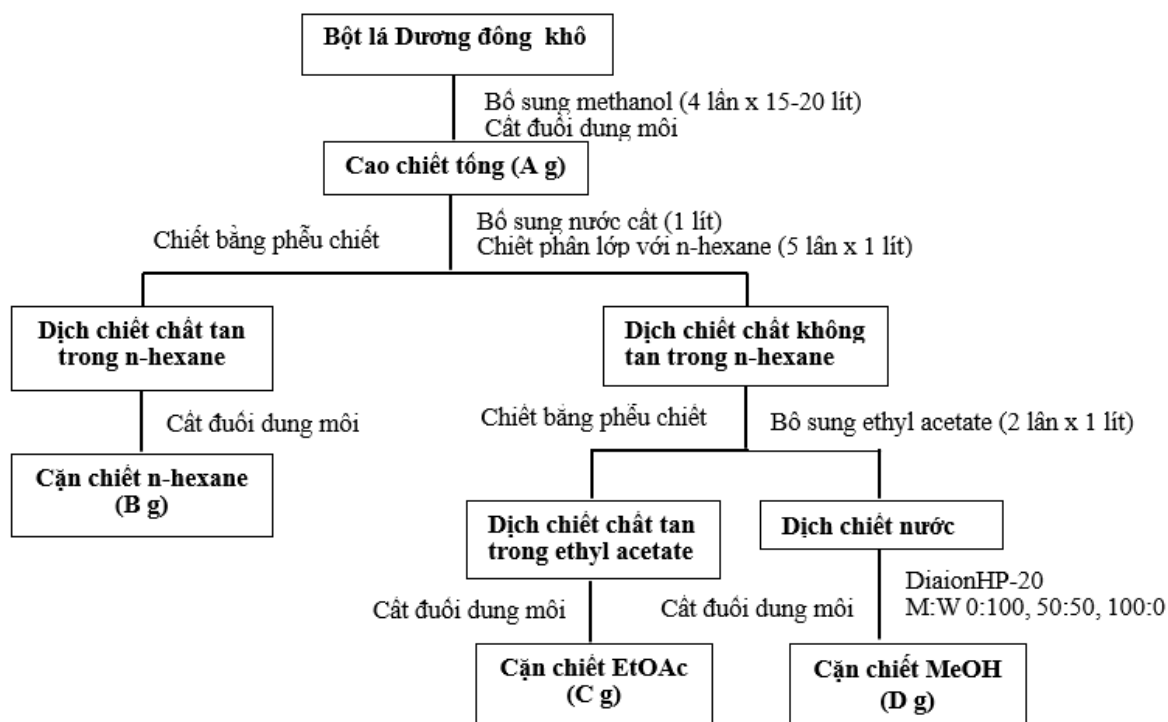
2.3.2. Phương pháp phân tích di truyền tiến hóa phân tử

Trình tự hệ gene lục lập hoàn chỉnh, gene *matK*, *trnL*, *rbcL* trong hệ gene lục lập của các loài thuộc chi *Adinandra* và các loài khác trong họ Pentaphylacaceae từ GenBank đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại giúp xác định vị trí phân loại của loài *A. bockiana* và nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài [160]. Các trình tự này được căn chỉnh với chế độ MUSCLE trong phần mềm Unipro UGENE v36.0 [111]. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide của hệ gene lục lập hoàn chỉnh, gene *matK*, *trnL* và *rbcL* bằng phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap được lặp lại 1000 của phần mềm Mega X [79].

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

2.3.3.1. Nhóm phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

Phương pháp tạo cao chiết tổng/cặn chiết: Lá của ba loài *Adinandra* sau khi thu hái được rửa sạch, thái nhỏ và phơi trong bóng mát hoặc sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50°C và đem nghiền nhỏ thành bột. Bột lá khô mỗi loài (*A. megaphylla* - 3,5 kg; *A. bockiana* - 3,3 kg và *A. glischroloma* - 3,2 kg) được ngâm chiết bằng dung môi methanol (MeOH) 4 lần (15-20 lít/mỗi lần, chiết sau 24 giờ ngâm) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết tổng của 4 lần chiết được gom lại và tiến hành cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ $\leq 50^{\circ}\text{C}$ thu được cao chiết tổng (A g). Cao chiết tổng được tạo huyền phù với 1 lít nước cất, sau đó chiết phân lớp lần lượt với các dung môi n-hexane (5 lần x1 lít) và ethyl acetate (2 lần x 1 lít) thu được dịch chiết n-hexane, dịch chiết ethyl acetate và lớp nước. Dịch chiết n-hexane, ethyl acetate được cất đuổi dung môi thu được cặn chiết n-hexane (B g) và cặn chiết ethyl acetate (C g). Dịch nước được chạy qua cột diaion, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O với độ phân cực lần lượt giảm dần (tỉ lệ 0:100, 50/50, 100:0) để thu được cặn MeOH (D g) (Hình 2.2) [12]. Các cặn chiết được sử dụng để phân lập các hợp chất.



Hình 2.2. Sơ đồ chiết mẫu lá khô của ba loài nghiên cứu

Phương pháp phân lập các hợp chất: Sử dụng các phương pháp sắc ký như:

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để khảo sát hệ dung môi rửa giải trong sắc ký cột, khảo sát sơ bộ tính chất phân cực và số lượng hợp chất có trong cặn chiết, kiểm tra độ tinh khiết của hợp chất. Sắc ký lớp mỏng (pha thường và pha đảo) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (0,25 mm, Merck), RP-18 F_{254s} (0,25 mm, Merck). Dung môi sử dụng cho sắc ký lớp mỏng là hỗn hợp các dung môi thông dụng như n-hexane (H), dichloromethane (D), metanol (M), acetone (A), ethyl acetate (E), H₂O (W).... Các hợp chất được phát hiện bằng đèn UV ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu [12].

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được sử dụng để phân tách các cặn chiết và phân lập các hợp chất. Pha tĩnh sử dụng trong sắc ký cột là các chất hấp phụ, gồm silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (230 - 400 mesh), silica gel pha đảo sử dụng loại RP-18 (150 µm, Fuji Silysia Chemical Ltd.), Sephadex LH-20, nhựa trao

đổi ion Diaion HP-20 (Misubishi Chemical Industries Co., Ltd.).... Pha động là các dung môi thông dụng như n-hexane, dichloromethane, methanol, acetone, ethyl acetate, H₂O... và các hỗn hợp của chúng [12].

Sắc ký khí (GC): Sắc ký khí là phương pháp sắc ký được sử dụng để kiểm tra độ tinh sạch của một chất cụ thể. Ngoài ra, kỹ thuật này dùng để tách và phân tích các hợp chất bay hơi mà không làm phân hủy hoặc thay đổi mẫu. Sắc ký khí có pha động là một hợp chất ở thể khí (heli), pha tĩnh có thể ở thể lỏng là silicone lỏng (GLC) [12].

Các hợp chất được phân lập từ lá của loài *A. megaphylla*, *A. bockiana* và *A. glischroloma* được mô tả theo các sơ đồ hình P3.1.1, hình P3.1.2 và hình P3.1.3 (Phụ lục 3.1).

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của hợp chất: Các hợp chất được xác định cấu trúc hóa học trên cơ sở sử dụng các phép xác định thông số vật lý và các phương pháp đo phổ bằng các thiết bị hiện đại đồng thời kết hợp với phân tích và tra cứu tài liệu tham khảo.

Các phương pháp đo phổ được sử dụng gồm: i) Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS) được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. ii) Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất chuẩn nội là TMS (Tetramethyl Silan). Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT); phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (HSQC, HMBC, COSY và NOESY). Dung môi sử dụng bao gồm DMSO-d₆, CD₃OD, CDCl₃ (việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo và không che khuất các tín hiệu phân tích). iii) Phổ sắc ký khí (GC) được đo trên máy GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Nhật Bản) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Độ quay cực ($[\alpha]_D$): Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3.3.2. Nhóm phương pháp xác định hoạt tính sinh học của các hợp chất

Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng một số loài vi khuẩn kiểm định của hợp chất nghiên cứu được xác định bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch theo nghiên cứu của Mahesh và Satish (2008) [91]. Các loài vi khuẩn kiểm định được hoạt hóa từ 4-8 giờ trong môi trường LB lỏng ở 28°C, lắc 200 vòng/phút trước khi tiến hành thử nghiệm. Hút 70 μ L dịch nuôi mỗi loài vi khuẩn kiểm định đã được hoạt hóa lên đĩa môi trường LB đặc và dùng que chang trải đều dịch khuẩn trên mặt thạch cho đến khi khô. Dùng khoan nút chai tạo năm giếng có đường kính 1 cm trên đĩa thạch. Sau đó, hút 100 μ L mẫu nghiên cứu (hợp chất) ở các nồng độ 100; 200 và 400 μ g/mL (mẫu được pha trong DMSO 1%), penicillin nồng độ 200 μ g/mL (đối chứng dương) và DMSO 1% (đối chứng âm) vào các giếng thạch. Đặt các đĩa petri đã bổ sung mẫu nghiên cứu vào tủ lạnh 4°C khoảng 1-2 giờ rồi đặt vào tủ ấm nuôi ở 28°C từ 18-24 giờ. Đo đường kính vòng kháng khuẩn, chụp hình và ghi lại kết quả. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Đường kính vùng ức chế được xác định theo công thức: $H = D - d$ (mm).

Trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d là đường kính giếng thạch (mm). Quy ước: $H \geq 25$ mm: Có hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh. $H \geq 20$ mm: Có hoạt tính kháng khuẩn mạnh. $H \geq 15$ mm: Có hoạt tính kháng khuẩn trung bình. $H \leq 15$ mm: Có hoạt tính kháng khuẩn yếu [91].

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* được xác định theo phương pháp của Skehan và cs (1990) [121]. Mẫu nghiên cứu (hợp chất) được chuẩn bị ở bốn nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 mg/mL. Chất tham khảo ellipticine ở các nồng độ 10; 2; 0,4 và 0,08 μ g/mL được sử dụng như là chất đối chứng dương. Dimethyl sulfoxide (DMSO) ở nồng độ 1% được sử dụng như là chất đối chứng âm. Hàm lượng protein tổng số của tế bào được xác định dựa vào mật độ quang học

(OD) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein. Giá trị OD càng lớn thì hàm lượng tế bào càng nhiều (hàm lượng protein càng nhiều).

Phép thử được lặp lại ba lần và được thực hiện như sau: Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào 96 giếng của đĩa. Giếng không có chất thử nhưng có 190 μL tế bào ung thư (TBUT) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau một giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng trichloroacetic acid (TCA) 20%. Sau 72 giờ ủ trong tủ ẩm tế bào được cố định bằng TCA trong một giờ và nhuộm tế bào bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa ba lần bằng acetic acid và để khô ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 10 mM đệm Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).

Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau: % ức chế = $100\% - [(OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày } 0)) / (OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày } 0))]$

Khả năng gây độc tế bào được xác định bằng nồng độ của chất mà ức chế 50% sự phát triển của tế bào (IC_{50}). Phần mềm TableCurve 2Dv4 được sử dụng để xác định giá trị IC_{50} . Chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$ [63].

Phương pháp thử hoạt tính ức chế α -glucosidase

Nguyên lý: Trong cơ thể, α -glucosidase là enzyme cắt liên kết α -1,4 glycoside trong các oligosaccharide để tạo thành các gốc glucose. Trong thử nghiệm, cơ chất được sử dụng là *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, chất này khi bị α -glucosidase thủy phân sẽ sinh ra *p*-nitrophenyl có màu vàng và hấp thu bước sóng 405 nm. Hoạt tính của α -glucosidase sẽ bị ức chế một phần, do đó lượng *p*-nitrophenyl sinh ra sẽ ít hơn so với khi không có mặt acarbose.

Cách tiến hành: Hút vào mỗi giếng của khay 96 giếng 10 μL dung dịch mẫu được chuẩn bị trong DMSO và 40 μL đệm 0,1 M phosphate pH 6,9 (mẫu đối chứng

âm được thay bằng đệm 0,1 M phosphate pH 6,9; đối chứng dương là acarbose) lắc đều trong 15 phút. Bổ sung 100 μ L α -glucosidase 1 U/mL được pha trong đệm 0,1 M phosphate pH 6,9 và lắc đều. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 30°C trong 10 phút, lắc 300 vòng/phút; sau đó thêm 50 μ L dung dịch 5 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside pha trong dung dịch 0,1 M phosphate pH 6,9 và lắc đều hỗn hợp sau đó ủ ở 30°C trong năm phút. Tiến hành đo khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 405 nm của mẫu trước và sau khi ủ cơ chất. Giá trị Δ là giá trị trung bình độ chênh lệch OD trước và sau khi ủ năm phút. Hoạt tính của enzyme α -glucosidase được xác định bằng cách đo p-nitrophenol được giải phóng từ pNPG. Acarbose được sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm mẫu thử được thay bằng đệm phản ứng [128].

Phần trăm ức chế α -glucosidase của mẫu thử được xác định bằng công thức:

$$\% \text{ ức chế} = [\Delta_{(\text{đối chứng})} - \Delta_{(\text{mẫu thử})}] / \Delta_{(\text{đối chứng})} \times 100\%$$

Trong đó: $\Delta_{(\text{đối chứng})}$ là sự thay đổi giá trị OD trước và sau khi ủ của mẫu đối chứng; $\Delta_{(\text{mẫu thử})}$ là sự thay đổi giá trị OD trước và sau khi ủ các mẫu thí nghiệm.

Khả năng ức chế α -glucosidase được xác định qua giá trị IC_{50} , được tính bằng phần mềm Tablecurve.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu và phân tích kết quả

Sử dụng phần mềm phân tích thống kê SPSS và các phần mềm tin sinh học: BioEdit, BLAST trong NCBI để phân tích hệ gene [53], [69], [79], [160].

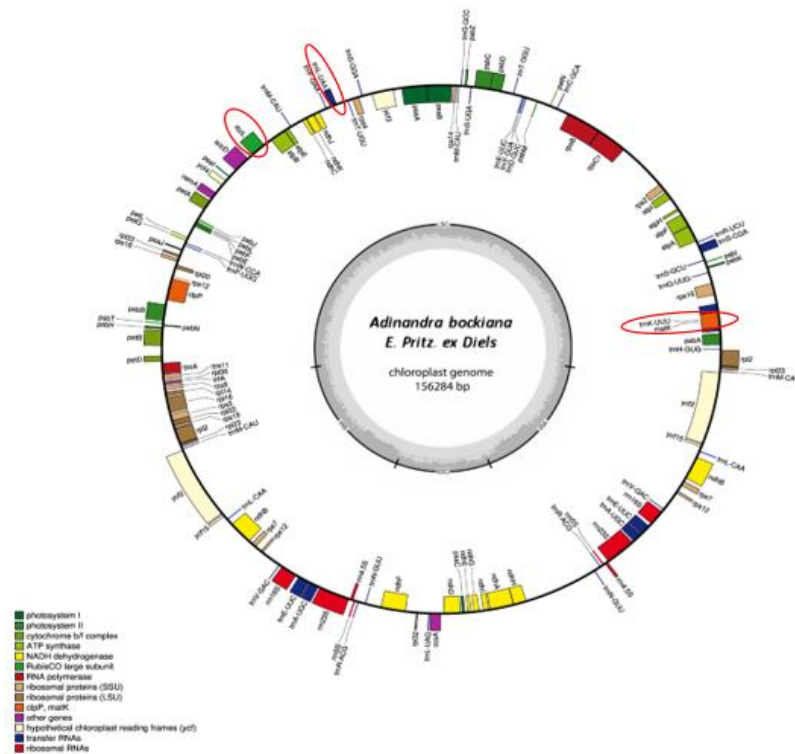
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hệ gene lục lập của loài *A. bockiana*

Từ trình tự hệ gene lục lập của loài *A. bockiana* được lưu trữ trên GenBank với mã số MW699853.1 [105], tiến hành nghiên cứu đặc điểm và chú thích hệ gene của loài *A. bockiana*, đánh giá đa dạng di truyền của hệ gene lục lập và phân tích mối quan hệ di truyền của một số loài thuộc chi *Adinandra*. Từ đó, tìm kiếm gene tiềm năng để đề xuất làm mã vạch DNA lục lập giúp nhận diện loài và phân tích mối quan hệ di truyền của chi *Adinandra*.

3.1.1. Cấu trúc và thành phần hệ gene lục lập của loài *A. bockiana*

Hệ gene lục lập hoàn chỉnh của loài *A. bockiana* có kích thước 156284 bp, có cấu trúc bốn vùng điển hình, gồm vùng sao chép đơn lớn (LSC) có kích thước 85693 bp, vùng sao chép đơn nhỏ (SSC) 18411 bp và cặp vùng lặp lại đảo được (IR) 26090 bp, hàm lượng GC chiếm 37,4% (Hình 3.1). Hệ gene lục lập của loài *A. bockiana* có nhiều điểm tương đồng với hệ gene lục lập của các loài thuộc chi *Adinandra* [104], [145], [146] và một số loài thực vật có hoa khác [40], [83], [124].



Hình 3.1. Bản đồ hệ gene lục lập của loài *A. bockiana*

Chú thích: Các gene bên trong vòng tròn được phiên mã theo chiều kim đồng hồ, các gene bên ngoài được phiên mã ngược chiều kim đồng hồ. Vòng tròn bên trong màu xám nhạt tương ứng hàm lượng AT, màu xám đậm tương ứng với hàm lượng GC. Các vị trí khoanh đỏ trên bản đồ là các gene *matK*, *trnL* và *rbcL*. Trình tự hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* ở Việt Nam được chú thích và đã được đăng ký trên Ngân hàng gene (GenBank) với mã số MW699853.1.

Phân tích hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* cho thấy, có 129 gene bao gồm 84 gene mã hóa protein (PCG), 37 gene mã hóa tRNA và 8 gene mã hóa rRNA. Căn cứ vào chức năng, 129 gene được phân chia trong 18 nhóm gồm: Các gene liên quan đến quang hợp (6 nhóm), các gene phiên mã và dịch mã (6 nhóm), các gene thực hiện chức năng khác (5 nhóm) và nhóm gene mã hóa khung đọc mở được bảo tồn. Xét về chức năng, 45 gene liên quan đến quang hợp; 73 gene liên quan đến quá trình phiên mã và dịch mã, 11 gene còn lại thực hiện các chức năng khác như mã hóa Acetyl-CoA-carboxylase, tổng hợp cytochrome loại c, chuyển hóa cacbon, phân giải protein, khung đọc mở.... Hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* có 20 gene chứa từ một đến hai *intron*, trong đó 18 gene có một *intron* (*atpF*, *ndhA*, *ndhB* (x2), *petB*, *rpl16*, *rpl2* (x2), *rpoC1*, *rps16*, *trnA-UGC* (x2), *trnC-ACA*, *trnE-UUC* (x2), *trnK-UUU*, *trnL-UAA*, *trnS-CGA*); 2 gene chứa hai *intron* (*clpP*, *ycf3*). Trong vùng IR có 17 gene có hai bản sao được chú thích gồm: 4 gene mã hóa rRNA (*rrn16S*; *rrn23S*; *rrn4,5S*; *rrn5S*), 7 gene mã hóa tRNA (*trnA-UGC*, *trnE-UUC*, *trnL-CAA*, *trnN-GUU*, *trnR-ACG*, *trnV-GAC*), 3 gene mã hóa protein ribosome (*rpl2*, *rpl23*, *rps7*), 1 gene mã hóa protein NADH-dehydrogenase (*ndhB*) và 2 gene thuộc vùng bảo tồn khung đọc mở (*ycf2*, *ycf15*) (Bảng 3.1). Vùng SSC chứa 11 gene, trong đó có 7 gene mã hóa NADH-dehydrogenase (*ndhA*, *ndhD*, *ndhE*, *ndhF*, *ndhG*, *ndhH*, *ndhI*) và 4 gene khác (*rpl32*, *trnL-UAG*, *ccsA*, *psaC*) (Hình 3.1). Vùng LSC có kích thước lớn chứa 84 gene còn lại.

Bảng 3.1. Các nhóm gene trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*

Gene chức năng	Nhóm các gene	Tên các gene
Quang hợp	Gene mã hóa ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF^a, atpH, atpI</i>
	Gene mã hóa NADH-dehydrogenase	<i>ndhA^a, ndhB (x2)^a, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	Gene mã hóa phức hợp cytochrome b/f	<i>petL, petB^a, petG, petA, petD, petN</i>
	Gene mã hóa của hệ quang hóa I	<i>psaJ, psaC, psaA, psaI, psaB</i>
	Gene mã hóa của hệ quang hóa II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	Gene mã hóa rubisco	<i>rbcL</i>
Phiên mã và dịch mã	Gene mã hóa protein tiểu phần lớn ribosome	<i>rpl14, rpl16^a, rpl2 (x2)^a, rpl20, rpl22, rpl23 (x2), rpl32, rpl33, rpl36</i>
	RNA polymerase phụ thuộc DNA	<i>rpoB, rpoA, rpoC1^a</i>
	Gene mã hóa protein tiểu phần nhỏ ribosome	<i>rps11, rps12, rps14, rps15, rps16^a, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7 (x2), rps8</i>
	Gene mã hóa rRNA	<i>rrn23S (x2), rrn16S (x2), rrn5S (x2), rrn4.5S (x2)</i>
	Gene mã hóa tRNA	<i>trnA-UGC (x2)^a, trnC-ACA^a, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC (x2)^a, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnH-GUG, trnK-UUU^a, trnL-CAA (x2), trnL-UAA^a, trnL-UAG, trnM-CAU (x4), trnN-GUU (x2), trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG (x2),</i>

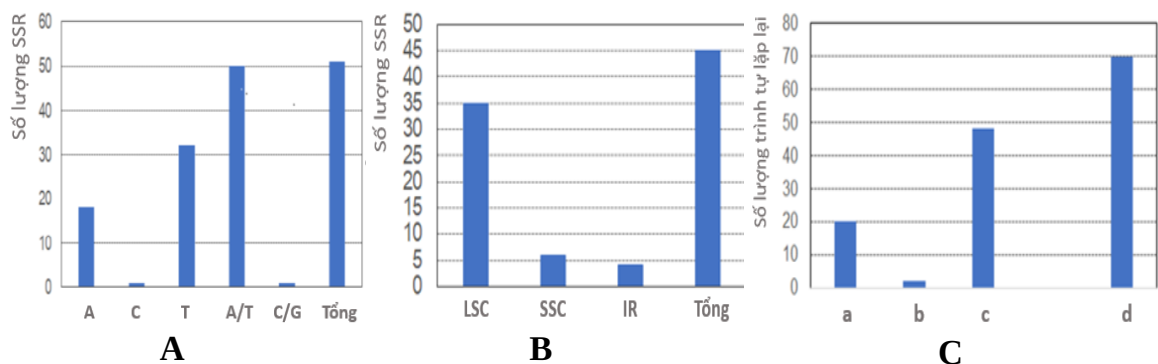
Gene chức năng	Nhóm các gene	Tên các gene
		<i>trnR-UCU</i> , <i>trnS-CGA^a</i> , <i>trnS-GCU</i> , <i>trnS-GGA</i> , <i>trnS-UGA</i> , <i>trnT-GGU</i> , <i>trnT-UGU</i> , <i>trnV-GAC</i> (x2), <i>trnW-CCA</i> , <i>trnY-GUA</i>
	Nhân tố khởi đầu phiên mã	<i>infA</i>
Các gene khác	Gene mã hóa Acetyl-CoA-carboxylase	<i>accD</i>
	Gene tổng hợp cytochrome c	<i>ccsA</i>
	Protein xuyên màng (vận chuyển đối cang K^+/H^+)	<i>cemA</i>
	Protease	<i>clpP^b</i>
	Gene mã hóa Maturase K	<i>matK</i>
Vùng bảo tồn khung đọc mở		<i>ycf2</i> (x2), <i>ycf3^b</i> , <i>ycf4</i> , <i>ycf15</i> (x2)

Ghi chú: (a) gene chứa một intron; (b) là gene chứa hai intron; (x2), (x3), (x4) là số bản copy của gene

3.1.2. Bộ dữ liệu về trình tự lặp lại ở loài *A. bockiana*

Tổng số chuỗi lặp đơn giản (SSR) trong hệ gene lục lạp là 51; với kiểu lặp lại đơn bao gồm A (18 SSR), T (32 SSR), G hoặc C (1 SSR) có độ dài từ 10-19 bp. Các SSR với kiểu lặp lại di-, tri-, tetra-, pentan- và hexa- nucleotide không được tìm thấy ở loài *A. bockiana*. Phần lớn các SSR nằm ở vùng LSC (35), số lượng SSR ở vùng SSC và IR rất ít với 6 và 4 SSR tương ứng ở mỗi vùng. Hệ gene lục lạp được xác định với 70 trình tự lặp, gồm 48 trình tự lặp giống nhau, 20 trình tự lặp xuôi và hai trình tự lặp đảo ngược và không có sự lặp lại bổ sung. Kích thước nhỏ nhất của trình tự lặp lại là 22 bp, kích thước lặp lại lớn nhất là 56 bp. Hầu hết kích thước của trình tự lặp lại (66%) cao hơn 30 bp (Hình 3.2).

Khi phân tích hệ gene lục lập của các loài thuộc chi *Adinandra* và thực vật có hoa cho thấy cấu trúc bốn vùng điển hình và kích thước hệ gene trung bình khoảng 15,6 kb. Trong các nghiên cứu trước đó, hệ gene lục lập của các loài có hoa chứa 129 gene với 18 gene chứa *intron* và chứng minh sự bảo tồn cao về hàm lượng gene [66], [113]. Hệ gene lục lập của loài *A. bockiana* tương tự cũng chứa 129 gene, trong đó có 20 gene chứa *intron*. Hệ gene lục lập của cả bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* đều chứa 70 trình tự lặp lại ở cả vùng mã hóa và không mã hóa [102], [146], [145]. Số lượng trình tự lặp lại cao hơn đáng kể so với các trình tự lặp lại ở các loài khác (từ 32-49 trình tự lặp lại ở chi *Curcuma*; 49 trình tự lặp ở loài *Hibiscus syriacus* và 42 trình tự lặp ở loài *S. adstringens*) [40], [83], [124]. Ở một số đơn vị phân loại thực vật hạt kín, các lần lặp lại có liên quan đặc biệt đến quá trình tái tạo hệ gene lục lập và có thể được coi là dấu hiệu của sự tái tổ hợp [67]. Do có khả năng tạo ra các cấu trúc thứ cấp, các tín hiệu nhận biết trong quá trình tái tổ hợp có thể được xác định bằng các chuỗi lặp lại [72]. Do tính di truyền đơn nguồn của cha hoặc mẹ chiếm ưu thế nên tái tổ hợp được cho là hiếm khi xảy ra. Ở thực vật hạt kín, sự tái tổ hợp tương đồng ở cấp độ phân tử đã được xác định trong một số trường hợp [96], [126]. Cho đến nay, tái tổ hợp hệ gene lục lập trong các nhóm thực vật không được chú ý nhiều. Trong họ Pentaphylacaceae, hiện tượng tái tổ hợp hệ gene lục lập không được tìm thấy.



Hình 3.2. Dữ liệu về trình tự lặp lại trong hệ gene lục lập của loài *A. bockiana*

Chú thích: A: Số kiểu của chuỗi lặp lại đơn giản (SSR); B: Tần suất của chuỗi lặp lại đơn giản SSR trong các vùng LSC, SSC và IR; C: Trình tự lặp lại (Trong đó: a, b, c, d là trình tự lặp lại lần lượt: xuôi, ngược, giống nhau và bổ sung)

3.1.3. Số lượng và tần suất sử dụng codon của gene mã hóa protein trong hệ gene lục lạp ở loài *A. bockiana*

Trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*, tại vùng mã hóa đã tìm thấy 52057 codon của các gene mã hóa protein (Bảng 3.2). Trong 64 loại codon mã hóa cho protein thì có 61 loại codon mã hóa cho amino acid và 3 codon làm nhiệm vụ kết thúc quá trình dịch mã. Số codon có tận cùng là A và U được tìm thấy thường xuyên hơn so với G và C (cụ thể, số codon có nucleotide cuối là A, U, G, C lần lượt là 16125; 16131; 9722 và 10079). Số codon mã hóa cho leucine nhiều nhất (5338, chiếm 10,25%), tiếp đến là serine (5067, chiếm 9,73%) và ít nhất là tryptophan (693, chiếm khoảng 1,33%). Trong 64 loại codon, có 30 loại codon được sử dụng thường xuyên so với mức dự kiến ở trạng thái cân bằng (giá trị RCSU > 1) và 29 loại codon có mức độ sử dụng ít (giá trị RCSU < 1). Tần suất sử dụng của các codon mở đầu AUG (mã hóa methionine) và UGG (mã hóa tryptophan) không có độ lệch (RCSU = 1) so với mức sử dụng codon dự kiến ở trạng thái cân bằng. Các codon kết thúc bao gồm UAA, UGA, UAG (Bảng 3.2).

Kết quả phân tích đặc điểm hệ gene cùng với tần suất sử dụng codon đã cho thấy khả năng bảo tồn cao, có ý nghĩa lớn trong các nghiên cứu phát sinh chủng loại và di truyền quần thể. Điều này khẳng định lại tính chất, hệ gene lục lạp của thực vật có hoa có cấu trúc và hàm lượng gene được bảo tồn cao [42], [113].

Bảng 3.2. Số lượng và tần suất sử dụng codon của các gene mã hóa protein ở loài *A. bockiana*

TT	Codon	AA	ObsFreq	RCSU	STT	Codon	AA	ObsFreq	RCSU	STT	Codon	AA	ObsFreq	RCSU
1	UAA	*	1153	1,17	23	AUC	I	1090	0,76	45	CGG	R	386	0,7
2	UGA	*	1037	1,05	24	AUA	I	1453	1,02	46	AGA	R	1129	2,04
3	UAG	*	774	0,78	25	AAA	K	2092	1,33	47	AGG	R	611	1,1
4	GCU	A	431	1,28	26	AAG	K	1062	0,67	48	UCU	S	1241	1,47
5	GCC	A	330	0,98	27	UUA	L	1116	1,25	49	UCC	S	956	1,13
6	GCA	A	380	1,13	28	UUG	L	1116	1,25	50	UCA	S	1034	1,22
7	GCG	A	207	0,61	29	CUU	L	1063	1,19	51	UCG	S	616	0,73
8	UGU	C	711	1,23	30	CUC	L	682	0,77	52	AGU	S	693	0,82
9	UGC	C	445	0,77	31	CUA	L	870	0,98	53	AGC	S	527	0,62
10	GAU	D	1088	1,41	32	CUG	L	491	0,55	54	ACU	T	645	1,15
11	GAC	D	453	0,59	33	AUG	M	911	1	55	ACC	T	576	1,03
12	GAA	E	1351	1,38	34	AAU	N	1750	1,38	56	ACA	T	644	1,15
13	GAG	E	612	0,62	35	AAC	N	790	0,62	57	ACG	T	378	0,67
14	UUU	F	2209	1,18	36	CCU	P	615	1,04	58	GUU	V	757	1,33
15	UUC	F	1537	0,82	37	CCC	P	598	1,01	59	GUC	V	414	0,73
16	GGU	G	509	0,93	38	CCA	P	736	1,25	60	GUA	V	680	1,2
17	GGC	G	352	0,65	39	CCG	P	411	0,7	61	GUG	V	423	0,74
18	GGA	G	782	1,43	40	CAA	Q	1074	1,37	62	UGG	W	693	1
19	GGG	G	539	0,99	41	CAG	Q	492	0,63	63	UAU	Y	1399	1,35
20	CAU	H	928	1,39	41	CGU	R	358	0,65	64	UAC	Y	679	0,65
21	CAC	H	410	0,61	43	CGC	R	240	0,43					
22	AUU	I	1734	1,22	44	CGA	R	594	1,07					

Chú thích: * codon kết thúc; AA: amino acid; ObsFreq: Số lượng codon; RCSU: Mức sử dụng codon tương đối.

3.1.4. So sánh hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* với loài *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*

Hệ gene lục lạp có tính bảo tồn cao, tuy nhiên trong đó cũng có những vùng dễ bị biến đổi. Sự biến đổi trình tự nucleotide ở các vùng khác nhau trong mỗi loài và giữa các loài. Chính sự biến đổi này tạo nên sự đa dạng di truyền của hệ gene lục lạp.

3.1.4.1. Sự đa dạng về kích thước và số lượng gene trong hệ gene lục lạp

So sánh hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *A. bockiana* (Mã số MW699853.1) [105] với các loài *A. megaphylla* (mã số MW697901.1) [104], *A. angustifolia* (mã số MF179491.1) [145] và *A. millettii* (mã số MF179492.1) [146] cho thấy, hệ gene lục lạp của các loài có sự đa dạng về kích thước và khối lượng của hệ gene, kích thước của từng vùng, số lượng gene (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Sự đa dạng về kích thước và số lượng gene trong hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Adinandra*

TT	Đặc điểm hệ gene	Tên loài			
		<i>A. bockiana</i>	<i>A. megaphylla</i>	<i>A. millettii</i>	<i>A. angustifolia</i>
1	Kích thước hệ gene (bp)	156284	156298	156311	156344
2	Kích thước LSC (bp)	85693	85688	85698	85743
3	Kích thước SSC (bp)	18411	18424	18421	18419
4	Kích thước IR (bp)	26090	26093	26096	26091
5	Hàm lượng GC (%)	37,4	37,4	37,4	37,4
6	Số lượng gene	129	131	132	132
7	Số lượng PCG	84	86	87	87
8	Số lượng tRNA	37	37	37	37
9	Số lượng rRNA	8	8	8	8

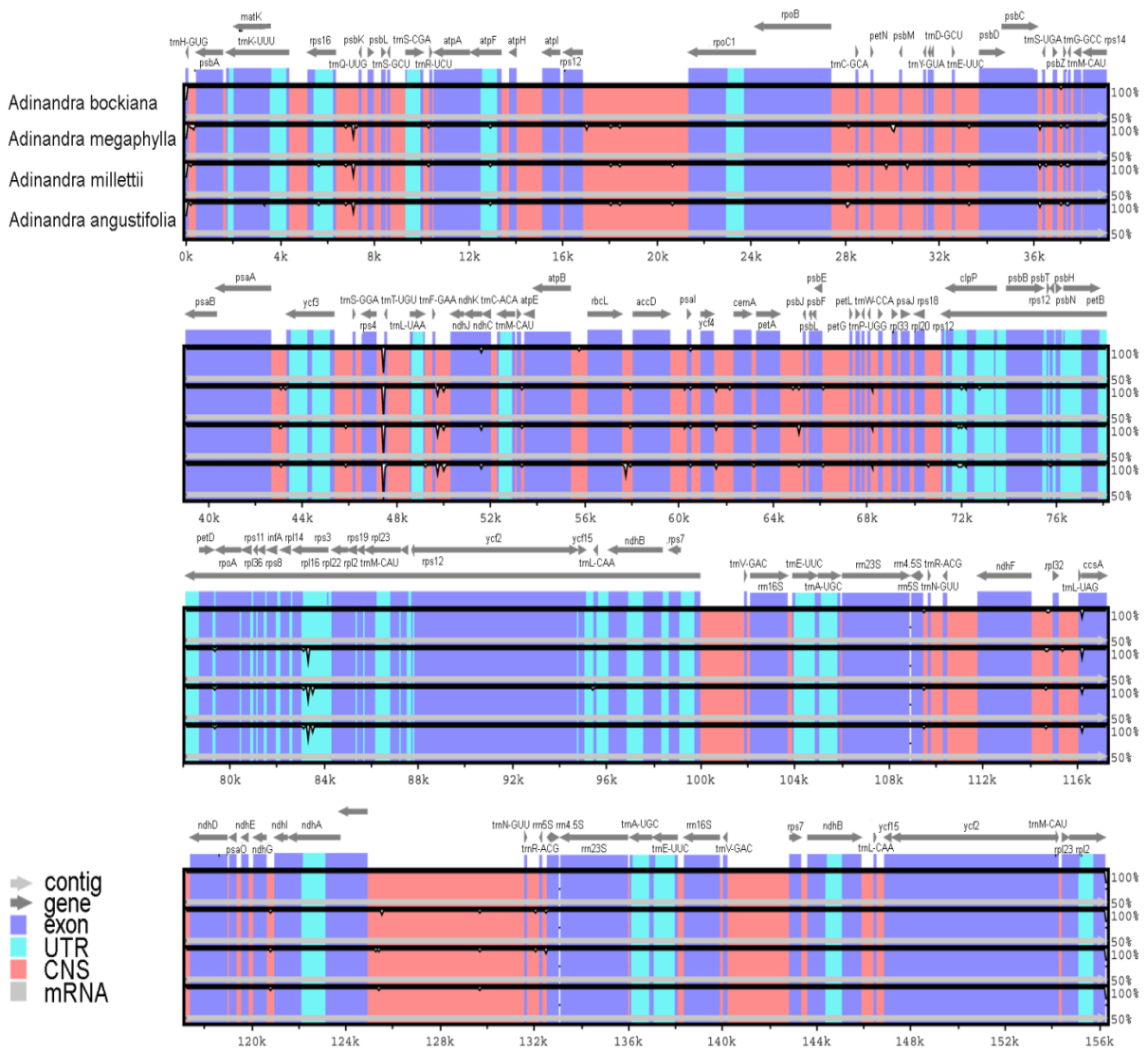
Bảng 3.3 cho thấy, kích thước hệ gene lục lạp của bốn loài dao động từ 156284 bp đến 156344 bp, kích thước vùng LSC từ 85688-85743 bp, vùng SSC từ 18411-18424 bp, vùng IR từ 26090-26096 bp. Số lượng gene trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* lần lượt là 129; 131; 132 và 132. Trong đó, hệ gene lục lạp của các loài này khác nhau về số lượng gene mã hóa

protein, cụ thể: ở loài *A. bockiana* số gene mã hóa protein là 84, loài *A. megaphylla* là 86, loài *A. millettii* và loài *A. angustifolia* là 87. Các gene mã hóa tRNA và rRNA được bảo tồn ở các loài với số lượng lần lượt 37 và 8. Hàm lượng GC của các loài được bảo tồn trung bình 37,4 (%).

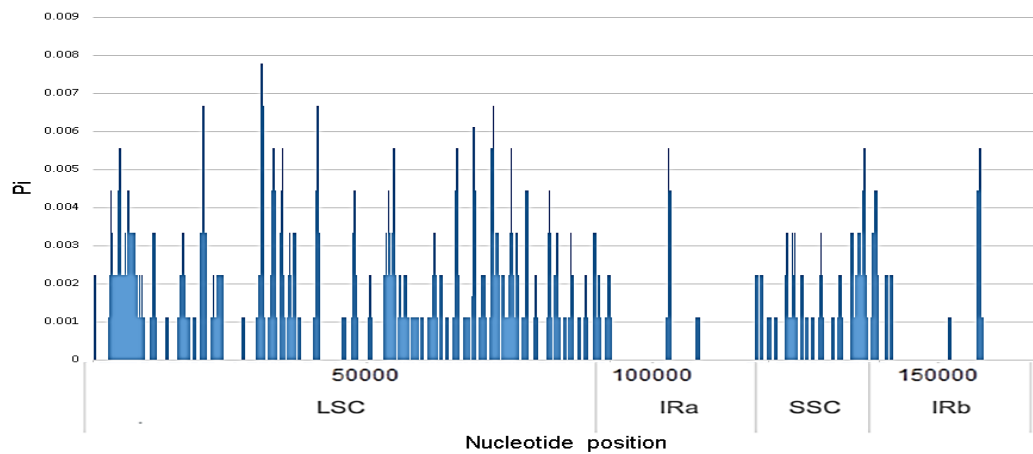
3.1.4.2. Sự sai khác trong trình tự gene của hệ gene lục lạp

Để mô tả sự khác biệt của hệ gene lục lạp, chú thích của các loài nghiên cứu được phân tích và so sánh. Kết quả cho thấy, hệ gene lục lạp có sự tương đồng rất cao giữa các loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*. Các trình tự trong hệ gene lục lạp được bảo tồn khá tốt trên ba dữ liệu với một vài vùng có sự biến đổi. So với vùng IR, vùng LSC và SSC có sự khác biệt cao hơn. Các vùng mã hóa có xu hướng được bảo tồn nhiều hơn so với các vùng không mã hóa và các biến thể được phát hiện chủ yếu ở các vùng không mã hóa. Các exon trong bốn hệ gene lục lạp có trình tự nucleotide gần giống nhau, các gene *matK*, *psaA*, *ndhK*, *ndhG* và *rbcL* có các đoạn nucleotide khác nhau giữa bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* (Hình 3.3).

Giá trị đa dạng nucleotide (P_i) giữa các trình tự gene lục lạp của bốn loài thuộc chi *Adinandra* khác nhau giữa các loài và khác nhau giữa các vùng của hệ gene lục lạp trong cùng một loài. Ở loài *A. megaphylla* giá trị P_i trung bình của vùng LSC là 0,001569, vùng SSC là 0,001339 và cao hơn nhiều so với vùng IR là 0,000219 [102]. Đối với loài *A. bockiana*, giá trị P_i trung bình của vùng LSC là 0,001447, vùng SSC là 0,001436 và vùng IR là 0,000265. Do đó, có thể thấy vùng LSC và SSC chứa nhiều biến thể hơn vùng IR, trong đó vùng LSC chứa nhiều biến thể nhất (Hình 3.4). Giá trị P_i trung bình của bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* là 0,00105.



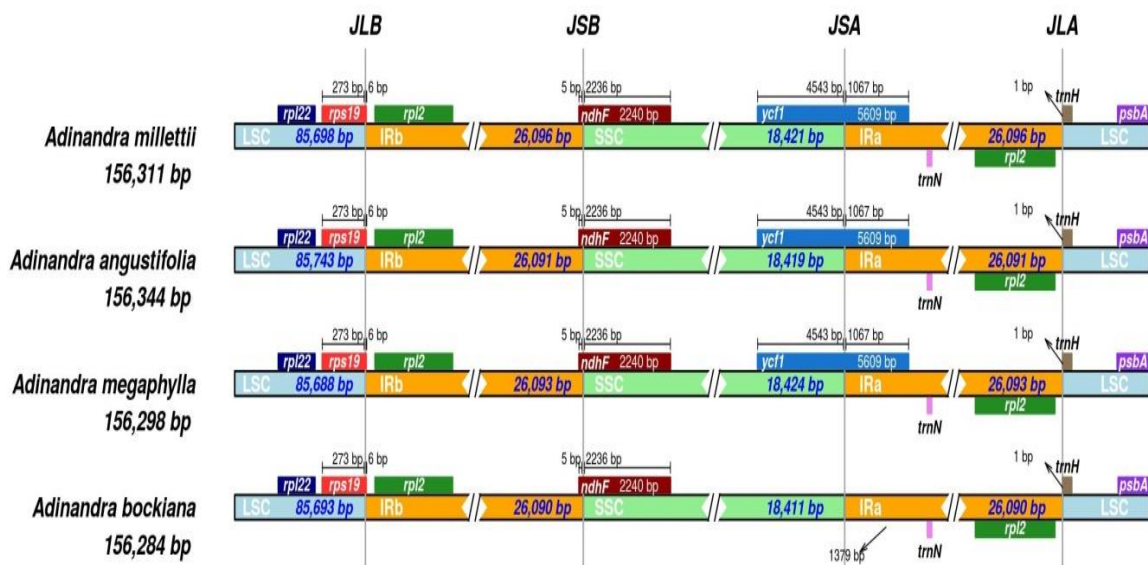
Hình 3.3. Biểu đồ so sánh hệ gene lục lạp của một số loài thuộc chi *Adinandra*



Hình 3.4. Phân tích so sánh các giá trị đa dạng nucleotide (Pi) giữa các trình tự gene lục lạp của bốn loài thuộc chi *Adinandra*.

3.1.4.3. Sự co lại và mở rộng của hệ gene lục lạp

Kích thước mỗi vùng IR của bốn hệ gene lục lạp dao động từ 26090-26096 bp. Vùng IR trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* có kích thước 26090 bp, loài *A. megaphylla* là 26093 bp, loài *A. angustifolia* là 26091 bp và loài *A. millettii* là 26096 bp. Kết quả phân tích cho thấy, không có sự mở rộng và co lại của vùng IR trong hệ gene lục lạp ở các loài nghiên cứu. Trong hệ gene lục lạp của cả bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*, gene *rps19* thuộc vùng LSC nhưng có 6 bp chồng chéo lên vùng IRb. Tương tự, gene *ndhF* thuộc vùng SSC nhưng chồng chéo lên vùng IRb 5 bp. Trong hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*, gene *ycf1* có 4543 bp thuộc vùng SSC (phần đầu gene) và 1067 bp nằm ở vùng IRa (phần đuôi gene), gene *ycf1* là ranh giới giữa vùng IRa và vùng SSC. Tuy nhiên, gene *ycf1* không tìm thấy ở vùng này trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* (Hình 3.5).



Hình 3.5. So sánh các vị trí tiếp giáp của LSC, IR và SSC trong hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra*

Trong nghiên cứu này, hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* đã được giải trình tự và phân tích so sánh với các hệ gene lục lạp của các loài *A. millettii*, *A. angustifolia* và *A. megaphylla* để xác định vị trí của loài *A. bockiana* trong họ Pentaphragaceae. Các

chỉ tiêu như: hàm lượng và tổ chức gene, sự phân bố biến thể trình tự, sự lặp lại và đặc điểm cấu trúc của hệ gene lục lạp hoàn chỉnh ở loài *A. bockiana* đã được sáng tỏ. Nhìn chung, hệ gene lục lạp của bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* có cấu trúc, hàm lượng gene tương tự nhau và có mức độ bảo tồn cao; không có sự mở rộng và co lại trong vùng IR; các biến thể về cấu trúc đã được xác định. Thông tin về hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* trong nghiên cứu này có thể hữu ích cho các nghiên cứu về hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* và khám phá sâu hơn về phát sinh chủng loại trong họ Pentaphylacaceae.

3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền và phát sinh chủng loại của chi *Adinandra*

Hệ gene lục lạp hoàn chỉnh được đề xuất là một siêu mã vạch giúp nhận diện loài, nghiên cứu phát sinh chủng loại và phân tích mối quan hệ di truyền [37]. Do đó, ngày càng nhiều loài thực vật được giải trình tự hệ gene lục lạp. Mặc dù, công nghệ giải trình tự thế hệ mới đã làm cho việc giải trình tự hệ gene lục lạp được thực hiện một cách nhanh chóng nhưng chi phí vẫn còn khá cao so với việc sử dụng mã vạch đơn lẻ. Do đó, trong nghiên cứu này tiến hành đánh giá khả năng nhận diện và phân loại loài của hệ gene lục lạp hoàn chỉnh và tìm kiếm các mã vạch đơn lẻ trong hệ gene lục lạp.

Từ kết quả so sánh hệ gene lục lạp giữa loài *A. bockiana* với các loài khác (*A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*) cho thấy, trong vùng LSC có nhiều biến thể, một số gene có sự sai khác về trình tự nucleotide giữa các loài. Chính sự sai khác này là cơ sở để nhận diện loài, xác định mối quan hệ di truyền ở cấp độ phân tử. Các gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của một số loài thuộc chi *Adinandra* (trong đó có loài *A. bockiana*) và một số loài trong họ Pentaphylacaceae được sử dụng để thiết lập cây phát sinh chủng loại nhằm xác định vị trí của loài *A. bockiana* và mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*, từ đó đề xuất gene tiềm năng làm mã vạch DNA để nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

3.2.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh

Cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của một số loài thuộc ba họ là Pentaphylacaceae, Theaceae và Styracaceae thuộc bộ Ericales. Trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của các loài này đã được công bố trên GenBank. Cây phát sinh chủng loại cho thấy độ tin cậy và ổn định rất cao (giá trị bootstrap là 100% ở tất cả các nhánh). Chi *Pentaphylax* của họ Pentaphylacaceae chia thành một nhánh; trong khi đó, nhánh của các chi *Adinandra*, *Eurya* và *Euryodendron* có quan hệ gần với nhánh của hai chi *Ternstroemia* và *Anneslea*. Ngoài ra, cả bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* đều tạo thành một nhánh với giá trị bootstrap 100% (Hình 3.6). Kết quả phân tích cây phát sinh chủng loại của hệ gene lục lạp hoàn chỉnh phù hợp với nghiên cứu trước đó [144] và hệ thống phân loại hiện nay [15], [6], [97]. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp thêm dẫn liệu để chứng minh hệ gene lục lạp hoàn chỉnh là một siêu mã vạch giúp nhận diện loài, nghiên cứu phát sinh chủng loại và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài.



Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài *A. bockiana* và các loài khác liên quan

3.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *matK*, *trnL* và *rbcL*

3.2.2.1. Đặc điểm gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của loài *A. bockiana*

Các gene *matK*, *trnL* và *rbcL* thuộc vùng LSC (là vùng chứa nhiều biến thể) được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài trong chi *Adinandra*. Vị trí và đặc điểm các gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của loài *A. bockiana* được đánh dấu trên bản đồ hệ gene lục lạp (Hình 3.1) và trình bày trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Đặc điểm gene *matK*, *trnL* và *rbcL* của loài *A. bockiana*

Đặc điểm gene		Gene <i>matK</i>	Gene <i>trnL</i>	Gene <i>rbcL</i>
Vị trí trên bản đồ gene		2041-3567	48603-49197	56117-57544
Kích thước (bp)		1527	595	1428
Khối lượng (Da)		923870	360300	866571
Hàm lượng GC (%)		32,94	35,80	43,63
Hàm lượng AT (%)		67,06	64,20	56,37
Số lượng nucleotide	A	468	223	392
	T	556	159	413
	G	244	112	352
	C	259	101	271

3.2.2.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *matK*

Phân tích độ tương đồng trình tự nucleotide của gene *matK* từ loài *A. bockiana* với 19 trình tự gene *matK* của các loài khác đã được công bố trên GenBank bằng BLAST trong NCBI cho thấy, trong phạm vi truy vấn từ 94-100% với tổng điểm BLAST từ 1157-1262, tỷ lệ tương đồng dao động từ 94,51-100%. Trong đó, loài *A. bockiana* có tỉ lệ tương đồng 100% với các loài *A. megaphylla* và *A. nitida*. Trình tự gene *matK* của loài *A. bockiana* có sự tương đồng rất cao với trình tự gene *matK* của các loài trong chi *Adinandra* từ 99,27-100%, thấp nhất với hai loài thuộc chi *Prunus*, họ Hoa Hồng (Rosaceae) với tỷ lệ tương đồng 94,72 và 94,51% (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Kết quả BLAST trình tự gene *matK* so sánh giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank

TT	Tên loài	Mã số	Tổng điểm	Phạm vi truy vấn (%)	Tỷ lệ tương đồng(%)
1	<i>A. megaphylla</i>	MW697901.1	1262	100	100,00
2	<i>A. nitida</i>	KP093834.1	1256	99	100,00
3	<i>A. formosana</i>	KJ687898.1	1256	100	99,89
4	<i>A. angustifolia</i>	MF179491.1	1256	100	99,85
5	<i>A. integerrima</i>	KJ708801.1	1184	94	99,69
6	<i>A. dumosa</i>	KJ708800.1	1166	94	99,38
7	<i>A. millettii</i>	AF380069.1	1234	100	99,27
8	<i>Eurya loquaiana</i>	HQ427372.1	1223	100	98,98
9	<i>Eurya macartneyi</i>	HQ415299.1	1223	100	98,98
10	<i>Euryodendron excelsum</i>	NC039178.1	1223	100	98,98
11	<i>Euryodendron excelsum</i>	MH159200.1	1223	100	98,98
12	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	AF380109.1	1190	100	98,10
13	<i>Ternstroemia fragrans</i>	HQ437949.1	1173	100	97,66
14	<i>Anneslea fragrans</i>	KR530349.1	1173	100	97,66
15	<i>Anneslea fragrans</i>	KR530350.1	1173	100	97,66
16	<i>Pentaphylax euryoides</i>	KJ510929.1	1164	95	97,53
17	<i>Pentaphylax euryoides</i>	HQ415369.1	1168	100	97,51
18	<i>Prunus persica</i>	AF288117.1	1162	98	94,72
19	<i>Prunus laurocerasus</i>	AF288116.1	1157	97	94,51

Hệ số sai khác về trình tự gene *matK* giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank dao động từ 0,001-1,100 (Bảng 3.6). Trong đó, hệ số sai khác nhỏ nhất là 0,001 (với loài *A. formosana*), tiếp đến là 0,003 (với loài *A. integerrima* và *A. angustifolia*). Điều đó cho thấy, loài *A. bockiana* có sự tương đồng lớn về trình tự gene *matK* và có mối quan hệ di truyền gần gũi với loài *A. formosana*, *A. integerrima*

và *A. angustifolia*. Các loài *A. megaphylla* và *A. nitida* không có sự sai khác trong trình tự gene *matK* so với loài *A. bockiana* (hệ số sai khác là 0,000). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả về hệ số tương đồng giữa loài *A. bockiana* với loài *A. megaphylla* và *A. nitida* (100%). Đồng thời kết quả cho thấy, loài *A. bockiana* có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *A. megaphylla* và *A. nitida*. Với các loài còn lại có hệ số sai khác không giống nhau, cho thấy gene *matK* có độ đa dạng di truyền cao và chứa nhiều biến thể sai khác giữa các loài.

Phân tích cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên trình tự gene *matK* của một số loài thuộc chi *Adinandra* và của một số loài khác trong họ Pentaphylacaceae và họ Rosaceae. Cây phát sinh chủng loại của gene *matK* mang lại độ tin cậy và ổn định rất cao, giá trị bootstrap hầu hết lớn hơn 90% ở đa số các nhánh (Hình 3.7). Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *matK* từ 20 loài được chia thành hai nhánh chính. Nhánh chính thứ nhất gồm hai loài thuộc chi *Prunus* (*Prunus persica* và *Prunus laurocerasus*), họ Rosaceae. Đây cũng là hai loài có tỷ lệ tương đồng thấp nhất và hệ số sai khác lớn nhất so với loài *A. bockiana* về trình tự gene *matK*. Nhánh chính thứ hai gồm 18 loài còn lại và được chia thành các nhánh phụ. Các loài trong cùng một chi (chi *Adinandra*, chi *Pentaphylax*, chi *Eurya*, chi *Euryodendron*) được phân bố trong cùng một nhánh. Trong nhánh của chi *Adinandra*, loài *A. bockiana* có mối quan hệ rất gần về mặt di truyền với các loài *A. megaphylla*, *A. formosana*, *A. nitida*, *A. angustifolia*, *A. millettii* và các loài này tạo thành một nhánh có quan hệ gần với nhánh chứa loài *A. integerrima* và loài *A. dumosa*. Loài *A. bockiana* được phân biệt với các loài khác trong chi với giá trị bootstrap 96,8%. Nhánh của chi *Adinandra* có quan hệ khá gần và được phân biệt với nhánh chứa chi *Eurya* và *Euryodendron* với giá trị bootstrap 100%. Kết quả phân tích cây phát sinh chủng loại hoàn toàn phù hợp với kết quả độ tương đồng và hệ số sai khác dựa trên trình tự gene *matK*, đồng thời phù hợp với những nghiên cứu trước đó [24], [52], [93], [144].

Bảng 3.6. Hệ số sai khác giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene *matK*

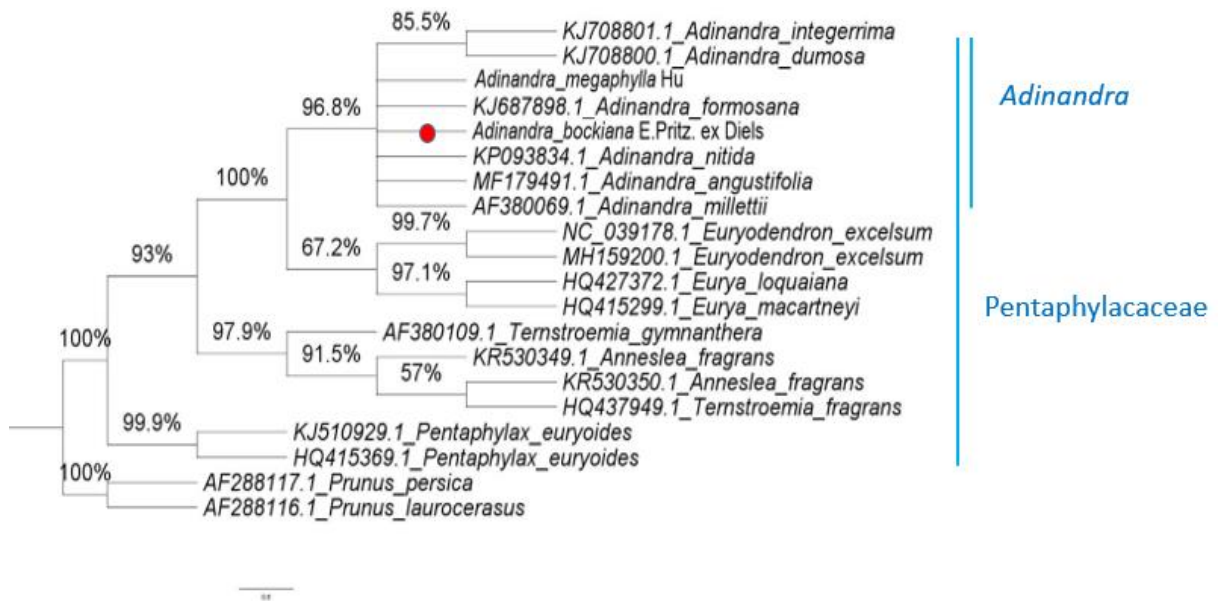
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																			
2	0,010																		
3	0,010	0,000																	
4	2,352	0,026	2,366																
5	0,011	0,003	0,003	2,372															
6	1,114	1,100	1,100	1,659	1,105														
7	1,107	1,094	1,094	1,659	1,098	0,000													
8	0,010	0,000	0,000	2,439	0,001	1,105	1,097												
9	0,013	0,003	0,003	2,458	0,004	1,087	1,080	0,003											
10	0,016	0,005	0,005	2,501	0,007	1,142	1,133	0,005	0,003										
11	0,011	0,001	0,000	2,404	0,001	1,098	1,098	0,000	0,003	0,005									
12	0,041	0,039	0,039	2,448	0,041	1,115	1,108	0,040	0,045	0,045	0,042								
13	0,027	0,026	0,026	2,344	0,027	1,108	1,101	0,022	0,026	0,028	0,024	0,032							
14	0,008	0,009	0,009	2,387	0,010	1,099	1,092	0,010	0,013	0,016	0,011	0,040	0,022						
15	0,037	0,036	0,036	2,420	0,037	1,105	1,097	0,037	0,042	0,042	0,038	0,002	0,029	0,039					
16	0,009	0,010	0,010	2,440	0,011	1,122	1,114	0,010	0,013	0,016	0,011	0,042	0,024	0,000	0,039				
17	0,026	0,025	0,025	2,367	0,026	1,105	1,098	0,018	0,021	0,023	0,020	0,031	0,004	0,021	0,028	0,021			
18	0,016	0,007	0,007	2,359	0,009	1,113	1,106	0,007	0,010	0,013	0,008	0,045	0,033	0,015	0,043	0,016	0,031		
19	0,178	0,178	0,178	2,522	0,179	1,182	1,175	0,180	0,187	0,188	0,191	0,166	0,176	0,179	0,169	0,179	0,173	0,191	
20	0,171	0,170	0,170	2,484	0,171	1,184	1,177	0,178	0,185	0,186	0,189	0,168	0,168	0,175	0,168	0,176	0,165	0,180	0,020

Chú thích:

- 1 NC039178.1-*Euryodendron excelsum*
- 2 MW699853.1-*A. bockiana*
- 3 MW697901.1-*A. megaphylla*
- 4 MH159200.1-*Euryodendron excelsum*
- 5 MF179491.1-*A. angustifolia*
- 6 KR530350.1-*Anneslea fragrans*
- 7 KR530349.1-*Anneslea fragrans*

- 8 KP093834.1-*A. nitida*
- 9 KJ708801.1-*A. integerrima*
- 10 KJ708800.1-*A. dumosa*
- 11 KJ687898.1-*A. formosana*
- 12 KJ510929.1-*Pentaphylax euryoides*
- 13 HQ437949.1-*Ternstroemia fragrans*
- 14 HQ427372.1-*Eurya loquaiana*

- 15 HQ415369.1-*Pentaphylax euryoides*
- 16 HQ415299.1-*Eurya macartneyi*
- 17 AF380109.1-*Ternstroemia gymnanthera*
- 18 AF380069.1-*A. millettii*
- 19 AF288117.1-*Prunus persica*
- 20 AF288116.1-*Prunus laurocerasus*



Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *matK* của loài *A. bockiana* và các loài khác liên quan

3.2.2.3. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *trnL*

Trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* được sử dụng để so sánh độ tương đồng với các trình tự gene *trnL* tương ứng của một số loài trong họ Pentaphylacaceae (trong đó có chi *Adianandra*) và họ Dầu (Dipterocarpaceae) trên GenBank bằng BLAST trong NCBI. Bảng 3.7 cho thấy, trong phạm vi truy vấn từ 99-100% với tổng điểm BLAST từ 1336-1661, tỉ lệ tương đồng dao động từ 93,58-100%. Trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng rất cao (từ 99,33-100%) với các loài thuộc chi *Adianandra*. Trong đó, loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài *A. glischroloma* và *A. hainanensis* là 100%; thấp nhất với hai loài thuộc chi *Hopea* (Họ Dipterocarpaceae) (Bảng 3.7).

Kết quả phân tích sự sai khác trong trình tự gene *trnL* giữa loài *A. bockiana* và những loài khác trên GenBank cho thấy, hệ số sai khác dao động từ 0,002-1,130. Trong đó, trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* có sự sai khác ít nhất (hệ số sai khác là 0,002) với các loài thuộc cùng chi *Adianandra* như loài *A. millettii*, *A. bockiana* (HM061582.1), *A. glischroloma*, *A. hirta* (AF534657.1), *A. hirta* (AF499817.1), *A. hainanensis*, *A. lasiostyla*, *A. formosana* (Bảng 3.8). Điều đó cho thấy, loài *A. bockiana* có quan hệ di truyền rất gần với các loài này và xa hơn với loài

A. angustifolia (hệ số sai khác 1,130). Trình tự gene *trnL* của các loài *A. dumosa* và *A. megaphylla* hoàn toàn giống với loài *A. bockiana* (hệ số sai khác là 0,000), do đó có thể đưa ra giả thiết loài *A. bockiana* có mối quan hệ di truyền gần nhất với loài *A. megaphylla* và *A. dumosa*. Kết quả về hệ số sai khác trong trình tự gene *trnL* giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích độ tương đồng. So sánh trình tự gene *trnL* giữa các loài với nhau cho các hệ số sai khác không giống nhau (Bảng 3.8). Sự chênh lệch về hệ số sai khác giữa các loài cho thấy sự đa dạng di truyền cao trong trình tự gene *trnL*.

Bảng 3.7. Kết quả BLAST trình tự gene *trnL* so sánh giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank

TT	Tên loài	Mã số	Tổng điểm	Phạm vi truy vấn (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>A. bockiana</i>	HM061582.1	1625	100	100,00
2	<i>A. glischroloma</i>	HM061581.1	1661	100	100,00
3	<i>A. hainanensis</i>	HQ158574.1	1661	100	100,00
4	<i>A. lasiostyla</i>	HM061586.1	1655	100	99,89
5	<i>A. formosana</i>	HM061585.1	1648	100	99,78
6	<i>A. hirta</i>	AF534657.1	1650	100	99,78
7		AF499817.1	1648	99	99,78
8	<i>A. megaphylla</i>	MW697901.1	1644	100	99,67
9	<i>A. millettii</i>	HM061584.1	1629	100	99,44
10	<i>A. angustifolia</i>	MF179491.1	1628	100	99,33
11	<i>A. dumosa</i>	DQ924310.1	1628	100	99,33
12	<i>Euryodendron excelsum</i>	HM061568.1	1544	100	97,48
13	<i>Euryodendron excelsum</i>	AF534668.1	1530	99	97,26
14	<i>Eurya weissiae</i>	HQ158582.1	1589	100	98,45
15	<i>Eurya brevistyla</i>	HM061571.1	1578	100	98,23
16	<i>Ternstroemia impressa</i>	AF396227.1	1380	100	94,41
17	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	AF499822.1	1376	100	94,30
18	<i>Anneslea fragrans</i>	HM061561.1	1369	100	94,19
19	<i>Anneslea fragrans</i>	HQ158576.1	1365	100	94,09
20	<i>Pentaphylax euryoides</i>	HM061551.1	1347	100	93,83
21	<i>Pentaphylax euryoides</i>	HM061552.1	1347	100	93,83
22	<i>Hopea odorata</i>	AB006402.1	1336	100	93,61
23	<i>Hopea nervosa</i>	AB006401.1	1336	100	93,58

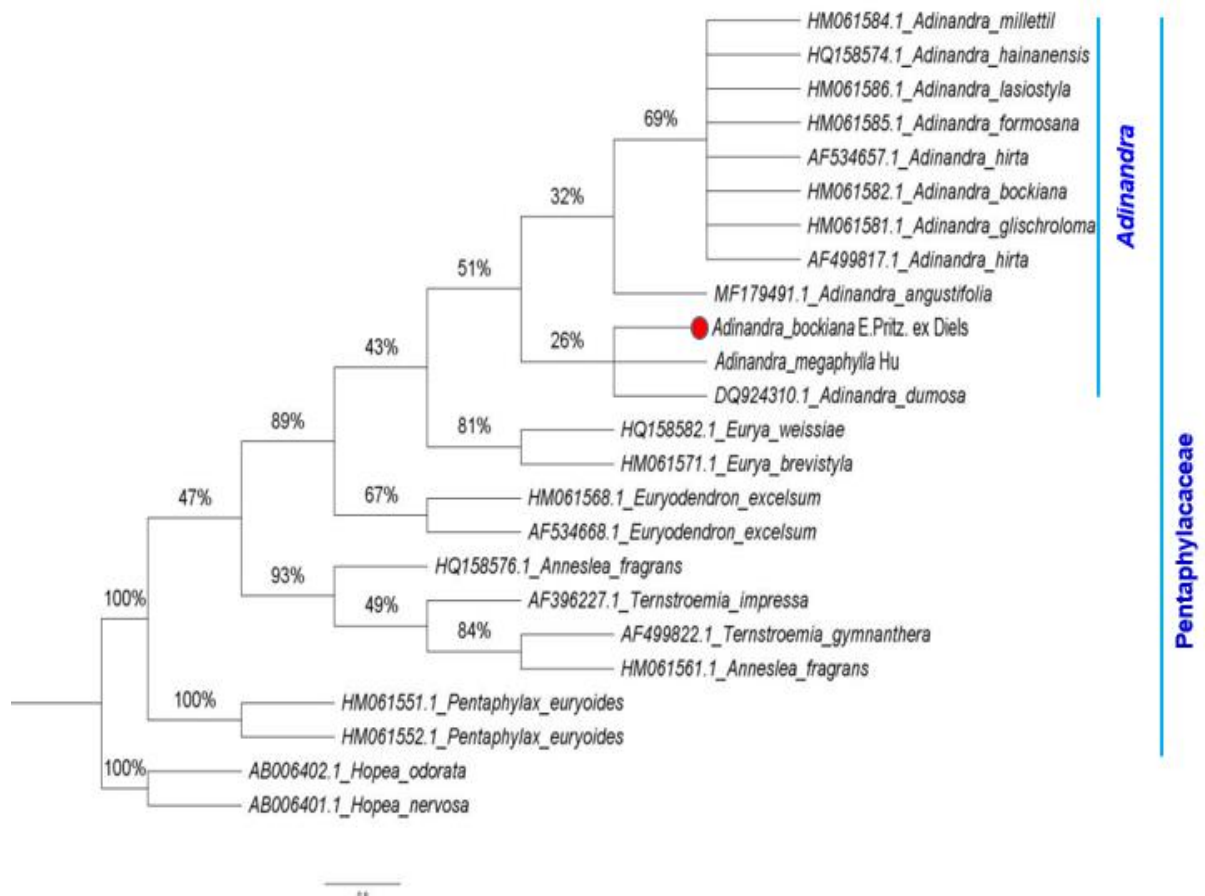
Bảng 3.8. Hệ số sai khác giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene *trnL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2	0,000																						
3	1,130	1,130																					
4	0,004	0,004	1,190																				
5	0,018	0,018	1,194	0,032																			
6	0,002	0,002	1,183	0,008	0,035																		
7	0,002	0,002	1,183	0,009	0,038	0,001																	
8	0,002	0,002	1,183	0,009	0,038	0,001	0,002																
9	0,002	0,002	1,176	0,007	0,036	0,001	0,002	0,002															
10	0,002	0,002	1,183	0,008	0,037	0,000	0,001	0,001	0,001														
11	0,002	0,002	1,183	0,008	0,037	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000													
12	0,004	0,004	1,190	0,003	0,037	0,010	0,011	0,011	0,010	0,010	0,010												
13	0,004	0,004	1,182	0,006	0,036	0,011	0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,007											
14	0,017	0,017	1,188	0,032	0,002	0,036	0,037	0,037	0,035	0,036	0,036	0,036	0,035										
15	0,025	0,025	1,175	0,048	0,051	0,051	0,052	0,052	0,049	0,051	0,051	0,052	0,051	0,050									
16	0,025	0,025	1,175	0,048	0,051	0,051	0,052	0,052	0,049	0,051	0,051	0,052	0,051	0,050	0,000								
17	0,000	0,000	1,190	0,012	0,040	0,008	0,009	0,009	0,009	0,008	0,008	0,013	0,015	0,041	0,054	0,054							
18	0,004	0,004	1,187	0,007	0,034	0,012	0,014	0,014	0,011	0,012	0,012	0,008	0,001	0,034	0,051	0,051	0,016						
19	0,002	0,002	1,193	0,011	0,040	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,011	0,012	0,037	0,052	0,052	0,011	0,013					
20	0,021	0,021	1,194	0,037	0,006	0,041	0,042	0,042	0,040	0,041	0,041	0,040	0,039	0,006	0,051	0,051	0,045	0,038	0,042				
21	0,002	0,002	1,193	0,009	0,038	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,011	0,012	0,037	0,052	0,052	0,009	0,014	0,000	0,042			
22	0,018	0,018	1,123	0,018	0,002	0,020	0,021	0,021	0,021	0,021	0,021	0,019	0,019	0,000	0,032	0,032	0,018	0,019	0,021	0,004	0,021		
23	0,202	0,202	1,157	0,203	0,206	0,206	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207	0,204	0,205	0,208	0,211	0,211	0,202	0,205	0,206	0,208	0,207	0,200	
24	0,206	0,206	1,135	0,207	0,210	0,209	0,211	0,211	0,211	0,211	0,211	0,208	0,212	0,212	0,217	0,217	0,206	0,211	0,209	0,212	0,211	0,204	0,030

Chú thích:

- | | | |
|---|--|---|
| 1. MW699853.1- <i>A. bockiana</i> | 9. HM061584.1- <i>A. millettii</i> | 17. DQ924310.1- <i>A. dumosa</i> |
| 2. MW697901.1- <i>A. megaphylla</i> | 10. HM061582.1- <i>A. bockiana</i> | 18. AF534668.1- <i>Euryodendron excelsum</i> |
| 3. MF179491.1- <i>A. angustifolia</i> | 11. HM061581.1- <i>A. glischroloma</i> | 19. AF534657.1- <i>A. hirta</i> |
| 4. HQ158582.1- <i>Eurya weissiae</i> | 12. HM061571.1- <i>Eurya brevistyla</i> | 20. AF499822.1- <i>Ternstroemia gymnanthera</i> |
| 5. HQ158576.1- <i>Anneslea fragrans</i> | 13. HM061568.1- <i>Euryodendron excelsum</i> | 21. AF499817.1- <i>A. hirta</i> |
| 6. HQ158574.1- <i>A. hainanensis</i> | 14. HM061561.1- <i>Anneslea fragrans</i> | 22. AF396227.1- <i>Ternstroemia impressa</i> |
| 7. HM061586.1- <i>A. lasiostyla</i> | 15. HM061552.1- <i>Pentaphylax euryoides</i> | 23. AB006402.1- <i>Hopea odorata</i> |
| 8. HM061585.1- <i>A. formosana</i> | 16. HM061551.1- <i>Pentaphylax euryoides</i> | 24. AB006401.1- <i>Hopea nervosa</i> |

Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *trnL* cho thấy, tại nhánh của chi *Adinandra*, gene *trnL* mang lại độ tin cậy và ổn định thấp hơn gene *matK* (giá trị bootstrap là 51%). Hình 3.8 cho thấy, chi *Adinandra* đã được tách ra thành hai phân nhóm: một phân nhóm gồm loài *A. bockiana*, *A. megaphylla* và *A. dumosa*; một phân nhóm được thiết lập bởi loài *A. angustifolia* và một số loài khác trong chi *Adinandra*. Trong mỗi phân nhóm độ tin cậy và ổn định cũng rất thấp (giá trị bootstrap lần lượt là 26% và 32%). Nhánh của chi *Adinandra* có quan hệ gần và được phân biệt với nhánh của chi *Eurya* nhưng chưa đủ độ tin cậy (giá trị bootstrap 43%). Mặc dù, gene *trnL* đã được đề xuất làm mã vạch DNA ở những công bố trước [89], [130]; tuy nhiên trong nghiên cứu này, cây phát sinh chủng loại của gene *trnL* không cho độ tin cậy cao giúp phân loại và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài trong chi *Adinandra*.



Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *trnL* của loài *A. bockiana* và các loài liên quan

3.2.2.4. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene *rbcL*

Kết quả so sánh trình tự gene *rbcL* giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank bằng chương trình BLAST cho thấy, tỷ lệ tương đồng dao động từ 98,18-99,72%. Trong đó, loài *A. bockiana* có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia* (99,72%), thấp nhất (98,18%) với các loài thuộc chi *Camellia*, họ Chè (Theaceae). Không có trình tự *rbcL* của loài nào tương đồng 100% với loài *A. bockiana* (Bảng 3.9). Điều đó cho thấy, gene *rbcL* có độ đa dạng di truyền cao và có chứa khá nhiều biến thể giữa các loài.

Bảng 3.9. Kết quả BLAST trình tự gene *rbcL* so sánh giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank

TT	Tên loài	Mã số	Tổng điểm	Phạm vi truy vấn (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>A. megaphylla</i>	MW697901.1	2615	100	99,72
2	<i>A. millettii</i>	MF179492.1	2615	100	99,72
3	<i>A. angustifolia</i>	MF179491.1	2615	100	99,72
4	<i>A. glischroloma</i>	NC_087777.1	2610	100	99,65
5	<i>A. formosana</i>	AF089713.1	2527	97	99,35
6	<i>Eurya loquaiana</i>	NC_050937.1	2555	100	98,95
7	<i>Eurya chinensis</i>	OP580972.1	2549	100	98,88
8	<i>Eurya rubiginosa</i> var. <i>attenuata</i>	ON729444.1	2549	100	98,88
9	<i>Eurya alata</i>	NC_041510.1	2549	100	98,88
10	<i>Euryodendron excelsum</i>	MH159200.1	2532	100	98,67
11	<i>Anneslea fragrans</i>	NC_035709.1	2510	100	98,39
12	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	NC_035706.1	2499	100	98,25
13	<i>Pyrenaria hirta</i> var. <i>cordatula</i>	KY406785.1	2499	100	98,25
14	<i>Pyrenaria hirta</i> var. <i>hirta</i>	KY406771.1	2499	100	98,25
15	<i>Pyrenaria microcarpa</i>	NC_035686.1	2494	100	98,18
16	<i>Camellia liberistylodes</i>	NC_087748.1	2494	100	98,18
17	<i>Camellia mairei</i>	NC_035688.1	2494	100	98,18
18	<i>Camellia reticulata</i>	KY406793.1	2494	100	98,18
19	<i>Camellia weiningensis</i>	MK820035.1	2494	100	98,18

Hệ số sai khác về trình tự gene *rbcL* giữa loài *A. bockiana* với 19 loài khác dao động từ 0,003-0,018 (Bảng 3.10). Các loài *A. millettii*, *A. angustifolia* và *A. megaphylla* có mối quan hệ di truyền gần nhất với loài *A. bockiana* (Hệ số sai khác 0,003), tiếp đến là loài *A. glischroloma* và *A. formosana* với hệ số sai khác lần lượt là 0,004 và 0,006. Hệ số sai khác lớn nhất là 0,018 khi so sánh trình tự gene *rbcL* của loài *A. bockiana* với các loài thuộc chi *Camellia* (4; 9; 15; 17), *Pyrenaria* (10; 18; 19) và *Ternstroemia* (8); trong khi, các loài thuộc chi *Eurya* (1; 2; 5; 6) có hệ số sai khác là 0,011. Điều đó cho thấy, các loài thuộc chi *Eurya* có mối quan hệ di truyền với loài *A. bockiana* gần hơn so với các loài thuộc chi *Camellia*, *Pyrenaria* và *Ternstroemia*. Kết quả phân tích hệ số sai khác hoàn toàn phù hợp với tỷ lệ tương đồng khi so sánh trình tự gene *rbcL* giữa loài *A. bockiana* với 19 loài khác. Khi so sánh trình tự gene *rbcL* của các loài khác nhau cho thấy sự chênh lệch về hệ số sai khác, điều đó chứng tỏ gene *rbcL* có sự đa dạng di truyền cao giữa 20 loài nghiên cứu.

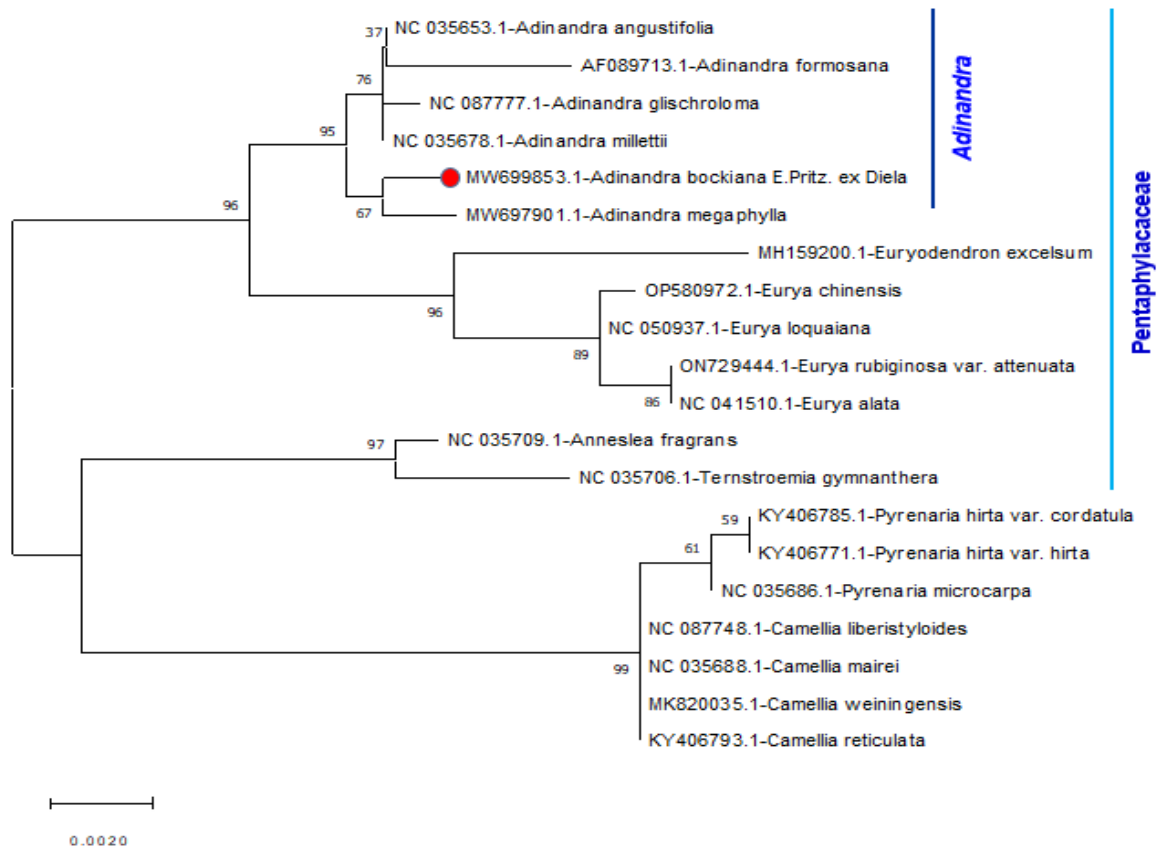
Kết quả phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *rbcL* cho thấy, các loài thuộc chi *Adinandra* phân bố trên cùng một nhánh và được chia thành hai phân nhóm có mối quan hệ rất gần nhau về mặt di truyền (giá trị bootstrap đạt 95%); loài *A. bockiana* cùng với *A. megaphylla* tạo nên phân nhóm 1; phân nhóm 2 gồm loài *A. glischroloma*, *A. angustifolia*, *A. millettii* và *A. formosana*. Nhánh của chi *Adinandra* có quan hệ gần và được phân biệt với nhánh chứa chi *Euryodendro* và *Eurya* với giá trị bootstrap 96%. Ở các nhánh khác cũng cho kết quả phân loại tương tự, các loài cùng chi được phân bố trên cùng một nhánh (chi *Euryodendro*, chi *Eurya*, chi *Camellia*...), các chi có quan hệ gần gũi về mặt di truyền sẽ được phân bố cạnh nhau (chi *Adinandra* cạnh chi *Eurya* và *Euryodendro*) (Hình 3.9). Kết quả của cây phát sinh chủng loại có sự thống nhất với kết quả phân tích độ tương đồng và hệ số sai khác trong trình tự gene *rbcL* và hoàn toàn phù hợp với hệ thống phân loại hiện nay [15], [6], [97].

Bảng 3.10. Hệ số sai khác giữa loài *A. bockiana* với các loài khác trên GenBank dựa trên trình tự gene *rbcL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																			
2	0,002																		
3	0,011	0,009																	
4	0,023	0,023	0,019																
5	0,001	0,001	0,010	0,023															
6	0,002	0,000	0,009	0,023	0,001														
7	0,016	0,015	0,016	0,017	0,015	0,015													
8	0,018	0,016	0,016	0,020	0,018	0,016	0,004												
9	0,023	0,023	0,019	0,000	0,023	0,023	0,017	0,020											
10	0,025	0,024	0,021	0,001	0,024	0,024	0,017	0,020	0,001										
11	0,010	0,010	0,001	0,018	0,009	0,010	0,015	0,016	0,018	0,020									
12	0,010	0,010	0,001	0,018	0,009	0,010	0,015	0,016	0,018	0,020	0,000								
13	0,011	0,011	0,004	0,018	0,011	0,011	0,016	0,018	0,018	0,018	0,003	0,003							
14	0,011	0,011	0,004	0,018	0,011	0,011	0,016	0,018	0,018	0,020	0,003	0,003	0,003						
15	0,023	0,023	0,019	0,000	0,023	0,023	0,017	0,020	0,000	0,001	0,018	0,018	0,018	0,018					
16	0,009	0,010	0,013	0,024	0,008	0,010	0,021	0,023	0,024	0,026	0,012	0,012	0,013	0,013	0,024				
17	0,023	0,023	0,019	0,000	0,023	0,023	0,017	0,020	0,000	0,001	0,018	0,018	0,018	0,018	0,000	0,024			
18	0,024	0,023	0,020	0,002	0,023	0,023	0,016	0,019	0,002	0,001	0,019	0,019	0,018	0,019	0,002	0,025	0,002		
19	0,024	0,023	0,020	0,002	0,023	0,023	0,016	0,019	0,002	0,001	0,019	0,019	0,018	0,019	0,002	0,025	0,002	0,000	
20	0,014	0,014	0,004	0,021	0,013	0,014	0,017	0,020	0,021	0,023	0,004	0,004	0,006	0,006	0,021	0,016	0,021	0,022	0,022

Chú thích:

- | | | | | | |
|---|---|----|--|----|--|
| 1 | OP580972.1- <i>Eurya chinensis</i> | 8 | NC_035706.1- <i>Ternstroemia gymnanthera</i> | 15 | MK820035.1- <i>Camellia weiningensis</i> |
| 2 | ON729444.1- <i>Eurya rubiginosa</i> var. <i>attenuata</i> | 9 | NC_035688.1- <i>Camellia mairei</i> | 16 | MH159200.1- <i>Euryodendron excelsum</i> |
| 3 | NC_087777.1- <i>A. glischroloma</i> | 10 | NC_035686.1- <i>Pyrenaria microcarpa</i> | 17 | KY406793.1- <i>Camellia reticulata</i> |
| 4 | NC_087748.1- <i>Camellia liberistylodes</i> | 11 | MF179492.1- <i>A. millettii</i> | 18 | KY406785.1- <i>Pyrenaria hirta</i> var. <i>cordatula</i> |
| 5 | NC_050937.1- <i>Eurya loquaiana</i> | 12 | MF179491.1- <i>A. angustifolia</i> | 19 | KY406771.1- <i>Pyrenaria hirta</i> var. <i>hirta</i> |
| 6 | NC_041510.1- <i>Eurya alata</i> | 13 | MW699853.1- <i>A. bockiana</i> | 20 | AF089713.1- <i>A. formosana</i> |
| 7 | NC_035709.1- <i>Anneslea fragrans</i> | 14 | MW697901.1- <i>A. megaphylla</i> | | |



Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *rbcL* của loài *A. bockiana* và các loài liên quan

Kết quả phân tích độ tương đồng, hệ số sai khác và cây phát sinh chủng loại của các gene cho thấy, gene *matK*, *trnL* và *rbcL* đều cho khả năng phân loại và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài. Tuy nhiên, cây phát sinh chủng loại của gene *trnL* cho độ tin cậy và ổn định chưa cao. Do đó, trình tự gene *matK* và *rbcL* thích hợp và được đề xuất là ứng viên mã vạch DNA để nhận diện loài, phân loại và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra* và một số loài thuộc họ Pentaphylacaceae. Gene *matK* và *rbcL* cũng là hai trong bảy vùng được chọn làm mã vạch DNA cho thực vật trên cạn [32], [60]. Từ kết quả phân tích độ tương đồng và hệ số sai khác cho thấy, nếu chỉ sử dụng một mã vạch DNA là gene *matK* hoặc *rbcL* thì không thể phân biệt được những loài có cùng tỷ lệ tương đồng là 100% và hệ số sai khác là 0,000. Do đó, nên kết hợp nhiều mã DNA để tăng hiệu quả nhận diện loài hoặc sử dụng siêu mã vạch là hệ gene lục lạp hoàn chỉnh sẽ đem lại hiệu quả tốt nhất.

3.3. Kết quả phân tích thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của ba loài nghiên cứu

3.3.1. Cấu trúc hoá học của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

Các hợp chất được phân lập từ căn chiết ethyl acetate và căn chiết MeOH bằng các phương pháp khác nhau. Sau khi phân lập, cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phương pháp quang phổ NMR và so sánh với dữ liệu được báo cáo trong tài liệu tham khảo (TLTK).

3.3.1.1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. megaphylla*

Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 15 hợp chất thu được từ lá của loài *A. megaphylla* được mô tả theo sơ đồ hình P3.1.1 (Phụ lục 3.1) và được tóm tắt trong bảng 3.11, hình 3.12. Trong 15 hợp chất có hai hợp chất mới lần đầu được mô tả là debutyldorycnic acid (**1**) và adinanquercetiside (**2**); 13 hợp chất còn lại (ký hiệu (KH) từ **3-15**) đã biết bao gồm coniferyl aldehyd (**3**), ursolic acid (**4**), 4,5-dihydroblumenol (**5**), metyl gallat (**6**), 24-hydroxytormentic acid (**7**), gallic acid (**8**), convoldorin (**9**), scopolin (**10**), isoquercitrin (**11**), horridin (**12**), pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside (**13**), syringaresinol β -D-glucoside (**14**) và cammellikaempferoside B (**15**) đã được làm sáng tỏ bằng cách so sánh dữ liệu phổ NMR của các hợp chất này với các tài liệu đã công bố. Ngoại trừ hợp chất (**4**) và (**5**), tất cả các hợp chất còn lại lần đầu tiên được tìm thấy ở chi *Adinandra*.

Trong phạm vi luận án chỉ trình bày cấu trúc hóa học của hai hợp chất mới là (**1**) và (**2**), các hợp chất đã biết (**3-15**) được trình bày trong phụ lục 3.2.

Bảng 3.11. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. megaphylla*

TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	F3.2	RP-18 (M:W 1:1)	AHL2 (3)	[98]	Coniferyl aldehyde	3,7
2	F5.2	Rửa acetone	AHL3 (4)	[19]	Ursolic acid	45,0
3	F5.3	RP-18 (M:W 1:1)	AHL4 (5)	[43]	4,5-dihydroblumenol	8,2
4	F5.3.1	Silicagel c, c (D:A 9:1)	AHL6 (6)	[118]	Methyl gallate	4,1
5	F6.7.2	Silicagel c, c (D:A 9:1)	AHL7 (7)	[61], [80]	24-hydroxytormentic acid	3,1
6			AHL8 (8)	[8]	Gallic acid	4,2
7	F9.1	RP-18 (M:W 1:3)	AHL13 (9)	[54]	Convoldorin	16,5
8	F9.2.1	RP-18 (M:W 1:4)	AHL19 (10)	[1]	Scopoline	5,1
9	F9.3	RP-18 (M:W 1:3)	AHL15 (1)		Debutyldorycnic acid	8,6
10	W3.2.3	RP-18 (M:W 1:1)	WAM1 (11)	[75]	Isoquercetine	3,6
11			WAM2 (12)	[48]	Horidin	4,2
12	W3.4.1	RP-18 (M:W 1:1)	WAM11A (13)	[112]	Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	7,1
13	W3.4.2	Silicagel c, c (D:M 1:9)	WAM16 (14)	[119]	Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	5,3
14	W3.8.4	RP-18 (M:W 1:3)	WAM15 (15)	[143]	Camellikaempferoside B	3,8
15			WAM11.5 (2)		Adinanquercetiside	5,1

Chú thích: KH: Kí hiệu; KL: Khối lượng

Hợp chất AHL15 (1): Là chất bột vô định hình, màu vàng nhạt. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 17,8$ (c 0,10; MeOH). Phổ UV (MeOH) xuất hiện bước sóng cực đại ($\lambda_{\max}$) tại 246 (0,68), 330 (1,13). Phổ IR xuất hiện pic $\nu_{\max}$ (KBr) 3324, 2953, 1684, 1637, 1599, 1516, 1285, 1181 cm^{-1} ; phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic tại m/z 353,0880 $[\text{M-H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9]^-$, 353,0878). Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR (Bảng 3.12) và (Hình P3.2.1c; Hình P3.2.1d - Phụ lục 3.2).

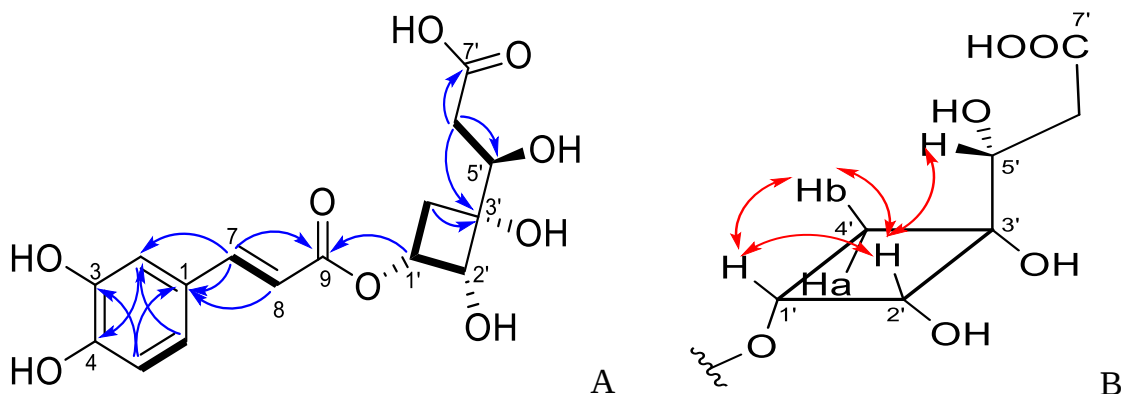
Bảng 3.12. Dữ liệu ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (150 MHz) của hợp chất **AHL15** trong DMSO d_6 [δ (ppm), J (Hz)]

C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	125,5
2	7,04 (1H, d, $J = 2,4$ Hz)	114,7
3		148,3
4	-	145,5
5	6,77 (1H, d, $J = 8,4$ Hz)	115,7
6	6,99 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, 8,4 Hz)	121,3
7	7,43 (1H, d, $J = 15,6$ Hz)	144,9
8	6,15 (1H, d, $J = 15,6$ Hz)	114,3
9	-	165,7
1'	5,08 (1H, m)	70,8
2'	3,57 (1H, m)	70,4
3'		73,4
4'	2,01 (1H, m) 1,96 (1H, dd, $J = 4,2$ Hz, 13,2 Hz)	36,3
5'	3,94 (br)	68,1
6'	2,03 (1H, m) 1,79 (1H, dd, $J = 6,6$ Hz, 13,2 Hz)	37,2
7'	-	174,9
3-OH	9,56 (br d, $J = 1,2$ Hz)	
4-OH	9,14 (br d, $J = 1,2$ Hz)	
2'-OH	4,89 (br d, $J = 1,2$ Hz)	
5'-OH	4,75 (br d, $J = 3,6$ Hz)	

Chú thích: δ_{H} : Độ dịch chuyển của H; δ_{C} : Độ dịch chuyển của C; J : Hằng số tách; s: Singlet (1 đỉnh); d: Duplet (2 đỉnh); m: multilet (từ 4 đỉnh); br: Phổ chân rộng.

Hợp chất **AHL15 (1)** được phân lập dưới dạng bột màu vàng nhạt. HR-ESI-MS âm tính cho thấy đỉnh ion giả phân tử $[M-H]^-$ ở m/z 353,0880, cho thấy công thức phân tử $C_{16}H_{18}O_9$. Phổ IR thể hiện sự hấp thụ hydroxyl và carbonyl ở bước sóng tương ứng là 3324 và 1684 cm^{-1} . Phổ 1H và ^{13}C NMR cho thấy sự hiện diện của một nhóm caffeate ở δ_H 7,04 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-2), 6,77 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), 6,99 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, 8,4 Hz, H-6), 7,43 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-7), 6,15 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-8)/ δ_C 125,5 (C-1), 114,7 (C-2), 148,3 (C-3), 145,5 (C-4), 115,7 (C-5), 121,3 (C-6), 144,9 (C-7), 114,3 (C-8), 165,7 (C-9) (Bảng 3.12). Trên phổ HMBC, một proton oxymethine ở δ_H 5,08 (1H, m, H-1')/ δ_C 70,8 cho thấy tín hiệu HMBC với nhóm carbonyl C-9 của nhóm caffeate. Trong phổ COSY 1H-1H, proton H-1' này cho thấy tín hiệu liên kết với proton oxymethine H-2' (δ_H 3,57) và 2 proton nhóm methylene H-4' (δ_H 2,01 (1H, m, H-4'a) và 1,96 (1H, dd, $J = 4,2$ Hz, 13,2 Hz, H-4'b)). Các tín hiệu HMBC của H-1' và H-4' đến C-3' (δ_C 73,4); của H-4' đến C-1' (δ_C 70,8) và C-2' (δ_C 70,4) cho thấy sự hiện diện của nhóm cyclobutyl liên kết với nhóm caffeate. Ngoài ra, tín hiệu của đoạn 3-hydroxypropanoic acid ở δ_H 3,94 (br, H-5'), 2,03 (m, 1H, H-6'a), 1,79 (1H, dd, $J = 6,6$ Hz, 13,2 Hz, H-6'b)/ δ_C 68,1 (C-5'), 37,2 (C-6'), 174,9 (C-7') được quan sát thấy trong phổ COSY và HSQC. Phổ HMBC cho thấy tín hiệu của H-6' với C-5' và C-7'. Mặt khác, các tín hiệu HMBC của H-6' với C-3' gợi ý 3-hydroxypropanoic acid liên kết với C-3' của vòng cyclobutane (Hình 3.10A). Dữ liệu được trình bày của hợp chất **AHL15** tương tự với dữ liệu của dorycnic acid và colvoldorine, cả hai đều được phân lập từ loài *Convolvulus dorycnium* [54], [99]. Hóa học lập thể của hợp chất **AHL15** được xác định bằng phổ NOESY và so sánh dữ liệu góc quay cực và NMR của **AHL15** với dorycnic acid, ở hợp chất này hóa học lập thể được xác định bằng sự kết hợp giữa phương pháp của Mosher và thí nghiệm NOESY [99]. Tương tự như dorycnic acid, tương tác NOE của H-1'/H-2', H-1'/H-4'b, H-2'/H-4'b và H-2'/H-5' chỉ ra rằng H-1', H-2', H-5' nằm ở cùng một phía của vòng cyclobutane (Hình 3.10B). Ngoài ra, góc quay cực đo được của hợp chất **AHL15**, có thể so sánh với góc quay cực của dorycnic acid $[\alpha]_D^{25}$ -15 (c 0,13; MeOH) và colvoldorine $[\alpha]_D^{25}$ -20,1 (c 0,10; MeOH). Dựa trên những bằng chứng này, cấu hình tại

C-1', C-2', C-3' và C-5' được gán là *R*, giống như cấu hình của dorycnic acid. Do đó, hợp chất **AHL15** được xác định là 3-(2*R*-hydroxy-3*R*-caffeoyl-1*R*-hydroxycyclobutyl)-3*R*-hydroxypropanoic acid và được đặt tên là debutyldorycnic acid (1) (Hình 3.12), (Hình P3.2.1e, Hình P3.2.1h, Phụ lục 3.2).



Hình 3.10. Các tín hiệu chính của HMBC (A) và NOESY (B) của hợp chất **AHL15**

Hợp chất WAM11.5 (2): Chất keo, màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -20,1$ (c 0,11; MeOH). Phổ UV (MeOH) xuất hiện bước sóng cực đại tại 272 (0,94), 317 (1,27). Phổ IR xuất hiện pic $\nu_{\max}$ (KBr) 3360, 2922, 1582, 1507, 1361, 1241, 1186, 1056 cm^{-1} . Phổ HR-ESI-MS m/z 937,2195 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{ClO}_{22}^-$, 937,2175). Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR (Bảng 3.13) và (Hình P3.2.2c; Hình P3.2.2d, Phụ lục 3.2).

Bảng 3.13. Dữ liệu ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (150 MHz) của hợp chất **WAM11.5** (2) trong CD_3OD

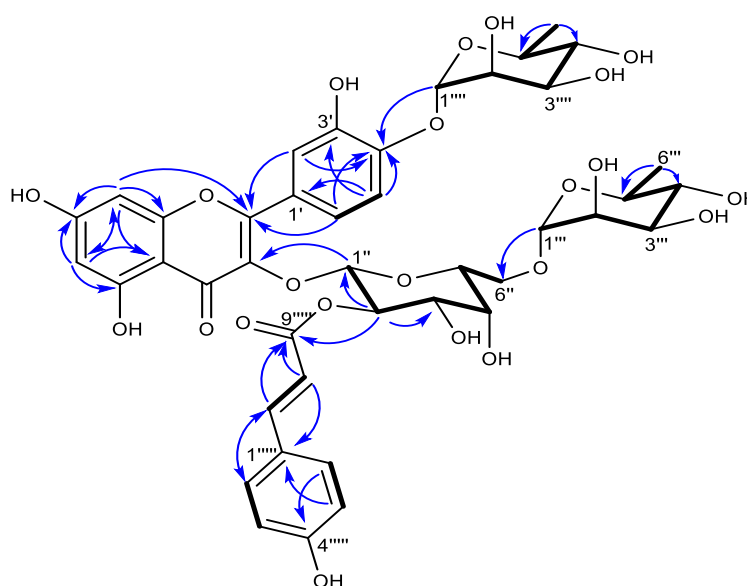
C	δ_{H}	δ_{C}	C	δ_{H}	δ_{C}
			6''-O-rha		
2	-	157,7	1'''	4,59 d (1,8)	102,0
3	-	135,7	2'''	3,65 dd (3,6, 1,8)	72,1
4	-	179,2	3'''	3,57*	72,3
5	-	163,1	4'''	3,31*	74,2
6	6,19 d (2,4)	100,0	5'''	3,58 m	69,8
7	-	166,1	6'''	1,23 d (6,0)	18,0
8	6,36 d (2,4)	94,8	4'-O-rha		
9	-	158,4	1''''	5,55 d (1,8)	100,8
10	-	105,8	2''''	4,16 dd (3,6, 1,8)	71,9

				1,8)	
1'	-	126,1	3''''	4,01 dd (9,0, 3,6)	72,1
2'	7,74 d (2,4)	118,1	4''''	3,52 t (9,0)	73,9
3'	-	148,1	5''''	3,78*	71,0
4'	-	148,2	6''''	1,29 d (6,6)	18,1
5'	7,26 d (8,4)	117,5	2''-O-coumaroyl		
6'	7,62 dd (8,4, 2,4)	122,6	1''''	-	127,3
3-O-gal			2''''	7,46 d (8,4)	131,2
1''	5,54 d (7,8)	101,7	3''''	6,83 d (8,4)	116,8
2''	5,39 dd (7,8, 10,2)	73,9	4''''	-	161,2
3''	3,81*	73,3	5''''	6,83 d (8,4)	116,8
4''	3,90 br d (3,6)	70,5	6''''	7,46 d (8,4)	131,2
5''	3,78*	75,6	7''''	7,70 d (16,2)	146,9
6''	3,81*, 3,56 dd (3,6, 9,6)	67,3	8''''	6,39 d (16,2)	115,3
			9''''	-	168,9

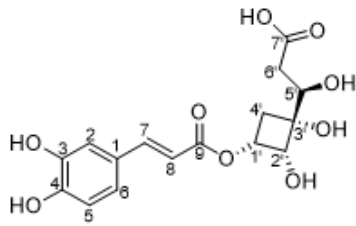
Chú thích: “*” Tín hiệu chồng lấp; δ_H : Độ dịch chuyển của H; δ_C : Độ dịch chuyển của C; *J*: Hằng số tách; d: Duplet (2 đỉnh); t: Triplet (3 đỉnh); m: multilet (từ 4 đỉnh); br: Phổ chân rộng

Hợp chất **WAM11.5** thu được từ phần MeOH dưới dạng keo màu vàng và cho HR-ESI-MS ở m/z 903,2595 $[M+Cl]^-$ phù hợp với công thức phân tử của $C_{42}H_{46}O_{22}$. Phổ IR cho thấy sự hấp thụ hydroxyl ở tần số 3360 cm^{-1} . Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất WAM11.5 cho thấy tín hiệu đặc trưng của một nhóm quercetin với hai proton *meta* thơm ở δ_H 6,19 (1H, $J = 2,4\text{ Hz}$, H-6) và 6,36 (1H, $J = 2,4\text{ Hz}$, H-8), ba proton thơm của hệ ABX ở δ_H 7,74 (1H, d, $J = 2,4\text{ Hz}$, H-2'), 7,26 (1H, d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-5'), 7,62 (1H, dd, $J = 8,4, 2,4\text{ Hz}$, H-6') (Bảng 3.13). Ngoài ra, tín hiệu của đoạn *p*-coumaroyl ở δ_H 7,70 (1H, d, $J = 16,2\text{ Hz}$, H-7'''), 6,39 (1H, d, $J = 16,2\text{ Hz}$, H-8'''), 7,46 (2H, d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-2''', H-6'''), 6,83 (2H, d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-3''', H-5''')/ δ_C 127,3 (C-1'''), 131,2 (C-2''', C-6'''), 116,8 (C-3''', C-5'''), 161,2 (C-4'''), 146,9 (C-7'''), 115,3 (C-8''') và 168,9 (C-9''') đã được quan sát. Vùng đường có ba proton anomer ở δ_H 5,55 (d, $J = 1,8\text{ Hz}$, H-1'')/ δ_C 100,8, 5,54 (d, $J = 7,8\text{ Hz}$, H-1'')/ δ_C 101,7 và 4,59 (d, $J = 1,8\text{ Hz}$, H-1'')/ δ_C 102,0 cũng như hai nhóm methyl thứ cấp ở δ_H 1,23 (3H,

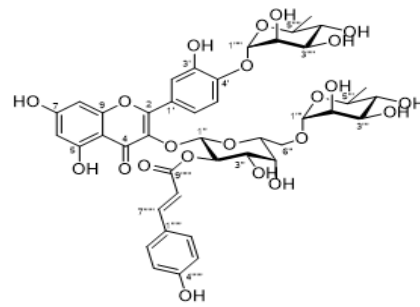
d, $J = 6,0$ Hz, H-6'') và 1,29 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-6'''). Đường được xác định là D-galactose và L-rhamnose bằng phương pháp thủy phân, tạo dẫn xuất và phân tích GC (Hình P3.2.2i, Hình P3.2.2m, Phụ lục 3.2). Bên cạnh đó đường được phân loại là β -D-galactopyranose và hai đơn vị α -L-rhamnopyranose dựa trên phổ COSY, HMBC và các phân tích hằng số ghép [58]. Trong phổ HMBC, mối tương quan của Rha H-1''' (δ_H 5,55) đến C-4' (δ_C 148,2), Gal H-1'' (δ_H 5,54) đến C-3 (δ_C 88,6), Rha H-1''' (δ_H 4,59) đến C-6'' (δ_C 67,3) và Gal H-2'' (δ_H 5,39) đến C-9''' (δ_C 168,9), chỉ ra rằng α -L-rhamnopyranose được kết nối với C-4', và [E-p-coumaroyl-(1 $\rightarrow$ 2), α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopyranoside được kết nối với C-3 của bộ khung flavonoid (Hình 3.11). Do đó, hợp chất **WAM11.5** được xác định là quercetin-3-O-[E-p-coumaroyl-(1 $\rightarrow$ 2)][α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopyranoside-4'-O- α -L-rhamnopyranoside, được đặt tên là adinanquercetiside (2) (Hình 3.12).



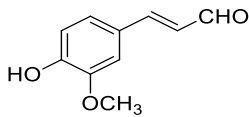
Hình 3.11. Tương tác 1H - 1H trong phổ COSY và HMBC của hợp chất **WAM11.5**



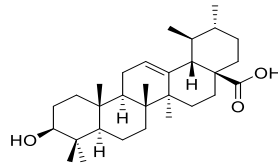
Debutylidorycnic acid (1)



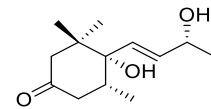
Adinanquercetiside (2)



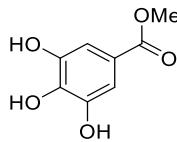
Coniferyl aldehyde (3)



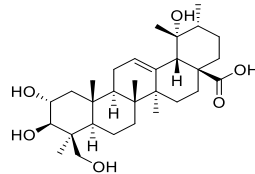
Ursolic acid (4)



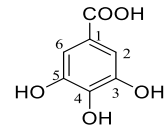
4,5-dihydroblumenol (5)



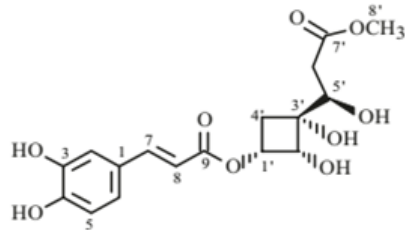
Methyl gallate (6)



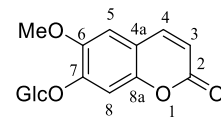
24-hydroxytormentoric acid (7)



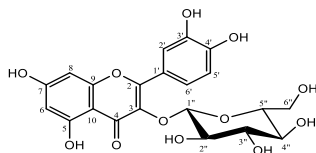
Gallic acid (8)



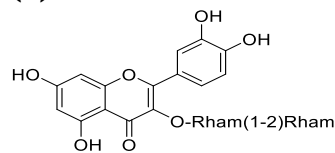
Convoldorin (9)



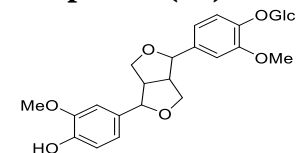
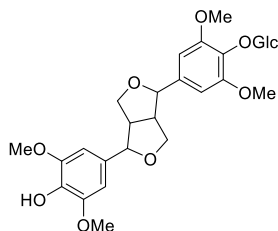
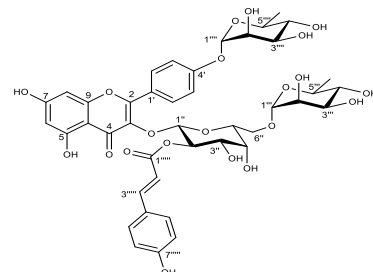
Scopoline (10)



Isoquercetin (11)



Horidin (12)

Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside (13)Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside (14)

Camellikaempferoside B (15)

Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. megaphylla*

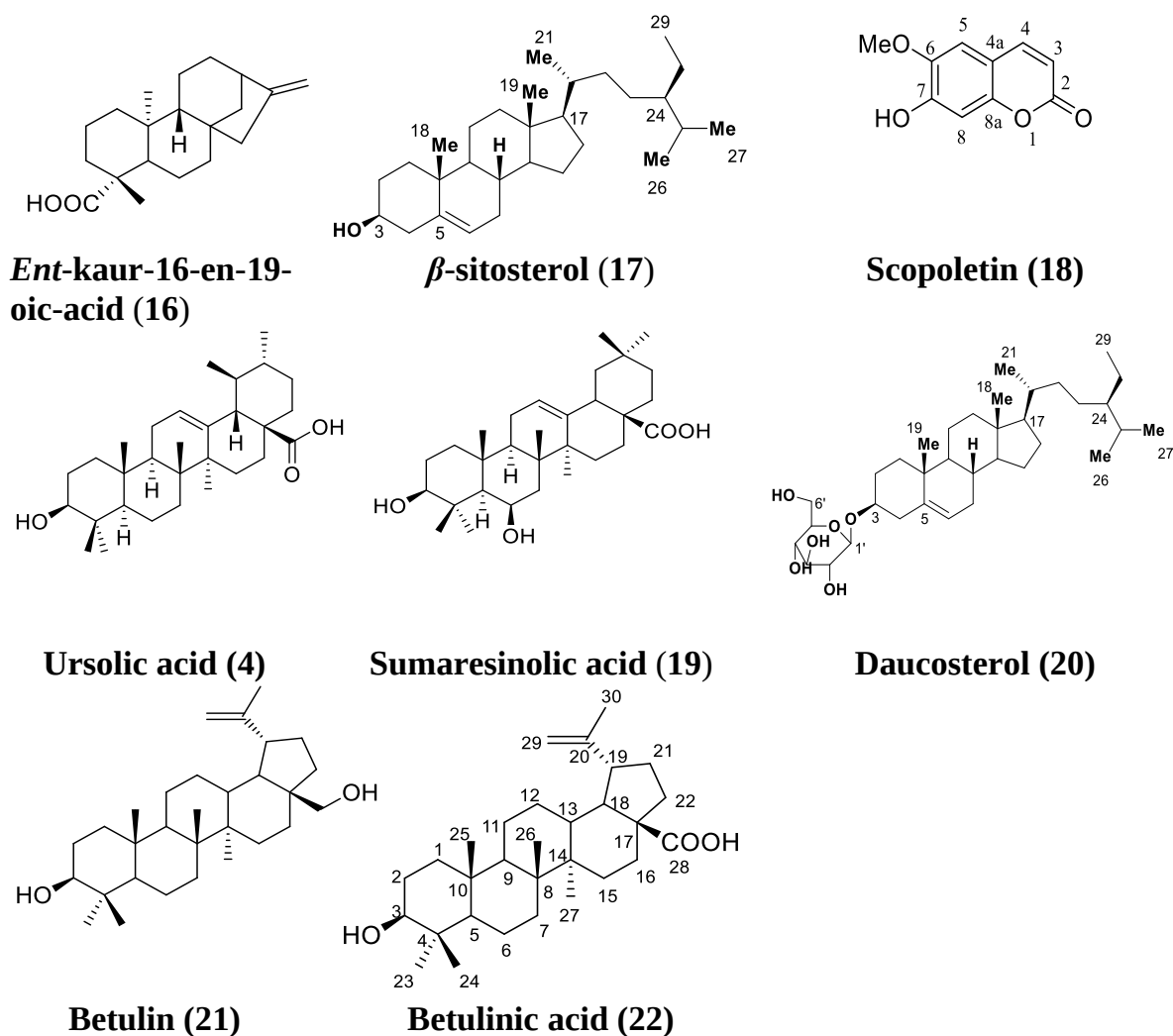
3.3.1.2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. bockiana*

Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của tám hợp chất từ lá của loài *A. bockiana* được trình bày theo sơ đồ hình P3.1.2 (Phụ lục 3.1) và bảng 3.14, hình 3.13. Tám hợp chất đã phân lập từ loài *A. bockiana* đều là những hợp chất đã được tìm thấy ở các loài thực vật khác; trong đó ursolic acid (**4**) đã được phân lập từ loài *A. megaphylla*. Phần lớn các hợp chất phân lập được thuộc nhóm triterpenoid (có 4/8 hợp chất: (**4**), (**19**), (**21**), (**22**)); hai hợp chất thuộc nhóm sterol (**17**), (**20**); nhóm coumarin (**18**); nhóm diterpenoid (**16**). Như vậy, cây *A. bockiana* cũng giàu các hợp chất nhóm triterpenoid giống cây *A. hainanensis*, *A. poilanei* ở Việt Nam trong các công bố trước đây [11], [133], [134], [135], [136].

Bảng 3.14. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. bockiana*

TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	E6.4.2	RP-18 (M:W 1,5:1)	BA1 (16)	[70]	<i>Ent-kaur-16-en-19-oic-acid</i>	5,0
2	E6.4.3	Silicagel c, c (H:E 9:1)	BA2 (17)	[123]	β -sitosterol	12,0
3	E10.8	Silicagel c, c (H:A 9:1)	BA15 (21)	[137]	Betulin	6,5
4	E10.10	Kết tinh	BA16 (22)	[65]	Betulinic acid	4,6
5	E16.1	Silicagel c, c (H:E 1:1)	BA3 (18)	[20]	Scopoletin	3,0
6	E16.4	RP-18 (M:W 3:1)	BA5 (4)	[19]	Ursolic acid	5,0
7	E21.1	Kết tinh	BA7 (20)	[47]	Daucosterol	15,0
8	E21.2	RP-18 (M:W 1,5:1)	BA4 (19)	[31]	Sumaresinolic acid	3,0

Chú thích: KH: Kí hiệu, KL: Khối lượng



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. bockiana*

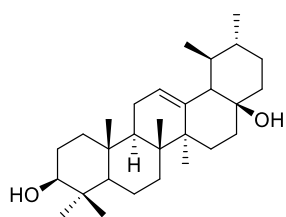
3.3.1.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *A. glischroloma*

Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. glischroloma* được mô tả theo sơ đồ hình P.3.1.3 (Phụ lục 3.1) và được tóm tắt trong bảng 3.15, hình 3.14. Từ lá của loài *A. glischroloma* phân lập được 14 hợp chất, là các hợp chất đã được tìm thấy trong các loài thực vật khác; trong đó có chín chất thuộc nhóm triterpenoid **(4)**, **(22)**-**(26)**, **(29)**, một chất thuộc nhóm diterpene **(16)**, một chất thuộc nhóm megastigmane **(30)**, một chất thuộc nhóm flavonoid **(11)**, một chất thuộc nhóm lignan **(31)** và một chất thuộc nhóm sterol **(17)**. Các chất cụ thể là: 28-nor-urs-12-ene-3 β ,17- β -diol **(23)**, micromeric acid **(24)**, 23-hydroxy ursolic acid **(25)**, euscaphic acid **(26)**, pomolic acid **(27)**, 3,13-dihydroxy ursolic acid -28,13-olide

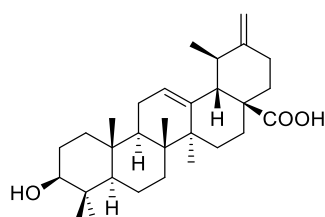
(28), ursolic acid (4), betulinic acid (22), oleanolic acid (29), *ent*-kaur-16-en-19-oic-acid (16), (3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol (30), quercetine-3-glucoside hoặc isoquercetin (11), syringaresinol (31) và β -sitosterol (17).

Bảng 3.15. Kết quả phân lập và xác định công thức hóa học của các hợp chất từ lá của loài *A. glischroloma*

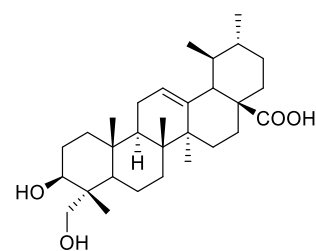
TT	Phân đoạn	Phương pháp phân lập	KH hợp chất	TLTK	Tên hợp chất	KL hợp chất (mg)
1	E3.7	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG16 (16)	[70]	<i>Ent</i> -kaur-16-en-19-oic-acid	3,1
2	E4	Silicagel c, c (H:D 5:1)	AG29 (17)	[123]	β -sistosterol	7,2
3	E4.2	Silicagel c, c (H:A 30:1)	AG2 (23)	[28]	28- <i>nor</i> -urs-12-ene-3 β ,17 β -diol	3,4
4	E6.6.3	RP-18 (M:W 10:1)	AG14 (22)	[65]	Betulinic acid	6,2
5	E6.6.5	RP-18 (M:W 10:1)	AG15 (29)	[19]	Oleanolic acid	5,5
6	E9.4	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG10 (28)	[18]	3, 13-dihydroxy ursolic acid 28, 13-olide	2,2
7	E9.7.1	Sephadex (MeOH)	AG18 (30)	[122]	(3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	3,2
8	E9.7.4	Silicagel c, c (H:E 9:1)	AG3 (24)	[21]	Micromeric acid	2,3
9	E9.7.6	RP-18 (M:W 1:1)	AG8 (27)	[127]	Pomolic acid	10,0
10	E12.2	Silicagel c, c (H:A 4:1)	AG28 (25)	[22], [27]	23-hydroxyursolic acid	4,2
11			AG11 (4)	[19]	Ursolic acid	3,2
12	E15.2.1	Silicagel c, c (D:M 100:1)	AG21 (31)	[114]	Syringaresinol	4,0
13	E15.2.5	RP-18 (A:W 1:1)	AG7 (26)	[147]	Euscaphic acid	2,0
14	W3.7.1	Sephadex (MeOH)	AG19 (11)	[75]	Isoquercetine	6,0



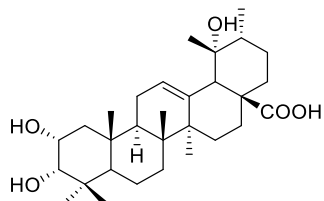
**28-nor-urs-12-ene-
3 β ,17 β -diol (23)**



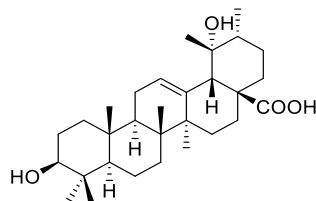
Micromeric acid (24)



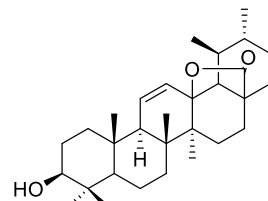
**23-hydroxy ursolic
acid (25)**



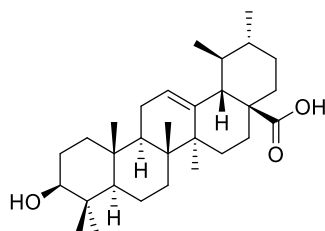
Euscaphic acid (26)



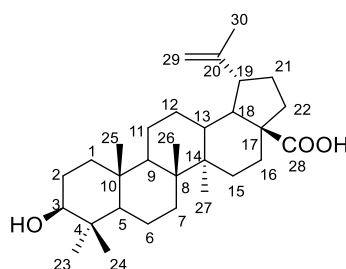
Pomolic acid (27)



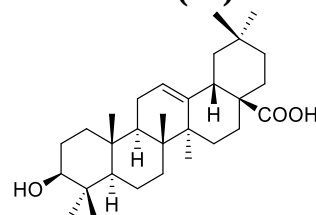
**3, 13-dihydroxy
ursolic acid 28,13-
olide (28)**



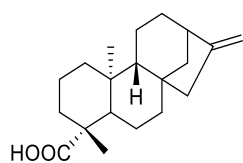
Ursolic acid (4)



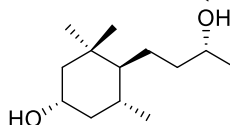
Betulinic acid (22)



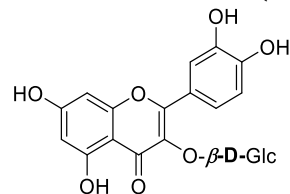
Oleanolic acid (29)



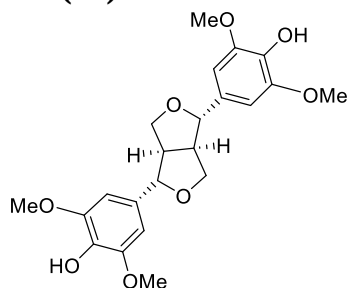
**Ent-kaur-16-en-19-oic-
acid (16)**



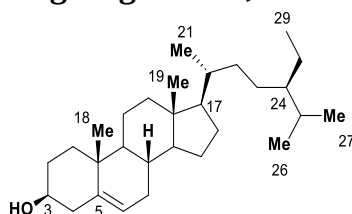
**(3S, 5R, 6S, 9R)-
megastigmane-3,9-diol (30)**



Isoquercitrin (11)



Syringaresinol (31)



β -sitosterol (17)

Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ lá của loài *A. glischroloma*

Trong số các hợp chất phân lập được, **(23)**-**(25)** và **(30)** chưa được mô tả ở các loài khác trong chi *Adinandra*; các hợp chất **(4)**, **(11)**, **(16)**, **(22)**, **(26)**-**(29)** và **(31)** phân bố trong các loài thuộc chi *Adinandra* (Bảng 3.16). β -sitosterol **(17)** là một hợp chất sterol rất phổ biến được tìm thấy trong nhiều loài thực vật [123]. Kết quả nghiên cứu đã bổ sung thêm những thành phần hóa học từ lá của loài *A. glischroloma* mà chưa từng được báo cáo trước đây.

Các hợp chất **(4)**, **(22)**, **(27)**, **(28)** và **(31)** trước đây đã được phân lập từ loài *A. poilanei* [133], [134], điều này cho thấy mối quan hệ phân loại hóa học chặt chẽ giữa loài *A. poilanei* và loài *A. glischroloma*. Các triterpene **(4)**, **(22)**, **(28)**, **(29)** trước đây đã được phân lập từ loài *A. hainanensis* [11], [135], [136], các hợp chất này cũng hỗ trợ mối quan hệ phân loại hóa học giữa các loài *A. hainanensis* và *A. glischroloma*. Hợp chất **(4)** và **(11)** đã được tìm thấy từ lá của loài *A. megaphylla*, **(16)** được phân lập từ lá của loài *A. bockiana*, trong khi triterpene **(26)** được phân lập từ lá của loài *A. nitida* [147] (Bảng 3.16), Những loài thuộc chi *Adinandra* trên có thể có chung con đường sinh tổng hợp tương tự đối với các thành phần hóa học khác nhau. Các nghiên cứu thành phần hóa học đã cho thấy loài *A. hainanensis*, *A. poilanei* và *A. glischroloma* ở Việt Nam rất giàu triterpene [11], [133], [134], [135], [136] khá khác biệt so với loài *A. nitida* của Trung Quốc (với hợp chất chính là flavonoid camellianin A) [49], [84], [85], [153], [154].

Các hợp chất **(23)**-**(25)** và **(30)** trước đây chưa được báo cáo ở bất kỳ loài nào thuộc chi *Adinandra* hoặc các chi khác thuộc họ Pentaphragaceae. Hợp chất 28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol **(23)** đã được tìm thấy trong một số loài thực vật thuộc họ Apocynaceae, Cornaceae, Gentianaceae và Myrtaceae (Bảng 3.17). Micromeric acid **(24)** đã được phân lập từ các loài thực vật thuộc họ Lamiaceae, Ericaceae và Plantaginaceae (Bảng 3.17). Megastigmane **(30)** chỉ được phân lập từ loài *Sedum sarmentosum* [109] và *Vitis vinifera* [122]. Sự tồn tại của các hợp chất **(23)**, **(24)** và **(30)** về bản chất khá hạn chế, do đó chúng có thể đóng vai trò là hợp chất đánh dấu phân loại hóa học cho *A. glischroloma*. Triterpene **(25)** trước đây đã được phân lập từ

nhiều họ thực vật (Bảng 3.17), tuy nhiên trong chi *Adinandra* hợp chất này lần đầu tiên được phân lập ở loài *A. glischroloma*.

Như vậy, kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin về thành phần hóa học có trong lá của loài *A. glischroloma* và bằng chứng về vị trí phân loại của các loài trong chi *Adinandra*. Các hợp chất (23)-(25) và (30) có thể đóng vai trò là chất đánh dấu phân loại hóa học giữa loài *A. glischroloma* với một số loài khác thuộc chi *Adinandra* (*A. megaphylla*, *A. bockiana*, *A. hainanensis*, *A. poilanei* và *A. lienii*). Kết quả cho thấy, *A. glischroloma* rất giàu triterpene năm vòng và có mối quan hệ chặt chẽ về mặt thành phần hóa học với các loài thuộc chi *Adinandra* khác của Việt Nam như *A. hainanensis* và *A. poilanei*.

Bảng 3.16. Sự phân bố của các hợp chất (4), (11), (16), (22), (26)-(29) và (31) ở các loài thuộc chi *Adinandra*

KH hợp chất	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
4	Ursolic acid	<i>A. poilanei</i>	Lá	[134]
		<i>A. hainanensis</i>	Lá	[11]
		<i>A. megaphylla</i>	Lá	
		<i>A. bockiana</i>	Lá	
		<i>A. lienii</i>	Lá	[5]
11	Isoquercitrin	<i>A. megaphylla</i>	Lá	
16	ent-kaur-16-en-19-oic-acid	<i>A. bockiana</i>	Lá	
22	Betulinic acid	<i>A. hainanensis</i>	Thân	[136]
		<i>A. hainanensis</i>	Lá	[11]
		<i>A. poilanei</i>	Thân	[133]
		<i>A. lienii</i>	Lá	[5]
		<i>A. bockiana</i>	Lá	
26	Euscaphic acid	<i>A. nitida</i>	Lá	[147]
27	Pomolic acid	<i>A. poilanei</i>	Lá	[134]
28	3,13-dihydroxy ursolic acid 28,13-olide	<i>A. hainanensis</i>	Lá	[11]
		<i>A. poilanei</i>	Lá	[134]
29	Oleanolic acid	<i>A. hainanensis</i>	Thân	[135]
31	Syringaresinol	<i>A. poilanei</i>	Lá	[134]

Bảng 3.17. Sự phân bố của các hợp chất (23)-(25) và (30) ở thực vật

KH hợp chất	Tên hợp chất	Phân lập từ loài	TLTK
23	28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol	<i>Swertia mileensis</i> (Gentianaceae)	[151]
		<i>Alstonia scholaris</i> (Apocynaceae)	[62]
		<i>Eucalyptus cladocalyx</i> (Myrtaceae)	[28]
		<i>Camptotheca acuminata</i> (Cornaceae)	[55]
24	Micromeric acid	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Plantaginaceae)	[36]
		<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)	[21]
		<i>Rhododendron adamsii</i> (Ericaceae)	[117]
25	23-hydroxy ursolic acid	<i>Elsholtzia densa</i> (Lamiaceae)	[142]
		<i>Viburnum lutescens</i> (Adoxaceae)	[64]
		<i>Carissa carandas</i> (Apocynaceae)	[27]
		<i>Patrinia saniculaefolia</i> (Caprifoliaceae)	[22]
		<i>Schefflera barteri</i> (Araliaceae)	[95]
		<i>Myrtus communis</i> (Myrtaceae)	[82]
		<i>Ilex hainanensis</i> (Aquifoliaceae)	[155]
30	(3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	<i>Lagerstroemia speciosa</i> (Lythraceae)	[90]
		<i>Sedum sarmentosum</i> (Crassulaceae)	[109]
		<i>Vitis vinifera</i> (Shiraz) (Vitaceae)	[122]

3.3.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

3.3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn của một số hợp chất phân lập được

Mười bốn hợp chất được thử hoạt tính kháng khuẩn ở các nồng độ 100; 200 và 400 $\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch trên nấm chủng vi khuẩn kiểm định. Sử dụng kháng sinh penicillin 200 $\mu\text{g/mL}$ làm đối chứng dương và DMSO 1% làm đối chứng âm. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất được thể hiện ở bảng 3.18.

Có 2/14 hợp chất ((1) và (12)) không có khả năng ức chế sự phát triển của bất kỳ chủng vi khuẩn nào ($H = 0$), trong đó (1) là hợp chất mới (Debutyldorycnic acid). Các hợp chất còn lại có hoạt tính kháng khuẩn với các mức độ khác nhau tùy thuộc vào nồng độ hợp chất và chủng vi khuẩn thử nghiệm. Hầu hết các hợp chất ở nồng độ 100

$\mu\text{g/mL}$ không có khả năng ức chế sự phát triển của bất kỳ một chủng vi khuẩn nào (trừ **(4)** và **(11)**). Với mỗi chủng vi khuẩn nhất định thì khả năng kháng khuẩn của mỗi hợp chất tỷ lệ thuận với nồng độ thử nghiệm, các hợp chất có hoạt tính mạnh nhất ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$.

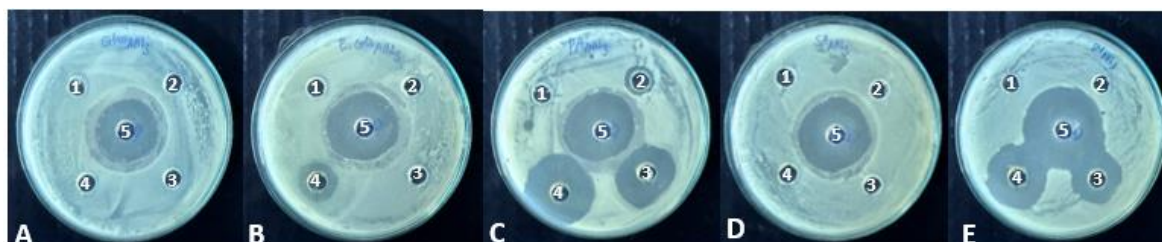
Các hợp chất **(2)**, **(3)**, **(6)**, **(7)**, **(10)**, **(27)** và **(31)** chỉ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$. Trong đó, hợp chất **(3)** và **(7)** có khả năng ức chế 2/5 chủng vi khuẩn là *S. aureus*, *S. milleri* và **(3)** có hoạt tính mạnh hơn **(7)** với đường kính vùng ức chế lần lượt với mỗi chủng là 17,23 mm, 12,36 mm; trong khi hợp chất **(7)** có vùng ức chế trên ba chủng đều nhỏ hơn 15 mm (ức chế yếu). Hợp chất **(6)** không có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *C. freundii* ở các nồng độ thử nghiệm và có hoạt tính yếu với 4/5 chủng còn lại ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất **(10)** có hoạt tính kháng khuẩn yếu với chủng vi khuẩn *C. freundii*, *S. milleri* và có khả năng ức chế không đáng kể với vi khuẩn *S. aureus* ($H = 4,12$ mm). Hợp chất **(27)** có hoạt tính yếu và không đáng kể với 4/5 chủng vi khuẩn (trừ chủng *P. aeruginosa*). Các hợp chất **(31)** và **(2)** chỉ có hoạt tính rất yếu trên chủng *S. milleri* ($H = 6,12$ mm; $H = 5,09$ mm) và không thể hiện hoạt tính với các chủng vi khuẩn khác (Bảng 3.18).

Các hợp chất **(8)**, **(22)** và **(17)** có khả năng ức chế sự phát triển của một số chủng vi khuẩn từ nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$. Cụ thể, hợp chất **(8)** có khả năng ức chế sự phát triển của các chủng *P. aeruginosa*, *S. milleri*, *E. coli*; trong đó, ức chế mạnh nhất ($H = 17,47$ mm) đối với chủng *S. milleri* và yếu nhất với chủng *E. coli* ($H = 12,55$ mm). Ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **(8)** thể hiện hoạt tính kháng mạnh ($H = 21,21$ mm) với chủng *S. milleri*; có hoạt tính trung bình với chủng *P. aeruginosa* và *S. aureus*; thể hiện hoạt tính kháng yếu ($H = 14,02$ mm) với chủng *E. coli*. Nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **(22)** chỉ có khả năng ức chế yếu chủng *C. freundii*. Khi nồng độ tăng lên 400 $\mu\text{g/mL}$ đã làm tăng hoạt tính của các hợp chất, **(22)** thể hiện hoạt tính yếu với 3/5 chủng vi khuẩn (trừ chủng *S. aureus* và *S. milleri*). Từ nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **(17)** đã có khả năng ức chế sự phát triển của 3/5 chủng vi khuẩn và có hoạt tính kháng khuẩn ở mức trung bình trên cả ba chủng khi nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 3.18).

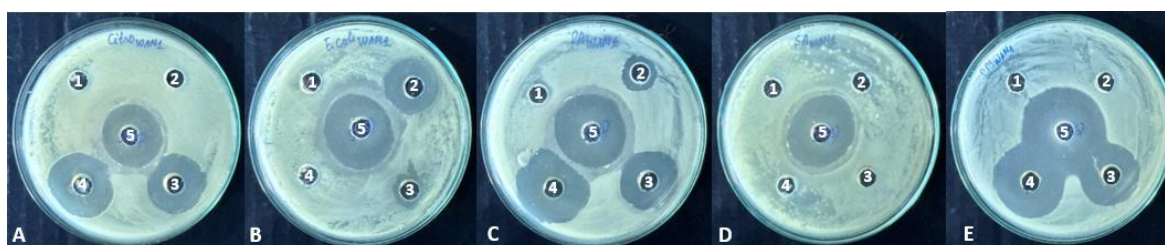
Bảng 3.18. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của một số hợp chất phân lập từ ba loài nghiên cứu

KH hợp chất	Nồng độ (µg/mL)	Chủng vi khuẩn và đường kính vùng ức chế (mm)				
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. milleri</i>	<i>E. coli</i>
1	Không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn ở bất kỳ nồng độ nào (H = 0)					
2	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	5,09±1,05	0
3	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	17,23±0,08	0	12,36±1,12	0
4	100	4,21±0,05	0	0	0	0
	200	20,22±0,98	0	0	15,12±0,89	0
	400	23,02±1,05	0	0	20,13±1,21	10,55±0,73
6	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	6,78±2,02	7,56±1,47	0	8,86±0,32	6,24±1,19
7	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	9,21±1,03	0	10,21±0,82
8	100	0	0	0	0	0
	200	16,11±1,03	0	0	17,47±1,14	12,55±0,84
	400	18,26±1,07	16,48±0,09	0	21,21±1,42	14,02±0,04
10	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	4,12±0,67	11,12±2,03	9,34±0,75	0
11	100	6,67±1,54	0	0	0	0
	200	17,09±1,04	0	17,31±0,25	18,26±1,36	5,08±1,57
	400	21,01±2,11	0	22,18±0,48	23,15±1,66	17,32±1,09
12	Không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn ở bất kỳ nồng độ nào (H = 0)					
17	100	0	0	0	0	0
	200	0	4,56±0,93	0	5,22±0,99	6,36±1,13
	400	0	17,35±1,47	0	17,92±0,08	18,21±1,54
22	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	6,15±1,32	0	0
	400	8,05±1,04	0	9,65±0,86	0	7,23±0,76
27	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	6,34±1,05	10,22±1,75	8,58±0,05	5,08±1,52
31	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	6,12±0,98	0
DMSO	1%	0	0	0	0	0
Penicillin	200	22,85±0,67	23,01±1,65	18,14±0,21	26,57±1,02	23,00±0,86

Chú thích: 1: Debutyldorycnic acid; 2: Adinanquercetiside, 3: Coniferyl aldehyde; 4: Ursolic acid; 6: Methyl gallate; 7: 24-hydroxytormentic acid; 8: Gallic acid; 10: Scopoline; 11: Isoquercetine; 12: Horidin; 17: β -sistosterol; 22: Betulinic acid; 27: Pomolic acid; 31: Syringaresinol.



(a)



(b)

Hình 3.15. Hoạt tính kháng khuẩn của hợp chất ursolic acid (a) và isoquercetine (b)

A: *C. freundii*, B: *E. coli*, C: *P. aeruginosa*, D: *S. aureus*, E: *S. milleri*; 1. DMSO 1%, 2. Nồng độ 100 µg/mL, 3. Nồng độ 200 µg/mL, 4. Nồng độ 400 µg/mL, 5. Penicillin 200 µg/mL.

Các hợp chất **(4)** và **(11)** có khả năng ức chế rất yếu sự phát triển của chủng *P. aeruginosa* từ nồng độ 100 µg/mL với giá trị H lần lượt 4,21 và 6,67 mm (Bảng 3.18). Ở nồng độ 200 µg/mL, hợp chất **(4)** có hoạt tính kháng khuẩn với chủng *P. aeruginosa* mạnh, có hoạt tính trung bình với chủng *S. milleri*. Khi nồng độ tăng lên 400 µg/mL, hợp chất **(4)** có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với cả hai chủng *P. aeruginosa*, *S. milleri* (H = 23,02 mm; 20,13 mm) và ức chế yếu với chủng *E. coli* (H = 10,55 mm) (Hình 3.15a). Hợp chất **(11)** không có khả năng ức chế sự phát triển của chủng vi khuẩn *S. aureus* ở tất cả các nồng độ khảo sát, ức chế rất yếu chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* ở nồng độ 100 µg/mL và chủng vi khuẩn *E. coli* ở nồng độ 200 µg/mL. Hợp chất **(11)** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trung bình và

mạnh từ nồng độ 200 µg/mL với các chủng vi khuẩn còn lại. Đặc biệt ở nồng độ 400 µg/mL, hợp chất **(11)** có khả năng ức chế mạnh chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* (H = 21,01 mm); *C. freundii* (H = 22,18 mm) và *S. milleri* (H = 23,15 mm) (Hình 3.15b).

Trong phạm vi nghiên cứu, nếu với mỗi một chủng vi khuẩn chọn ra một hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất thì kết quả thu được như sau: hợp chất **(4)** ức chế vi khuẩn *P. aeruginosa*; **(11)** ức chế vi khuẩn *C. freundii*, *S. milleri*; **(17)** ức chế vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*. Trong đó, hợp chất **(4)** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với chủng *P. aeruginosa* từ nồng độ 200 µg/mL, thậm chí cao hơn kháng sinh penicillin 200 µg/mL khi nồng độ 400 µg/mL. Trong số 14 hợp chất thử nghiệm thì hợp chất **(17)** có khả năng ức chế mạnh nhất chủng *S. aureus* và *E. coli*; tuy nhiên, ở nồng độ 400 µg/mL cũng chỉ cho hoạt tính kháng khuẩn trung bình và thấp hơn khá nhiều so với penicillin 200 µg/mL. Như vậy, trong phạm vi nghiên cứu thì ursolic acid **(4)**, isoquercetine **(11)** là những hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất. Cụ thể, hợp chất **(4)** ức chế mạnh vi khuẩn *P. aeruginosa* và hợp chất **(11)** với đối *C. freundii*, *S. milleri*.

3.3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được

Các hợp chất được thử hoạt tính gây độc tế bào với nồng độ thử tối đa 200 µg/mL trên bốn dòng tế bào ung thư ở người gồm: ung thư biểu mô phổi (SK-LU-1), ung thư biểu mô dạ dày (MKN-7), ung thư biểu mô tế bào gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7) và tế bào thận phôi người (HEK-293A) được sử dụng làm đối chứng. Trong đó, các hợp chất **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(5)**, **(7)**, **(9)**, **(10)** và từ **(12)**-**(15)** thử nghiệm khả năng gây độc trên các dòng tế bào ung thư SK-LU-1, MKN-7, HepG2; các hợp chất **(16)**, **(23)**-**(26)**, **(29)** và **(30)** thử nghiệm trên hai dòng tế bào là HepG2 và MCF-7. Bảng 3.19 cho thấy, hợp chất **(7)** có khả năng gây độc rất yếu đối với cả bốn dòng tế bào được thử nghiệm (trong đó có cả dòng tế bào HEK-293A) với giá trị IC₅₀ dao động từ 179,37-191,87 µg/mL. Hợp chất **(10)** có khả năng gây độc mức trung bình với hai dòng tế bào HepG2 và MCF-7 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 32,00 và 43,63 µg/mL; không có khả năng gây độc với các dòng

tế bào ung thư SK-LU-1, MKN-7 và đối chứng (HEK-293A). Các hợp chất **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(5)**, **(9)**, **(12)**-**(15)** không có khả năng gây độc với bốn dòng tế bào thử nghiệm, giá trị $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Bảng 3.19).

Các hợp chất **(16)**, **(23)** và **(25)** có khả năng gây độc trên cả hai dòng tế bào ung thư HepG2 và MCF-7; hợp chất **(29)** chỉ gây độc trên một dòng tế bào MCF-7; ba hợp chất **(24)**, **(26)**, **(30)** không có khả năng gây độc trên cả hai dòng tế bào ung thư thử nghiệm ($IC_{50} > 128 \mu\text{g/mL}$). Các hợp chất **(16)**, **(23)** và **(25)** có khả năng gây độc dòng tế bào HepG2 với giá trị IC_{50} từ $3,28 \mu\text{g/mL}$ đến $72,41 \mu\text{g/mL}$; trong đó, hợp chất **(25)** có hoạt tính mạnh nhất với giá trị $IC_{50} = 3,28 \mu\text{g/mL}$; yếu nhất là hợp chất **(23)** với IC_{50} là $72,41 \mu\text{g/mL}$. Các hợp chất **(16)**, **(23)**, **(25)** và **(29)** có khả năng gây độc dòng tế bào MCF-7 với giá trị IC_{50} từ $1,16 \mu\text{g/mL}$ đến $98,28 \mu\text{g/mL}$. Trong đó, hợp chất **(25)** có hoạt tính mạnh nhất ($IC_{50} = 1,16 \mu\text{g/mL}$), yếu nhất là **(29)** với giá trị IC_{50} là $98,28 \mu\text{g/mL}$. Tất cả các hợp chất **(16)**, **(23)**-**(26)**, **(29)**, **(30)** đều không có biểu hiện gây độc với dòng tế bào HEK-293A (Bảng 3.19).

Kết quả xác định hoạt tính gây độc tế bào ung thư của 18 hợp chất cho thấy, hợp chất 24-hydroxytormentic **(7)** có biểu hiện gây độc rất yếu với ba dòng tế bào ung thư (SK-LU-1, MKN-7, HepG2), đồng thời **(7)** có biểu hiện gây độc với cả dòng tế bào bình thường (HEK-293A). Scopolin **(10)** có khả năng gây độc mức trung bình với hai dòng tế bào HepG2 và MCF-7. Các hợp chất kaurenoic acid **(16)**, 28-nor-urs-12-ene- $3\beta,17\beta$ -diol **(23)**, oleanolic acid **(29)** có khả năng gây độc yếu với dòng HepG2 và MCF-7 nhưng không gây độc với dòng tế bào HEK-293A; trong khi các hợp chất còn lại (bao gồm hai hợp chất mới) không có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Như vậy, trong 18 hợp chất được thử hoạt tính thì 23-hydroxyursolic acid **(25)** có hoạt tính gây độc mạnh trên cả hai dòng tế bào HepG2, MCF-7 và không gây độc với dòng tế bào phôi thận bình thường (HEK-293A).

Bảng 3.19. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất

KH hợp chất	Tên hợp chất	IC ₅₀ (µg/mL)				
		SK- LU-1	MKN- 7	HEK- 293A	HepG2	MCF-7
1	Debutyldorycnic acid	> 200	> 200	> 200	> 200	-
2	Adinanquercetiside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
4	Ursolic acid	> 200	> 200	> 200	> 200	-
5	4,5-dihydroblumenol	> 200	> 200	> 200	> 200	-
7	24-hydroxytormentic	181,89± 3,11	189,03± 3,02	191,87± 2,94	179,37± 2,86	-
9	Convoldorin	> 200	> 200	> 200	> 200	-
10	Scopoline	> 200	> 200	> 200	32,00±0,75	43,63±1,34
12	Horidin	> 200	> 200	> 200	> 200	-
13	Pinoresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
14	Syringaresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside	> 200	> 200	> 200	> 200	-
15	Camellikaempferoside B	> 200	> 200	> 200	> 200	-
16	Kaurenoic acid	-	-	>128	67,03±1,62	65,19±1,69
23	28-nor-urs-12-ene-3β,17 β-diol	-	-	>128	72,41±1,03	79,44±0,79
24	Micromeric acid	-	-	>128	>128	>128
25	23-hydroxyursolic acid	-	-	>128	3,28±0,17	1,16±0,03
26	Euscaphic acid	-	-	>128	>128	>128
29	Oleanolic acid	-	-	>128	>128	98,28±3,23
30	3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	-	-	>128	>128	>128
ĐC (+)	Ellipticine	0,34 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,32± 0,03	0,47± 0,06	0,43±0,02
ĐC (-)	DMSO	Không có khả năng gây độc bất kỳ dòng tế bào nào				

Chú thích: (-): Không thử nghiệm; ĐC (+): Đối chứng dương (Ellipticine được thử nghiệm ở các nồng độ 10; 2; 0,4 và 0,08 µg/mL. ĐC (-): Đối chứng âm (DMSO được thử nghiệm ở nồng độ 1%).

Trong những công bố trước, các hợp chất thuộc nhóm flavonoid (camellianin A, camellianin B, apigenin) và nhóm phenolic từ các loài thuộc chi *Adinandra* ở

Trung Quốc gồm: *A. nitida*, *A. glischroloma* var. *jubata*, *A. millettii* và *A. latifolia* có hoạt tính gây độc một số dòng tế bào ung thư [38], [150]. Kết quả của nghiên cứu này còn cho thấy, một số hợp chất thuộc nhóm triterpenoid cũng có khả năng gây độc tế bào ung thư dòng HepG2 và MCF-7 như 23-hydroxyursolic acid; 28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol; kaurenoic acid, đặc biệt 23-hydroxyursolic acid có hoạt tính mạnh. Ở những nghiên cứu khác trên một số loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam cũng cho kết quả tương tự; các hợp chất betulinic acid, ursolic acid, pomolic acid thuộc nhóm triterpenoid được phân lập từ loài *A. hainanensis* và *A. poilanei* cũng có khả năng gây độc một số dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU) và ung thư vú (MCF-7) [11], [134], [135], [136].

3.3.2.3. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất phân lập được

Các hợp chất phân lập từ lá của ba loài *A. megaphylla*, *A. bockiana* và *A. glischroloma* được thử hoạt tính ức chế α -glucosidase ở các nồng độ 0,5; 2; 8; 32; 128 μ g/mL (Acarbose được sử dụng làm đối chứng dương). Kết quả bảng 3.20 cho thấy, có 7/18 hợp chất có tác dụng ức chế α -glucosidase với các mức độ khác nhau, 11 hợp chất không có hoạt tính này (trong đó có hai hợp chất mới). Cụ thể, các hợp chất **(4)**, **(5)**, **(7)**, **(16)**, **(23)**, **(25)** và **(29)** có khả năng ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} dao động từ 1,00-98,91 μ g/mL; các hợp chất này đều có hiệu quả ức chế mạnh hơn đối chứng (IC_{50} = 147 μ g/mL) và giá trị IC_{50} lần lượt của các hợp chất **(4)**, **(5)**, **(7)**, **(16)**, **(23)**, **(25)**, **(29)** là 27,52; 13,67; 18,38; 13,08; 98,91; 1,00; 4,16 μ g/mL. Trong đó, 23-hydroxyursolic acid **(25)** có hoạt tính mạnh nhất với IC_{50} = 1,00 μ g/mL cao gấp khoảng 147 lần đối chứng. Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase (IC_{50} > 128 μ g/mL) trong đó có hai hợp chất mới.

Như vậy, xếp theo thứ tự giảm dần thì 23-hydroxyursolic acid **(25)** có hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh nhất, tiếp theo là hợp chất oleanolic acid **(29)**; kaurenoic acid **(16)**; 4,5-dihydroblumenol **(5)**; 24-hydroxytormentic **(7)**; ursolic acid **(4)** và yếu nhất là 28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol **(23)**. Đặc biệt, tất cả các hợp chất đều có hoạt tính mạnh hơn rất nhiều lần so với acarbose.

Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các hợp chất phân lập được

KH hợp chất	Tên hợp chất	IC ₅₀ (μ g/mL)	KH hợp chất	Tên hợp chất	IC ₅₀ (μ g/mL)
1	Debutyldorycnic acid	> 128	15	Camellikaempferoside B	> 128
2	Adinanquercetiside	> 128	16	Kaurenoic acid	13,08 $\pm$ 0,94
4	Ursolic acid	27,52 $\pm$ 0,51	23	28-nor-urs-12-ene-3 β ,17 β -diol	98,91 $\pm$ 5,78
5	4,5-dihydroblumenol	13,67 $\pm$ 0,42	24	Micromeric acid	>128
7	24-hydroxytormentic	18,38 $\pm$ 0,41	25	23-hydroxyursolic acid	1,00 $\pm$ 0,07
9	Convoldorin	> 128	26	Euscaphic acid	>128
10	Scopoline	> 128	29	Oleanolic acid	4,16 $\pm$ 0,27
12	Horidin	> 128			
13	Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	> 128	30	3S, 5R, 6S, 9R)-megastigmane-3,9-diol	>128
14	Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside	> 128	ĐC	Acarbose	147,86 $\pm$ 4,69

Vu và cs (2019, 2021, 2022) cũng đã chứng minh khả năng ức chế mạnh α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ loài *A. hainanensis* và *A. poilanei*. Cụ thể, các hợp chất betulinic acid, ursolic acid, triterpene lupan-3 β , 20-dihydroxy-28 carbaldehyde (phân lập từ lá và thân của loài *A. hainanensis*); các hợp chất massagenic acid I, oleanderolide, platanic acid, pomolic acid (phân lập từ lá của loài *A. poilanei*) có khả năng ức chế mạnh hoạt tính của α -glucosidase với các giá trị IC₅₀ lần lượt nằm trong các khoảng từ 2,27-12,25 μ g/mL và từ 1,29-3,13 μ g/mL [134], [135], [136]. Như vậy, 23-hydroxyursolic acid được phân lập từ lá của loài *A. glischroloma* có hoạt tính mạnh nhất trong tất cả các hợp chất phân lập từ chi *Adinandra* ở Việt Nam đã được thử hoạt tính ức chế α -glucosidase.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana* (mã số MW699853.1) với kích thước 156284 bp, có cấu trúc bốn vùng điển hình gồm vùng LSC (85693 bp), vùng SSC (18411 bp) và cặp vùng IRa và IRb (26090 bp/vùng), hàm lượng GC chiếm 37,4%, có 129 gene, 70 trình tự lặp lại và 51 SSR. Trong hệ gene lục lạp của loài *A. bockiana*, gene *ycf1* không được tìm thấy tại ranh giới giữa IRa và SSC giống như các loài khác trong chi *Adinandra*. Các loài thuộc chi *Adinandra* có sự sai khác về số lượng gene của hệ gene lục lạp, loài *A. bockiana* (129 gene), loài *A. megaphylla* (131 gene), loài *A. millettii* và loài *A. angustifolia* (132 gene).

1.2. Các biến thể trình tự gene tìm thấy chủ yếu ở vùng không mã hóa. Trong vùng mã hóa, các gene *matK*, *psaA*, *ndhK*, *ndhG* và *rbcL* có các đoạn nucleotide khác nhau giữa bốn loài *A. bockiana*, *A. megaphylla*, *A. millettii* và *A. angustifolia*. Vùng LSC và SSC chứa nhiều biến thể hơn vùng IR, trong đó vùng LSC chứa nhiều biến thể nhất. Gene *matK* và *rbcL* được đề xuất là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng giúp hỗ trợ nhận diện loài thuộc chi *Adinandra*.

1.3. Phân lập được 15 hợp chất từ loài *A. megaphylla*, 8 hợp chất từ loài *A. bockiana*, 14 hợp chất từ loài *A. glischroloma*; trong đó có hai chất mới được đặt tên là debutyldorycnic acid và adinanquercetiside. Các hợp chất phân lập được từ ba loài đa số thuộc nhóm triterpenoid. Hợp chất 23-hydroxyursolic acid phân lập từ loài *A. glischroloma* có hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan (HepG2) và ung thư vú (MCF-7) mạnh nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,28 và 1,16 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất 23-hydroxyursolic acid có hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh nhất ($IC_{50} = 1,00 \mu\text{g/mL}$). Chất ursolic acid có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* và isoquercetine với chủng *C. freundii*, *S. milleri*.

2. Kiến nghị

2.1. Tiếp tục phân tích trình tự hệ gene lục lạp của các loài thuộc chi *Adinandra* để cung cấp thêm dữ liệu, tìm kiếm các vùng gene tiềm năng làm mã vạch DNA phục vụ định danh loài.

2.2. Tiếp tục đánh giá các hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm, kháng virus của hai hợp chất mới (debutyldorycnic acid và adinanquercetiside) nhằm xác định tiềm năng ứng dụng của các hợp chất này trong thực tiễn.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Pho Thi Thuy Hang**, Nguyen Thi Thu Nga, Sy Danh Thuong, Le Nguyen Thanh, Nguyen Van Phuong, Chu Hoang Mau, Nguyen Huu Quan (2024), “Chemical constituents of *Adinandra glischroloma* Hand.-Mazz. and their chemotaxonomic significance”, *Biochemical Systematics and Ecology* (SCIE, Q3, IF: 1,4), 113, 104803. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2024.104803>
2. Quan N. H., **Hang P. T. T.**, Nga N. T. T., Duc H. V., Hue V. T., Thuong S. D., Thanh L. N., Mau C. H. (2023), “Chemical constituents and biological activities of the leaves of *Adinandra megaphylla*”, *Phytochemistry Letters* (SCIE, Q2, IF: 1,873), 56, pp. 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.06.002>
3. Nga Thi Thu Nguyen, **Hang Thi Thuy Pho**, Quan Huu Nguyen, Nhung Thi Doan, Lan Thi Ngoc Nguyen, Huong Mai Pham, Lam Tung Le, Thuong Danh Sy, Ha Hoang Chu, Lien Thi Kim Vu, Mau Hoang Chu (2023), “Characteristics of the chloroplast genome of *Adinandra bockiana* and comparative analysis with species of *Pentaphylacaceae* family”, *Plant Molecular Biology Reporter* (SCIE, Q2, IF: 1,816), 41, pp. 611-621. <https://doi.org/10.1007/s11105-023-01389-3>.
4. **Phó Thị Thúy Hằng**, Trần Đại Dương, Nguyễn Thị Thu Nga, Từ Quang Tân, Nguyễn Hữu Quân, Chu Hoàng Mậu (2022), “Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết từ thân của loài Sum lông”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 227(05), tr. 186-194. DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5561>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Hoàng Lê Tuấn Anh (2015), “Nghiên cứu thành phần hóa học cây Lu lu đực (*Solanum nigrum* L.) tại tỉnh Thái Bình”, *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ VI*, tr. 1025-1031.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam*, phần II. Thực vật, Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 23, 342-343.
3. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam* (Bộ mới), tập 2, Nxb. Y học, tr. 734-735.
4. Nguyễn Thanh Điềm, Lê Thị Lý, Nguyễn Hữu Thuần Anh, Nguyễn Thành Công, Vũ Thị Huyền Trang (2020), "Xây dựng bản đồ bộ gene lục lạp hoàn chỉnh của loài Lan hài hồng (*Paphiopedilum delenatii* Guillaumin 1924) đặc hữu Việt Nam", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(1), tr. 87-102.
5. Đỗ Văn Hiệu, Vũ Thị Kim Oanh, Nguyễn Hữu Quân, Văn Thị Mỹ Huệ, Phạm Hà Thanh Tùng, Lê Nguyễn Thành, Hoàng Thị Minh Hiền, Đỗ Hải Hà (2021), “Một số hợp chất phân lập từ lá loài Sum liên (*Adinandra lienii* Hien & Yakovlev)”, *Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 2, tr. 36-41.
6. Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh.
7. Huỳnh Thị Thu Huệ, Đào Quang Hà, Lê Hồng Điệp, Nguyễn Đăng Tôn (2021), “Đánh giá khả năng phân loại của hai chỉ thị *rbcL* và *trnL* với một số mẫu Bách bộ (*Stemonaceae*) thu tại phía Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 63(8), tr. 25-29. [https://doi.org/10.31276/VJST.63\(8\).25-29](https://doi.org/10.31276/VJST.63(8).25-29).
8. Vũ Đức Lợi, Phạm Giang Lam, Hoàng Văn Hùng và Nguyễn Thị Phương (2016), “Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ lá cây Gối hạc (*Leea rubra* Blume ex Spreng.)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Y Dược*, 32(1), tr. 12-17.
9. Nguyễn Thị Thu Ngà, Phan Thị Mai, Đào Thị Thu Hà, Phạm Thị Hòa, Nguyễn Hữu Quân (2020), "Nghiên cứu hình thái, giải phẫu và phương pháp khử trùng

- tạo mẫu sạch phục vụ nhân giống *in vitro* cây *Adinandra Adinandra* sp.", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 225(08), tr. 134-141.
10. Vũ Thị Kim Oanh, Bùi Thu Hà, Đinh Ngọc Thức, Lê Nguyễn Thành (2021), “Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ loài *Adinandra poilanei* Gagnep”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 63 (7), tr. 22-25. [https://doi.org/10.31276/VJST.63\(7\).22-25](https://doi.org/10.31276/VJST.63(7).22-25).
 11. Vũ Thị Kim Oanh, Phạm Thị Lan Phương, Đinh Ngọc Thức, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Thị Minh Hằng, Lê Nguyễn Thành (2019), “Hợp chất triterpen và tác dụng sinh học từ lá cây Sum hải nam (*Adinandra hainanensis* Hayata)”, *Tạp chí Dược học*, 59(523), tr. 65 – 68.
 12. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh
 13. Nguyễn Hữu Quân, Kiều Thị Trà Giang (2015), “Sử dụng mã vạch DNA *matK* để định danh mẫu Sum liên thu tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam,” *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 197(04), tr. 205-210.
 14. Nguyễn Hữu Quân, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Ngà, Sỹ Danh Thường, Chu Hoàng Mậu (2021), “Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết từ lá loài *Adinandra bockiana* E. Pritz. ex Diels”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(12), tr. 34-38. [https://doi.org/10.31276/VJST.64\(12\).34-38](https://doi.org/10.31276/VJST.64(12).34-38).
 15. Hoàng Thị Sản (2009), *Phân loại học thực vật*, Nxb. Giáo Dục.
 16. Trung tâm dữ liệu thực vật Việt Nam, <http://www.botanyvn.com/cnt.asp?param=edir&v=Adinandra&list=genu,10/5/2019>.
 17. Nguyễn Thị Hải Yến, Ngô Xuân Quảng, Chu Hoàng Mậu, Đỗ Tiến Phát (2021), “Sử dụng đặc điểm hình thái và gen chỉ thị trnH-psbA để nhận dạng lan Hải đuôi công (*Paphiopedilum gratixianum*)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 226(10), tr. 138-145. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4549>.

TIẾNG ANH

18. Abdel-Monem A. R., Kandil Z. A., Abdel-Naim A. B., Abdel-Sattar E. (2015), “A new triterpene and protective effect of *Periploca somaliensis* Browicz fruits against CCl₄-induced injury on human hepatoma cell line (Huh7)”, *Natural Product Research*, 29(5), pp. 423-429.
19. Acebey-Castellon I. L., Voutquenne-Nazabadioko L., Doan T. M. H., Roseau N., Bouthagane N., Muhammad D., Lavaud C. (2011), “Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*”, *Journal of Natural Products*, 74(2), pp. 163-168.
20. Adfa M., Yoshimura T., Komura K., and Koketsu M. (2010), “Antitermite activities of coumarin derivatives and scopoletin from *Protium javanicum* Burm. f.”, *Journal of chemical ecology*, 36, pp. 720-726.
21. Altinier G., Sosa S., Aquino R. P., Mencherini T., Loggia R. D., Tubaro A. (2007), “Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L”, *J. Agri. Food Chem.*, 55, pp. 1718–1723.
22. An R. B., Na M. K., Min B. S., Lee H. K., Bae K. H. (2008), “Anti-complement activity of triterpenoids from the whole plant of *Patrinia saniculaefolia*”, *Nat. Prod. Sci.*, 14, pp. 249–253
23. Angiosperm Phylogeny Group (2009), “An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the ordo and famillies of flowering plants”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), pp. 105-121.
24. Aristya G. R., Putri F., Kasiamdari R. S., Musthofa A. (2020) “DNA barcoding and phylogenetic analysis sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) based on *matK* (maturase K) gene”, *Key Engineering Materials*, 840, pp.162-170. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.840.162>
25. Asaf S., Khan A. L., Khan M. A., Imran Q. M., Kang S-M., Al-Hosni K., Jeong E. J., Lee K. E., Lee I-J. (2017), "Comparative analysis of complete plastid geneomes from wild soybean (*Glycine soja*) and nine other *Glycine* species", *PLoS One*, 12(8), e0182281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182281> (2017).

26. Alwadani K. G., Janes J. K. and Andrew R. L. (2019), "Chloroplast geneome analysis of box-ironbark *Eucalyptus*", *Mol. Phylogeneet*, 136, pp. 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.001>.
27. Bano Z., Begum S., Ali S. S., Kiran Z., Siddiqui B. S., Ahmed A. and Jabeen A. (2022), "Phytochemicals from *Carissa carandas* with potent cytotoxic and anti-inflammatory activities", *Natural Product Research*, 36(6), pp. 1587-1592.
28. Benyahia S., Benayache S., Benayache F., León F., Quintana J., López M., Hernandez J.C., Bermejo J. F. E. (2005), "Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity", *Phytochemistry*, 66, pp. 627 - 632.
29. Bi Y., Zhang M. F., Xue J., Dong R., Du Y. P., Zhang X. H. (2018), "Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: A case study on *Fritillaria*", *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1184.
30. Brawand D., Soumillon M., Necsulea A., Julien P., Csárdi G., Harrigan P., and Kaessmann H. (2014), "The evolution of gene expression levels in mammalian organs", *Nature*, 508(7497), pp. 66-70.
31. Calderón A. I., Simithy J., Quaggio G., Espinosa A., López-Pérez J. L., Gupta, M. P. (2009), "Triterpenes from *Warszewiczia coccinea* (Rubiaceae) as inhibitors of acetylcholinesterase", *Nat. Prod. Comm.*, 4(10), 1934578X0900401002.
32. CBOL plant working Group (Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., Bank V. D. M., Chase M. W., Cowan R. S., Erickson D. L.) (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc Natl Acad Sci*, 106, pp. 12794 - 12797.
33. Chang H. T. (1998), Theaceae (1) Theoideae 1: *Camellia*. In: Delectis florae reipublicae popularis sinicae agenda academiae sinicae edita (Ed.) *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, Science press Beijing, pp. 3-195.
34. Chen M., Yu J., She G., Zhu Y., (1996), "Analysis of nutritional components and medicinal components in wild Shiyacha", *Nat. Prod. Res. Dev.*, 8(1), pp. 84-86.

35. Chen R., Lian Y., Wen S., Li Q., Sun L., Lai X., Zhang Z., Zhu J., Tang L., Xuan J., Yuan E., Sun S. (2022), “Shibi tea (*Adinandra nitida*) and camellianin A alleviate CCl₄-Induced liver injury in C57BL-6J mice by attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis”, *Nutrients*, 14(15), pp. 3037. doi: 10.3390/nu14153037.
36. Chen X., Cao Y. G., Ren Y. J., Liu Y. L., Fan X. L., He C., Li X. D., Ma X. Y., Feng, W. S. (2022), “Ionones and lignans from the fresh roots of *Rehmannia glutinosa*”, *Phytochemistry*, 203, 113423.
37. Chen X., Zhou J., Cui Y., Wang Y., Duan B., Yao H. (2018), “Identification of Ligularia herbs using the complete chloroplast genome as a super-barcode”, *Frontiers in pharmacology*, 9, pp. 695-695.
38. Chen Y., Chen G., Fu X., Liu R. H. (2015), "Phytochemical profiles and antioxidant activity of different varieties of *Adinandra* tea (*Adinandra Jack*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (1), pp. 169-176.
39. Chen Y., Ma X., Fub X., and Yan R. (2017), “Phytochemical content, cellular antioxidant activity and antiproliferative activity of *Adinandra nitida* tea (Shiyacha) infusion subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion”, *RSC Advances*, 7, pp. 50430–50440. <https://doi.org/10.1039/c7ra07429h>.
40. Cheng Y., Zhang L., Qi J., Zhang L. (2020), “Complete chloroplast genome sequence of *Hibiscus cannabinus* and comparative analysis of the Malvaceae family”, *Front Genet*, 11(227), pp 1-10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00227>.
41. Cronquist A. (1981), *An integrated system of classification of flowering plants*, Columbia University Press, New York.
42. Daniell H., Lin C. S., Yu M., Chang W. J. (2016), "Chloroplast geneomes: diversity, evolution, and applications in geneetic engineering", *Geneome Biol*, 17(1), p. 134.
43. De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. (2004), “Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and

- their inhibitory effects on nitric oxide production”, *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp. 7525-7531.
44. Dean G. H., Asmarayani R., Ardiyani M., Santika Y., Triono T., Mathews S. and Webb C. O. (2018), *Adinandra dumosa* voucher gp-394 maturase K (*matK*) gene, partial cds; chloroplast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1469273631>. Ngày 27/9/2023.
 45. Dirir A. M., Daou M., Yousef A. F. and Yousef L. F. (2022), “A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes”, *Phytochemistry Reviews*, 21, pp. 1049–1079.
 46. Erickson D. L. (2015), *Adinandra integerrima* voucher BT_0095963741 maturase K (*matK*) gene, partial cds; chloroplast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KJ708801.1>. Ngày 27/9/2015.
 47. Faizi S., Ali M., Saleem R., Irfanullah and Bibi S. (2001), “Complete ^1H and ^{13}C -NMR assignments of stigma-5-en-3-O-b-glucoside and its acetyl derivative”, *Magn. Reson. Chem.*, 39, pp. 399 – 405.
 48. Flamini G., Bulleri C., Morelli I., Manunta A., (2000), “A new flavonoid glycoside from *Centaurea horrida*”, *J. Nat. Prod.*, 63, pp. 662-663.
 49. Gao H., Liu B., Liu F., Chen Y. (2010), "Anti-proliferative effect of camellianin A in *Adinandra nitida* leaves and its apoptotic induction in human Hep G2 and MCF-7 cells", *Molecules*, 15(6), pp. 3878-3886.
 50. Gitzendanner M. A., Soltis P. S., Wong G. K. S., Ruhfel B. R. and Soltis D. E. (2018), "Plastid phylogeneomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history", *Am. J. Bot.*, 105, pp. 291-301. [https:// doi. org/ 10. 1002/ ajb2. 1048](https://doi.org/10.1002/ajb2.1048).
 51. Graur D., and Li W. H. (2000), *Fundamentals of Molecular Evolution* (2nd ed.), Sinauer Associates.
 52. Gu C., Ma L., Wu Z., Chen K. and Wang Y. (2019), "Comparative analyses of chloroplast geneomes from 22 *Lythraceae* species: Inferences for phylogeneetic

- relationships and genome evolution within Myrtales", *BMC Plant Biol*, 19, p. 281. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1870-3>.
53. Hall T. A. (1999), "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95 - 98.
 54. Hassine M., Zardi-Berguaoui A., Harzallah-Skhiri F., Abreu P., Jannet H. B. (2016), "Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from the roots of the Tunisian *Convolvulus dorycnium*", *Chem. Nat. Comp.*, 52, pp. 830-833.
 55. He H., Shang X. Y., Liu W. W., Zhang Y., Song S. J. (2019), "Triterpenes from the fruit of *Camptotheca acuminata* suppress human hepatocellular carcinoma cell proliferation through apoptosis induction", *Nat. Prod. Res.*, 33, pp. 3527–
 56. Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., de Waard J. R. (2003), "Biological identifications through DNA barcodes", *Proceedings Biological Sciences/The Royal Society*, 270, pp. 313-321.
 57. Hilu K. W. (1997), "Thay *matK* gen: sequence variation and application in plant systematics", *American journal of botany*, 84, pp. 830 – 839.
 58. Ho D. V., Hoang H. N. T., Vo H. Q., Nguyen K. V., Pham T. V., Le A. T., Phan K. V., Nguyen H. M., Morita H., Nguyen H. T. (2020), "Three new steroidal saponins from *Aspidistra letreae* plants and their cytotoxic activities", *J. Nat. Med.*, 74, pp. 591-598.
 59. Hoang T. S., Luong V. D. (2014), "*Adinandra hongiaoensis* (Theaceae) a new species from Lam Dong, Vietnam", *J. Jpn. Bot*, 89, pp. 331-334.
 60. Hollingsworth P. M., Graham S. W., Little D. P. (2011), "Choosing and using a plant DNA barcode", *PLoS One*, 6(5), e. 19254.
 61. Houghton P. J., Lian L. M. (1986), "Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*", *Phytochemistry*, 25, pp. 1939-1944.
 62. Hu B. Y., Zhao Y. L., Ma D. Y., Xiang M. L., Zhao L. X., Luo X. D. (2022), "Antihyperuricemic bioactivity of *Alstonia scholaris* and its bioactive

- triterpenoids *in vivo* and *in vitro*”, *J. Ethnopharmacol*, 290, 115049.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115049>
63. Hughes P. J., Rees S., Kalindjian B. S. and Philpott L. K. (2011), “Principles of early drug discovery,” *British journal of pharmacology*, 162, pp. 1239-1249.
 64. Huong L. T., Gal M., Kim O., Tran P. T., Nhiem N. X., Kiem P. V., Minh C. V., Dang N. H., Lee J. H. (2022), “In 23-Hydroxyursolic acid from *Viburnum lutescens* inhibits osteoclast differentiation *in vitro* and lipopolysaccharide-induced bone loss *in vivo* by suppressing c-Fos and NF- κ B signalling”, *Int. Immunopharm*, 111, 109038.
 65. Jalil J., Sabandar C. W., Ahmat N., Jamal J. A., Jantan I., Aladdin N., Muhammad K., Buang F., Mohamad H. F. and Sahidin I. (2015), “Inhibitory effect of triterpenoids from *Dillenia serrate* (Dilleniaceae) on prostaglandin E2 production and quantitative HPLC analysis of its koetjapic acid and betulinic acid contents, *Molecules*, 20, pp. 3206-3220.
 66. Jansen R. K., Cai Z., Raubeson L. A., Daniell H., dePamphilis C. W., Leebens-Mack J., Müller K. F., Guisinger-Bellian M., Haberle R. C., Hansen A. K., Chumley T. W., Lee S.-B., Peery R., McNeal J. R., Kuehl J. V. and Boore J. L. (2007), "Analysis of 81 genes from 64 plastid geneomes resolves relationships in angiosperms and identifies geneome-scale evolutionary patterns", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, pp. 19369-19374. [https:// doi. org/ 10. 1073/ pnas. 07091 21104](https://doi.org/10.1073/pnas.0709121104).
 67. Jansen R. K., Ruhlman T. A. (2012), *Plastid genomes of seed plants*. In: Bock R, Knoop V, editors. Genomics of chloroplasts and mitochondria. Advances in Photosynthesis and Respiration (Including Bioenergy and Related Processes), Springer, pp. 103–126. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2920-9_5.
 68. Jarvis E. D., Mirarab S., Aberer A. J., Li B., Houde P., Li C., and Zhang G. (2014), “Whole-geneome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds”, *Science*, 346(6215), pp. 1320-1331.

69. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezuk Y., McGinnis S., Madden T. L. (2008), "NCBI BLAST: A better web interface", *Nucl. Acids Res*, 36 (Web Server Issue), W5–W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201> (2008).
70. Jung H. A., Lee E. J., Kim J. S., Kang S. S., Lee J. H., Min B. S., Choi J. S. (2009), "Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*", *Arch. Pharm. Res.*, 32, pp. 1399 - 1408.
71. Kane N., Sveinsson S., Dempewolf H., Yang J. Y., Zhang D., Engels J. M., Cronk Q. (2012), "Ultrabarcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA", *American Journal of Botany*, 99(2), pp. 320-9
72. Kawata M., Harada T., Shimamoto Y., Oono K., Takaiwa F. (1997), "Short inverted repeats function as hotspots of intermolecular recombination giving rise to oligomers of deleted plastid DNAs (ptDNAs)", *Curr Genet*, 31, pp.179–184.
73. Keng H. (1962), "Comparative morphological studies in the Theaceae", *Univ. Calif. Publ.*, 33, pp. 269–384.
74. Khourang M., Babaei A., Sefidkon F., Naghavi M. R., Asgari D., Potter D. (2014), "Phylogenetic relationship in *Fritillaria* spp. of Iran inferred from ribosomal ITS and chloroplast *trnL-trnF* sequence data", *Biochemical Systematics and Ecology*, 57, pp. 451-457.
75. Kim H. Y., Moon B. H., Lee H. J., Choi D. H. (2004), "Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity", *J. Ethnopharm*, 93, pp. 227–230.
76. Koonin E. V. (2014), "The origin and early evolution of *Eukaryotes* in the light of phylogenomics", *Genome Biology*, 15(5), p. 209.
77. Korber B., Hraber P., Wagh K., and Hahn B. H. (2017), "Polyvalent vaccine design for diversity coverage and improvement of HIV neutralizing antibody responses", *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(3), pp. 309-315.
78. Kress W. J., Erickson D. L. (2008), "DNA barcodes: Genes, geneomics, and bioinformatics", *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(8), pp. 2761 - 2762.

79. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. (2018), "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, 35, pp. 1547-1549.
80. Li X. H., Shen D. D., Li N. and Yu S. S. (2003), "Bioactive triterpenoids from *Symplocos chinensis*", *Journal of Asian natural products research*, 5(1), pp. 49-56.
81. Liu B., Ma Y., Liu Y., Yang Z., Zhang L. (2013), "Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Adinandra nitida* leaves", *Trop. J. Pharm. Res.*, 12, pp. 1045-1051.
82. Liang C., Staerk D., Kongstad K. T. (2020), "Potential of *Myrtus communis* Linn. as a bifunctional food: dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS and NMR for identification of antidiabetic triterpenoids and phloroglucinol derivatives", *J. Funct.Foods*, 64, 103623.
83. Liang H., Zhang Y., Deng J., Gao G., Ding C., Zhang L., Yang R. (2020), "The complete chloroplast genome sequences of 14 *Curcuma* species: insights into genome evolution and phylogenetic relationships within Zingiberales", *Front Genet*, 11(802), pp. 1-17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00802>
84. Liu B., Ning Z., Gao J. and Xu K. (2008), "Preparing Apigenein from *Adinandra nitida* leaves", *Food Technology and Biotechnology*, 46 (1), pp. 111-115.
85. Liu B., Ning Z., Zhan Y., Xu K., Gao J. (2008), "Characterization and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of methanol and supercritical carbon dioxide extracts from leaves of *Adinandra nitida*", *Journal of Food Biochemistry*, 32, pp. 431 - 442.
86. Liu B., Yang J., Ma Y., Yuan E., Chen C. (2010), "Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of ethanol extract and pure flavonoid from *Adinandra nitida* leaves", *Pharmaceutical biology*, 48(12), pp. 1432-1438.
87. Liu B. G., Ning Z. X., Zhan Y., Xu K. Y., Gao J. H. (2008), "Characterization and antioxidant activity of flavonoid extract from leaves of *Adinandra nitida*

- Merr", *Chem. Ind. Forest Prod.*, 28(1), pp. 6-10.
88. Liu J., Yan H. F., Newmaster S. G., Pei N., Ragupathy S. and Ge X. J. (2015), *Adinandra nitida* isolate SCBGP336_1 maturase K (*matK*) gene, partial cds; chloroplast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP093833.1>. Ngày 18/2/2015.
 89. Loera-Sánchez M., Studer B. and Kölliker R. (2020), "DNA barcode *trnH-psbA* is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses", *BMC Res Notes*, 35(13). <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4897-5>.
 90. Lu P., Li L., Wu J. (2019), "Phytochemicals from *Lagerstroemia speciosa* protect PC12 cells against the neurotoxicity induced by A β 1-42, *Lat. Am. J. Pharm*, 38, pp. 2241–2247.
 91. Mahesh B. and Satish S. (2008), "Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens" *World J. Agric. Sci.*, 4, pp. 839-843.
 92. Manzanilla V., Kool A., Nguyen N. L., Nong V. H., Le T. T. H., de Boer H. J. (2018), "Phylogeneomics and barcoding of *Panax*: toward the identification of ginseng species", *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), p. 44.
 93. Manzoor M. T., Ali S., Fatima A., Tariq M. R., Ali Q., Shafiq M., Iqbal M. A., Zahid A. and Hussain A. (2022), "Analyzing local spinach plant diversity using the *rpoC1* and *matK* DNA barcode technique", *Pak. J. Agri. Sci.*, 59(6), pp. 1029-1034. DOI:10.21162/PAKJAS/22.48.
 94. Mayor C., Brudno M., Schwartz J. R., Poliakov A., Rubin E. M., Frazer K. A., Pachter L. S., Dubchak I. (2000), "VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length", *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16, pp. 1046–1047. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.11.1046>.
 95. Mbougna J. F. T., Bitchagno G. T. M., Wouamba S. C. N., Jouda J. B., Awouafack M. D., Tene M., Lenta B. N., Kouam S. F., Tane P., Sewald N. (2022), "Two new triterpenoid fatty acid esters from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae)", *Nat. Prod. Res.*, 36, pp. 2085 - 2096.

96. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. (1985), “Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, pp. 6960–6964.
97. Min T. and Bartholomew B. (2007), *Flora of China, Theaceae* (vol 12), Science Press, Beijing and Missouri botanical garden press, St. Louis, 12, pp. 366 – 478. <http://www.efloras.org/>.
98. Moujir L., Seca A. M., Silva A. M., Barreto M. C. (2008), “Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia*”, *Planta Med.*, 74, pp. 751-753.
99. Nacef S., Jannet H. B., Abreu P., Mighri Z., (2010), “Phenolic constituents of *Convolvulus dorycnium* L. flowers”, *Phytochem. Lett.*, 3, pp. 66-69.
100. Nei M., and Kumar S. (2000), *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press.
101. Nguyen B., Kim K., Kim Y. C., Lee S. C., Shin J. E., Lee J., Kim N. H., Jang W., Choi H. I., Yang T. J. (2017), “The complete chloroplast genome sequence of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv (Araliaceae)”, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 28(1), pp. 85-86. doi: 10.3109/19401736.2015.1110810.
102. Nguyen H. Q., Nguyen T. N. L., Doan T. N., Nguyen T. T. N., Phạm M. H., Le T. L., Sy D. T., Chu H. H. and Chu H. M. (2021), "Complete chloroplast genome of novel *Adrinandra megaphylla* Hu species: molecular structure, comparative and phylogeneetic analysis", *Scientific Reports*, 11731. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91071-z>.
103. Nguyen L. T. N, Nguyen Q. H, Nguyen N. T. T, Xuan Vi T. T., Sy T. D, Nguyen T. T, Chu M. H. (2020), “Antibacterial, antioxidant and anti - cancerous activities of *Adiandra megaphylla* Hu leaf extracts”, *Biosc. Biotech. Res. Comm*, 13(3), pp. 1015–1020.
104. Nguyen Q. H., Nguyen L. T. N., Nguyen N. T. T., Sy T. D., Chu M. H., Chu H. H., Le L. T., Doan N. T., Pham H. M. and Doan G. T. H. (2021), *Adinandra megaphylla* chloroplast, complete genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW697901.1>, ngày 24/5/2021.

105. Nguyen Q. H., Nguyen L. T. N., Nguyen N. T. T., Sy T. D., Chu M. H., Chu H. H., Le L. T., Doan N. T., Pham H. M. and Doan G. T. H. (2021), *Adinandra bockiana* chloroplast, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW699853.1>, ngày 24/5/2021.
106. Nguyen Q. H., Than K. P. T., and Chu M. H. (2019), “Study on chemical composition and antibacteria activity of extracts total from leaves of *Adiandra lienii* species”, *Proceedings National Biotechnology Conference 2019*, pp. 178-182.
107. Nguyen T. H. Y, Ngo X. Q., Nguyen D. T., Do T. P, Chu H. M. (2023), “Morphology and DNA marker for distinguishig *Paphiopedilum hangianum* and *Paphiopedilum emersonii* from Vietnam”, *Journal of experimental biology and agricultural sciences*, 11(2), pp. 423-435.
108. Nguyen T. N. L. and Nguyen H. Q. (2021), “Chemical composition and biological activity of extracts total from stem of *Adiandra megaphylla* Hu collected in Lao Cai, Vietnam”, *TNU Journal of Science and Technology*, 226, pp. 55-61.
109. Ninomiya K., Morikawa T., Zhang Y., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Yoshikawa M. (2007), “Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXIII. Absolute structures of new megastigmane glycosides, sedumosides A4, A5, A6, H, and I, and hepatoprotective megastigmanes from *Sedum sarmentosum*”, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, pp. 1185 - 1191.
110. Nock C. J., Waters D. L., Edwards M. A., Bowen S. G., Rice N., Cordeiro G. M., Henry R. J. (2011), “Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification”, *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), pp. 328-33.
111. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. and team U. (2012), "Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit", *Bioinformatics*, 28, pp. 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091> (2012).
112. Ouyang M. A., Wein Y. S., Zhang Z. K. and Kuo Y. H. (2007), “Inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) replication of pinorexinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of *Rhus javanica* var.

- roxburghiana*”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(16), pp. 6460-6465.
113. Palmer J. D. (1985), “Comparative organization of chloroplast genomes”, *Annu Rev Genet*, 19, pp. 325–354.
 114. Panyo J., Matsunami K., and Panichayupakaranant P. (2016), "Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens", *Pharmaceutical biology*, 54(9), 1522-1527.
 115. Rousselle M., Lavergne A., Figuet E., Nabholz B., and Galtier N. (2014), “Influence of recombination and GC-biased gene conversion on the adaptive and nonadaptive substitution rate in mammals versus birds”, *Molecular Biology and Evolution*, 33(2), 139-146.
 116. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sanchez-Delbarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. (2017), "DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets", *Molecular Biology and Evolution*, 34, pp. 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248> (2017).
 117. Razgonova M., Zakharenko A., Ercisli S., Grudev V., Golokhvast K. (2020), “Comparative analysis of Far East Sikhotsky *Rhododendron* (*Rh. sichotense*) and East Siberian *Rhododendron* (*Rh. adamsii*) using supercritical CO₂-extraction and HPLCESI-MS/MS spectrometry”, *Molecules*, 25, 3774.
 118. Sánchez E., Heredia N., Camacho-Corona M. D. R. and García S. (2013), “Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*”, *Journal of applied microbiology*, 115(6), pp. 1307-1316.
 119. Shahat A. A., Abdel-Azim N. S., Pieters L., Vlietinck A. J. (2004), “Isolation and NMR spectra of syringaresinol- β -D-glucoside from *Cressa cretica*”, *Fitoterapia*, 75, pp. 771-773.
 120. Shendure J., Ji H. (2008), "Next-geneeration DNA sequencing", *Nat Biotechnol*, 26(10), pp. 1135-45.
 121. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D.,

- Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. (1990), “New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening”, *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), pp. 1107-1112, <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.
122. Skouroumounis G. K., Gunata Y. Z., Baumes R. L. (2000), “Isolation of two megastigmane-3,9-diol glucosides from Shiraz leaves”, *J. Essen. Oil Res.*, 12, pp. 653-660.
123. Sosinska E., Przybylski R., Hazendonk P., Zhao Y. Y., Curtis J. M. (2013), “Characterisation of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol”, *Food Chemistry*, 139, pp. 464-474.
124. Souza U. J. B., Nunes R., Targueta C. P., Diniz-Filho J. A. F., Telles M. P.C.(2019),” The complete chloroplast genome of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae-Caesalpinioideae): comparative analysis with related mimosoid species”, *Sci Rep*, 9(14206), pp. 1-12.
125. Steier J., and Gostel M. (2022), *Adinandra glischroloma* voucher BRIT: Gostel546 maturase K (*matK*) gene, partial cds; chloroplast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL537803.1>, ngày 04/02/2022.
126. Sullivan A. R., Schiffthaler B., Thompson S. L., Street N. R., Wang X. R. (2017), “Interspecific plastome recombination reflects ancient reticulate evolution in *Picea* (Pinaceae)”, *Mol Biol Evol*, 34, pp.1689-1701.
127. Thuong P. T., Jin W., Lee J., Seong R., Lee Y. M., Seong Y., Song K., Bae K. (2005), “Inhibitory effect on TNF- α -induced IL-8 production in the HT29 cell of constituents from the leaf and stem of *Weigela subsessilis*”, *Archives of pharmacal research*, 28, pp. 1135-1141.
128. Tran T. H. H., Nguyen M. C., Le H. T., Nguyen T. L., Pham T. B., Chau V. M., Nguyen H. N. and Nguyen T. D. (2014), “Inhibitors of α -glucosidase and α -amylase from *Cyperus rotundus*”, *Pharm. Biol.*, 52, pp. 74-77. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.814692>.
129. Tsou C. H., Yang Y. W. and Lai K. N. (2016), *Adinandra formosana* ribulose-

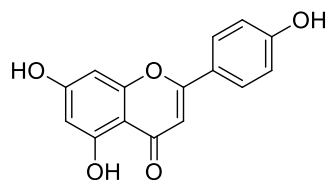
- 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds; chloroplast gene for chloroplast product, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF089713.1>. ngày 14/7/2016.
130. Tu Q. T., Pham T. T. H. (2023), “Characteristics of the *trnL* gene region and phylogentic analysis of *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight”, *TNU Journal of Science and Technology*, 228(5), pp. 316-323.
 131. Turktas M., Aslay M., Kaya E., Ertugrul F. (2012), “Molecular characterization of phylogenetic relationships in *Fritillaria* species inferred from chloroplast *trnL-trnF* sequences”, *Turkish Journal of Biology*, 36(5), pp. 552-560.
 132. Vu H. T., Tran N., Nguyen T. D., Vu Q. L, Bui H. M., Le M. T. and Le L. (2020), "Complete chloroplast genome of *Paphiopedilum delenatii* and phylogeneetic relationships among *Orchidaceae*", *Plants*, 9, p. 61.
 133. Vu T. K. O., Bui T. H., Le T. H. N., Nguyen T. V. A., Le N. T. (2021), “Triterpenes from the stems of *Adinandra poilanei* Gagnep.”, *Journal of Medicinal Materials*, 26 (1+2), pp. 5-9.
 134. Vu T. K. O., Nguyen T. T. H., Ho V. D., Dinh N. T., Nguyen T. M. H., Le N. T. (2021), “New triterpene and nor-diterpene derivatives from the leaves of *Adinandra poilanei*”, *Phytochemistry Letters*, 46, pp. 110-113. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.003>.
 135. Vu T. K. O., Nguyen T. T. O., Tran H. G., Bui T. H., Dinh N. T., Nguyen T. M. H., Le N. T. (2019), “Triterpenes from the stems of *Adinandra hainanensis* Hayata”, *Vietnam journal of Chemistry*, 57(4e3, 4), pp. 333 – 336.
 136. Vu T. K. O., Tran H. G., Bui T. H., Diep T. L. P., Nguyen T. V. A. and Le N. T. (2022), “Chemical constituents and biological activity of the stems of *Adinandra hainanensis* Hayata”, *Records of Natural products*, 16(2), pp. 346-352. <http://doi.org/10.25135/rnp.282.2108.2158>.
 137. Vu V. N., Nguyen T. H., Pham T. H., Vu T. H., Le N. T., Nguyen X. N., Pham V. C., Nguyen Q. V. (2022), “Triterpenes from the stems and leaves of *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume”, *Journal of Analytical Sciences*, 28 (4), pp. 1-6.

138. Wang Y., Chen S., Ni J., Yao X., Ye W., Zhao S. (2003), "Chemical studies on the *Adinandra nitida*", *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 34(5), pp. 407-409.
139. Wang Y., Li X., Yin H., Li J., Fan Z., Liu W. (2021), "Characterization and phylogentic analysis of the complete chloroplast genome of *Camellia chrysanthoides* (Theaceae)", *Mitochondrial DNA B Resour*, 6(11), pp. 3103-3104. <https://doi: 10.1080/23802359.2021.1981788>.
140. Wang Y., Ye W., Yin Z., Zhao S. (2008), "Triterpene saponins from *Adinandra nitida*", *YaoXue XueBao*, 43(5), pp. 504-508.
141. Wicke S., Schneeweiss G. M., de Pamphilis C. W., Müller K. F., and Quandt D. (2014), "The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function", *Plant Molecular Biology*, 76(3-5), pp. 273-297.
142. Yang J., Du J., Yu F., Li R., Zhong J. (2022), "Two new compounds from the aerial parts of *Elsholtzia densa*", *Phytochem. Lett.*, 52, 104 - 108.
143. Yang S., Liu W., Lu S., Tian Y. Z., Wang W. Y., Ling T.J., Liu R. T. (2016), "A novel multifunctional compound Camellikaempferoside B decreases A β production, interferes with A β aggregation, and prohibits A β -mediated neurotoxicity and neuroinflammation", *ACS Chem. Neurosci.*, 7, pp. 505-518.
144. Yu X. Q., Gao L. M., Soltis D. E., Soltis P. S., Yang J. B., Fang L., Yang S. X., Li D. Z. (2017), "Insights into the historical assembly of East Asian subtropical evergreen broadleaved forests revealed by the temporal history of the tea family", *New Phytol*, 215, pp. 1235–1248.
145. Yu X. Q., Gao L. M., Soltis D. E., Soltis P. S., Yang J. B., Fang L., Yang S. X. and Li D. Z. (2017), "*Adinandra angustifolia* voucher 14CS8678 plastid, complete genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF179491.1>, ngày 24/7/2017.
146. Yu X. Q., Gao L. M., Soltis D. E., Soltis P. S., Yang J. B., Fang L., Yang S. X. and Li D. Z. (2017), "*Adinandra millettii* voucher 14CS8453 plastid, complete genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF179492.1>, ngày 24/7/2023.

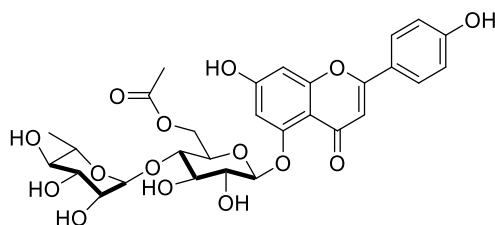
147. Yuan C., Huang L., Suh J. H. and Wang Y. (2019), "Bioactivity-guided isolation and identification of antiadipogenic compounds in Shiya tea (leaves of *Adinandra nitida*)", *J. Agric. Food Chem.*, 67, pp. 6785–6791. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01326> (2019).
148. Yuan E., Lian Y., Li Q., Lai Z., Sun L., Lai X., Chen R., Wen S., Zhu J., Zhang W., Sun S. (2022), "Roles of *Adinandra nitida* (Theaceae) and camellianin A in HCl/ethanol-induced acute gastric ulcer in mice", *Food Science and Human Wellness*, 11(4), pp. 1053-1063. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.03.032>.
149. Yuan E., Liu B., Ning Z. (2008), "Preparation and antioxidant activity of camellianin A from *Adinandra nitida* leaves", *J. Food Process Pres.*, 32, pp. 785-797. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00214.x>.
150. Yuan E., Liu B., Ning Z., Chen C. (2009), "Preparative separation of flavonoids in *Adinandra nitida* leaves by high - speed counter – current chromatography and their effects on human epidermal carcinoma cancer cells", *Food Chem.*, 115, pp. 1158-1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.009>.
151. Yuan X., Yan Q., Hu H., He X. P., Wang L. X., Liu Y. C., Liu Y., Gou K., Li S. H. (2023), "Bioactive triterpenoids from the traditional Chinese medicine *Swertia mileensis*", *Phytochem. Lett.*, 55, pp. 1-5.
152. Zhang C., Li Y., Zhang M., Li Y., Duan Y. and Wang X (2021), "Complete chloroplast genome of *Eurya alata*, a nectar shrub that blossoms in winter", *Pak. J. Bot.*, 53(5), pp. 1691-1700. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-5\(26\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-5(26)).
153. Zhang J., Tao D., Duan J., Liang Z., Zhang W., Zhang L., Huo Y., Zhang Y. (2006), "Separation and identification of compounds in *Adinandra nitida* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization source ion trap tandem mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), pp. 586-593.
154. Zhang J., Yang J., Duan J. C., Liang Z., Zhang L. H., Huo Y. S., Zhang Y. K. (2005), "Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of

- Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection”, *Analytica Chimica Acta*, 532, pp. 97 - 104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.042>.
- 155 . Zhao W. W., Zan K., Wu J. Y., Gao W., Yang J., Ba Y. Y., Wu X., Chen X. Q. (2019), “Antibacterial triterpenoids from the leaves of *Ilex hainanensis* Merr”, *Nat. Prod. Res.*, 33, pp. 2435-2439.
156. Yang M., Xie F., Li J., Zhang Y., Li X., Yin H., Li J. (2021), “The complete chloroplast genome of *Camellia fluviatilis* (Theaceae), a wild oil-Camellia species”, *Mitochondrial DNA B Resour*, 6(12), pp. 3511-3512. <http://doi:10.1080/23802359.2021.2005482>.
157. Yin X., Li T., Huang B., Xu L., Wen Q. (2021), “Complete chloroplast genome of *Camellia chekiangoleosa* (Theaceae), a shrub with gorgeous flowers and rich seed oil”, *Mitochondrial DNA B Resour*, 6(3), pp. 840-841. <http://doi:10.1080/23802359.2021.1884026>.
158. Zhou J., Cui Y., Chen X., Li Y., Xu Z., Duan B., Li Y., Song J. and Yao H. (2018), "Complete chloroplast geneomes of *Papaver rhoeas* and *Papaver orientale*: Molecular structures, comparative analysis, and phylogeneetic analysis", *Molecules*, 23(2), p. 437. <https://doi.org/10.3390/molecules23020437>.
159. *Adinandra*, theplantlist.org/browse/A/Pentaphylacaceae/Adinandra/.
160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

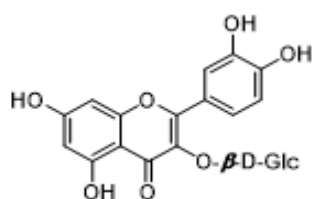
PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Công thức hóa học của các hợp chất phân lập được từ chi *Adinandra*

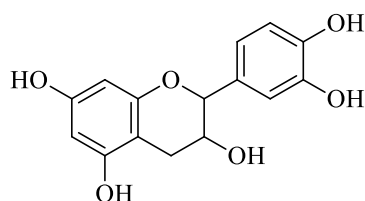
Apigenein



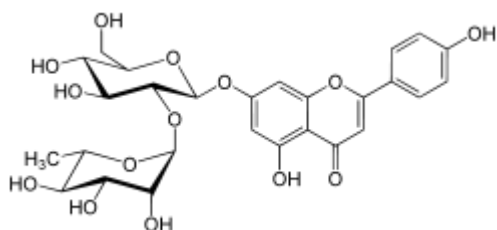
Camellianin A



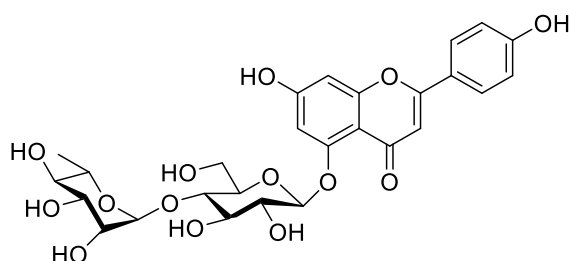
Quercitrin



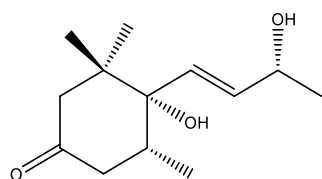
Epicatechin



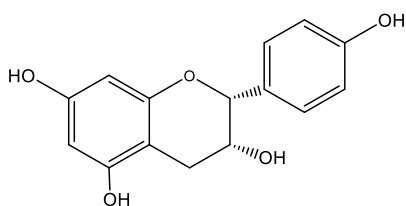
Rhoifolin



Camellianin B

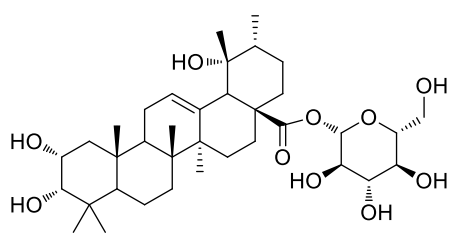


Megastigmane

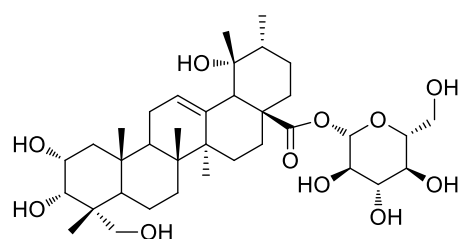


Epiafzelechin

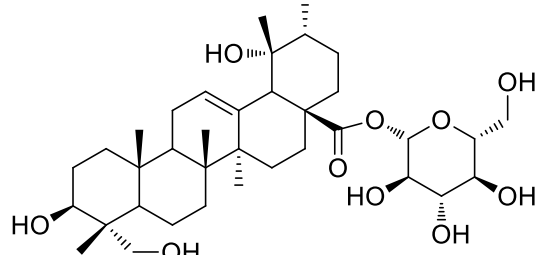
Hình P1.1. Công thức hóa học của tám hợp chất thuộc nhóm flavonoid phân lập từ chi *Adinandra*



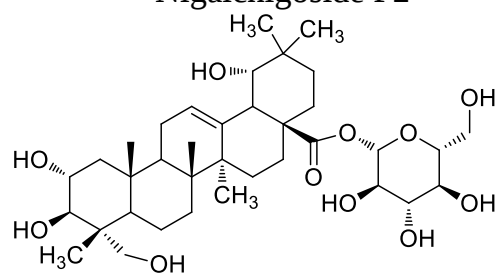
Kajiichigoside F1



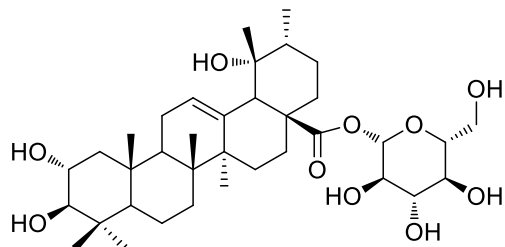
Nigaichigoside F2



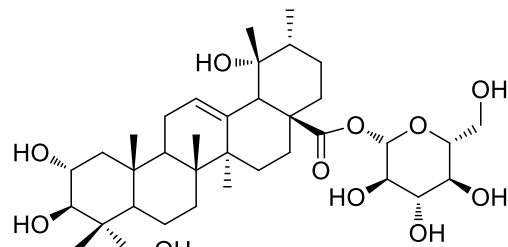
Peduncloside



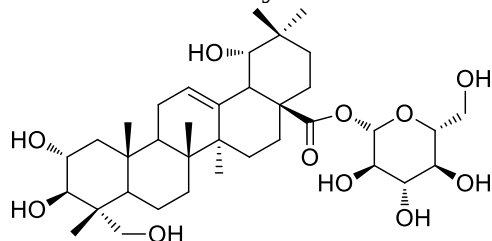
Sericoside



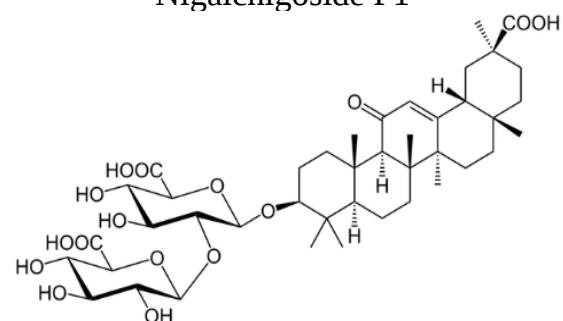
Glucosyl tormentate



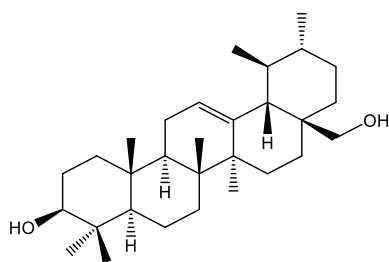
Nigaichigoside F1



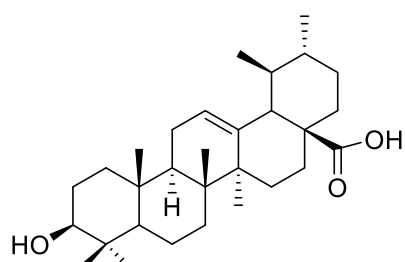
Arjunglucoside I

2 α , 3 α , 19 α -trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid-28-O-beta-D-glucopyranoside

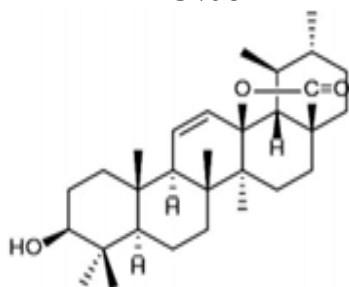
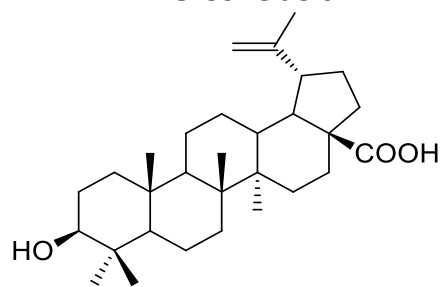
Hình P1.2. Công thức hóa học của tám hợp chất thuộc nhóm saponin triterpenoid phân lập từ chi *Adinandra*



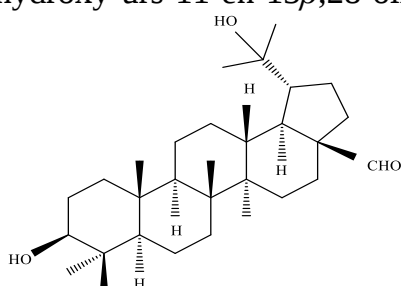
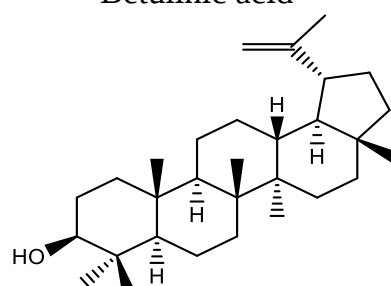
Uvaol



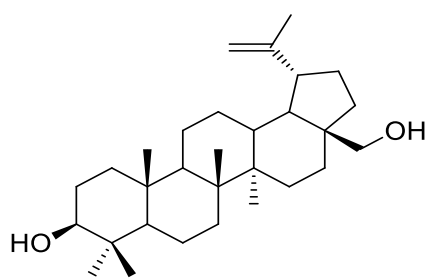
Ursolic acid

3 β -hydroxy-urs-11-en-13 β ,28-olide

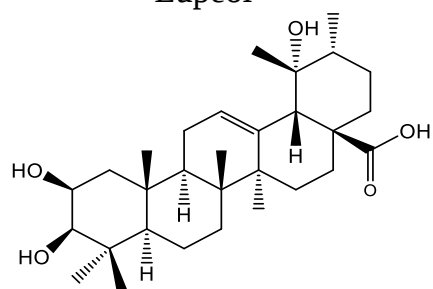
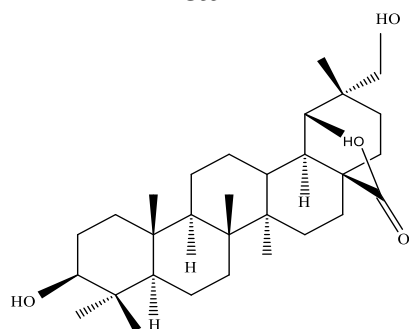
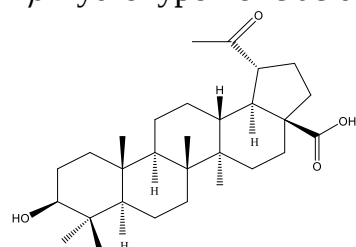
Betulinic acid

3 β , 20-dihydroxy-28-carbaldehyde

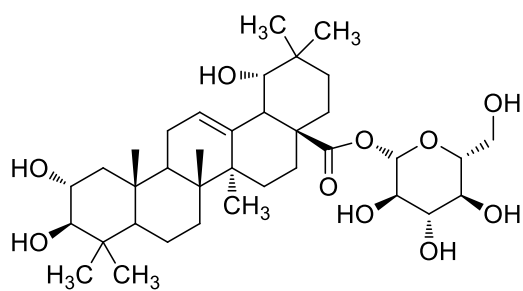
Lupeol



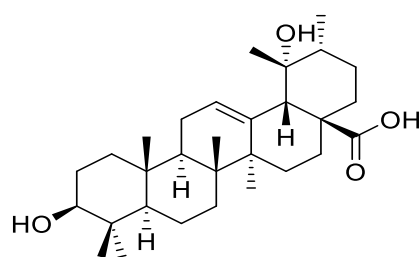
Betulin

2 β -hydroxypomolic acid3 β ,30-dihydroxy-18H α -oleane-
28 β ,19 β -olide

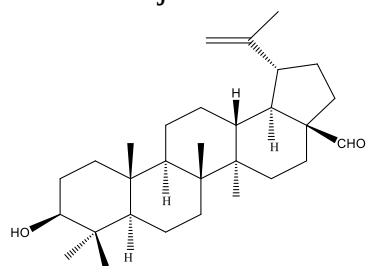
Platanic acid



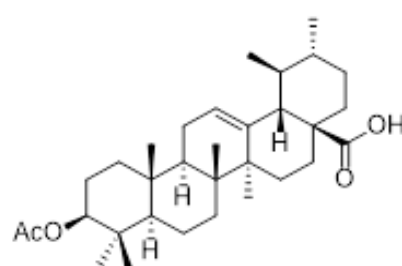
Arjunetin



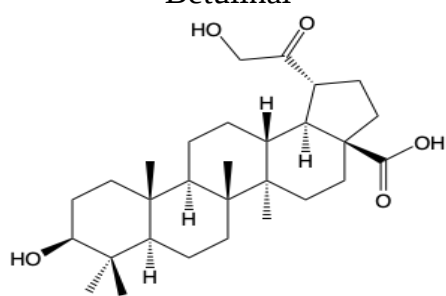
Pomolic acid



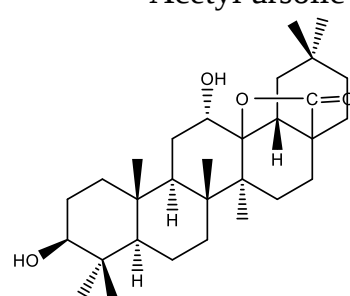
Betulinal



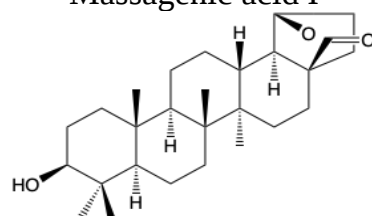
Acetyl ursolic acid



Massagenic acid I

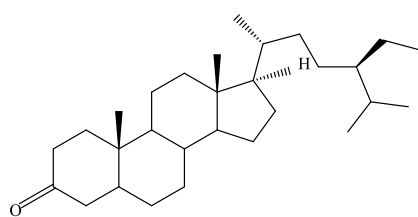


Oleanderolide

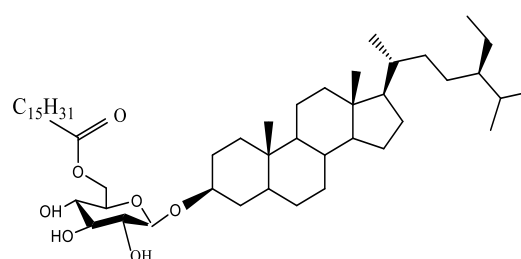


Diospyrolide

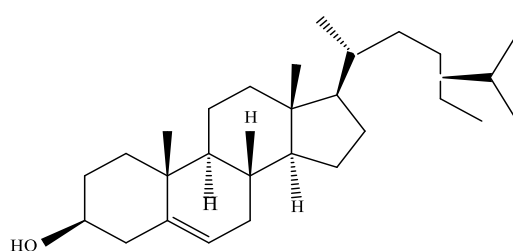
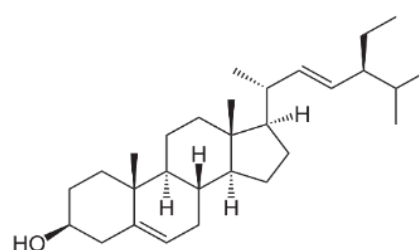
Hình P1.3. Công thức hóa học của 17 hợp chất nhóm triterpenoid phân lập được từ chi *Adinandra*



Stigmas-3-one

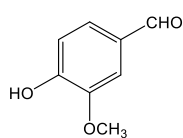


Sitoindoside I

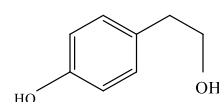
 γ -sitosterol

Stigmasterol

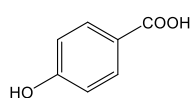
Hình P1.4. Công thức hóa học của bốn hợp chất nhóm sterol phân lập được từ chi *Adinandra*



Vanillin

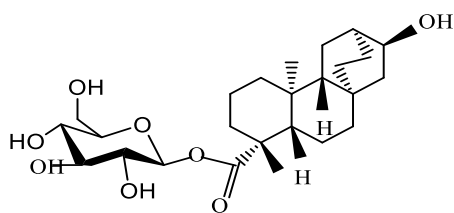


Tyrosol

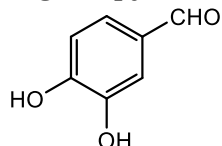


4-hydroxybenzoic acid

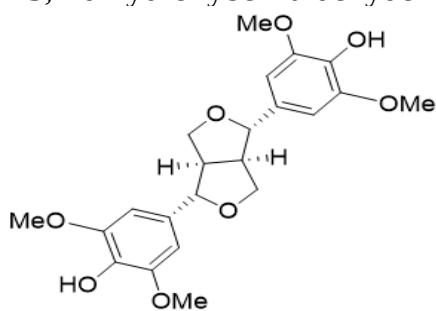
Hình P1.5. Công thức hóa học của ba hợp chất nhóm phenolic phân lập được từ chi *Adinandra*



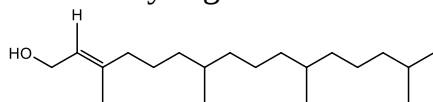
Ent-17-nor-atisane-16 β -hydroxy-18-oic
acid β -D-glucopyranosyl ester



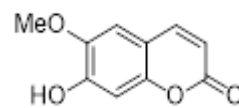
3,4-dihydroxybenzaldehyde



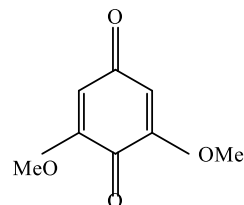
Syringersinol



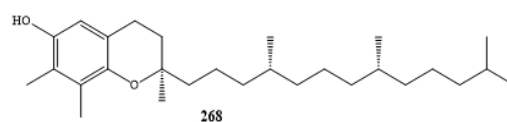
3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol



Scopoletin



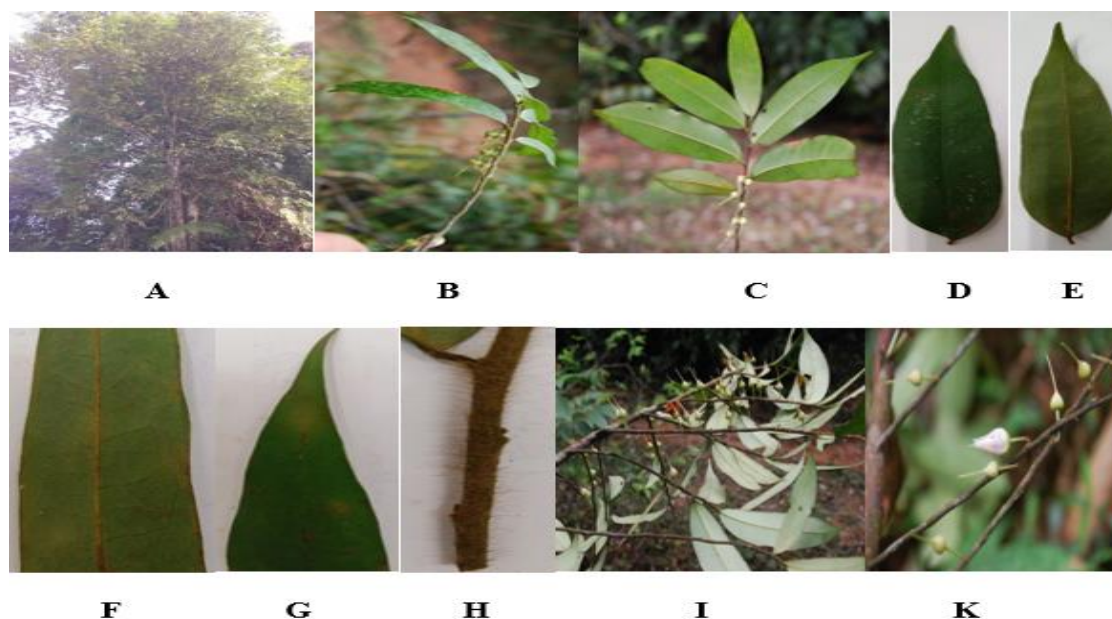
2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone



γ -tocopherol

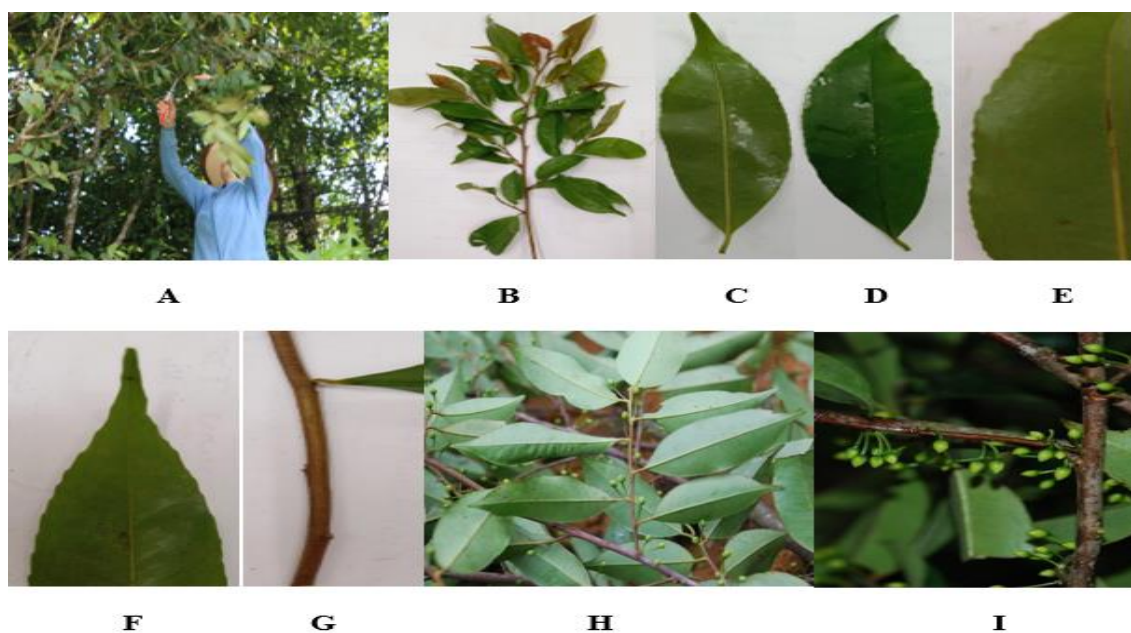
Hình P1.6. Công thức hóa học của
bảy hợp chất thuộc các nhóm hợp chất
khác phân lập từ chi *Adinandra*

Phụ lục 2. Hình ảnh ba loài thuộc chi *Adinandra* sử dụng trong nghiên cứu



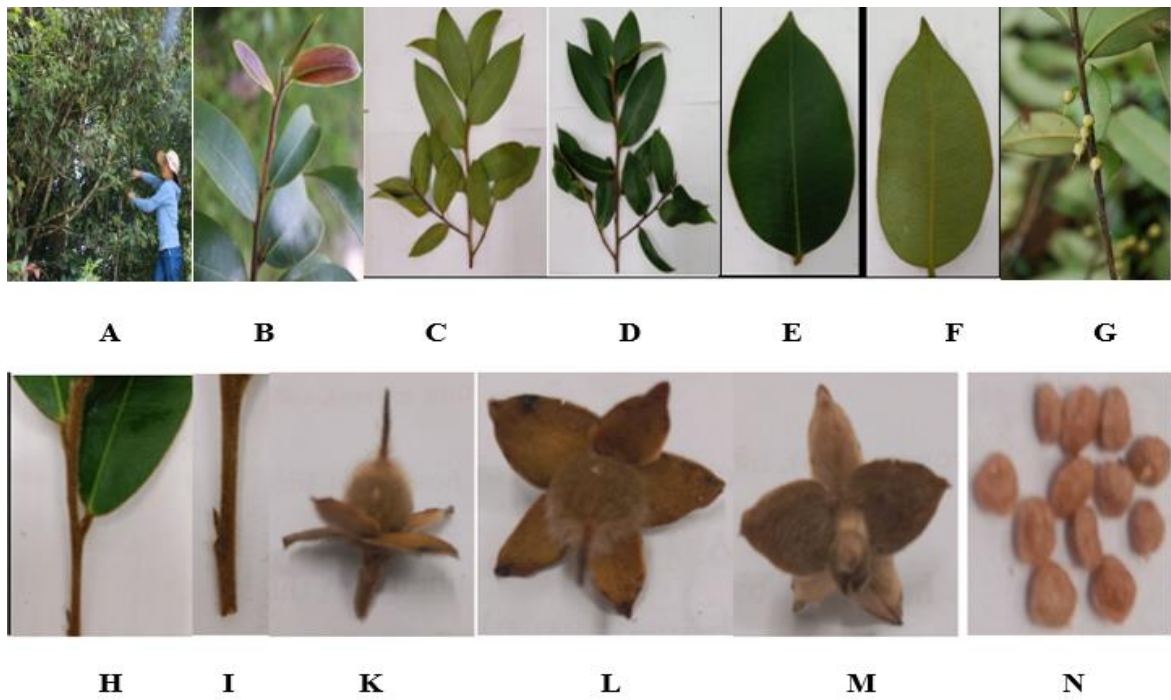
Hình P2.1. Một số bộ phận của loài *A. megaphylla* Hu

A: Dạng sống; B, C: Mặt trước, mặt sau cành mang lá; D, E: Mặt trước, mặt sau lá; F: mặt sau của phiến lá; G: chóp lá; H: thân, I: Cành mang nụ; K: Nụ hoa



Hình P2.2. Một số bộ phận của loài *A. bockiana*

A: Dạng sống; B: Cành mang chồi non; C, D: Mặt trước, mặt sau của lá; E: mặt sau của phiến lá và mép lá; F: chóp lá; G: Thân; H: Cành mang nụ; I: Nụ hoa

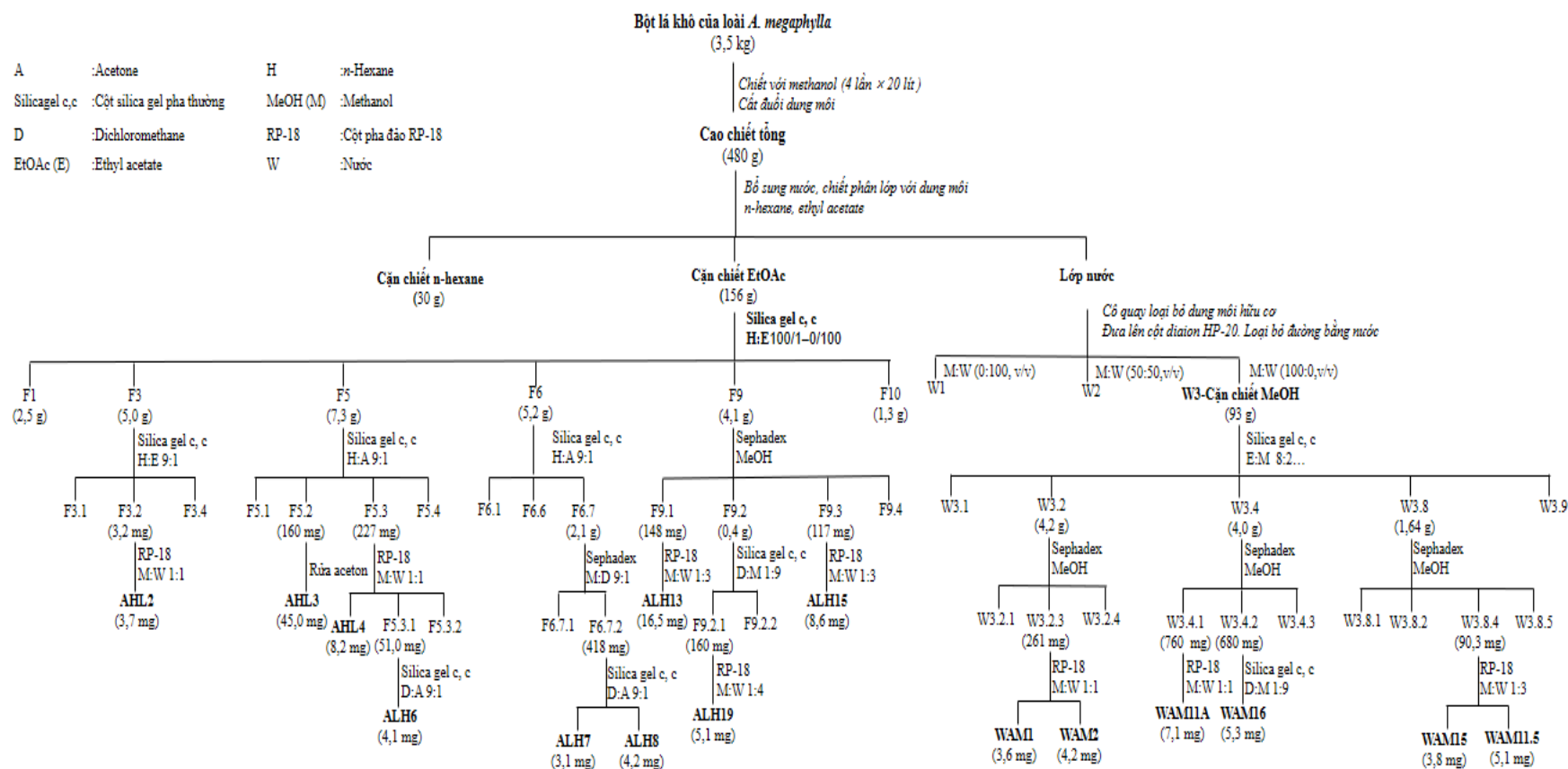


Hình P2.3. Một số bộ phận của loài *A. glischroloma*

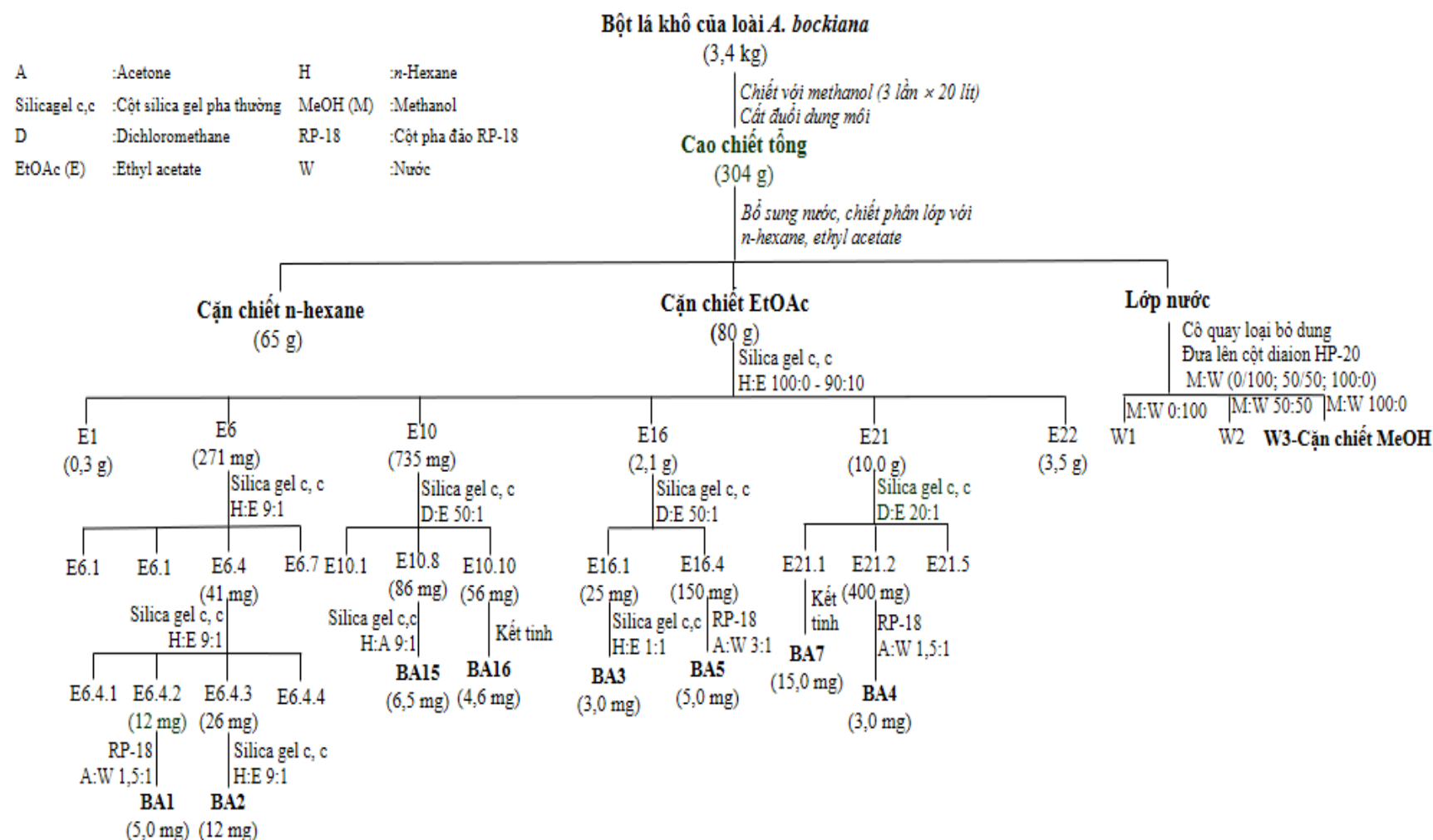
A: Dạng sống; B, C: Mặt trước, mặt sau cành mang lá; D, E: Mặt trước, mặt sau lá;
F: Cành mang chồi non; G: Cành mang nụ; H, I: Thân; K, L, M: Quả khô; N: Hạt

Phụ lục 3. Phân lập các hợp chất từ lá của ba loài nghiên cứu

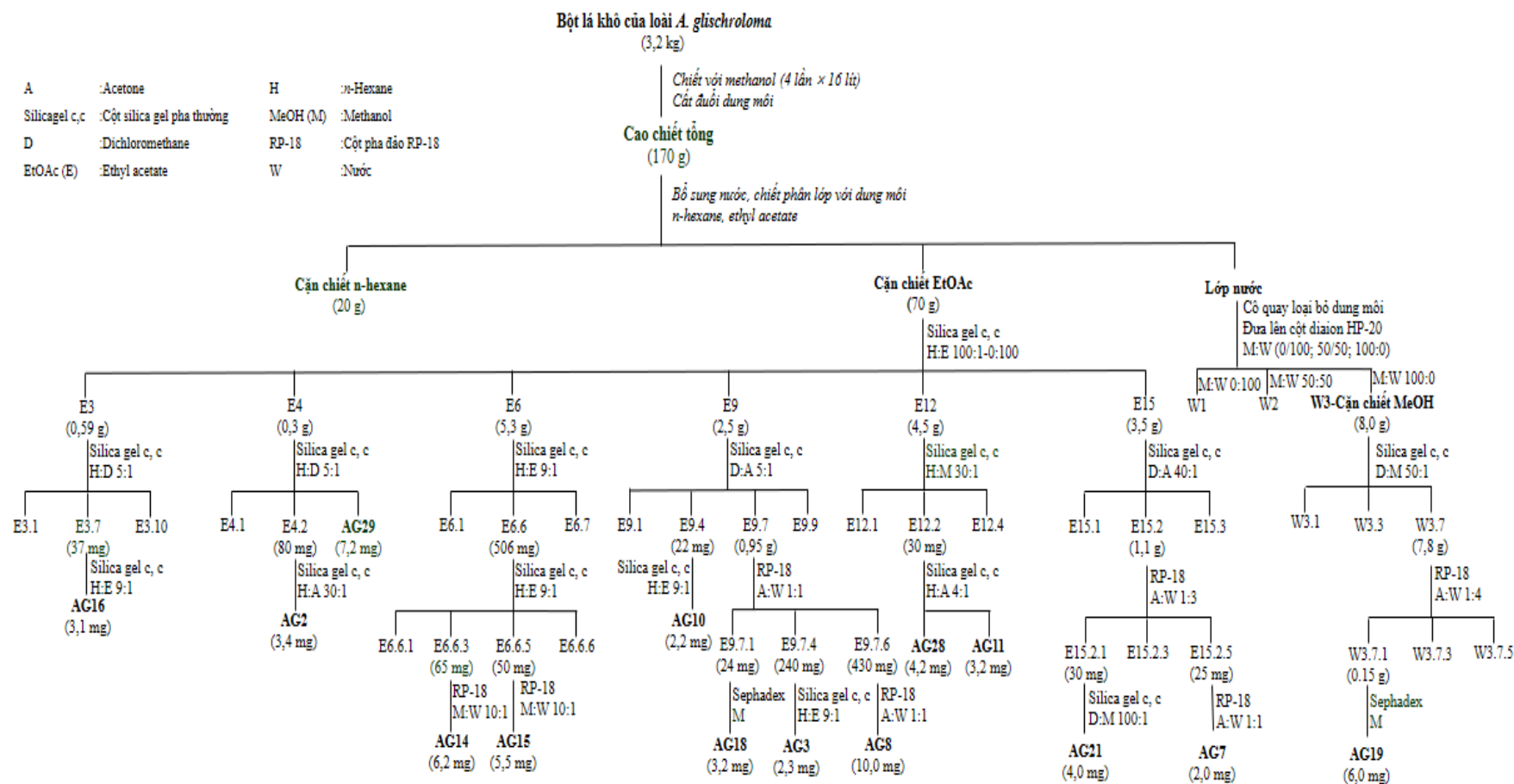
Phụ lục 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ ba loài nghiên cứu



Hình P3.1.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lá của loài *A. megaphylla*



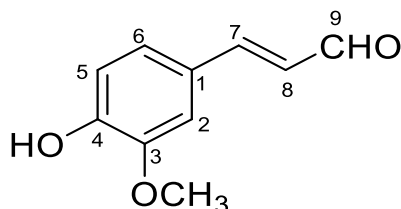
Hình P3.1.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lá của loài *A. bockiana*



Hình P3.1.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lá của loài *A. glischroloma*

Phụ lục 3.2. Xác định công thức hóa học của các hợp chất phân lập được từ lá của ba loài nghiên cứu

Coniferyl aldehyde (AHL2)



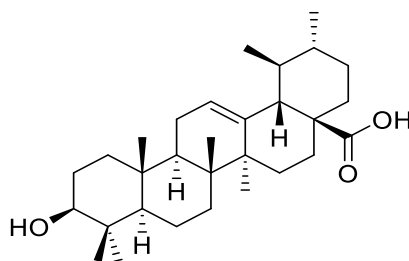
Hình P3.2.3a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL2 (3)**

Bảng P3.2.3. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (100 MHz) của hợp chất **AHL2 (3)** trong CDCl_3 và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{C} [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., J in Hz)	δ_{H} (mult., J in Hz) [TLTK]
1	126,7	126,7		
2	109,4	109,3	7,07 (1H, d, $J = 2$ Hz)	7,07 (1H, d, $J = 1,7$ Hz)
3	146,9	147,0		
4	149,9	148,8		
5	114,9	114,9	6,96 (1H, d, $J = 8$ Hz)	6,97 (1H, d, $J = 8,2$ Hz)
6	124,0	124,1	7,13 (1H, dd, $J = 8$ Hz, 2 Hz)	7,13 (1H, dd, $J = 1,7$ và 8,2 Hz)
7	152,9	153,1	7,41 (1H, d, $J = 15,5$ Hz)	7,40 (1H, d, $J = 15,8$ Hz)
8	126,5	126,4	6,59 (1H, dd, $J = 15,5$ Hz, 8 Hz)	6,59 (1H, dd, $J = 7,8$ và 15,8 Hz)
9	193,5	193,6	9,66 (1H, d, $J = 8$ Hz)	9,66 (1H, d, $J = 7,8$ Hz)
OMe	56,0	56,0	3,95 (3H, s)	3,95 (3H, s)

^a: 100 MHz, CDCl_3 ^c: 500 MHz, CDCl_3

TLTK: Moujir L., Seca A. M., Silva A. M., Barreto M. C. (2008), “Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia*”, *Planta Med.*, 74, pp. 751-753.

Ursolic acid (AHL3)**Hình P3.2.4a.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL3 (4)****Bảng P3.2.4.** Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL3** trong $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ và TLTK

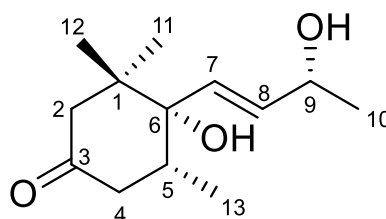
C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ [TLTK]	C^{b}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$ (Mult., J Hz) [TLTK]
1	38,5	38,5		
2	27,9	27,9		
3	78,8	78,8	3,12, 1H, m	3,18, 1H, m
4	39,3	39,0		
5	55,1	55,1		
6	18,2	18,2		
7	32,9	32,9		
8	39,3	39,4		
9	47,5	47,5		
10	36,8	36,8		
11	23,1	23,1		
12	125,3	125,4	5,17, 1H, t, 7,5 Hz	5,19, 1H, t, 3,1 Hz
13	138,1	138,1		
14	41,9	42,0		
15	26,6	26,7		
16	24,1	24,1		
17	47,7	47,7		
18	52,7	52,7		
19	39,0	38,8		
20	36,8	38,6		
21	30,6	30,6		
22	36,7	36,7		
23	28,0	27,9	0,90 (3H, s)	0,93 (3H, s)
24	15,3	15,3	0,85 (3H, s)	0,87 (3H, s)
25	15,5	15,5	0,70 (3H, s)	0,72 (3H, s)
26	16,7	16,8	0,74 (3H, s)	0,76 (3H, s)
27	23,4	23,4	1,01 (3H, s)	1,03 (3H, s)
28	180,5	180,6	-	-

C	δ_C^a [TLTK]	C ^b	δ_H^c (Mult., J Hz)	δ_C^d (Mult., J Hz) [TLTK]
29	16,9	16,9	0,80 (3H, d, 6,5 Hz)	0,81 (3H, d, 6,4 Hz)
30	21,1	21,0	0,87 (3H, d, 6,5 Hz)	0,89 (3H, d, 6,2 Hz)

^a: CDCl₃ ^b: CDCl₃+ CD₃OD, 125 MHz ^c: CDCl₃+ CD₃OD, 500 MHz ^d: CDCl₃

TLTK: Acebey-Castellon I. L., Voutquenne-Nazabadioko L., Doan T. M. H., Roseau N., Bouthagane N., Muhammad D., Lavaud, C. (2011), “Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*”, *Journal of Natural Products*, 74(2), pp. 163-168.

4,5-Dihydroblumenol (AHL4)



Hình P3.2.5a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL4 (5)**

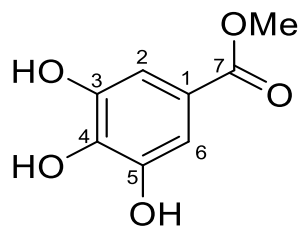
Bảng P3.2.5. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL4** trong CD₃OD và TLTK

C	δ_C^a	δ_C^b [TLTK]	δ_H^c (mult., J in Hz)	δ_H^d (mult., J in Hz) [TLTK]
1	43,9	43,8		
2	52,5	52,2	2,88 (1H, d, J=13,5 Hz) 1,83 (1H, dd, J=13,5 Hz, 2 Hz)	2,87 (1H, d, J = 13,4 Hz) 1,82 (1H, dd, J= 13,4, 2,0 Hz)
3	205,0	214,6		
4	46,2	45,9	2,45 (1H, d, J=13,5 Hz) 2,16 (1H, m)	2,45 (1H, t, J = 13,4 Hz) 2,13 (1H, dd, J = 13,4, 2,1)
5	37,9	37,5	2,29 (1H, m)	2,27 (1H, m)
6	77,9	78,0		
7	132,2	133,8	5,68 (1H, d, J = 16,0 Hz)	5,66 (1H, d, J = 15,8 Hz)
8	136,6	135,3	5,86 (1H, dd, J = 16,0, 6,0 Hz)	5,83 (1H, dd, J = 15,8, 5,9 Hz)
9	69,0	69,4	4,36 (1H, m)	4,34 (1H, quint)
10	24,9	24,2	1,28 (3H, d, J= 6,5 Hz)	1,27 (3H, d, J = 6,4 Hz)
11	25,0	25,9	1,00 (3H, s)	0,98 (3H, s)
12	24,0	25,2	0,94 (3H, s)	0,92 (3H, s)
13	19,5	16,3	0,92 (3H, d, J = 6,5 Hz)	0,90 (3H, d, J = 6,6 Hz)

^{a, b}: 125 MHz, CD₃OD; ^{c, d}: 500 MHz, CD₃OD

TLTK: De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. (2004), “Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production”, *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp. 7525-7531.

Methyl gallate (AHL6)



Hình P3.2.6a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL6 (6)**

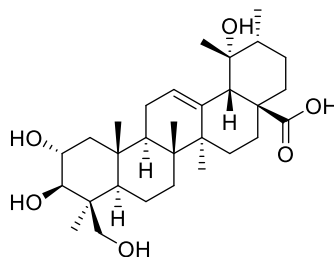
Bảng P3.2.6. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL6** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., <i>J</i> in Hz) [TLTK]
1	122,4	119,3		
2	111,1	108,5	7,06 (2H, s)	6,94 (2H, s)
3	146,5	145,6		
4	139,8	138,4		
5	146,5	145,6	7,06 (2H, s)	
6	111,1	108,5		
7	169,1	166,3		
OMe	52,2	51,0	3,83 (3H, s)	3,74 (3H, s)

^a: 125 MHz, CD_3OD ^b: 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ^c: 500MHz, CD_3OD ^d: 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$

TLTK: Sánchez E., Heredia N., Camacho-Corona M. D. R. and García S. (2013), “Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*”, *Journal of applied microbiology*, 115(6), pp. 1307-1316.

24-Hydroxytormentic acid (AHL7)



Hình P3.2.7a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL7 (7)**

Bảng P3.2.7. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL7** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK 1]	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$ [TLTK 2]	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{e}}$ (mult., J in Hz)
1	47,8	46,1	47,8		
2	69,6	67,7	68,7	3,81 (1H, m)	3,70 (1H, t, $J= 10,4$ Hz)
3	86,0	84,2	85,8	3,07 (1H, d, $J = 9,5$ Hz)	2,96 (1H, d, $J= 10$ Hz)
4	44,4	42,5	44,0		
5	57,2	53,3	56,6		
6	19,9	18,0	19,4		
7	34,4	32,6	33,8		
8	39,0	40,8	40,4		
9	46,9	46,8	47,9		
10	36,4	39,2	38,3		
11	24,9	24,9	24,4		
12	129,1	127,2	127,9	5,31 (1H, t, $J = 3,5$ Hz)	5,18 (1H, t, $J = 4$ Hz)
13	140,1	138,2	140,0		
14	42,6	41,1	42,1		
15	29,5	28,6	29,3		
16	27,0	25,4	26,9		
17	49,6	47,7	48,3		
18	55,0	55,3	54,6		
19	73,6	71,9	72,7		
20	43,0	41,3	42,4		
21	26,6	27,7	26,4		
22	39,0	37,2	38,5		
23	23,8	22,9	24,2	1,24 (3H, s)	1,14 (3H, s)
24	66,2	64,2	65,7	4,05 (1H, d, $J = 11,0$ Hz)	3,94 (1H, d, $J= 12$ Hz)

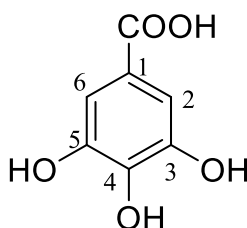
				3,40 (1H, d, $J = 11,0$ Hz)	3,28 (1H, d, $J = 12$ Hz)
25	17,5	21,8	17,3	0,79 (3H, s)	0,69 (3H, s)
26	17,4	14,6	17,1	1,00 (3H, s)	0,90 (3H, s)
27	24,7	22,3	24,6	1,35 (3H, s)	1,24 (3H, s)
28	182,3	180,7	180,7		
29	27,3	23,0	27,1	1,21 (3H, s)	1,09 (3H, s)
30	16,6	15,7	16,8	0,94 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	0,83 (3H, d, $J = 6$ Hz)

^a: 125 MHz, CD₃OD; ^b: 100 MHz, CDCl₃; ^c: Pyridine ^d: 500 MHz, CD₃OD; ^e: 360 MHz, CDCl₃

TLTK: 1. Houghton P. J., Lian L. M. (1986), “Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*”, *Phytochemistry*, 25(8), pp. 1939-1944.

2. Li X. H., Shen D. D., Li N. and Yu S. S. (2003), “Bioactive triterpenoids from *Symplocos chinensis*”, *Journal of Asian natural products research*, 5(1), pp. 49-56.

Gallic acid (AHL8)



Hình P3.2.8a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL8 (8)**

Bảng P3.2.8. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL8** trong CD₃OD và TLTK

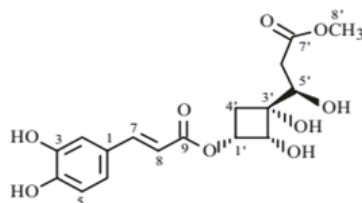
C	δ_C^a	δ_C^b [TLTK]	δ_H^c (mult., J in Hz)	δ_H^d (mult., J in Hz) [TLTK]
1	122,0	122,8		
2	110,4	110,5	7,08 (s)	8,07 (1H, s)
3	146,4	147,5		
4	139,6	140,4		
5	146,4	147,5		
6	110,4	110,5	7,08 (s)	8,07 (1H, s)
COOH	170,4	169,6		

^a: 125 MHz, CD₃OD ^b: 125 MHz, C₅D₅N ^c: 500 MHz, CD₃OD ^d: 500 MHz, C₅D₅N

TLTK: Vũ Đức Lợi, Phạm Giang Lam, Hoàng Văn Hùng và Nguyễn Thị Phương (2016), “Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ lá cây Gối hạc (*Leea rubra* Blume

ex Spreng.)”, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 32(1), pp. 12-17.

Convoldorin (AHL13) (9)



Hình P3.2.9a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL13**

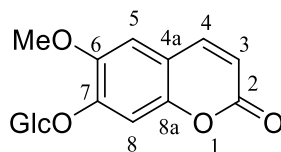
Bảng P3.2.9. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL13** trong acetone- d_6 và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., J in Hz) [TLTK]
1	127,5	127,50	-	-
2	115,1	115,03	7,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	7,03 (1H, s)
3	148,8	149,90	-	-
4	146,3	146,91	-	-
5	116,3	116,52	6,86 (1H, d, $J = 7,0$ Hz)	6,77 (1H, d, $J = 7,8$)
6	122,5	123,0	7,03 (1H, dd, $J = 7,0$, 2,0 Hz)	6,94 (1H, d, $J = 7,8$)
7	145,8	147,21	7,53 (1H, d, $J = 13,0$ Hz)	7,52 (1H, d, $J = 15,8$)
8	115,7	114,91	6,22 (1H, d, $J = 13,0$ Hz)	6,20 (1H, d, $J = 15,9$)
9	167,0	168,30	-	-
1'	71,4	72,06	5,33 (1H, m)	5,23–5,27 (1H, m)
2'	70,7	72,55	3,73 (1H, dd, $J = 7,0$ Hz, 2,5 Hz)	3,70 (1H, m)*
3'	75,8	7,81	-	-
4'	38,6	37,80	2,16 (1H, dd, $J = 12,0$ Hz, 2,5 Hz) 2,07 (1H, m)	2,10–2,22 (3H, m)
5'	73,0	70,31	4,17 (1H, m)	4,10–4,17 (1H, m)
6'	37,9	38,0	2,25 (1H, m) 2,01 (1H, dd, $J = 11,0$ Hz, 3,0 Hz)	1,98–2,03 (1H, m) 2,10–2,22 (1H, m)
7'	174,4	175,40	-	-
OMe	52,5	53,0	3,69 (3H, s)	3,70 (3H, s)

^a: 125 MHz, acetone-*d*₆ ^b: 400 MHz, CD₃OD ^c: 500 MHz, acetone-*d*₆ ^d: 100 MHz, CD₃OD

TLTK: Hassine M., Zardi-Berguaoui A., Harzallah-Skhiri F., Abreu P., Jannet H. B. (2016), “Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from the roots of the Tunisian *Convolvulus dorycnium*”, *Chemistry of Natural Compounds*, 52(5), pp. 830-833.

Scopoline (AHL19)



Hình P3.2.10a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AHL19 (10)**

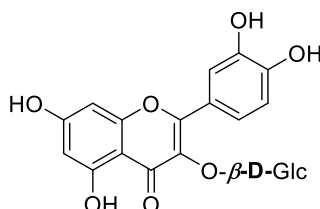
Bảng P3.2.10. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AHL19** trong CD₃OD và TLTK

C	δ _C ^a	δ _C ^b [TLTK]	δ _H ^c (mult., <i>J</i> in Hz)	δ _H ^d (mult., <i>J</i> in Hz) [TLTK]
2	163,5	163,53		
3	114,6	114,55	6,32 (1H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,33 (1H, d, <i>J</i> = 9,5 Hz)
4	145,7	145,63	7,91 (1H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,92 (1H, d, <i>J</i> = 9,5 Hz)
4a	114,5	114,59		
5	110,8	110,83	7,12 (1H, s)	7,22 (1H, s)
6	148,2	148,28		
7	151,7	151,76		
8	105,2	105,28	6,79 (1H, s)	
8a	150,7	150,70		
OMe	57,1	57,10	3,93 (3H, s)	3,92 (s)
Glc				
1'	102,0	102,08	5,08 (1H, d, <i>J</i> = 6,0 Hz)	5,09 (1H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz)
2'	74,7	74,72	3,59-3,42 (4H, m)	3,43-3,74 (6H)
3'	78,3	78,40	3,59-3,42 (4H, m)	
4'	71,2	71,23	3,59-3,42 (4H, m)	
5'	77,8	77,84	3,59-3,42 (4H, m)	
6'	62,3	62,41	3,92 (1H, dd, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2Hz) 3,72 (1H, dd, <i>J</i> = 10,0 Hz, 5Hz)	

^a: 125 MHz, CD₃OD ^b: 125 MHz, DMSO-*d*₆ ^c: 500 MHz, CD₃OD ^d: 500 MHz, DMSO-*d*₆

TLTK: Hoàng Lê Tuấn Anh (2015), “Nghiên cứu thành phần hóa học cây Lu lu đực (*Solanum nigrum* L.) tại tỉnh Thái Bình, *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ VI*, tr.1025-1031.

Isoquercitrin (WAM1)



Hình P3.2.11a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WAM1 (11)**

Bảng P3.2.11. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất

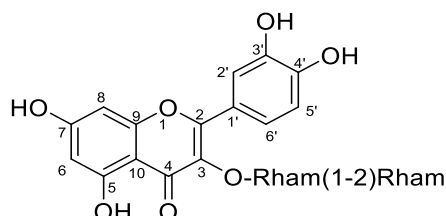
WAM1 trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a}}[\text{TLTK}]$	$\delta\text{C}^{\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)
2	159,05	159,0	
3	135,65	135,6	
4	179,50	179,5	
5	163,05	163,0	
6	99,92	99,9	6,22 (1H, d, 2,0 Hz)
7	166,06	166,1	
8	94,73	94,7	6,40 (1H, d, 2,0 Hz)
9	158,48	158,9	
10	105,70	105,7	
1'	123,10	123,2	
2'	117,59	117,6	7,72 (1H, d, 2,5 Hz)
3'	145,91	145,9	
4'	149,85	149,8	
5'	116,01	116,0	6,88 (1H, d, 8,5 Hz)
6'	123,20	123,2	7,60 (1H, dd, 2,5 Hz, 8,5 Hz)
1''	104,39	104,4	5,26 (1H, d, 7,5 Hz)
2''	75,74	75,5	
3''	78,18	78,2	
4''	71,25	71,2	
5''	78,38	78,4	
6''	62,59	62,6	3,73 (1H, dd, 2,5 Hz, 12,0 Hz) 3,59 (1H, dd, 5,0 Hz, 12,0 Hz)

^a: CD_3OD , ^b: CD_3OD , 125 MHz ^c: CD_3OD , 600 MHz

TLTK. Kim H. Y., Moon B. H., Lee H. J., Choi D. H. (2004), “Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity”, *J. Ethnopharm*, 93, pp. 227-230.

Horridin (WAM2)



Hình P3.2.12a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WAM2 (12)**

Bảng P3.2.12. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **WAM2** trong acetone- d_6 và TLTK

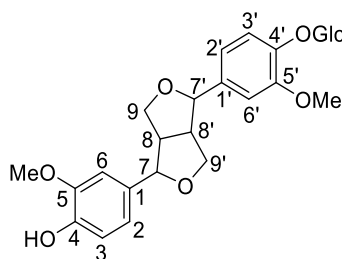
C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., J in Hz) [TLTK]
2	157,9	156,5		
3	135,9	133,8		
4	179,1	178,2		
5	162,9	161,3		
6	99,4	99,0	6,26 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,24 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
7	164,8	164,4		
8	94,5	94,4	6,47 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,49 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
9	158,3	156,8		
10	105,7	104,1		
1'	122,8	122,2		
2'	116,7	115,7	7,50 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	7,31 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
3'	145,7	145,0		
4'	148,9	148,6		
5'	116,1	116,3	7,00 (1H, d, $J = 7,0$ Hz)	6,89 (1H, d, $J = 8,2$ Hz)
6'	122,6	122,0	7,40 (1H, dd, $J = 7,0$ Hz, 2,0 Hz)	7,28 (1H, dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz)
1''	101,8	100,3	5,64 (1H, d, $J = 1,0$ Hz)	5,32 (1H, br s)
2''	77,6	76,4	4,31 (1H, m)	4,21 (1H, br s)
3''	71,4	70,0		
4''	73,2	71,8		
5''	71,9	70,4		
6''	17,87	17,7	0,94 (3H, d, $J = 5,0$ Hz)	0,90 (3H, d, $J = 5,7$ Hz)
1'''	102,9	101,5	5,06 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	4,79 (1H, br s)
2'''	71,5	70,2		

3'''	72,2	70,5		
4'''	73,7	71,9		
5'''	69,7	69,6		
6'''	17,95	17,4	1,22 (3H, d, $J = 5,5$ Hz, H-6'')	0,94 (3H, d, $J = 5,7$ Hz)
5-OH			12,75 (1H, s)	

^a: 125 MHz, acetone- d_6 ^b: 500 MHz, DMSO- d_6 ^c: 500 MHz, acetone- d_6 ^d: 200 MHz, CD₃OD

TLTK: Flamini G., Bulleri C., Morelli I., Manunta A., (2000), “A new flavonoid glycoside from *Centaurea horrida*”, *J. Nat. Prod.*, 63, pp. 662-663.

Pinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside (WAM11A)



Hình P3.2.13a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WAM11A (13)**

Bảng P3.2.13. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **WAM11A** trong CD₃OD và TLTK

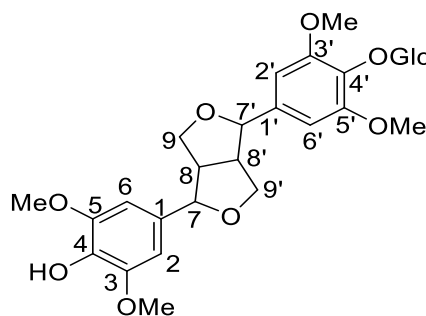
C	δ_C^a	δ_C^b [TLTK]	δ_H^c (mult., J in Hz)	δ_H^d (mult., J in Hz) [TLTK]
1	137,4	137,1	-	-
2	111,0	111,2	7,05 (1H, s)	7,04 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
3	149,2	148,0	-	-
4	147,5	146,8	-	-
5	118,0	117,3	7,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)	7,12 (1H, d, $J = 8,3$ Hz)
6	120,1	119,3	6,83 (1H, dd, $J = 7,5$ Hz)	6,89 (1H, dd, $J = 8,3, 1,9$ Hz)
7	87,5	86,4	4,79 (1H, m)	4,22 (2H, m)
8	55,3	55,2	3,15 (2H, m)	3,09 (2H, m)
9	72,7	72,2	3,89 (2H, m)	3,80 (2H, m)
1'	133,7	133,7	-	-
2'	111,6	110,4	6,95 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	6,98 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
3'	147,4	146,6	-	-
4'	150,9	150,2	-	-

C	δ_C^a	δ_C^b [TLTK]	δ_H^c (mult., J in Hz)	δ_H^d (mult., J in Hz) [TLTK]
5'	116,1	115,3	6,78 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz)	6,79 (1H, d, $J = 8,3$ Hz)
6'	119,8	118,9	6,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)	6,83 (1H, dd, $J = 8,3, 1,9$ Hz)
7'	87,1	86,2	4,72 (1H, m)	4,71 (1H, d, $J = 4,1$ Hz)
8'	55,5	55,1	3,15 (2H, m)	3,39 (1H, t, $J = 9,1$ Hz)
9'	72,6	72,1	4,25 (2H, m)	4,67 (1H, d, $J = 4,1$ Hz)
1''	102,8	102,3	4,90 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)	4,90 (1H, d, $J = 7,4$ Hz)
2''	74,9	74,5	3,53-3,41 (4H, m)	3,62-3,48 (1H, m)
3''	78,2	77,7	3,53-3,41 (4H, m)	3,62-3,48 (1H, m)
4''	71,3	71,1	3,53-3,41 (4H, m)	3,62-3,48 (1H, m)
5''	77,8	77,6	3,53-3,41 (4H, m)	3,62-3,48 (1H, m)
6''	62,4	62,5	3,88 (1H, m) 3,71 (1H, m)	4,02 (1H, dd, $J = 9,3, 4,6$ Hz) 3,60 (1H, dd, $J = 4,6, 2,5$ Hz),
OMe	56,8	56,3	3,89 (3H, s)	3,84 (3H, s)
OMe	56,4	56,1	3,87 (3H, s)	3,84 (3H, s)

^a: 500 MHz, CD₃OD ^b: 400MHz, CD₃COCD₃ ^c: 125 MHz, CD₃OD ^d: 100 MHz, CD₃COCD

TLTK: Ouyang, M. A., Wein, Y. S., Zhang, Z. K., and Kuo, Y. H. (2007), "Inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) replication of pinorexinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*", *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(16), 6460-6465.

Syringaresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside (WAM16)



Hình P3.2.14a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WAM16 (14)**

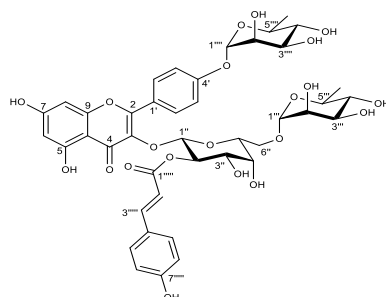
Bảng P3.2.14. Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **WAM16** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., J in Hz) [TLTK]
1	133,1	139,62	-	-
2	104,6	104,96	6,72 (2H, s)	6,72 (2H, s)
3	149,4	154,49	-	-
4	136,3	135,72	-	-
5	149,4	154,49	-	-
6	104,6	104,96	6,72 (2H, s)	6,72 (2H, s)
7	87,6	87,26	4,72 (1H, d, $J = 3,5$ Hz)	4,77 (1H, d, $J = 4,6$ Hz)
8	55,7	55,57	3,13 (2H, m)	3,14 (1H, m)
9	72,9	72,93	3,90 (4H, m)	3,91 (1 H, m)
1'	139,6	133,17	-	-
2'	104,9	104,66	6,56 (2H, s)	6,65 (2H, s)
3'	154,4	149,44	-	-
4'	135,8	136,35	-	-
5'	154,4	149,44	-	-
6'	104,9	104,66	6,56 (2H, s)	6,65 (2H, s)
7'	87,2	87,65	4,72 (1H, d, $J = 3,5$ Hz)	4,72 (1H, d, $J = 4,5$ Hz)
8'	55,7	55,78	3,13 (2H, m)	3,14 (1H, m)
9'	72,9	72,99	4,92 (4H, m)	4,28 (1H, m)
1''	105,4	105,43	4,85 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)	4,85 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)
2''	75,7	75,78	3,47 (1H, m)	3,47 (1H, m)
3''	77,8	77,90	3,41 (2H, m)	3,40 (2H, m)
4''	71,4	71,43	3,41 (2H, m)	3,40 (2H, m)
5''	78,3	78,40	3,19 (1H, m)	3,20 (1H, m)
6''	62,6	62,67	3,77 (1H, dd, $J = 2,0$ Hz, 10 Hz) 3,71 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz, 10 Hz)	3,76 (1H, m) 3,65 (1H, dd, $J = 12,0$ Hz, 5,2 Hz)
2xOMe	57,1	57,16	3,85 (6H, s)	3,86 (6H, s)
2xOMe	56,8	56,90	3,84 (6H, s)	3,84 (6H, s)

^a: 125 MHz, CD_3OD ^b: 100MHz, CD_3COCD_3 ^c: 500 MHz, CD_3OD ^d: 400 MHz, CD_3COCD_3

TLTK: Shahat A. A., Abdel-Azim N. S., Pieters L., Vlietinck A. J. (2004), "Isolation and NMR spectra of syringaresinol- β -D-glucoside from *Cressa cretica*", *Fitoterapia*, 75, pp. 771-773.

Camellikaempferoside B (WAM15)



Hình P3.2.15a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WAM15 (15)**

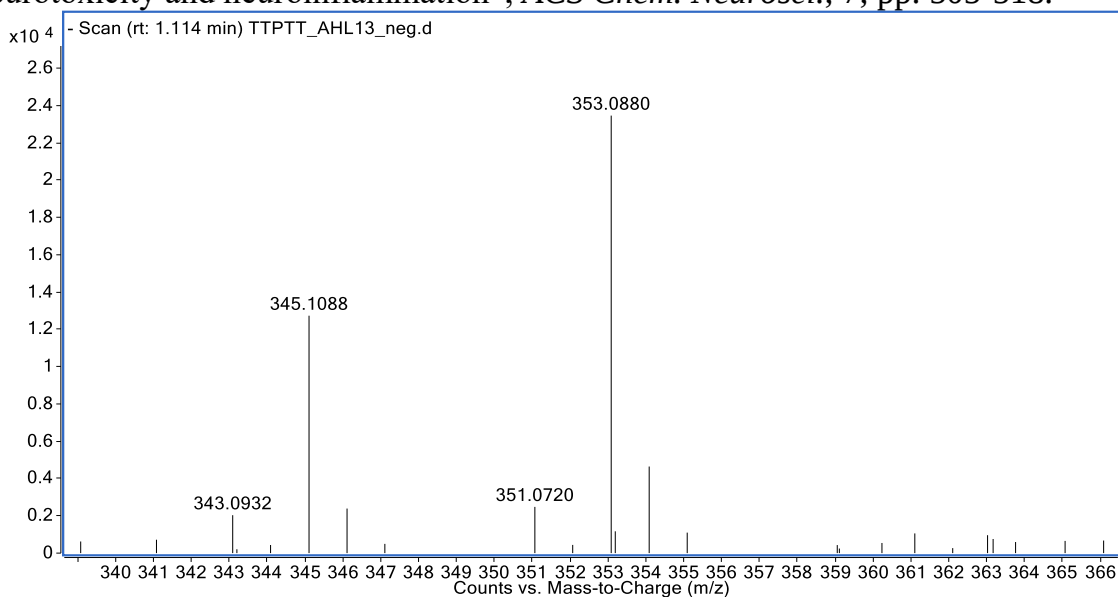
Bảng P3.2.15. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (150 MHz) của hợp chất **WAM15** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ [TLTK]	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$ (mult., <i>J</i> in Hz) [TLTK]
2	157,7	156,54	-	-
3	135,2	113,19	-	-
4	178,6	177,07	-	-
5	159,1	161,19	-	-
6	102,1	98,89	6,07 d (1,8)	6,178 d (2,0)
7	164,7	164,50	-	-
8	96,8	93,87	6,20 s	6,387 d (2,0)
9	158,8	156,36	-	-
10	105,85	103,97	-	-
1'	125,8	123,51	-	-
2'	131,9	130,68	8,06 d (9,0)	8,023 d (9,0)
3'	117,0	115,82	7,18 d (9,0)	7,160 d (9,0)
4'	159,6	157,91	-	-
5'	117,0	115,82	7,18 d (9,0)	7,160 d (9,0)
6'	131,9	130,68	8,06 d (9,0)	8,023 d (9,0)
3-O-glc				
1''	101,7	98,62	5,37 d (8,4)	5,530 d (8,0)
2''	73,93	73,88	5,39 dd (8,4, 10,2)	4,830 dd (8,2, 9,4)
3''	73,3	73,91	3,81*	3,481 ^b
4''	70,5	70,60	3,86 brd (3,6)	3,345 ^c
5''	75,5	75,75	3,71*	3,371 ^c
6''	67,2	66,99	3,80, 3,50	3,701 ^a , 3,250 ^d
6''-O-rha				
1'''	101,9	100,84	4,58 d (1,2)	4,350 br s
2'''	72,10	70,34	3,62	3,412 ^b
3'''	72,33	70,39	3,57*	3,488 ^b

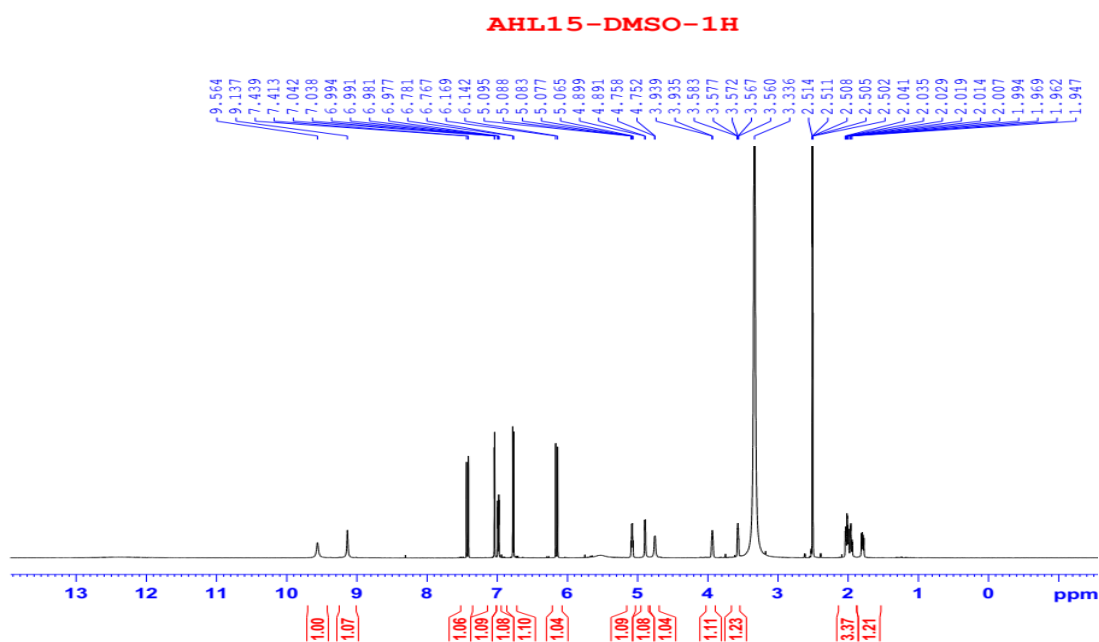
4'''	74,1	71,75	3,31*	3,142 m
5'''	69,6	68,30	4,01 m	3,272 ^d
6'''	18,1	17,94	1,27 d (6,6)	0,982 d (6,2)
4'-O-rha				
1''''	99,7	98,12	5,56 d (1,2)	5,540 br s
2''''	71,9	70,19	4,06 dd (3,6, 1,8)	3,881 m
3''''	72,2	70,31	3,55	3,674 ^a
4''''	73,86	71,75	3,50	3,318 ^c
5''''	69,7	70,04	3,57	3,423 ^b
6''''	18,00	17,71	1,23 d (6,6)	1,135 d (6,2)
2''-O-cinnamoyl				
1'''''	168,8	165,81	-	-
2'''''	115,1	114,35	6,37 d (15,6)	6,396 d (16,0)
3'''''	146,9	144,98	7,71 d (15,6)	7,603 d (16,0)
4'''''	127,0	125,12	-	-
5'''''	131,2	130,25	7,72 d (7,5)	7,541 d (8,6)
6'''''	116,9	115,86	6,85 d (7,5)	6,799 d (8,6)
7'''''	161,8	159,86	-	-
8'''''	116,9	115,86	6,85 d (7,5)	6,799 d (8,6)
9'''''	131,2	130,25	7,72 d (7,5)	7,541 d (8,6)

^a: 150 MHz, CD₃OD ^b: 125 MHz, DMSO-d₆ ^c: 600 MHz, CD₃OD ^d: 500 MHz, DMSO-d₆

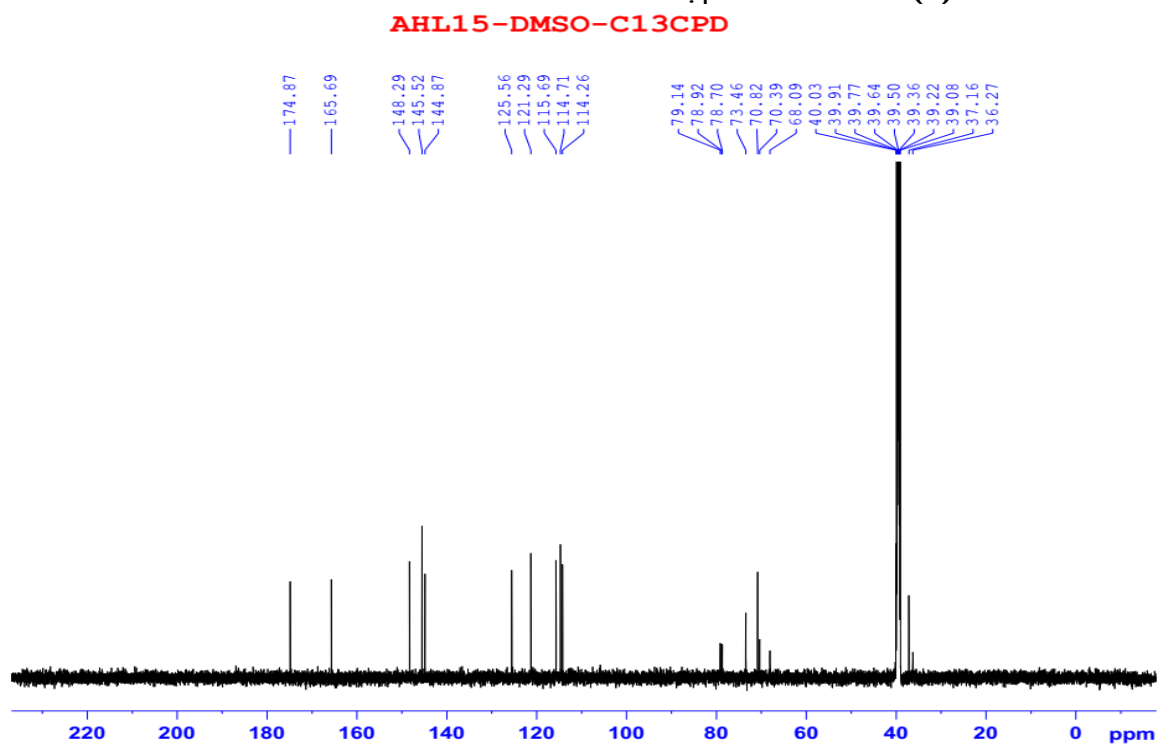
TLTK: Yang S., Liu W., Lu S., Tian Y. Z., Wang W. Y., Ling T.J., Liu R. T. (2016), "A novel multifunctional compound Camellikaempferoside B decreases A β production, interferes with A β aggregation, and prohibits A β -mediated neurotoxicity and neuroinflammation", *ACS Chem. Neurosci.*, 7, pp. 505-518.



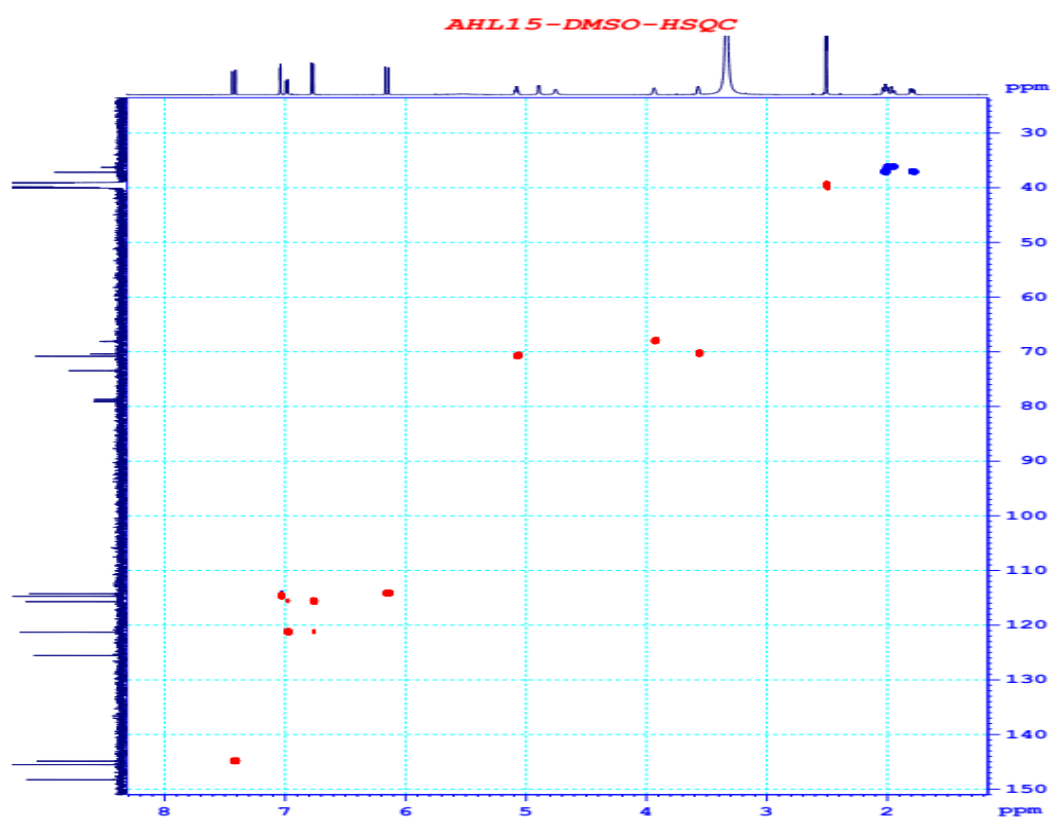
Hình P3.2.1b. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất AHL15 (1)



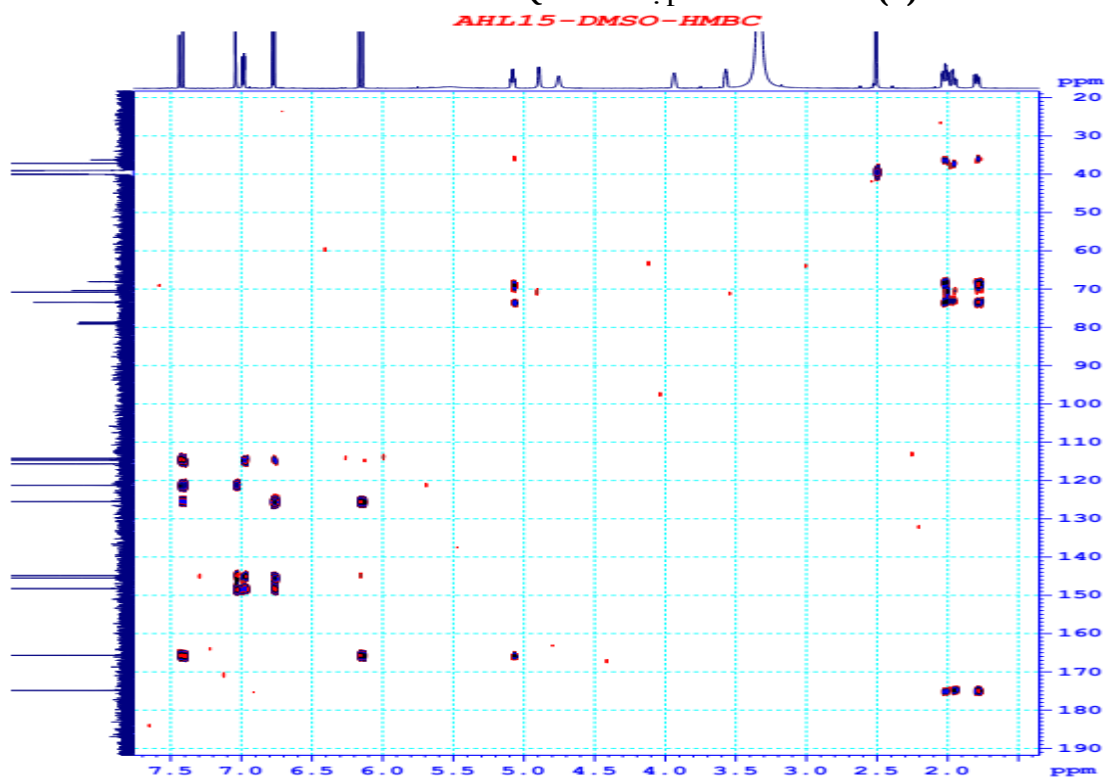
Hình P3.2.1c. Phổ ^1H -NMR của hợp chất AHL15 (1)



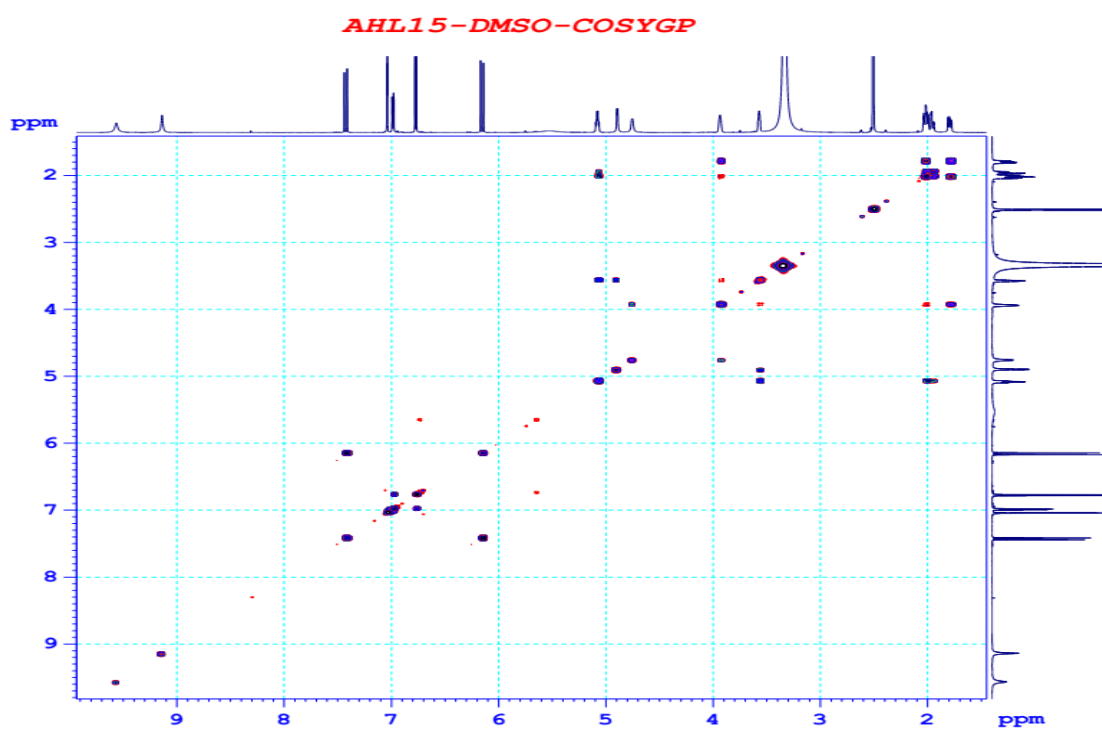
Hình P3.2.1d. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AHL15 (1)



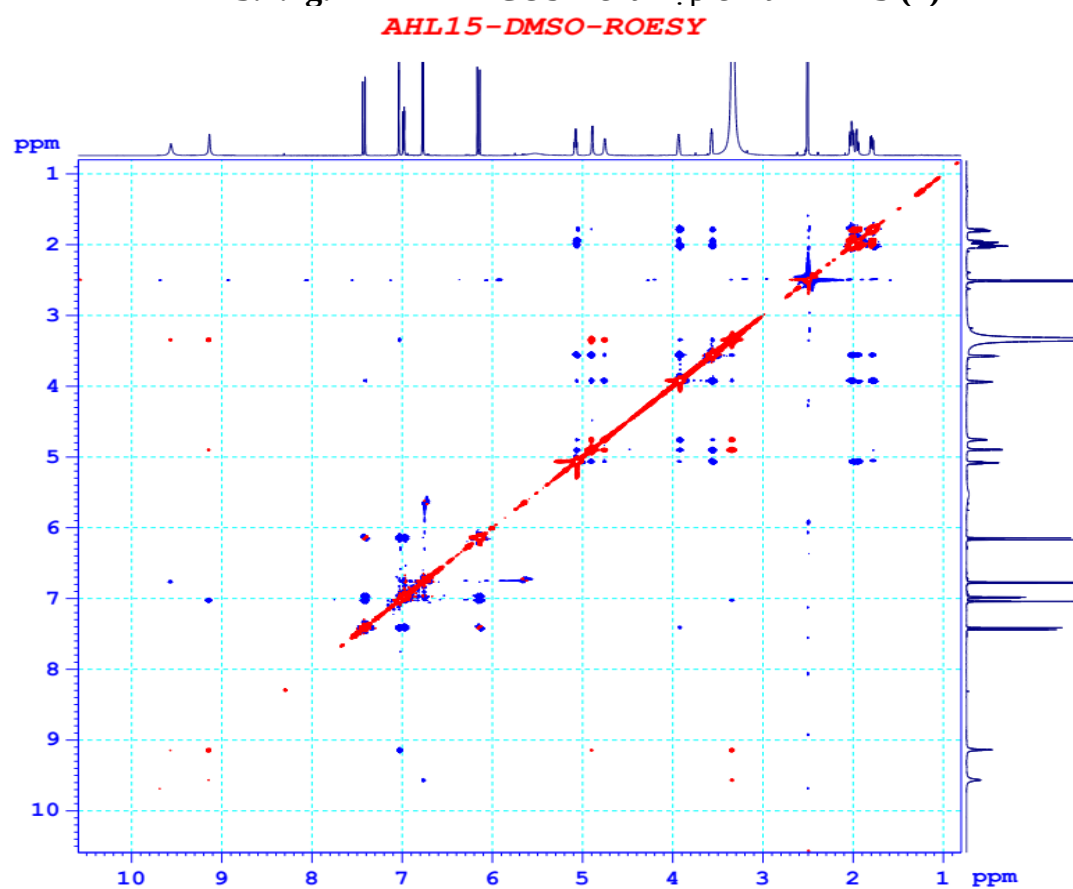
Hình P3.2.1e. Phổ HSQC của hợp chất AHL15 (1)



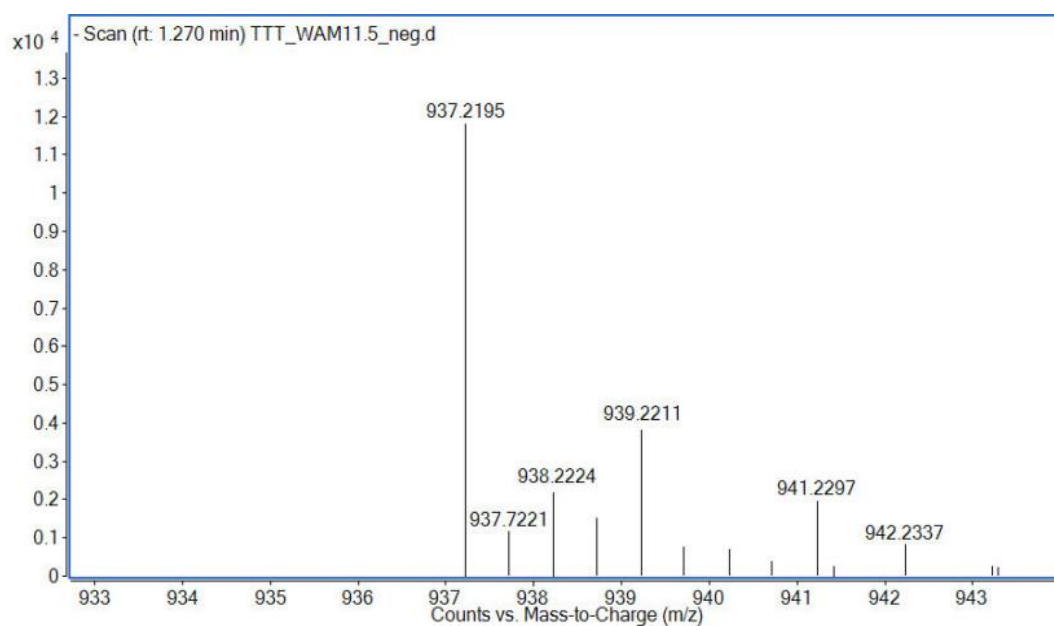
Hình P3.2.1f. Phổ HMBC của hợp chất AHL15 (1)



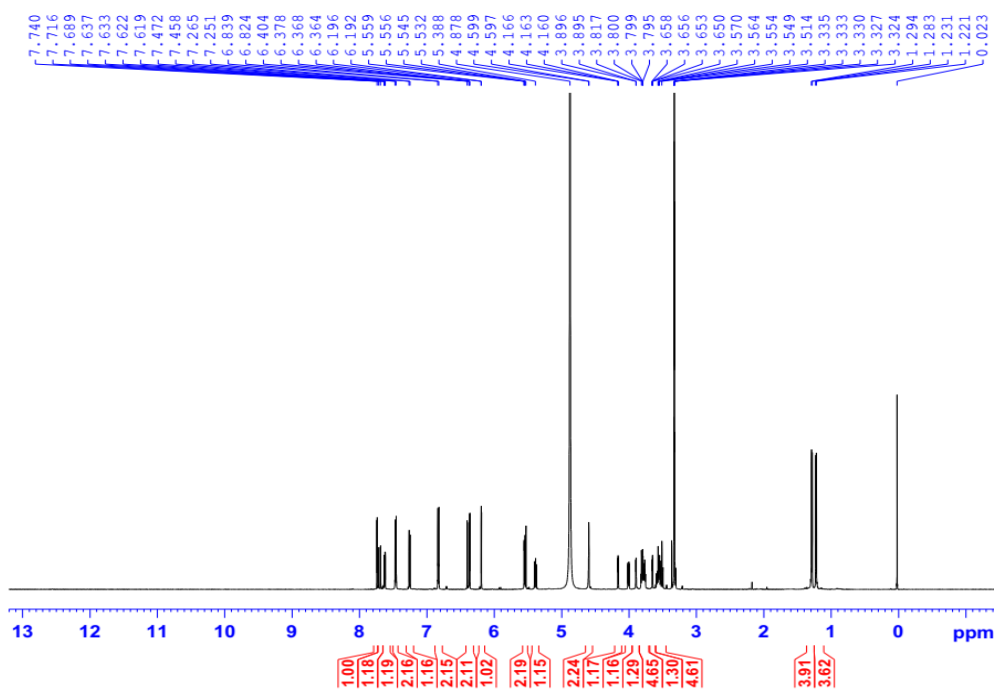
Hình P3.2.1g. Phổ ^1H - ^1H COSY của hợp chất AHL15 (1)



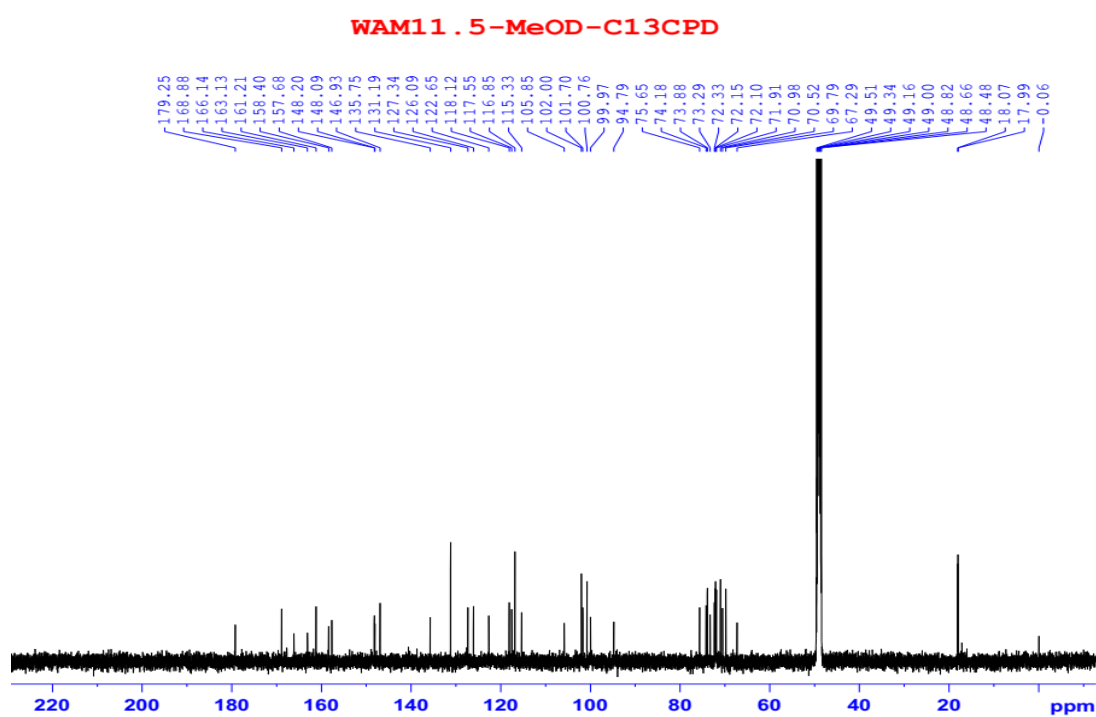
Hình P3.2.1h. Phổ NOESY của hợp chất AHL15 (1)



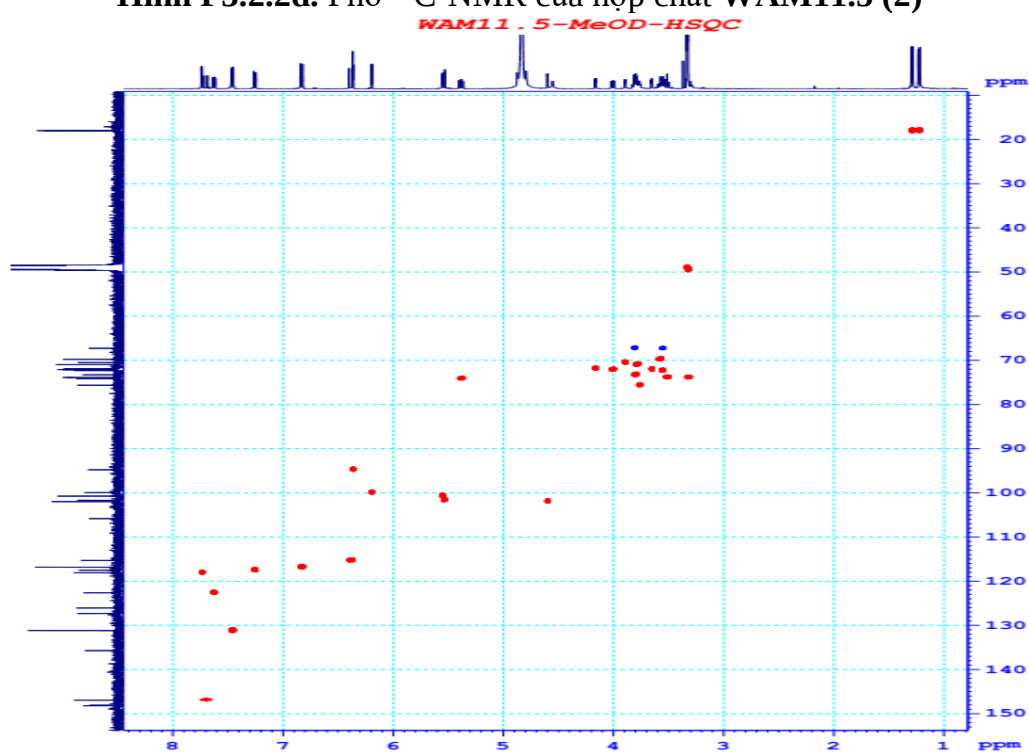
Hình P3.2.2b. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **WAM11.5 (2)**
WAM11.5-MeOD-1H



Hình P3.2.2c. Phổ ¹H-NMR của hợp chất **WAM11.5 (2)**



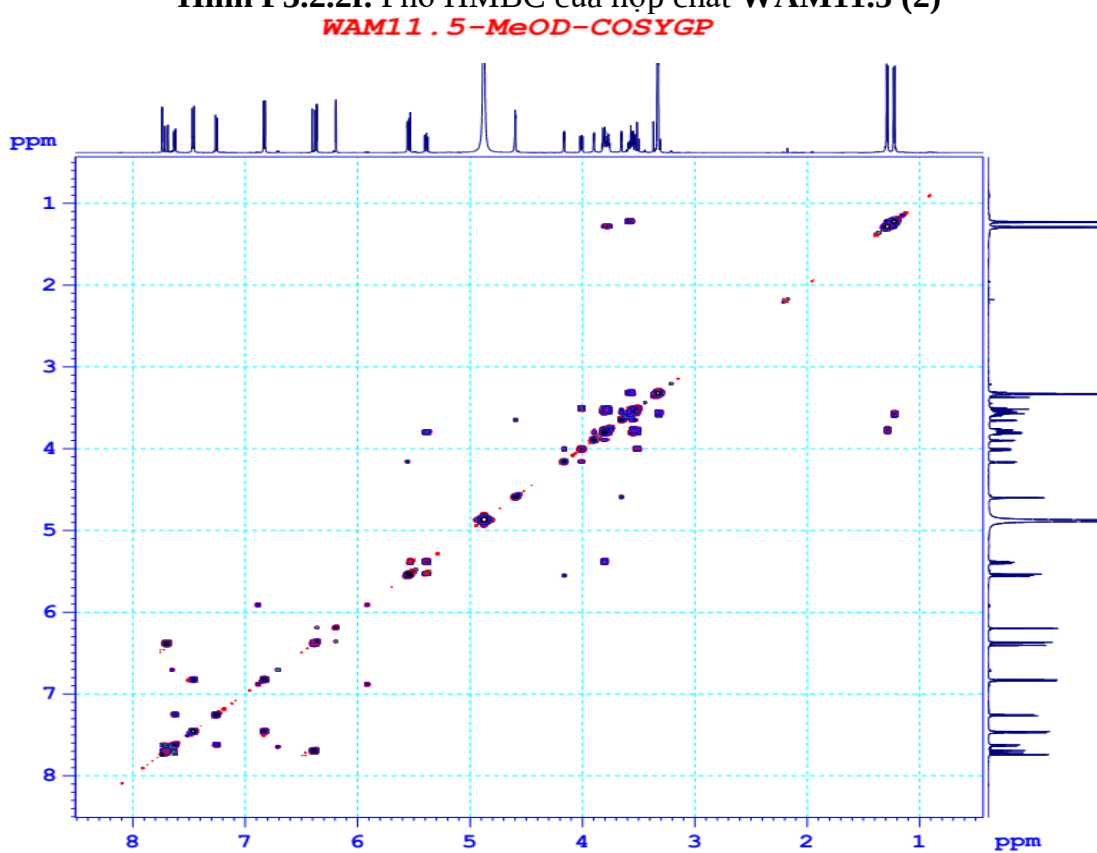
Hình P3.2.2d. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất WAM11.5 (2)



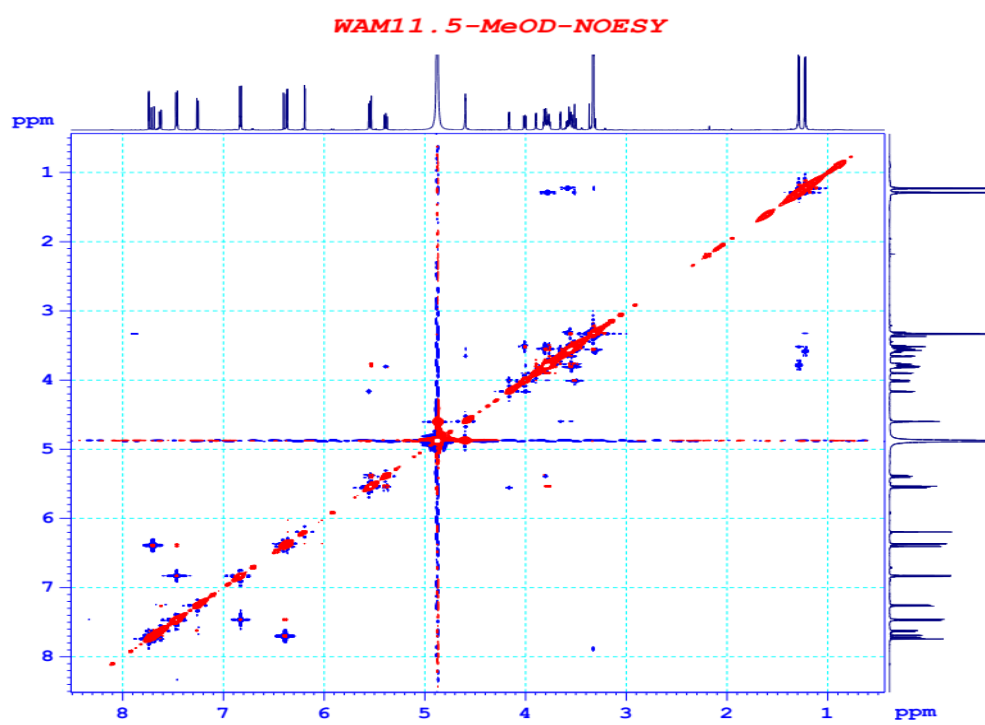
Hình P3.2.2e. Phổ HSQC của hợp chất WAM11.5 (2)



Hình P3.2.2f. Phổ HMBC của hợp chất WAM11.5 (2)



Hình P3.2.2g. Phổ ^1H - ^1H COSY của hợp chất WAM11.5 (2)

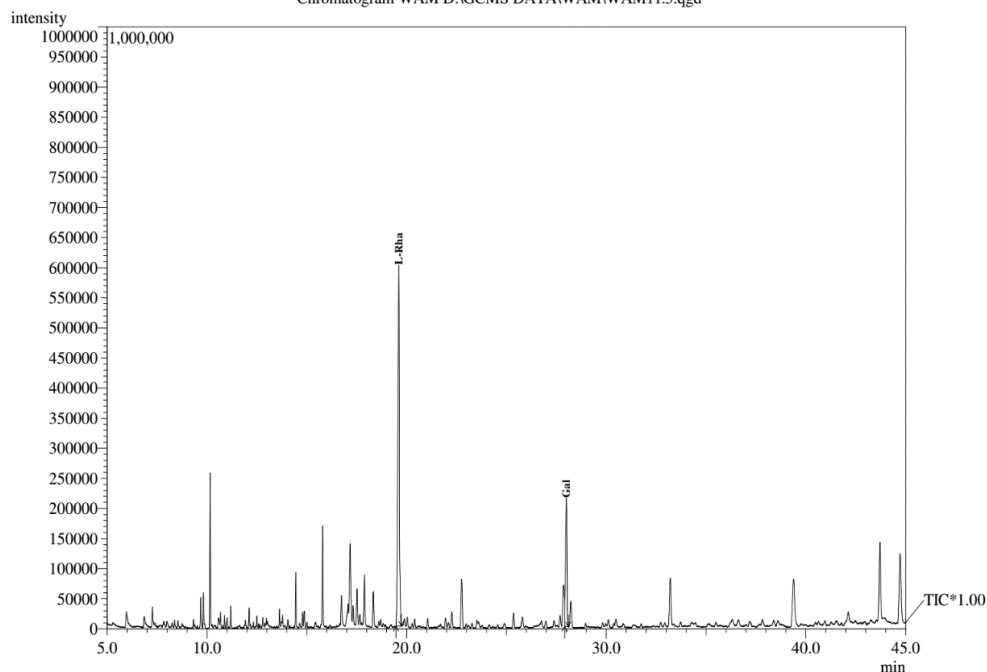


Hình P3.2.2h. Phổ NOESY của hợp chất **WAM11.5** (2)

5/13/2022 09:11:45

Sample name: WAM11.5.qgd
 Data file: D:\GCMS DATA\WAM\WAM11.5.qgd
 Date: 13/May/2022

Chromatogram WAM D:\GCMS DATA\WAM\WAM11.5.qgd



Method

Method

[Comment]

[Comment]

===== Analytical Line 1 =====

===== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

[GCMS-QP2010 Plus]

Column Oven Temp. :80.0 °C
 Injection Temp. :220.00 °C
 Injection Mode :Splitless
 Sampling Time :1.00 min
 Flow Control Mode :Linear Velocity
 Pressure :80.8 kPa
 Total Flow :16.2 mL/min
 Column Flow :1.20 mL/min
 Linear Velocity :40.3 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :10.0
 High Pressure Injection :OFF
 Carrier Gas Saver :OFF
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	80.0	2.00
10.00	180.0	2.00
2.00	220.0	5.00
5.00	240.0	5.00

IonSourceTemp :230.00 °C
 Interface Temp. :280.00 °C
 Solvent Cut Time :4.50 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.00 kV
 Threshold :100

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--
 Start Time :5.00min
 End Time :48.00min
 ACQ Mode :Scan
 Event Time :0.50sec
 Scan Speed :1000
 Start m/z :40.00
 End m/z :500.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

Use MS Program :OFF

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

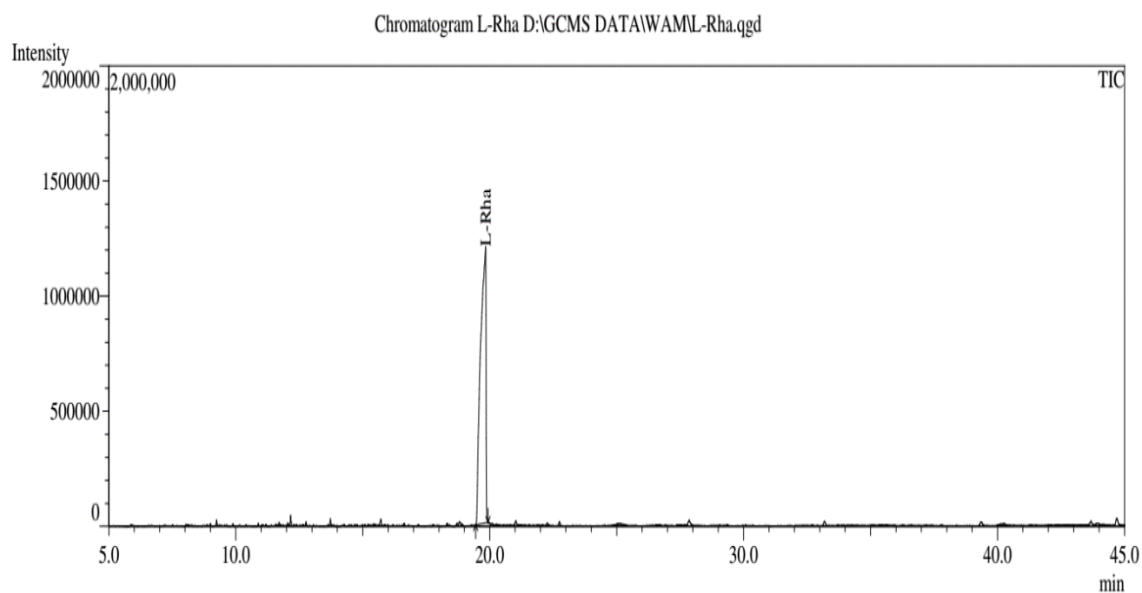
< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait :No
 Equilibrium Time :1.0 min

[GC Program]

Hình P3.2.2i. Sắc ký đồ GC của monosaccarit của hợp chất WAM11.5 (2)

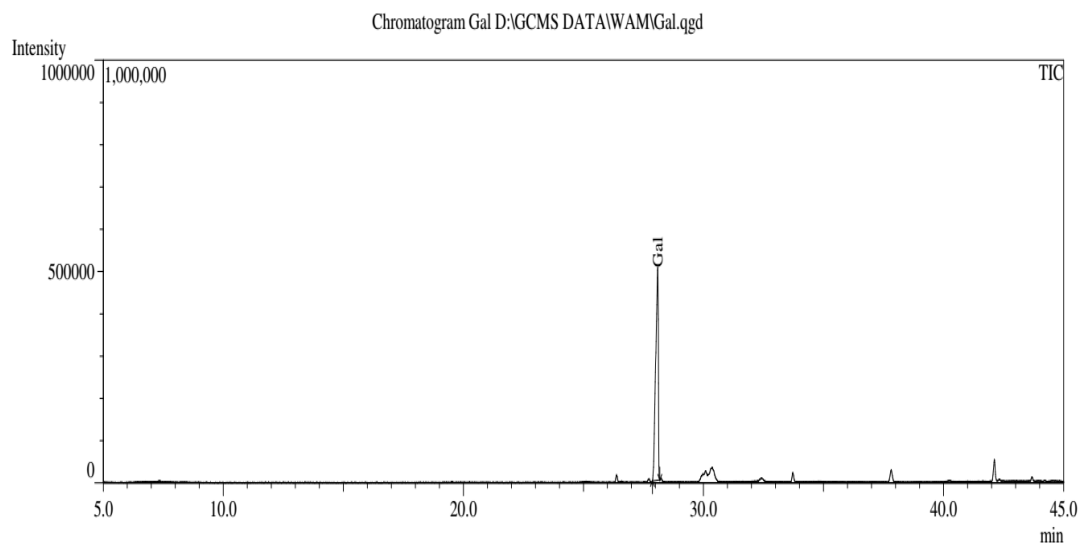
D:\GCMS DATA\WAML-Rha.qgd



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Peak Report TIC		A/H	Mark	Name
						Height	Height%			
1	19.843	19.450	19.933	17751312	100.00	1199767	100.00	14.79		L-Rha
				17751312	100.00	1199767	100.00			

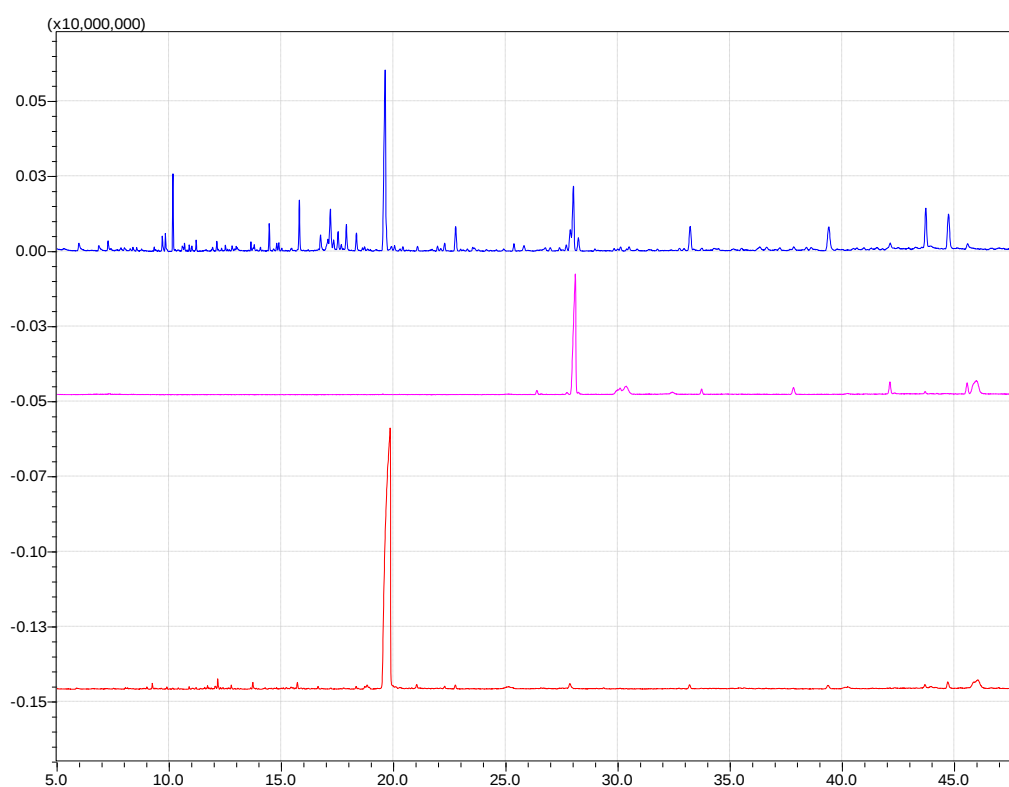
Hình P3.2.2k. Sắc ký đồ GC của L-rhamnose

D:\GCMS DATA\WAMGal.qgd

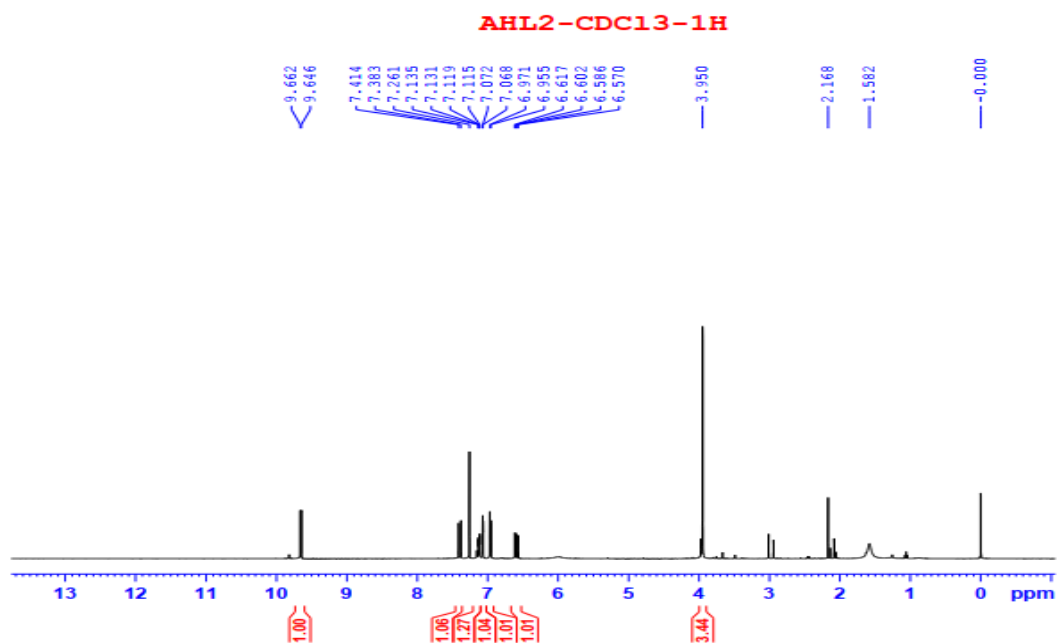


Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Peak Report TIC		A/H	Mark	Name
						Height	Height%			
1	28.097	27.875	28.183	3810562	100.00	502936	100.00	7.57		Gal
				3810562	100.00	502936	100.00			

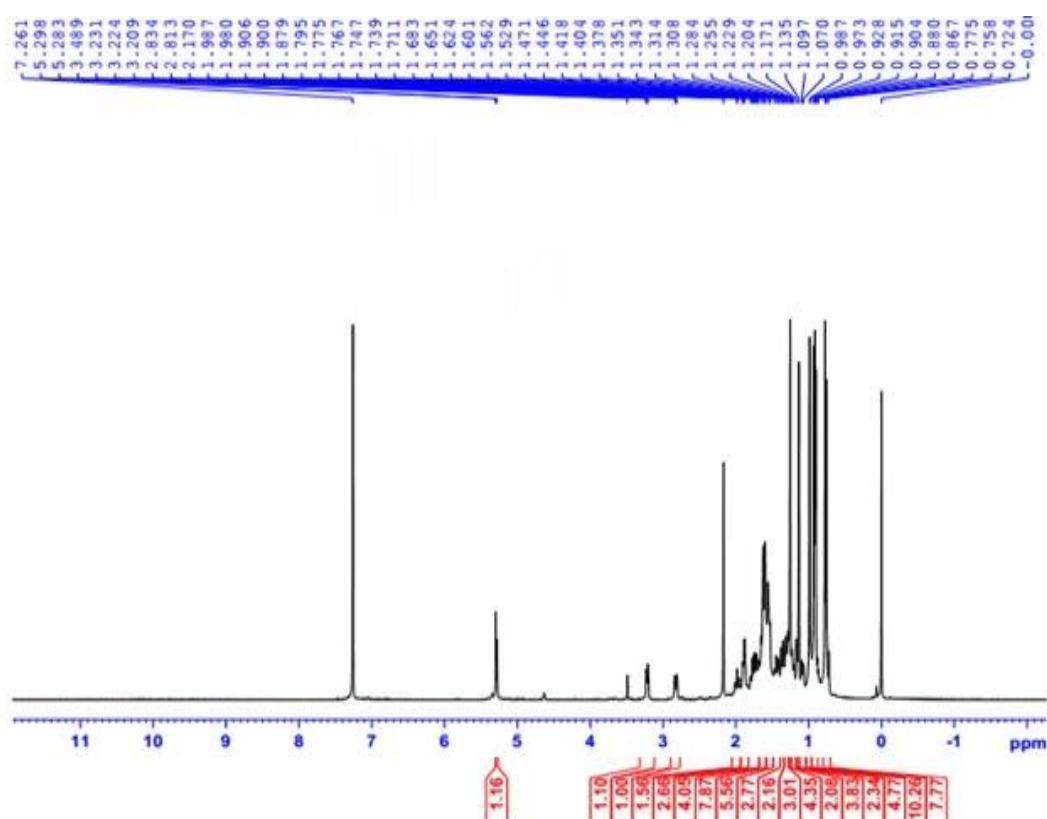
Hình P3.2.2l. Sắc ký đồ GC của D-galactose



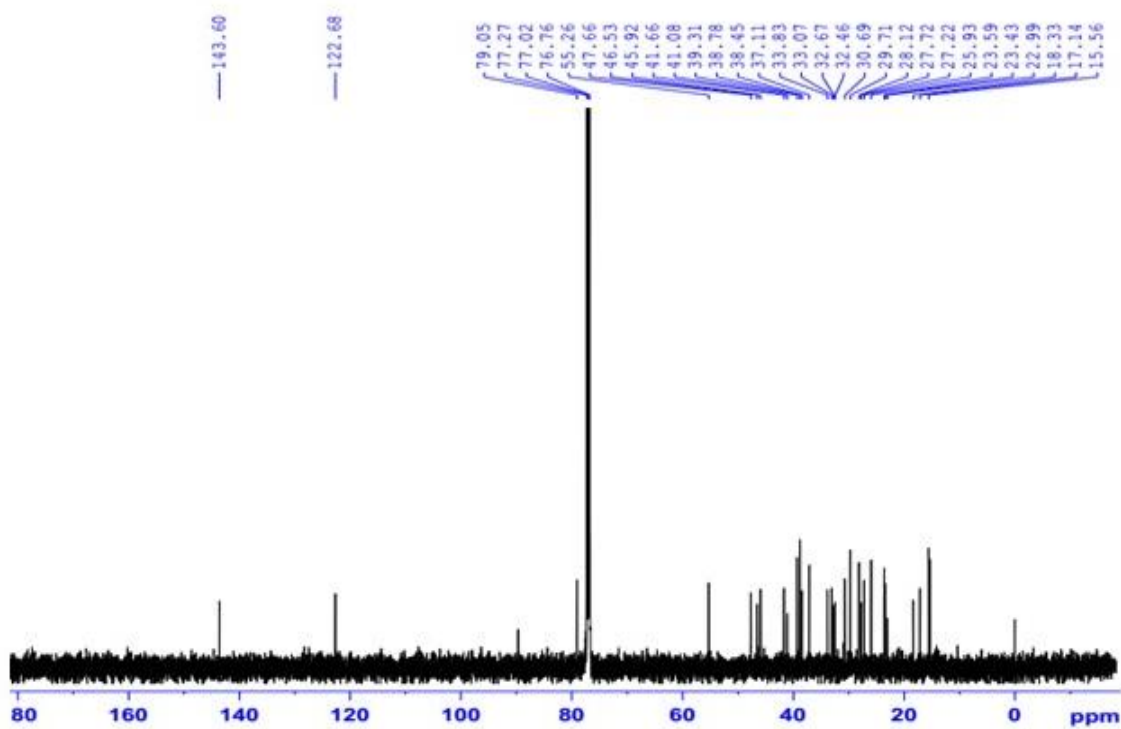
Hình P3.2.2m. Sắc ký đồ GC chồng lấp của monosaccarit của hợp chất **WAM11.5 (2)**, D-galactose và L-rhamnose



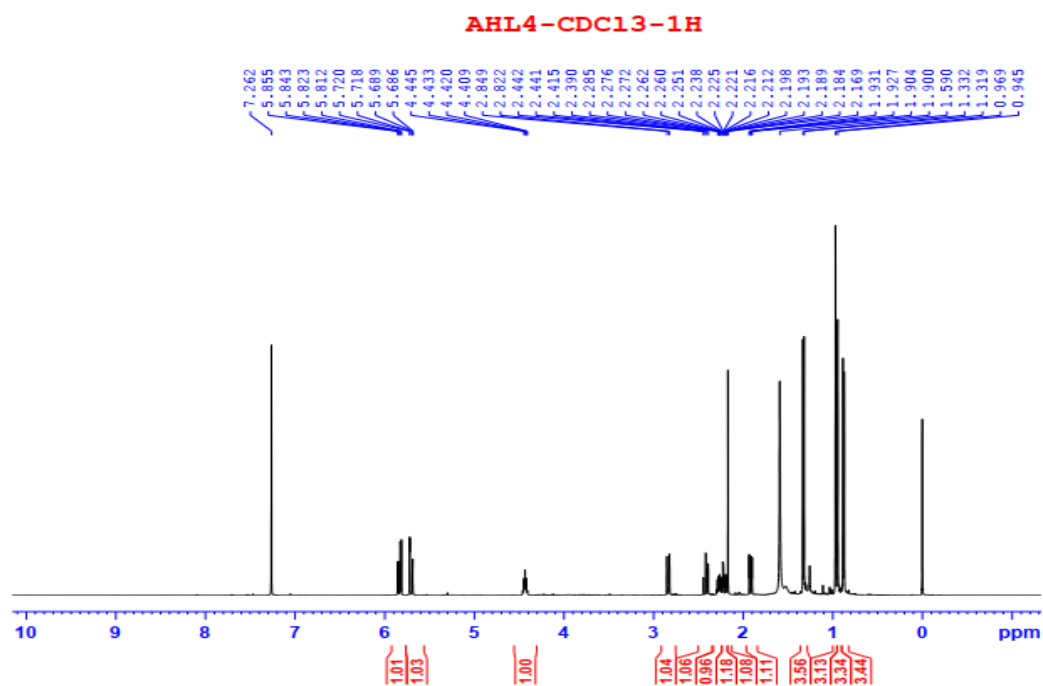
Hình P3.2.3b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **3 (AHL2)**



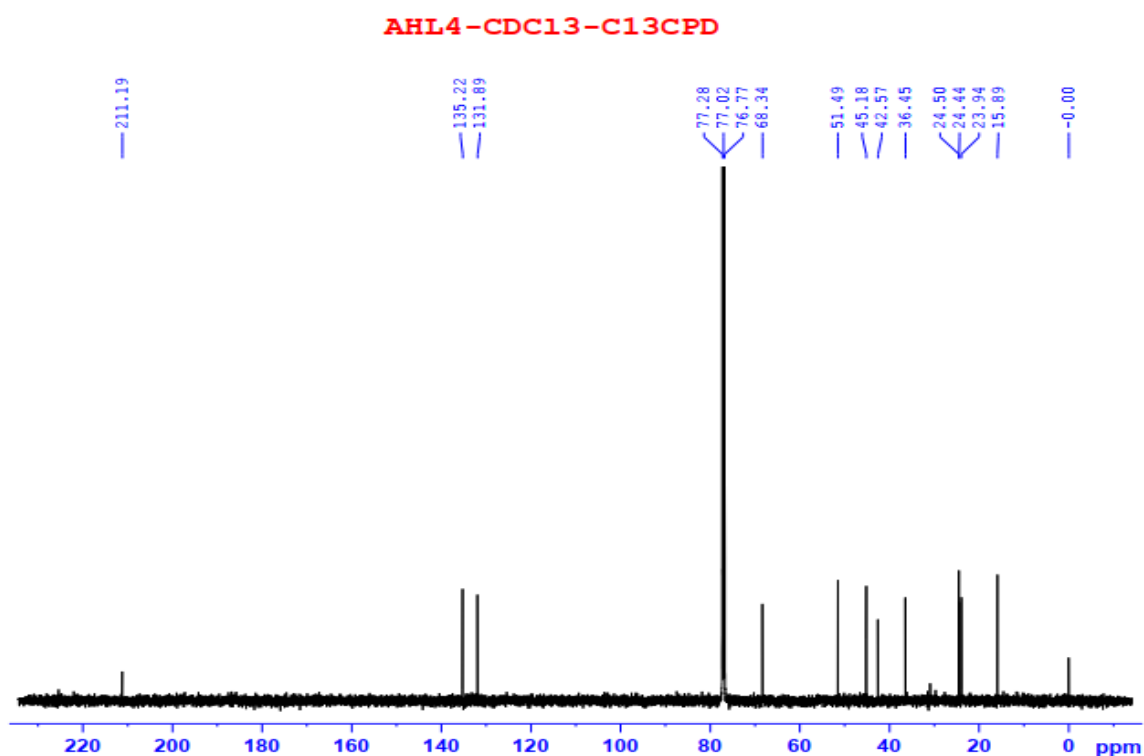
Hình P3.2.4b. Phổ ¹H-NMR của hợp chất 4 (AHL3)



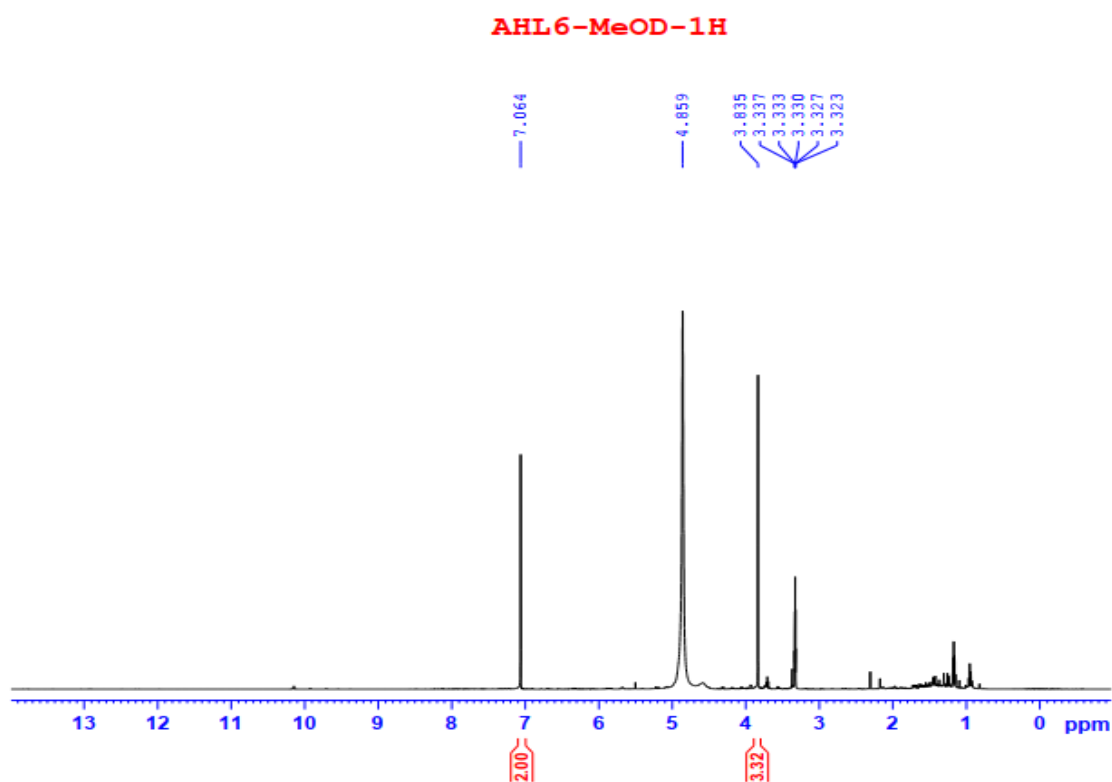
Hình P3.2.4c. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất 4 (AHL3)



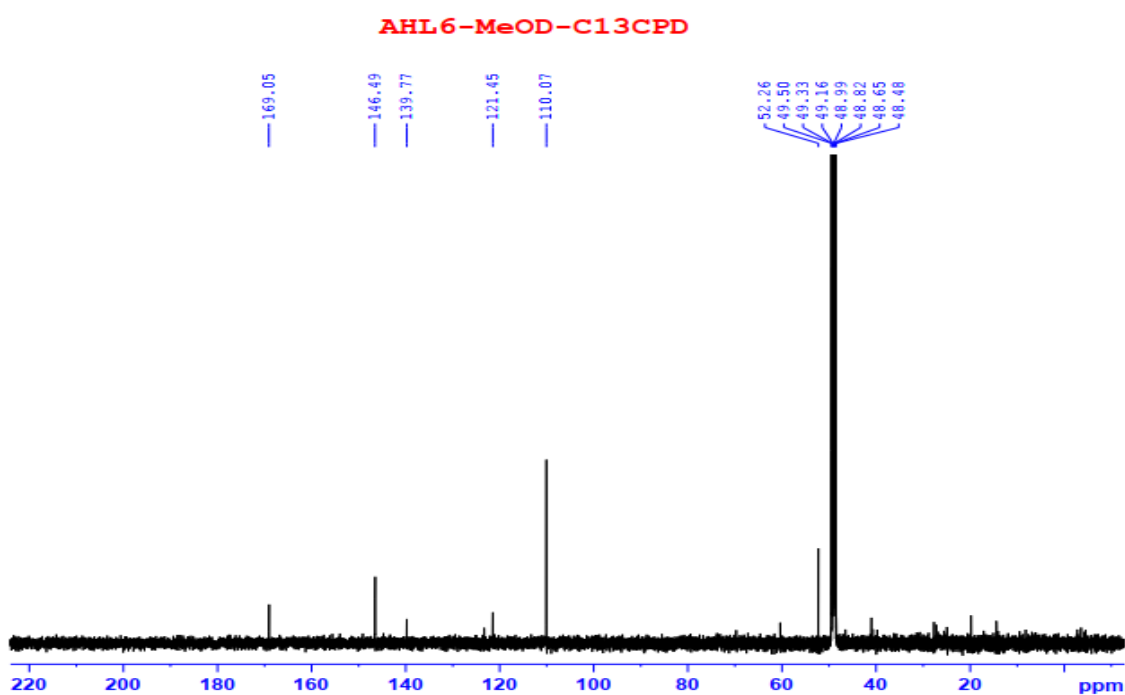
Hình P3.2.5b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 5 (AHL4)



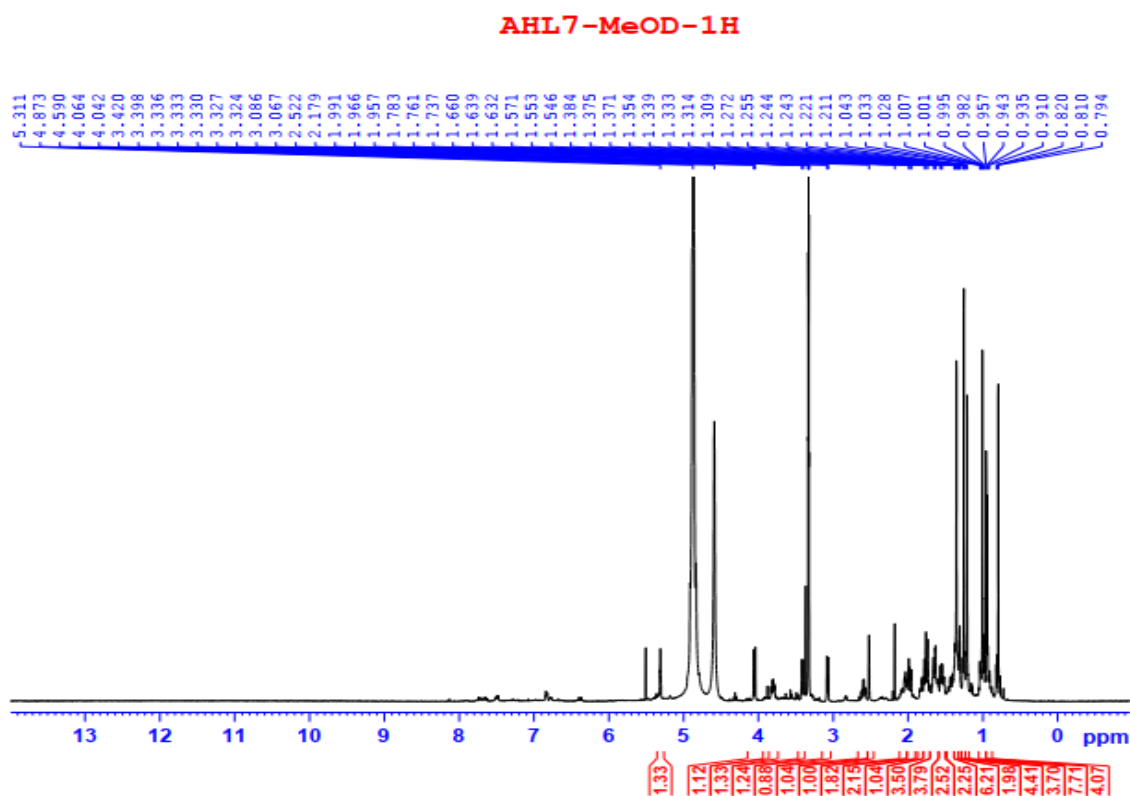
Hình P2.1.5c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 5 (AHL4)



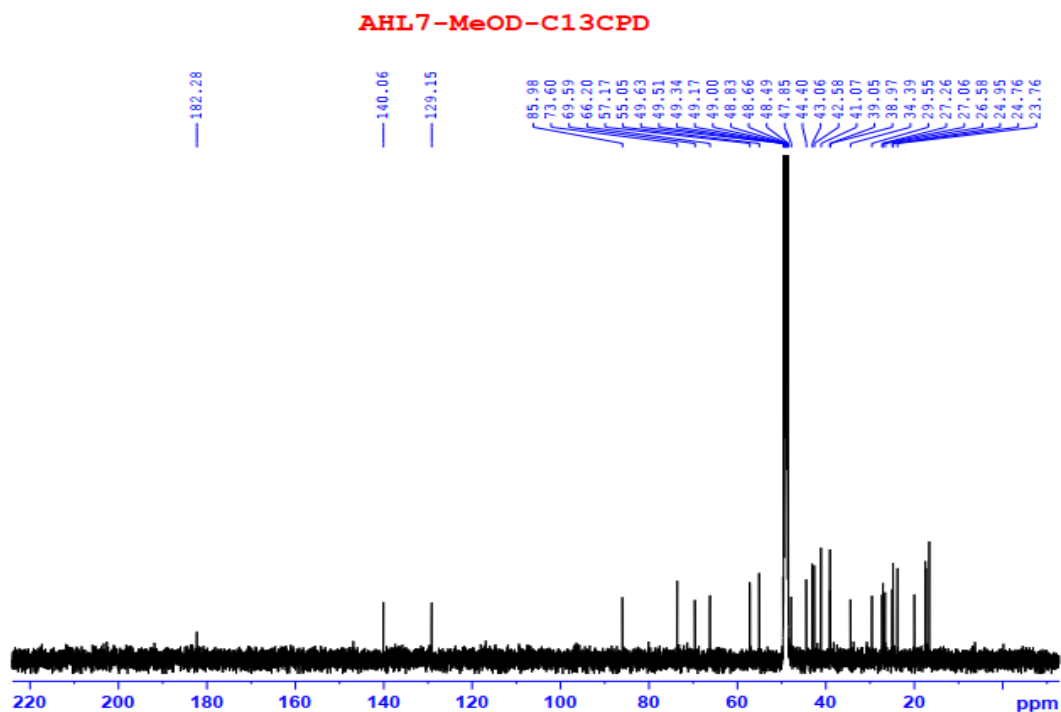
Hình P3.2.6b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 6 (AHL6)



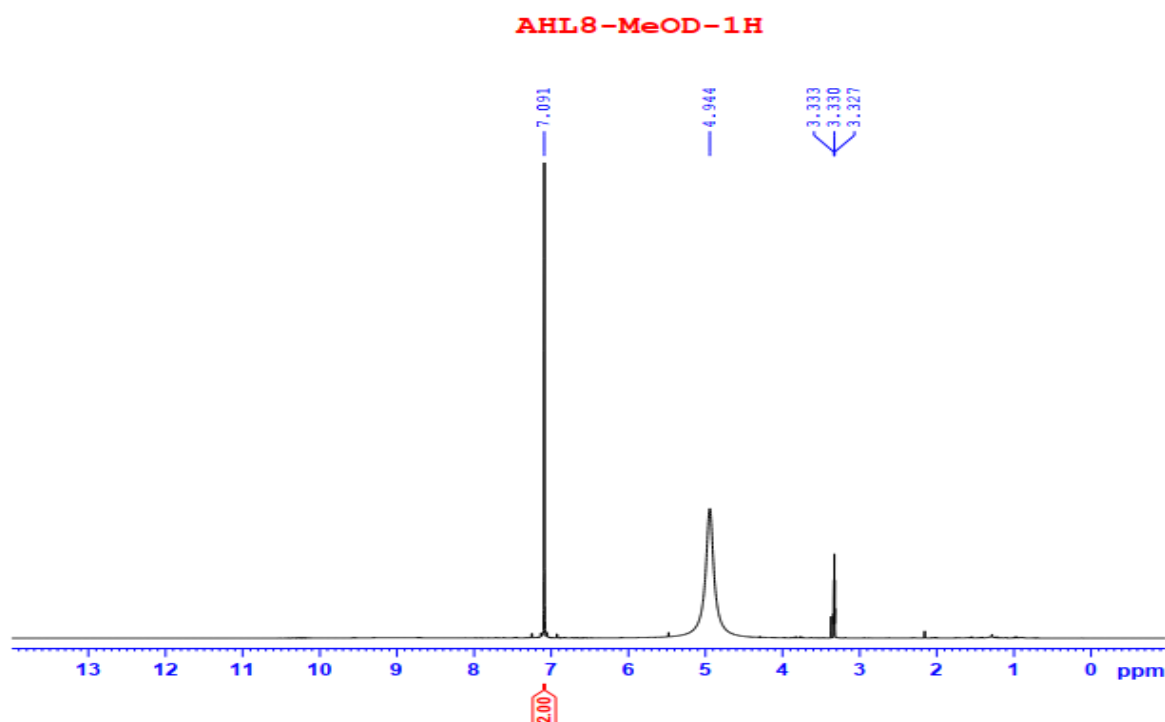
Hình P3.2.6c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 6 (AHL6)



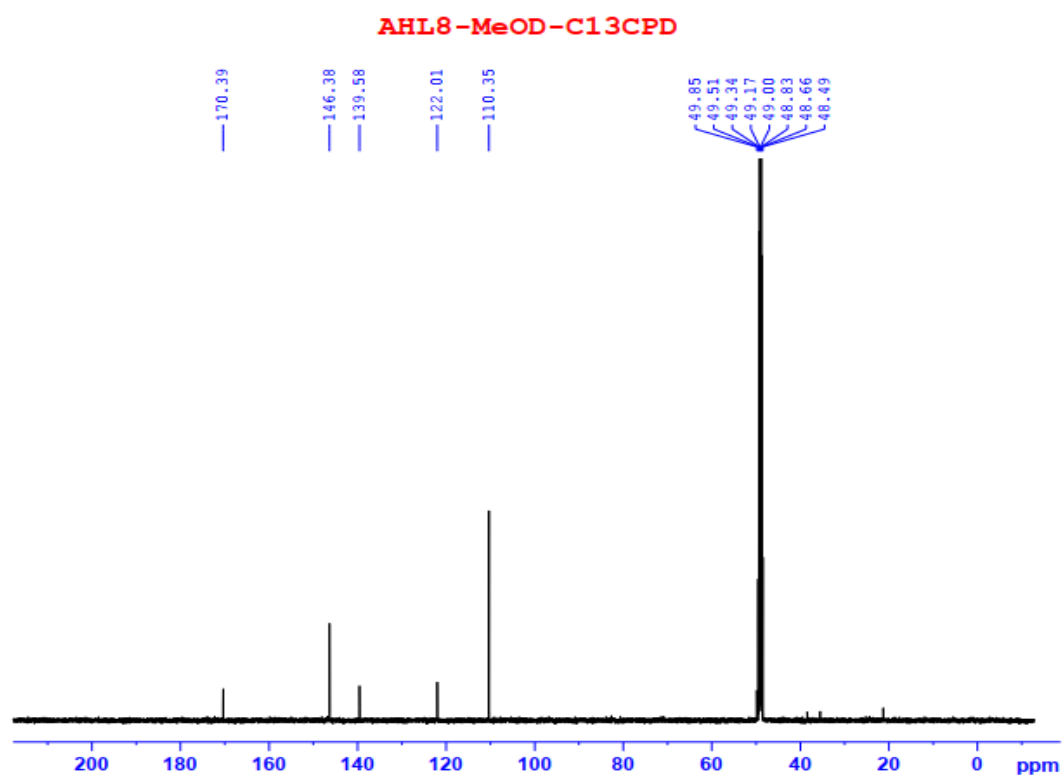
Hình P3.2.7b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 7 (AHL7)



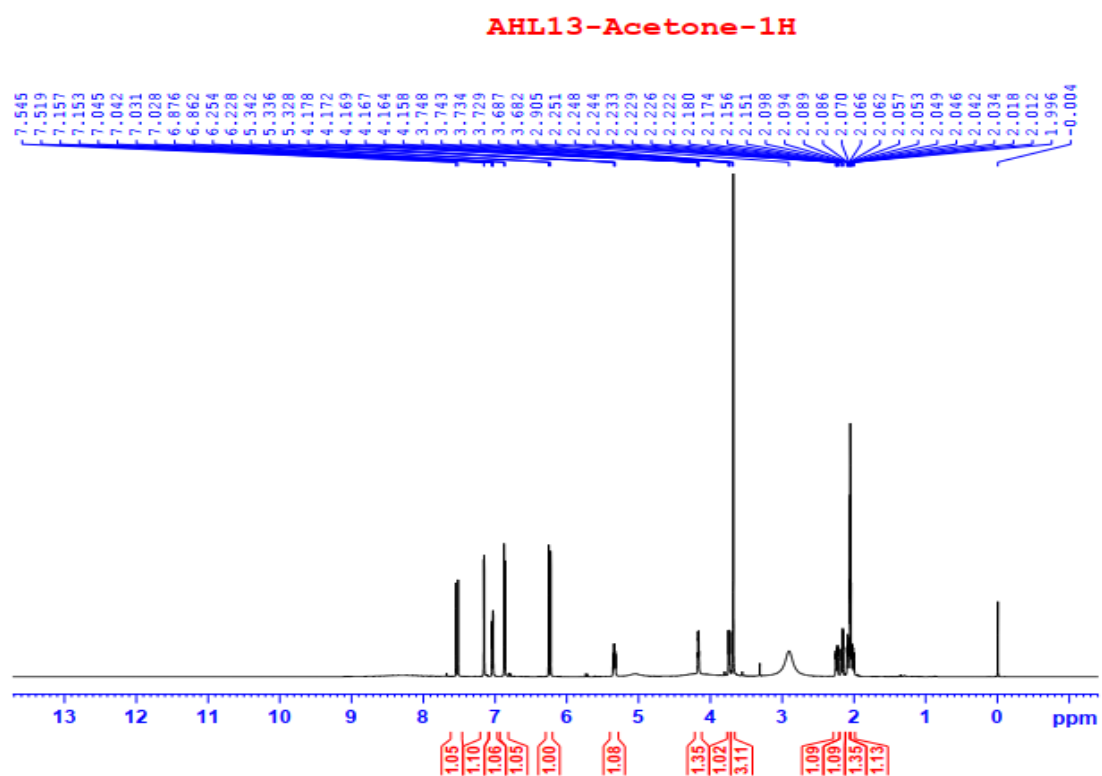
Hình P3.2.7c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 7 (AHL7)



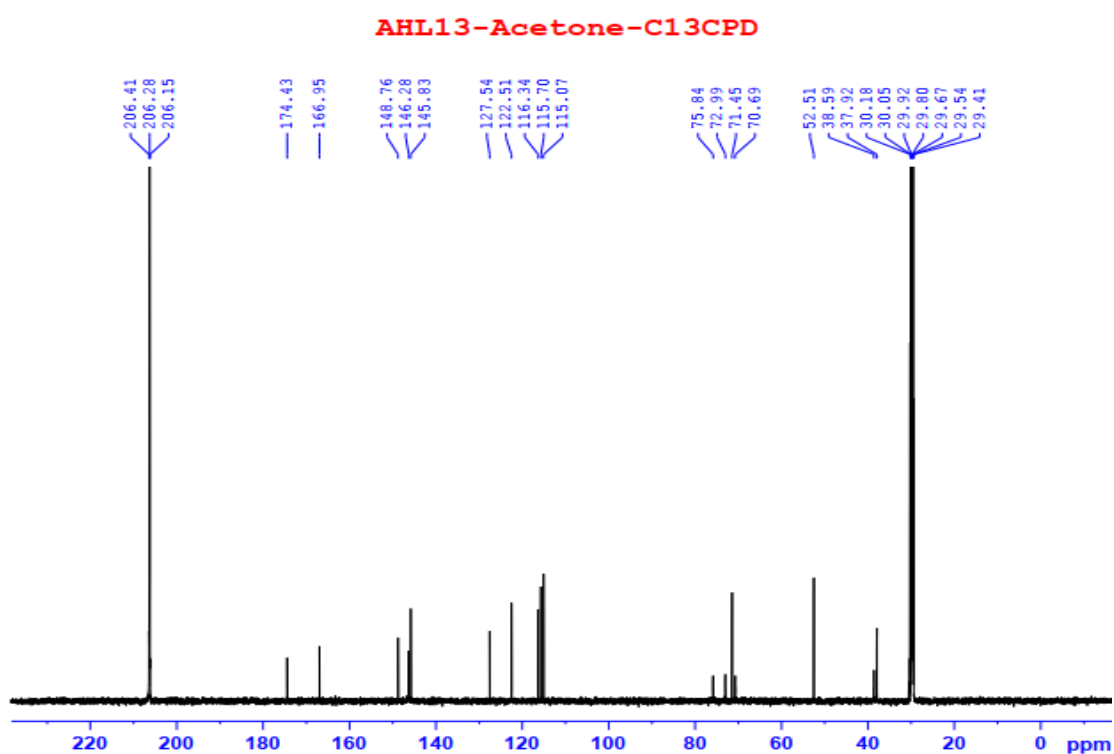
Hình P3.2.8a. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **8** (AHL8)



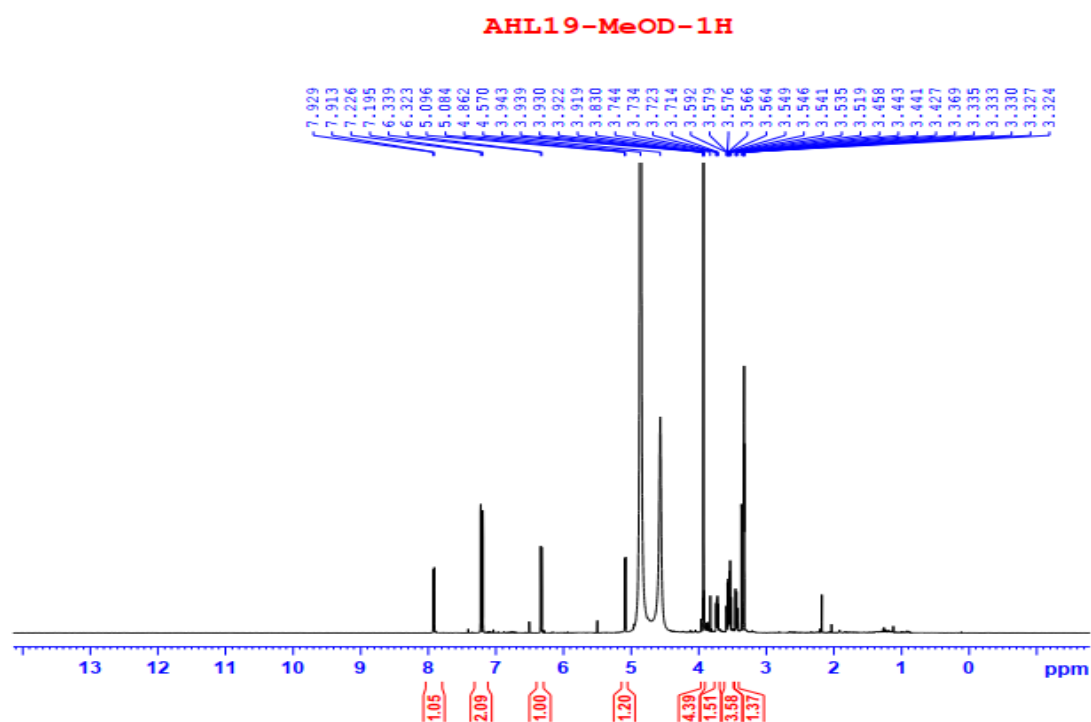
Hình P3.2.8b. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **8** (AHL8)



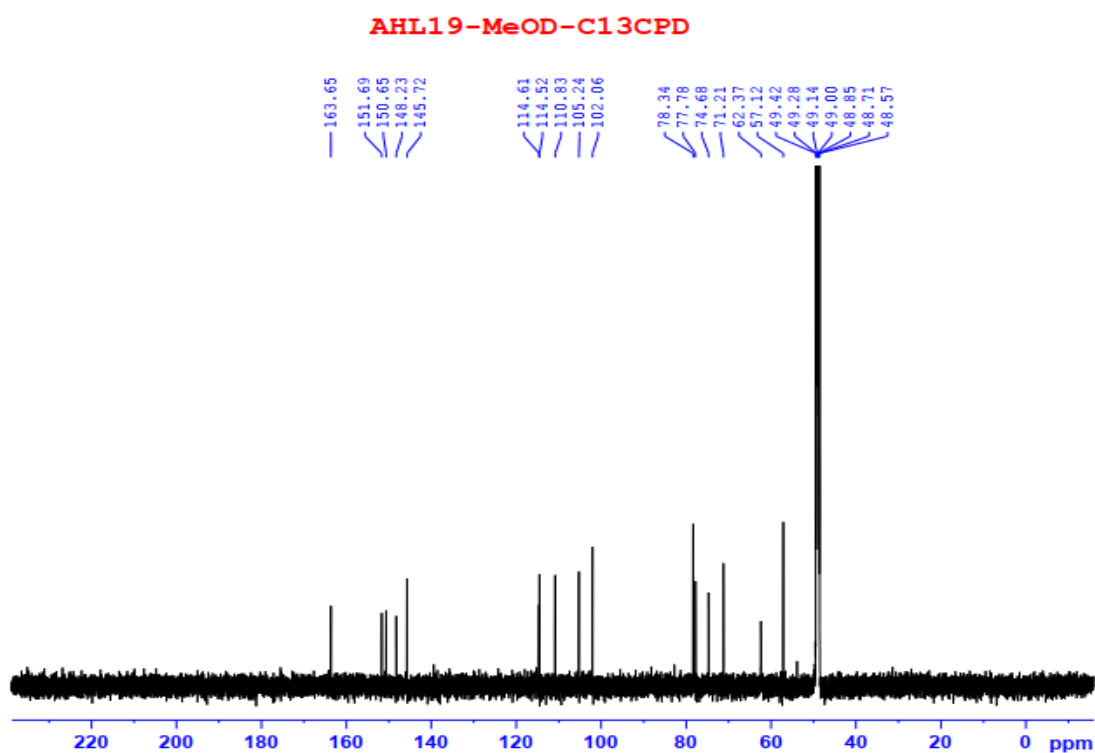
Hình P3.2.9a. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **9** (AHL13)



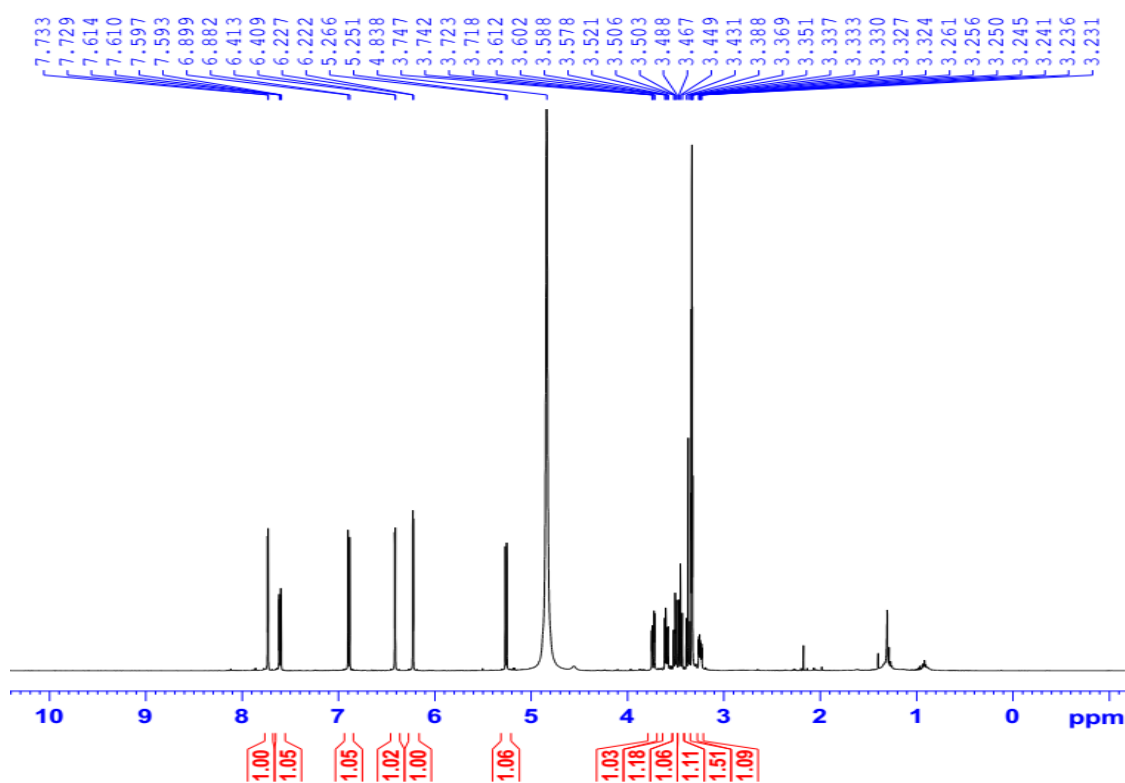
Hình P3.2.9b. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **9** (AHL13)



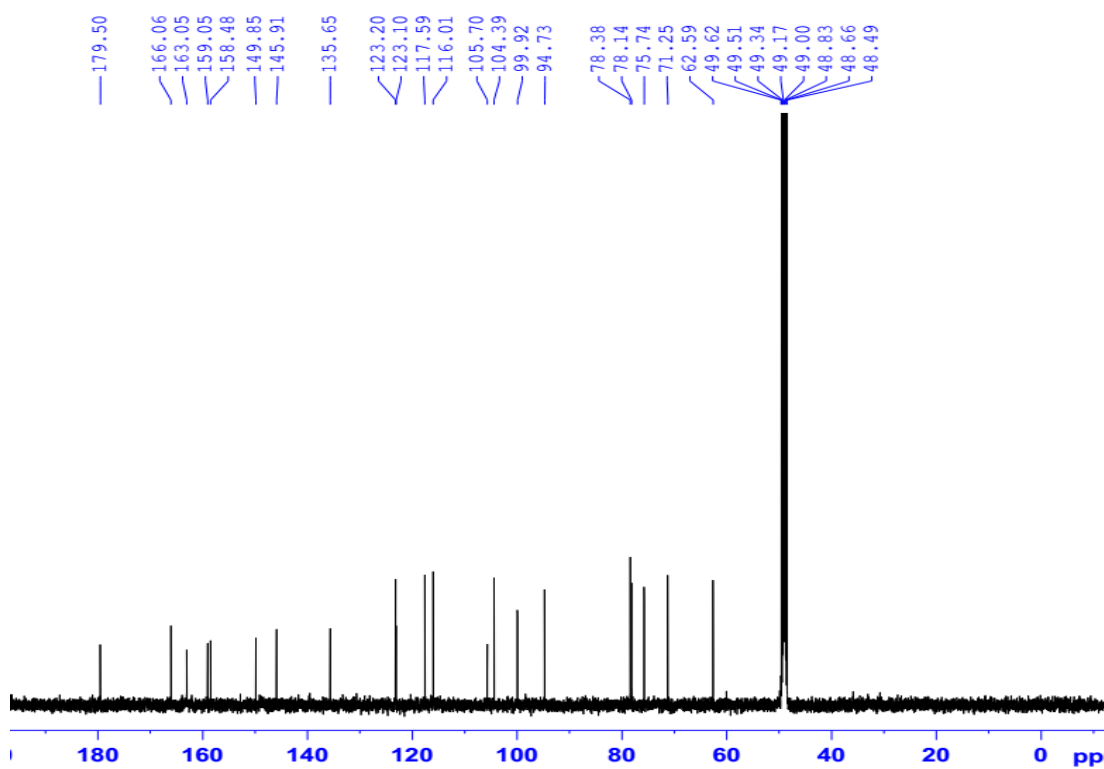
Hình P3.2.10b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 10 (AHL19)



Hình P3.2.10c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 10 (AHL19)

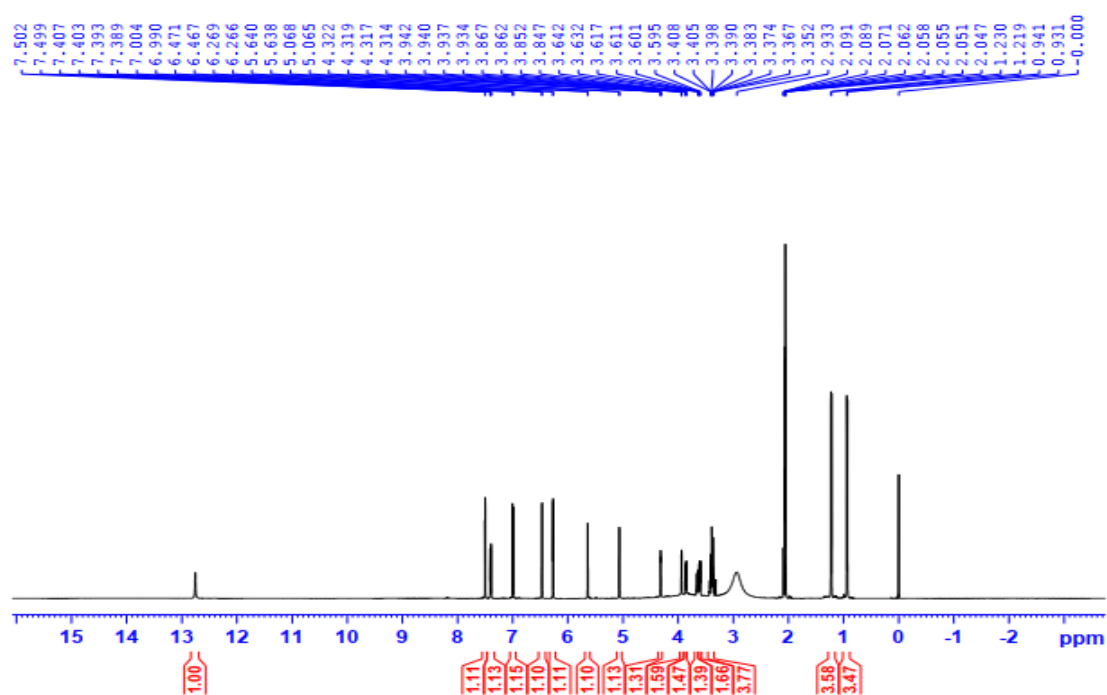


Hình P3.2.11b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 11 (WAM1)



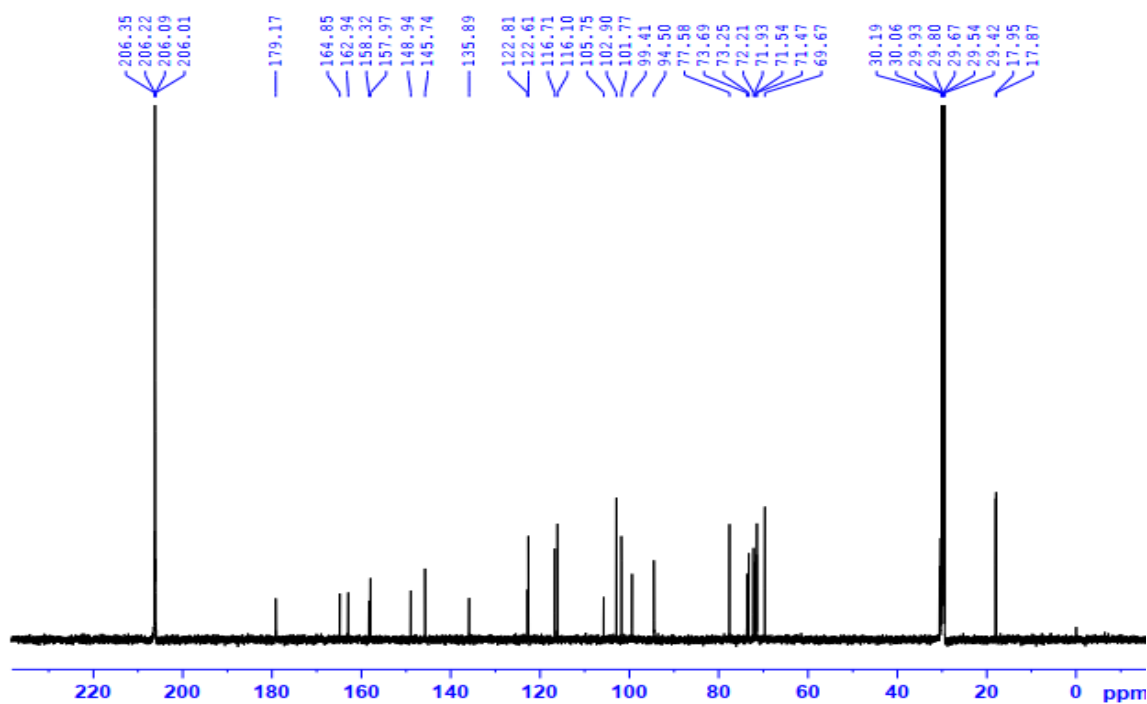
Hình P3.2.11c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 11 (WAM1)

WAM2-Acetone-1H

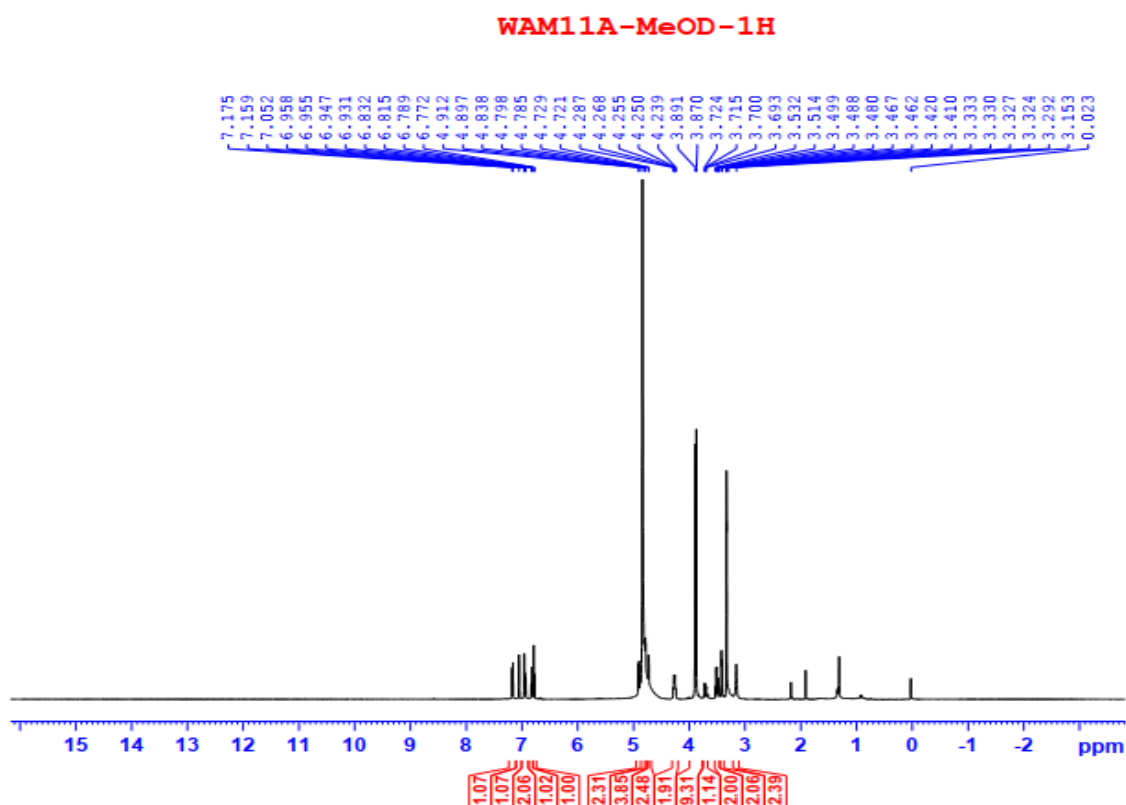


Hình P3.2.12b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 12 (WAM2)

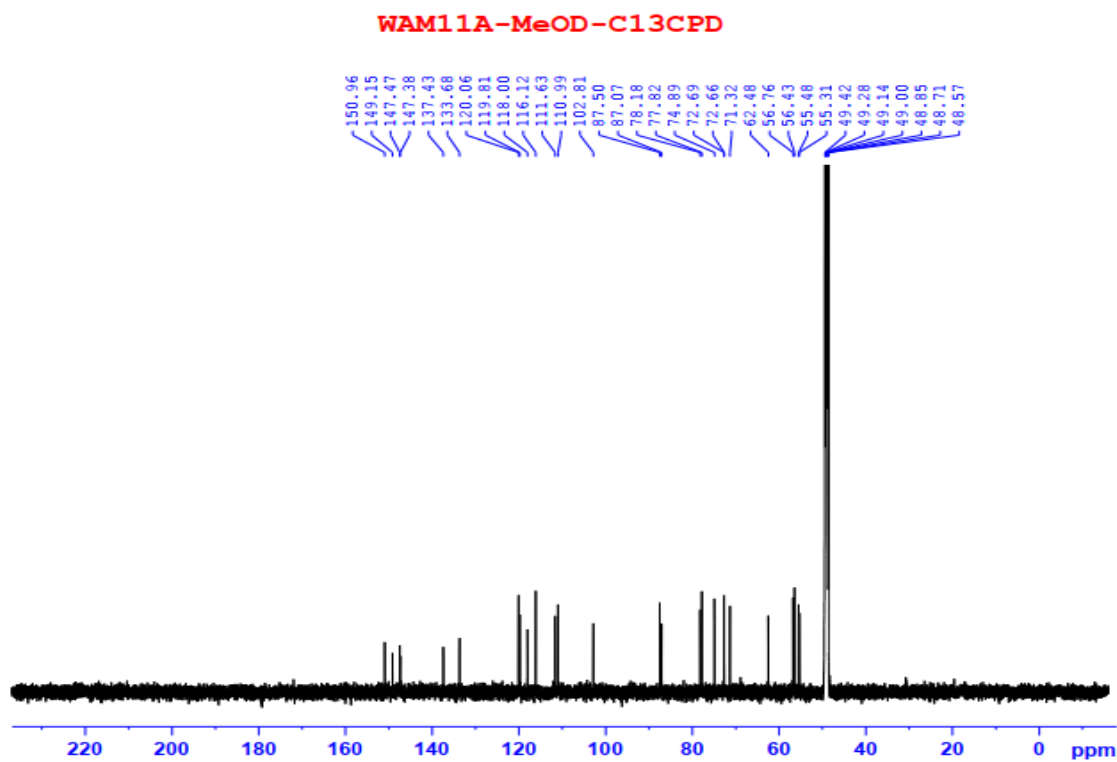
WAM2-Acetone- C^{13}CPD



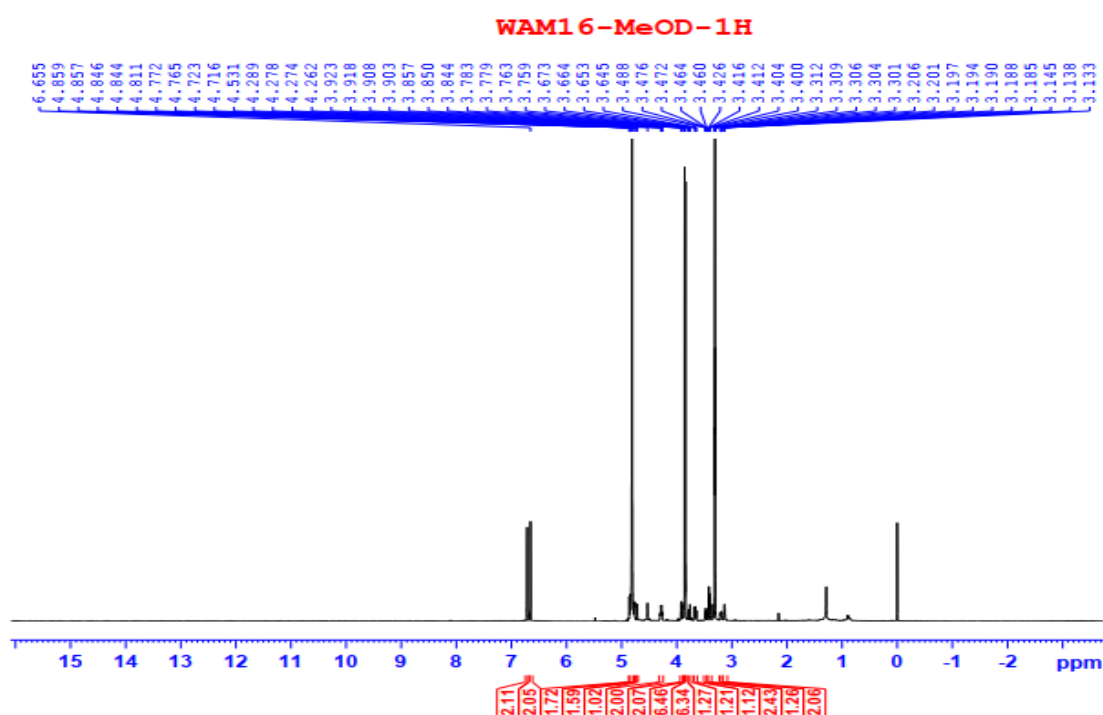
Hình P3.2.12c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 12 (WAM2)



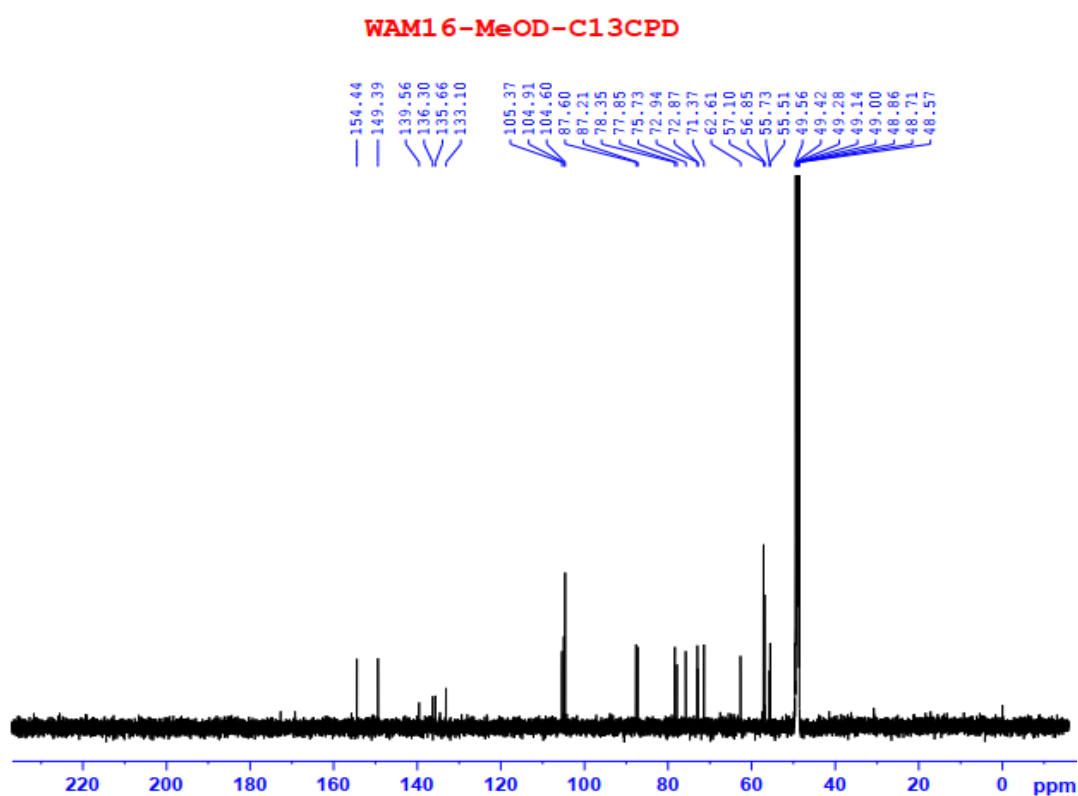
Hình P3.2.13b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 13 (WAM11A)



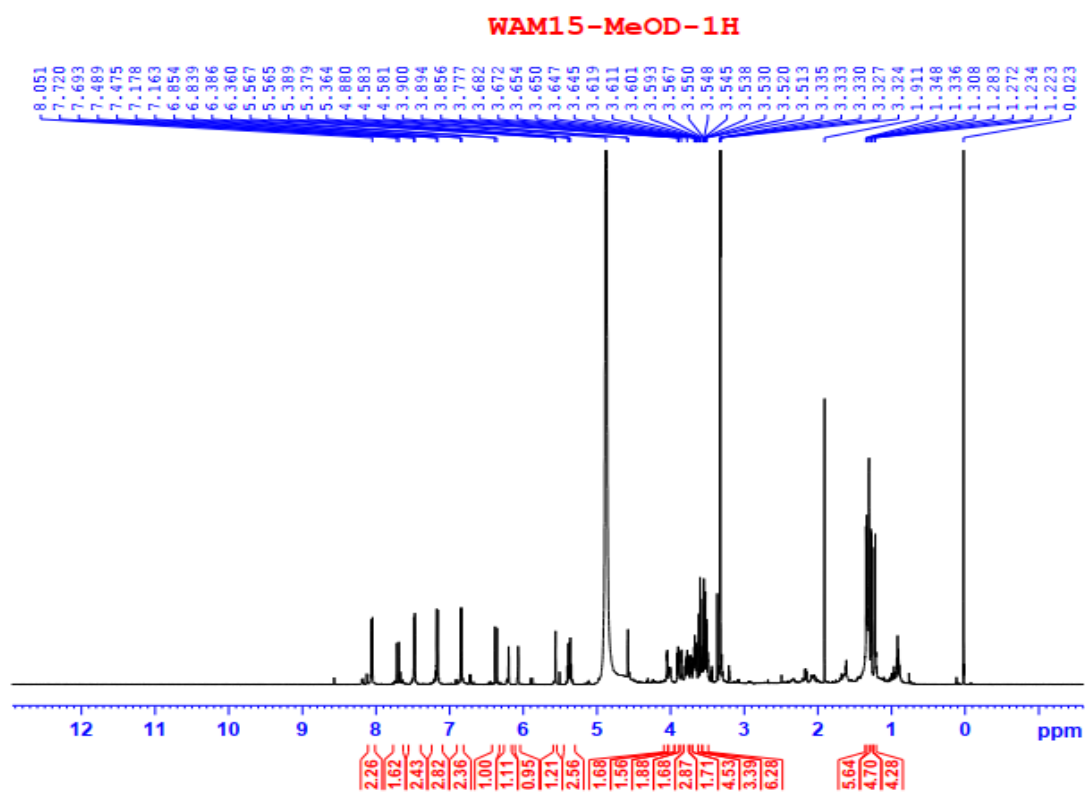
Hình P3.2.13c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 13 (WAM11A)



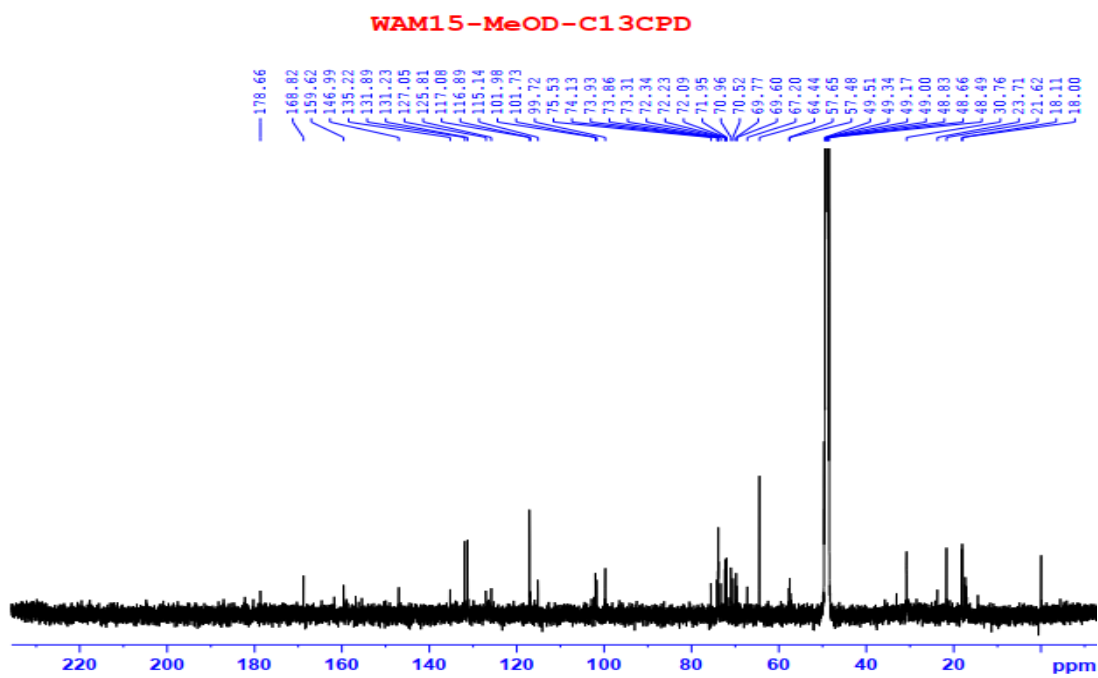
Hình P3.2.14b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 14 (WAM16)



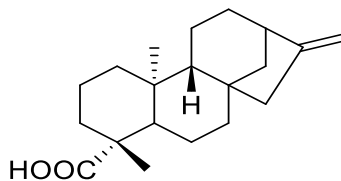
Hình P3.2.14c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 14 (WAM16)



Hình P3.2.15b Phổ ^1H -NMR của hợp chất 15 (WAM15)



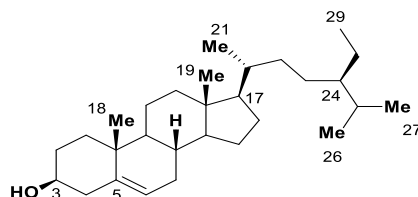
Hình P3.2.15c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 15 (WAM15)

Ent-Kaur-16-en-19-oic-acid (BA1)**Hình P3.2.16a.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA1** (16)**Bảng P3.2.16.** Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) của hợp chất **BA1** và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a,b}}$ [TLTK]	$\delta\text{C}^{\text{a,c}}$	$\delta\text{H}^{\text{a,d}}$ Mult., (J tính theo Hz)	$\delta\text{H}^{\text{a,e}}$ Mult. (TLTK), (J tính theo Hz)
1	40,6	40,7		
2	19,1	19,1		
3	37,7	37,9		
4	43,8	43,9		
5	57,5	57,0		
6	21,8	21,8		
7	41,2	41,3		
8	44,2	44,2		
9	55,1	55,1		
10	39,1	39,6		
11	18,4	18,4		
12	33,1	33,1		
13	43,7	43,6	2,64 (1H, br s, H-13)	2,50 (1H, br s, H-13)
14	39,6	39,7		
15	48,9	49,0		
16	155,8	155,9		
17	103,0	103,0	4,80 (1H, s) 4,74 (1H, s)	4,66 (1H, s) 4,60 (1H, s)
18	28,9	28,9	1,24 (3H, s, H-18)	1,11 (3H, s)
19	185,0	182,2		
20	15,5	15,6	0,95 (3H, s)	0,88 (3H, s)

^a: CDCl_3 , ^b: 100 MHz, ^c: 125 MHz, ^d: 500 MHz, ^e: 400 MHz

TLTK: Jung H. A., Lee E. J., Kim J. S., Kang S. S., Lee J. H., Min B. S., Choi J. S. (2009), “Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*”, Arch. Pharm. Res., 32, pp. 1399-1408.

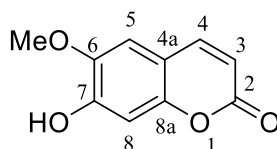
β -sitosterol (BA2)**Hình P3.2.17a.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA2 (17)****Bảng P3.2.17.** Dữ liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR của hợp chất **BA2** trong CDCl_3 và TLTK

C	δH^a (Mult., J Hz)	δH^b (Mult., J Hz) [TLTK]
1		
2		
3	3,52 (1H, m)	3,51 (1H, m)
4		
5		
6	5,34 (1H, br d, $J = 4,5$ Hz),	5,35 (1H, ddd, 5,3, 2,2, 1,4 Hz),
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18	0,68 (3H, s)	0,68 (3H, s)
19	1,01 (3H, s)	1,01 (3H, s)
20		
21	0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)	0,92 (3H, d, $J = 6,4$ Hz)
22		
23		
24		
25		
26	0,80 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)	0,81 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
27	0,83 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	0,83 (3H, d, $J = 6,4$ Hz)
28		
29	0,84 (3H, t, $J = 7,5$ Hz)	0,85 (3H, t, $J = 7,5$ Hz)

^a: CDCl₃, 500 MHz ^b: CDCl₃

TLTK: Sosinska E., Przybylski R., Hazendonk P., Zhao Y. Y., Curtis J. M. (2013), “Characterisation of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol”, *Food Chemistry*, 139, pp. 464-474.

Scopoletin (BA3)



Hình P3.2.18a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA3 (18)**

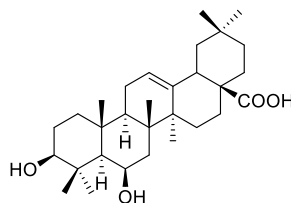
Bảng P3.2.18. Dữ liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) của hợp chất **BA3** và TLTK

C	δ_C^a	δ_C^b [TLTK]	δ_H^c (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_H^d (mult., <i>J</i> in Hz) [TLTK]
2	164,0	164,0		
3	112,6	112,6	6,21 (1H, d, <i>J</i> = 9,6 Hz)	6,20 (1H, d, <i>J</i> = 9,6 Hz)
4	146,1	146,1	7,86 (1H, d, <i>J</i> = 9,6 Hz)	7,85 (1H, d, <i>J</i> = 9,6 Hz)
4a	112,6	112,5		
5	110,0	110,0	7,11 (1H, s)	7,11 (1H, s)
6	147,1	147,1		
7	153,0	152,9		
8	104,0	104,0	6,78 (1H, s)	6,77 (1H, s)
8a	151,4	151,4		
OMe	56,8	56,8	3,92 (s)	3,91 (s)

^a: 125 MHz, CD₃OD ^b: CD₃OD ^c: 500 MHz, CD₃OD ^d: CD₃OD

TLTK: Adfa M., Yoshimura T., Komura K., and Koketsu M. (2010), “Antitermite activities of coumarin derivatives and scopoletin from *Protium javanicum* Burm. f.”, *Journal of chemical ecology*, 36, pp. 720-726.

Sumaresinolic acid (BA4)



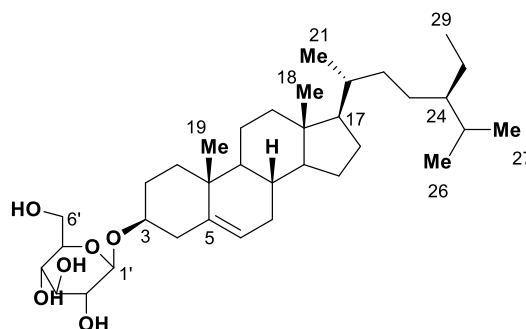
Hình P3.2.19a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA4 (19)**

Bảng P3.2.19. Bảng dữ liệu phổ ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của hợp chất **BA4** và TLTK

C	$^a\delta_{\text{C}}$ [TLTK]	$^b, ^c\delta_{\text{C}}$	$^b, ^d\delta_{\text{H}}$ Mult., (J tính theo Hz)
1	40,7	40,6	
2	26,7	27,3	
3	78,8	79,1	3,15, dd, 10,8, 5,4 Hz
4	39,4	39,6	
5	56,0	55,7	0,74, br s
6	67,6	68,7	4,54, br s
7	40,3	40,5	
8	38,4	38,4	
9	48,0	48,0	
10	36,4	36,5	
11	23,1	23,3	
12	122,6	122,9	5,33, t, 3,6 Hz
13	143,1	142,8	
14	42,1	42,3	
15	27,1	27,6	
16	22,8	23,0	
17	46,4	46,5	
18	41,3	41,1	2,84, dd, 13,8, 3,6 Hz
19	47,5	45,9	
20	30,9	30,9	
21	33,6	33,9	
22	32,5	32,3	
23	27,1	27,9	1,08, s
24	16,3	17,1	1,18, s
25	16,0	16,9	1,30, s
26	17,4	18,3	1,08, s
27	25,1	25,9	1,10, s
28	180,7	182,2	
29	32,2	33,1	0,90, s
30	26,6	23,5	0,93, s

a : Đo trong CD_3OD , b : Đo trong CDCl_3 , c : 600 MHz, d : 125 MHz

TLTK: Calderón A. I., Simithy J., Quaggio G., Espinosa A., López-Pérez J. L., Gupta, M. P. (2009), "Triterpenes from *Warszewiczia coccinea* (Rubiaceae) as inhibitors of acetylcholinesterase", *Nat. Prod. Comm.*, 4(10), 1934578X0900401002.

Daucosterol (BA7)**Hình P3.2.20a.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA7 (20)****Bảng P3.2.20.** Số liệu phổ ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) của hợp chất **BA7** và TLTK

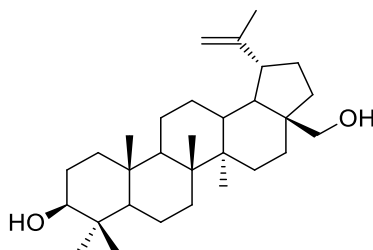
Vị trí	^1H	^{13}C	$^{13}\text{C}^a$ [TLTK]
1		36,8	36,7
2		29,2	29,2
3	3,44 (1H, m)	76,9	76,8
4	2,36 (1H, dd, $J = 10$ Hz) 2,12 (1H, m)	38,3	38,2
5		140,6	140,2
6	5,34 (1H, br)	121,1	121,1
7		31,4	31,3
8		31,3	31,3
9		49,6	49,5
10		36,2	36,1
11		20,5	20,5
12		39,2	39,1
13		41,8	41,8
14		56,1	56,1
15		23,8	23,8
16		27,7	27,7
17		55,4	55,5
18	0,64 (3H, s)	11,7	11,6
19	0,95 (3H, s)	19,0	19,0
20		35,4	35,4
21	0,90 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)	18,6	18,1
22		33,3	33,3
23		25,4	25,4
24		45,1	45,1
25		28,7	28,6
26	0,79 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	18,9	18,6

27	0,81 (3H, t, $J = 7,0$ Hz)	19,6	19,6
28		22,6	22,5
29	0,82 (3H, t, $J = 7,0$ Hz)	11,6	11,6
D-Glu			
1'	4,21 (1H, d, $J = 8$ Hz)	100,8	100,8
2'	2,89 (1H, t, $J = 8$ Hz)	73,4	73,4
3'	3,12 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	76,7	76,6
4'	3,01-3,08 (2H, m)	70,1	70,0
5'		76,7	76,4
6'	3,63 (1H, d, $J = 12$ Hz) 3,40 (1H, m)	61,1	61,0

^a: Đo phổ trong DMSO-d₆, 500 MHz

TLTK: Faizi S., Ali M., Saleem R., Irfanullah and Bibi S. (2001), “Complete ¹H and ¹³C-NMR assignments of stigma-5-en-3-O-β-glucoside and its acetyl derivative”, *Magn. Reson. Chem.*, 39, pp. 399-405.

Betulin (BA15)



Hình P3.2.21a. Cấu trúc hóa học của hợp chất BA15 (21)

Bảng P3.2.21. Dữ liệu phổ ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) của hợp chất BA15 và TLTK

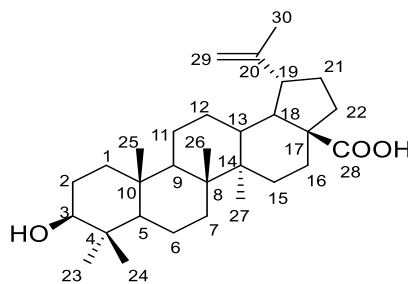
C	δC ^a [TLTK]	δC ^{b, c}	δH ^{b, d} Mult., (J tính theo Hz)
1	38,7	38,7	
2	27,4	27,4	
3	79,0	79,0	3,19 (dd, $J = 4,8; 12,6$ Hz)
4	38,9	38,9	
5	55,3	55,3	0,68, m
6	18,3	18,3	
7	34,3	34,2	
8	40,9	40,9	
9	50,4	50,4	
10	37,2	37,2	
11	20,9	20,8	
12	25,2	25,2	

13	37,3	37,3	
14	42,7	42,7	
15	27,1	27,1	
16	29,2	29,2	
17	47,8	47,8	
18	48,8	48,8	
19	47,8	47,8	
20	150,5	150,5	
21	29,8	29,8	
22	34,0	34,0	
23	28,0	28,0	0,97, s
24	15,4	15,3	0,76, s
25	16,1	16,1	0,82, s
26	16,0	16,0	0,98 s
27	14,8	14,8	1,02 s
28	60,6	60,5	3,79 (1H, d, $J = 10,8$ Hz) 3,33 (1H, d, $J = 10,8$ Hz)
29	109,7	109,7	4,68 (1H, br s) 4,58 (1H, br s)
30	19,1	19,1	1,68, s

^a: Đo trong CDCl₃, ^b: Đo trong CDCl₃, ^c: 600 MHz, ^d: 125 MHz

TLTK: Vu V. N., Nguyen T. H., Pham T. H., Vu T. H., Le N. T., Nguyen X. N., Pham V. C., Nguyen Q. V. (2022), “Triterpenes from the stems and leaves of *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume”, *Journal of analytical sciences*, 28 (4), pp. 1-6.

Betulinic acid (BA16)



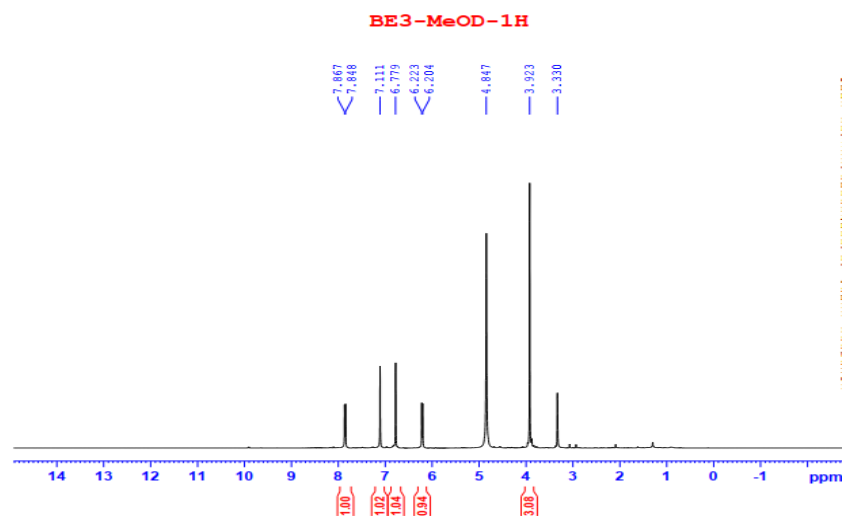
Hình P3.2.22a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **BA16 (22)**

Bảng P3.2.22. Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) của hợp chất **BA16** và TLTK

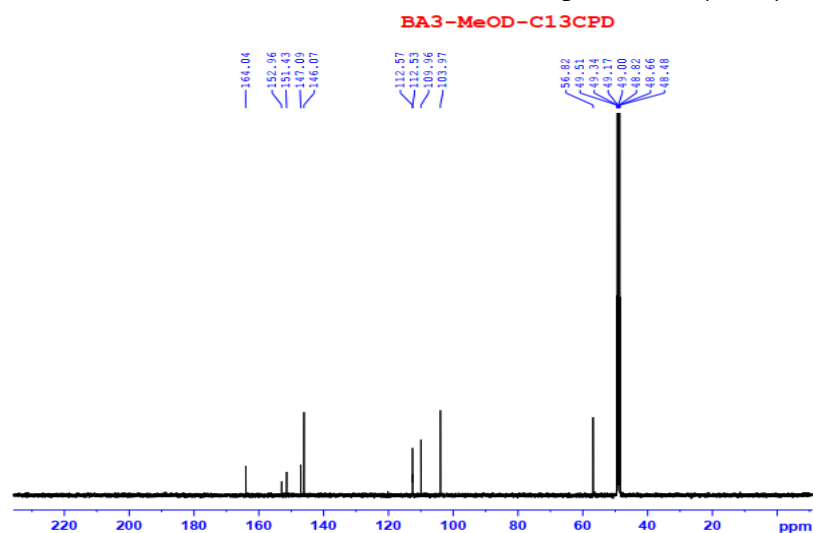
C	$^1\text{H-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$ (TLTK)	^{13}C	^{13}C (TLTK)
1			38,0	38,7
2			27,1	27,6
3	2,98-2,93 (m)	2,95 (m)	76,8	77,2
4			38,5	38,9
5			54,9	55,3
6			18,0	18,4
7			33,9	34,4
8			40,3	40,7
9			49,9	50,4
10			36,7	37,2
11			20,5	20,9
12			25,1	25,5
13			37,6	38,0
14			42,0	42,5
15			29,2	29,7
16			31,7	32,2
17			55,4	55,9
18			48,6	48,9
19			46,6	47,1
20			150,3	150,8
21			30,1	30,5
22			36,3	36,8
23	0,87 (s)	0,86 (s)	28,1	28,6
24	0,65 (s)	0,64 (s)	15,8	16,3
25	0,87 (s)	0,85 (s)	15,7	16,2
26	0,76 (s)	0,75 (s)	15,9	16,4
27	0,93 (s)	0,92 (s)	14,4	14,8
28			177,2	177,7
29	4,69 (1H, Br s) 4,56 (1H, br s)	4,68 (1H,d, = 2,0) 4,55 (1H, br s)	109,6	110,1
30	1,64 (s)	1,64 (s)	18,9	19,4

TLTK: Jalil J., Sabandar C. W., Ahmat N., Jamal J. A., Jantan I., Aladdin N., Muhammad K., Buang F., Mohamad H. F. and Sahidin I. (2015), "Inhibitory effect of triterpenoids from *Dillenia serrate* (Dilleniaceae) on prostaglandin E2 production

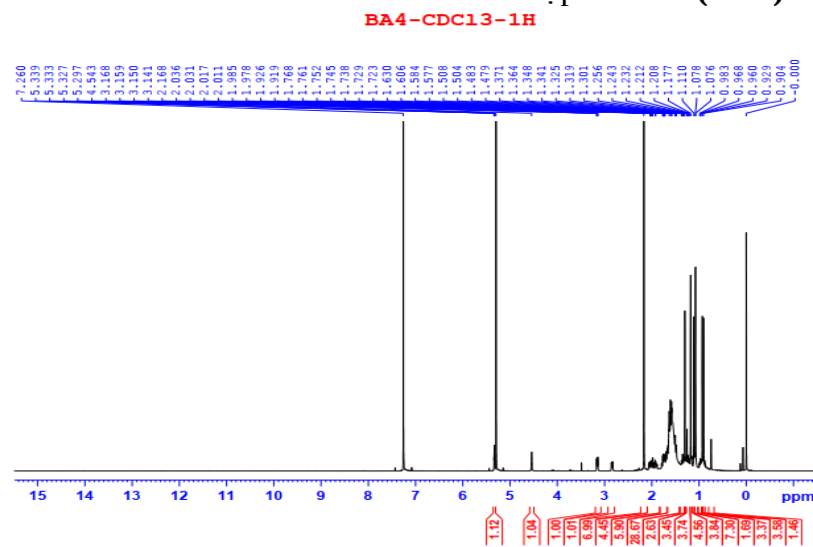




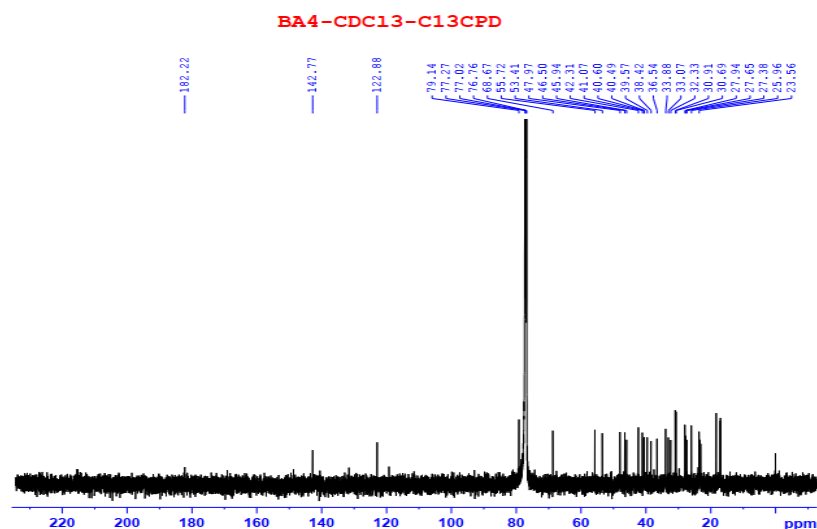
Hình P3.2.18b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **18** (BA3)



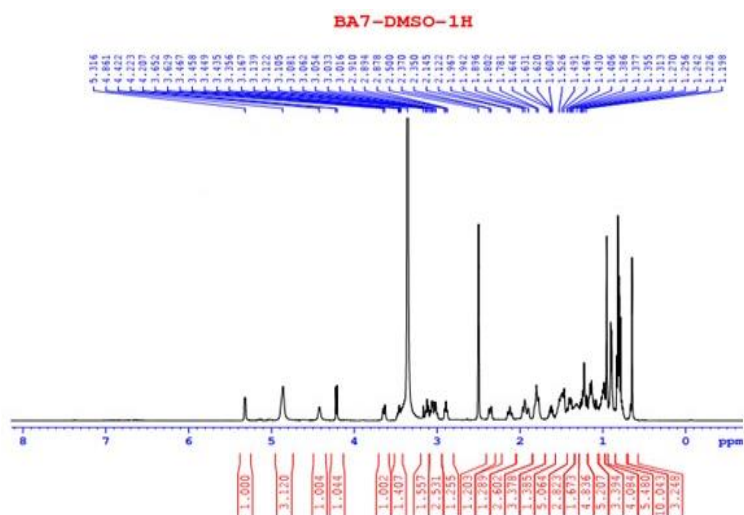
Hình P3.2.18c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **18** (BA3)



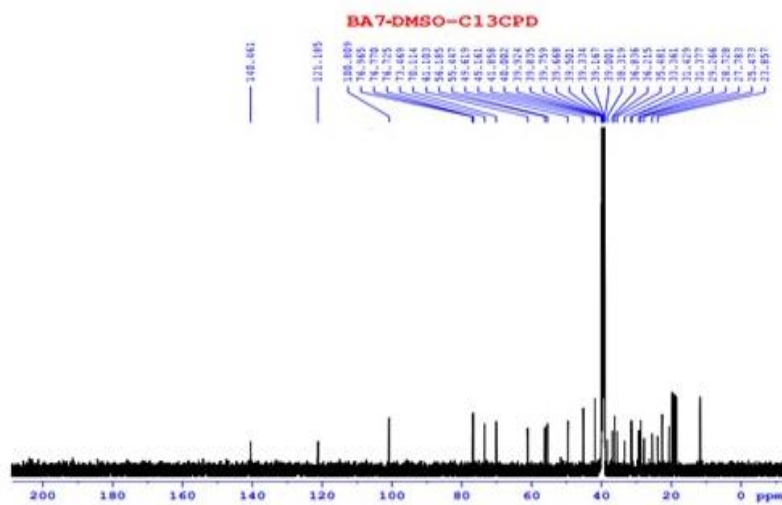
Hình P3.2.19b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **19** (BA4)



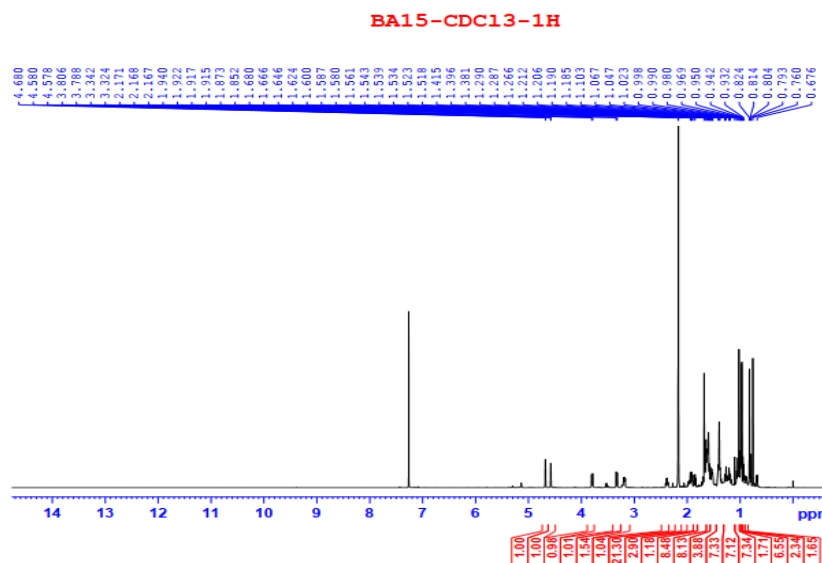
Hình P3.2.19c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 19 (BA4)



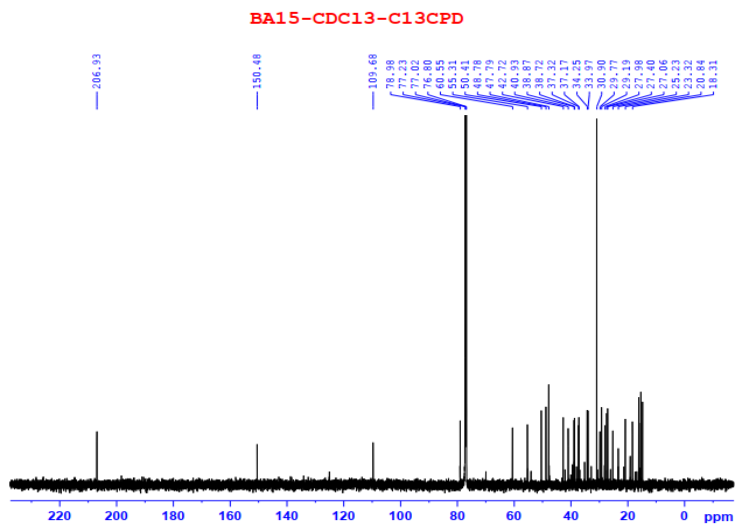
Hình P3.2.20b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 20 (BA7)



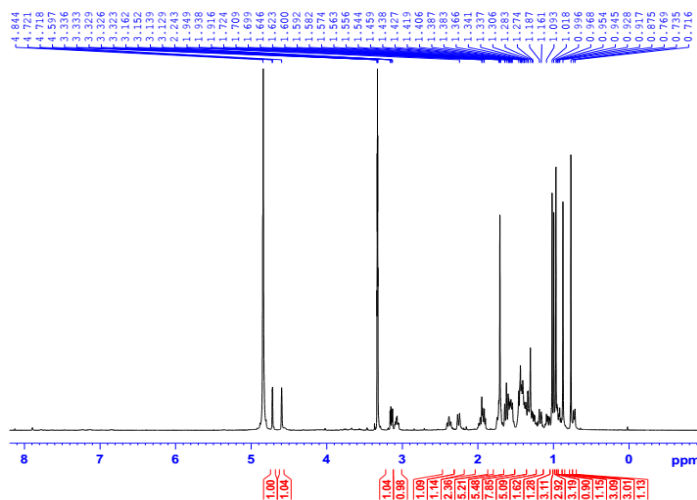
Hình P3.2.20c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 20 (BA7)



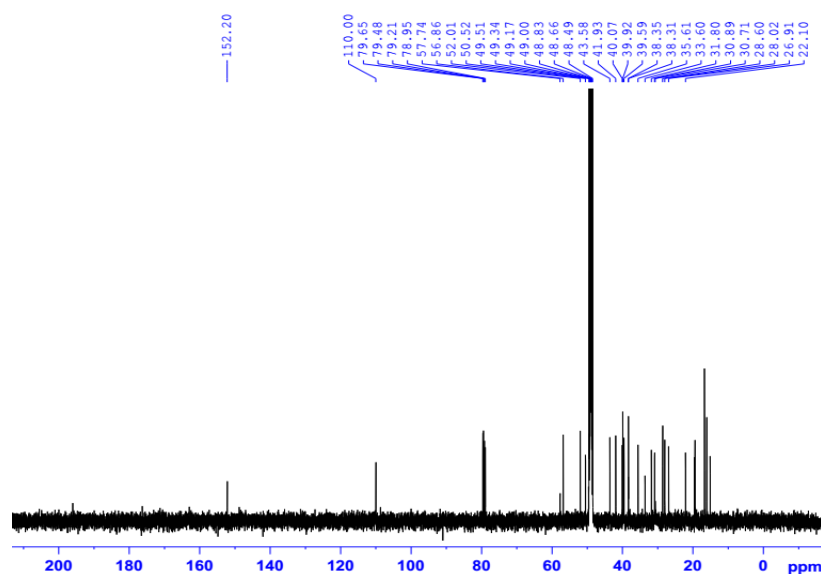
Hình P3.2.21b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 21 (BA15)



Hình P3.2.21c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 21 (BA15)

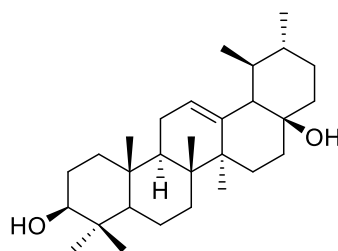


Hình P3.2.22b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 22 (BA16)



Hình P3.2.22c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 22 (BA16)

28-nor-Urs-12-ene-3 β ,17 β -diol (AG2)



Hình P3.2.23a. Cấu trúc hóa học của hợp chất AG2 (23)

Bảng P3.2.23. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất AG2 trong CDCl_3 và TLTK

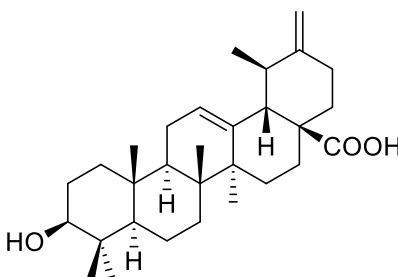
C	$\delta\text{C}^{\text{a}}$ [TLTK]	$\delta\text{C}^{\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)	$\delta\text{H}^{\text{d}}$ (Mult., J Hz) [TLTK]
1	38,77	38,8		
2	27,24	27,3		
3	79,00	79,0	3,23 (1H, dd, 11,4, 5,4 Hz)	3,23 (1H, dd, 10,7, 4,6 Hz)
4	38,67	38,7		
5	55,24	55,5		
6	18,32	18,3		
7	33,01	33,0		
8	39,84	39,8		
9	47,62	47,6		
10	36,99	37,0		

11	23,58	23,6		
12	127,80	127,8	5,30 (1H, t, 4,2 Hz)	5,29 (1H, t, 3,6 Hz)
13	138,00	138,0		
14	41,88	41,9		
15	26,00	26,0		
16	28,44	28,4		
17	72,10	72,1		
18	60,60	60,6		
19	39,28	39,3		
20	41,56	41,6		
21	32,33	32,3		
22	40,41	40,4		
23	28,16	28,2	1,00 (3H, s)	1,00 (3H, s)
24	15,62	15,6	0,80 (3H, s)	0,79 (3H, s)
25	20,70	20,7	0,95 (3H, s)	0,93 (3H, s)
26	17,13	17,1	0,99 (3H, s)	0,99 (3H, s)
27	23,05	23,0	1,08 (3H, s)	1,08 (3H, s)
28				
29	17,29	17,3	0,83 (3H, d, 6,0 Hz)	0,82 (3H, d, 6,44 Hz)
30	15,49	15,5	0,93 (3H, d, 6,0 Hz)	0,94 (3H, d, 5,58 Hz)

^a: CDCl₃, 100 MHz ^b: CDCl₃, 125 MHz ^c: CDCl₃, 600 MHz ^d: CDCl₃, 400 MHz

TLTK: Benyahia S., Benayache S., Benayache F., León F., Quintana J., López M., Hernandez J. C., Bermejo J. F. E. (2005), "Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity", *Phytochemistry*, 66, pp. 627–632.

Micromeric acid (AG3)



Hình P3.2.24a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG3 (24)**

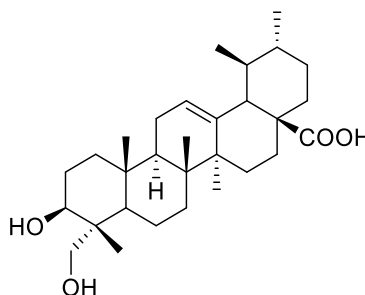
Bảng P3.2.24. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AG3** trong DMSO- d_6 và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a}}$ [TLTK]	$\delta\text{C}^{\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz) [TLTK]
1	39,9	39,0		
2	28,5	27,0		
3	80,3	77,0	3,01 (1H, m)	3,23 (1H, dd, 10,7, 4,6 Hz)
4	39,9	38,7		
5	56,7	54,9		
6	18,3	18,1		
7	34,2	32,7		
8	40,7	40,0		
9	48,8	47,2		
10	38,2	36,7		
11	24,6	22,2		
12	127,7	125,1	5,16 (1H, t, 3,6 Hz)	5,34 (1H, t, 3,6 Hz)
13	138,0	138,0		
14	43,3	41,8		
15	29,1	27,6		
16	25,6	24,6		
17	48,0	47,1		
18	56,1	54,6		
19	38,7	36,6		
20	152,8	153,0		
21	33,5	31,8		
22	40,1	38,3		
23	29,4	28,6	0,93 (3H, s)	1,00 (3H, s)
24	16,9	16,1	0,68 (3H, s)	0,79 (3H, s)
25	16,6	15,3	0,89 (3H, s)	0,94 (3H, s)
26	18,3	17,0	0,74 (3H, s)	0,78 (3H, s)
27	24,6	23,2	1,09 (3H, s)	1,16 (3H, s)
28	177,8	177,8		
29	17,3	16,1	0,93 (3H, d, 6,6 Hz)	1,03 (3H, d, 6,2 Hz)
30	106,5	104,8	4,67 and 4,57 (each 1H, br s)	4,70 and 4,65 (each 1H, br s)

^a: CD_3OD , 150 MHz ^b: DMSO- d_6 , 125 MHz ^c: DMSO- d_6 , 600 MHz ^d: CD_3OD , 600 MHz

TLTK: Altinier G., Sosa S., Aquino R. P., Mencherini T., Loggia R. D., Tubaro A. (2007), "Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L.", *J. Agri. Food Chem.*, 55, pp. 1718-1723.

23-Hydroxy ursolic acid (AG28)



Hình P3.2.25a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG28 (25)**

Bảng P3.2.25. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AG28** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a}}$ [TLTK1]	$\delta\text{C}^{\text{b}}$ [TLTK2]	$\delta\text{C}^{\text{c}}$	$\delta\text{H}^{\text{d}}$ (Mult., J Hz)	$\delta\text{H}^{\text{e}}$ (Mult., J Hz) [TLTK2]
1	39,0	38,2	39,6		
2	27,7	26,8	27,4		
3	73,5	77,1	74,0	3,55 (1H, m)	3,62 (1H, t, 7,2 Hz)
4	42,9	41,6	43,3		
5	48,6	49,7	49,5		
6	18,6	18,4	19,1		
7	33,3	32,7	33,8		
8	40,0	39,4	40,7		
9	48,1	47,5	48,4		
10	37,2	36,8	37,8		
11	23,7	24,1	24,3		
12	125,5	125,7	126,7	5,14 (1H, t, 3,6 Hz)	5,24 (1H, t, 3,2 Hz)
13	139,4	137,9	139,8		
14	42,6	41,9	43,2		
15	28,8	27,9	29,2		
16	25,0	23,2	25,4		
17	48,1	47,8	48,8		
18	53,6	52,7	54,5	2,13 (1H, d, 10,8 Hz)	2,17 (1H, d, 11,0 Hz)
19	39,6	38,8	40,5		

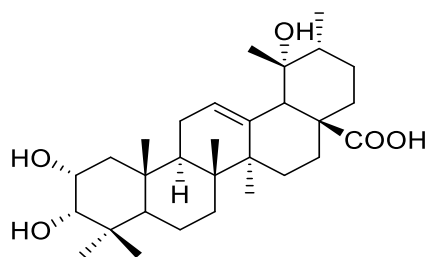
20	39,5	39,0	40,4		
21	31,2	30,5	31,8		
22	37,5	36,6	38,2		
23	67,9	72,2	67,4	3,53 (1H, d, 10,8 Hz) 3,45 (1H, d, 10,8 Hz)	3,71 (1H, d, 11,2 Hz) 3,41 (1H, d, 10,8 Hz)
24	13,2	11,3	12,8	0,63 (3H, s)	0,78 (3H, s)
25	16,2	15,8	16,4	0,92 (3H, s)	0,95 (3H, s)
26	17,6	17,0	17,9	0,81 (3H, s)	0,87 (3H, s)
27	23,9	23,5	24,1	1,04 (3H, s)	1,06 (3H, s)
28	180,7	178,1	175,4		
29	17,6	17,0	17,6	0,81 (3H, d, 6,6 Hz)	0,84 (3H, d, 6,2 Hz)
30	21,4	21,1	21,6	0,89 (3H, d, 7,2 Hz)	0,92 (3H, d, 7,2 Hz)

^a: pyridine-d₅, 150 MHz ^b: CDCl₃, 100 MHz ^c: CD₃OD, 125 MHz, ^d: CD₃OD, 600 MHz, ^e: CDCl₃, 400 MHz

TLTK: 1. An R. B., Na M. K., Min B. S., Lee H. K., Bae K. H. (2008), "Anti-complement activity of triterpenoids from the whole plant of *Patrinia saniculaefolia*", *Nat. Prod. Sci.*, 14, pp. 249–253.

2. Bano Z., Begum S., Ali S. S., Kiran Z., Siddiqui B. S., Ahmed A., ... and Jabeen A. (2022), "Phytochemicals from *Carissa carandas* with potent cytotoxic and anti-inflammatory activities", *Natural Product Research*, 36(6), pp. 1587-1592.

Euscaphic acid (AG7)



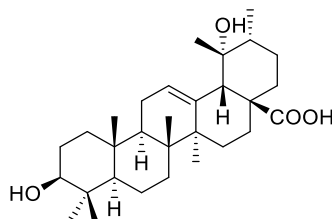
Hình P3.2.26a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG7 (26)**

Bảng P3.2.26. Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AG7** trong DMSO- d_6 và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a}}$ [TLTK]	$\delta\text{C}^{\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)	$\delta\text{H}^{\text{d}}$ (Mult., J Hz) [TLTK]
1	41,3	41,4		
2	65,8	64,7	3,77 (1H, m)	3,95 (1H, m)
3	78,7	77,9	3,15 (1H, d, 1,2 Hz)	3,35, m
4	38,1	38,0		
5	47,9	47,6		
6	17,9	17,7		
7	32,7	32,6		
8	39,9	39,5		
9	46,8	46,5		
10	38,0	37,8		
11	23,3	23,1		
12	128,0	126,7	5,17 (1H, br s)	5,32 (1H, t, 4,0 Hz)
13	138,7	138,6		
14	41,6	41,6		
15	27,9	28,0		
16	25,2	25,2		
17	47,3	46,9		
18	53,7	53,2		
19	72,2	71,6		
20	41,1	41,2		
21	25,7	25,9		
22	37,6	37,3		
23	28,2	28,9	0,88 (3H, s)	1,01 (3H, s)
24	21,1	21,8	0,68 (3H, s)	0,81 (3H, s)
25	15,5	16,1	0,78 (3H, s)	0,89 (3H, s)
26	16,1	16,6	0,88 (3H, s)	1,01 (3H, s)
27	23,5	24,1	1,29 (3H, s)	1,37 (3H, s)
28	180,9	179,0	-	-
29	25,9	26,4	1,08 (3H, s)	1,22 (3H, s)
30	15,3	16,3	0,84 (3H, d, 7,8 Hz)	0,95 (3H, d, 5,2 Hz)

^a: CD_3OD , 100 MHz ^b: DMSO- d_6 , 125 MHz ^c: DMSO- d_6 , 600 MHz ^d: CD_3OD , 400 MHz

TLTK: Yuan C., Huang L., Suh J. H., Wang Y. (2019), "Bioactivity-guided isolation and identification of antiadipogenic compounds in Shiya tea (Leaves of *Adinandra nitida*)", *J. Agric. Food Chem.*, 67, pp. 6785-6791.

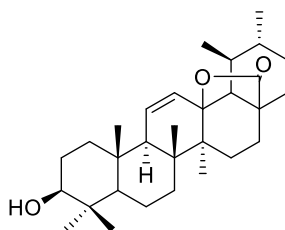
Pomolic acid (AG8)**Hình P3.2.27a.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG8 (27)****Bảng P3.2.27.** Dữ liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) của hợp chất **AG8** trong CD_3OD và TLTK

C	$\delta\text{C}^{\text{a}}$ [TLTK]	$\delta\text{C}^{\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{c}}$ (Mult., J Hz)
1	39,1	39,8	
2	29,5	27,9	
3	78,4	79,8	3,18 (1H, d, 11,5, 3,5 Hz)
4	39,5	39,9	
5	56,1	56,7	
6	19,1	19,6	
7	33,8	34,2	
8	40,5	41,1	
9	48,0	48,3	
10	37,5	38,1	
11	24,2	24,6	
12	128,2	129,5	5,30 (1H, t, 3,5 Hz)
13	140,1	140,0	
14	42,3	42,6	
15	30,1	29,6	
16	26,5	26,6	
17	48,5	48,8	
18	54,8	55,1	
19	72,9	73,6	
20	42,5	43,1	
21	27,1	27,3	
22	38,6	39,0	
23	28,9	28,7	1,21 (3H, s)
24	15,7	15,8	0,80 (3H, s)
25	16,7	16,3	0,82 (3H, s)
26	17,4	17,5	0,98 (3H, s)
27	24,9	24,8	1,35 (3H, s)
28	180,9	182,3	-
29	27,3	27,1	1,00 (3H, s)
30	16,9	16,6	0,95 (3H, d, 7,0 Hz)

^a: CD₃OD, 75 MHz ^b: CD₃OD, 125 MHz ^c: CD₃OD, 600 MHz

TLTK: Thuong P. T., Jin W., Lee J., Seong R., Lee Y. M., Seong Y., Song K., Bae K. (2005), "Inhibitory effect on TNF- α -induced IL-8 production in the HT29 cell of constituents from the leaf and stem of *Weigela subsessilis*", *Archives of pharmacal research*, 28, pp. 1135-1141.

3, 13-Dihydroxy ursolic acid 28,13-olide (AG10)



Hình P3.2.28a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG10 (28)**

Bảng P3.2.28. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AG10** trong CDCl₃ và TLTK

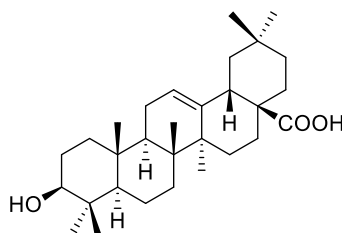
C	δC^a [TLTK]	δC^b	δH^c (Mult., J Hz)	δH^d (Mult., J Hz) [TLTK]
1	38,2	38,3		
2	27,0	27,0		
3	78,7	78,7	3,21, 1H, dd, 11,5 Hz, 5 Hz	3,19, 1H, dd, 10 Hz, 6 Hz
4	38,9	38,9		
5	54,7	54,8		
6	17,6	17,7		
7	31,2	31,2		
8	41,9	41,9		
9	53,0	53,0		
10	36,3	36,4		
11	128,7	128,8	5,53, 1H, dd, 10,4 Hz; 3 Hz	5,51, 1H, dd, 10 Hz; 2,8 Hz
12	133,4	133,4	5,95, 1H, d, 10 Hz	5,95, 1H, d, 10,4 Hz
13	89,6	89,6		
14	41,6	41,7		
15	25,5	25,5		
16	22,7	22,8		
17	45,0	45,1		
18	60,5	60,6		
19	38,1	38,1		

20	40,2	40,3		
21	30,8	30,8		
22	31,3	31,3		
23	27,7	27,7	0,99 (3H, s)	0,98 (3H, s)
24	14,9	14,9	0,78 (3H, s)	0,78 (3H, s)
25	17,8	17,8	0,91 (3H, s)	0,90 (3H, s)
26	18,8	18,9	1,05 (3H, s)	1,05 (3H, s)
27	16,0	16,1	1,16 (3H, s)	1,15 (3H, s)
28	179,8	179,8	-	-
29	17,8	17,9	1,00 (3H, d, 6,5 Hz)	0,99 (3H, d, 6,4 Hz)
30	19,1	19,1	0,94 (3H, d, 6,5 Hz)	0,92 (3H, d, 6,4 Hz)

^a: CDCl₃, 150 MHz ^b: CDCl₃, 125 MHz ^c: CDCl₃, 500 MHz ^d: CDCl₃, 600 MHz

TLTK: Abdel-Monem A. R., Kandil Z. A., Abdel-Naim A. B., Abdel-Sattar E. (2015), "A new triterpene and protective effect of *Periploca somaliensis* Browicz fruits against CCl₄-induced injury on human hepatoma cell line (Huh7)", *Natural Product Research*, 29(5), pp. 423-429.

Oleanolic acid (AG15)



Hình P3.2.29a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG15 (29)**

Bảng P3.2.29. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AG15** trong CDCl₃ và TLTK

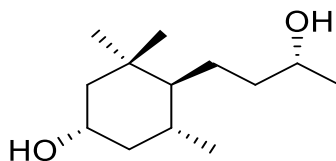
C	δC ^a [TLTK]	δC ^b	δH ^c (Mult., J Hz)	δH ^d (Mult., J Hz) [TLTK]
1	38,9	38,4		
2	27,9	27,2		
3	79,7	79,0	3,21, 1H, dd, 11,0, 3,5 Hz	3,19, 1H, dd, 11,3, 4,5 Hz
4	39,8	38,8		
5	56,7	55,3		
6	19,5	18,3		
7	34,0	32,7		
8	40,5	39,3		
9	49,3	47,7		

10	38,2	37,1		
11	24,5	23,0		
12	123,6	122,7	5,29, 1H, br s	5,27, 1H, br t, 3,2 Hz
13	145,2	143,6		
14	42,9	41,7		
15	28,8	27,7		
16	24,0	23,4		
17	47,6	45,9		
18	42,7	41,1	2,83, 1H, dd, 5,0, 10 Hz	2,88, 1H, dd, 13,7, 3,7 Hz
19	47,2	46,5		
20	31,6	30,7		
21	34,9	33,8		
22	33,8	32,5		
23	28,7	28,1	0,99 (3H, s)	1,00 (3H, s)
24	16,3	15,6	0,75 (3H, s)	0,81 (3H, s)
25	15,9	15,3	0,93 (3H, s)	0,97 (3H, s)
26	17,7	17,1	0,77 (3H, s)	0,85 (3H, s)
27	26,4	25,9	1,13 (3H, s)	1,19 (3H, s)
28	177,9	181,9	-	-
29	33,6	33,1	0,90 (3H, s)	0,93 (3H, s)
30	24,0	23,6	0,92 (3H, s)	0,97 (3H, s)

^a: CDCl₃ ^b: CDCl₃, 125 MHz ^c: CDCl₃, 500 MHz ^d: CDCl₃

TLTK: Acebey-Castellon I. L., Voutquenne-Nazabadioko L., Doan T. M. H., Roseau N., Bouthagane N., Muhammad D., Lavaud, C. (2011), “Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*”, *Journal of Natural Products*, 74(2), pp. 163-168.

(3S, 5R, 6S, 9R)-Megastigmane-3,9-diol (AG18)



Hình P3.2.30a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG18 (30)**

Bảng P3.2.30. Dữ liệu phổ ¹H (600 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AG18** trong CDCl₃ và TLTK

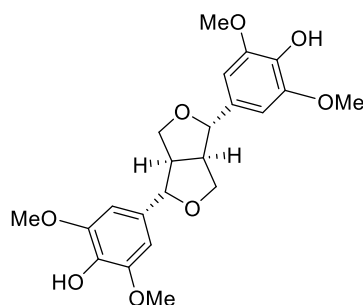
C	δC ^a [TLTK]	δC ^b	δH ^c (Mult., J Hz)
1	35,9	35,9	
2	51,0	51,1	
3	66,9	66,9	3,75, m

4	45,7	45,7	
5	33,6	33,6	
6	52,6	52,6	0,55, ddd, $J = 11,4, 5,4, 1,8$ Hz
7	25,0	25,0	
8	41,6	41,6	
9	68,7	68,7	3,75, m
10	23,4	23,4	1,20, d, $J = 6,0$ Hz
11	21,0	21,0	0,81, s
12	30,7	30,7	0,94, s
13	20,9	20,9	0,96, d, $J = 6,6$ Hz

^a: CDCl₃, ^b: CDCl₃, 125 MHz ^c: CDCl₃, 600 MHz

TLTK: Skouroumounis G. K., Gunata Y. Z., Baumes R. L. (2000), “Isolation of two megastigmane-3,9-diol glucosides from Shiraz leaves”, *J. Essen. Oil Res.*, 12, pp. 653-660.

Syringaresinol (AG21)



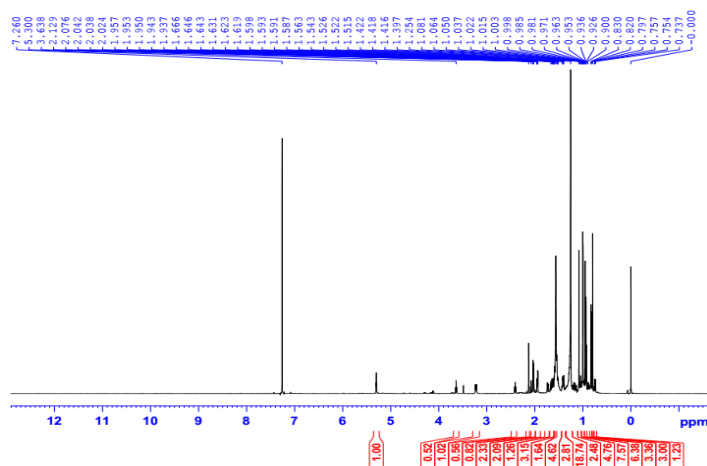
Hình P3.2.31a. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AG21 (31)**

Bảng P3.2.31. Dữ liệu phổ ¹H (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của hợp chất **AG21** trong CD₃OD và TLTK

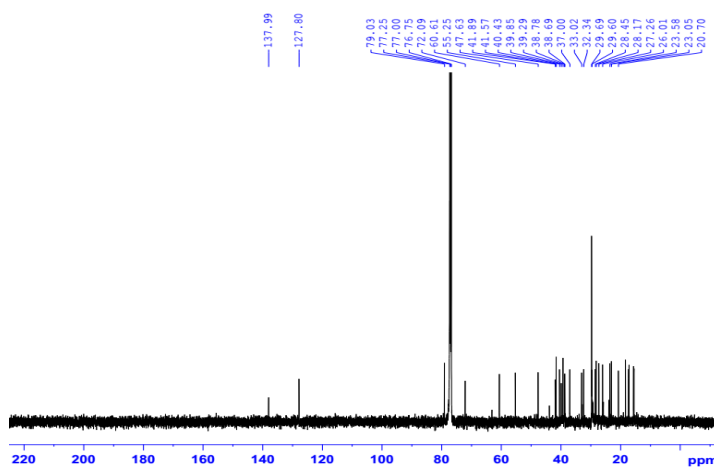
C	δC^a [TLTK]	δC^b	δH^c (Mult., J Hz)	δH^d (Mult., J Hz) [TLTK]
1,1'	132,7	134,2		
2, 2'	105,2	104,9	6,76 (2H, s)	6,97 (2H, s)
3, 3'	149,8	149,3		
4, 4'	137,7	136,2		
5, 5'	149,8	149,3		
6,6'	105,2	104,9	6,76 (2H, s)	6,97 (2H, s)
7, 7'	87,1	84,5	4,99 (2H, d, $J = 4,5$ Hz)	4,99 (2H, d, $J = 3,8$ Hz)
8, 8'	55,2	55,4	2,32 (2H, m)	2,33 (2H, m)
9, 9'	72,5	61,8	3,73 (2H, dd, 5,0; 11,5 Hz) 3,65 (2H, dd, 5,0; 11,5 Hz)	4,39 (2H, m) 4,07 (2H, dd, 6,8; 9,1 Hz)
4x OMe	56,9	56,8	3,88 (12H, s)	3,82 (12H, s)

^a: CD₃OD, 125 MHz ^b: CD₃OD, 125 MHz ^c: CD₃OD, 500 MHz, ^d: CD₃OD, 600 MHz,

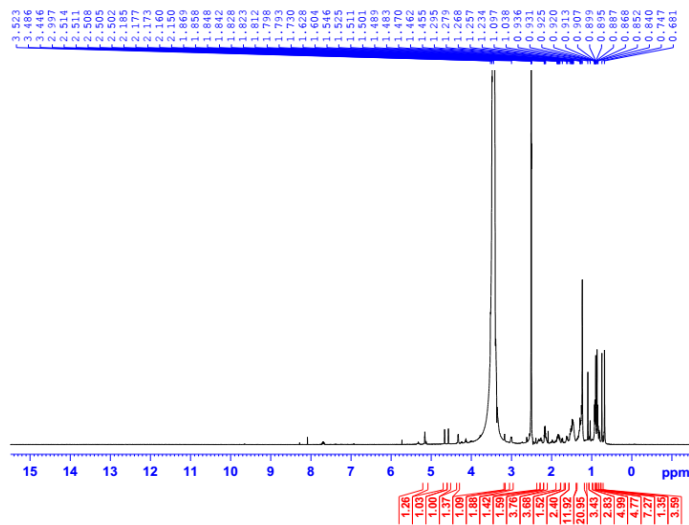
TLTK: Panyo J., Matsunami K., and Panichayupakaranant P. (2016), "Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens", *Pharmaceutical biology*, 54(9), pp. 1522-1527.



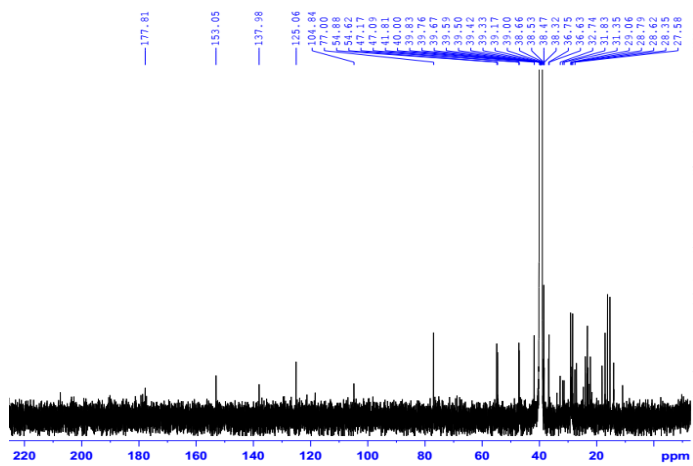
Hình P3.2.23c. Phổ ¹H-NMR của hợp chất AG2 (23)



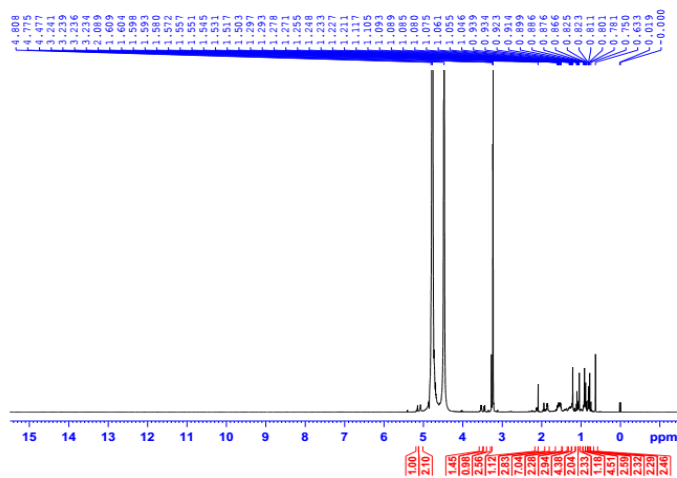
Hình P3.2.23d. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất AG2 (23)



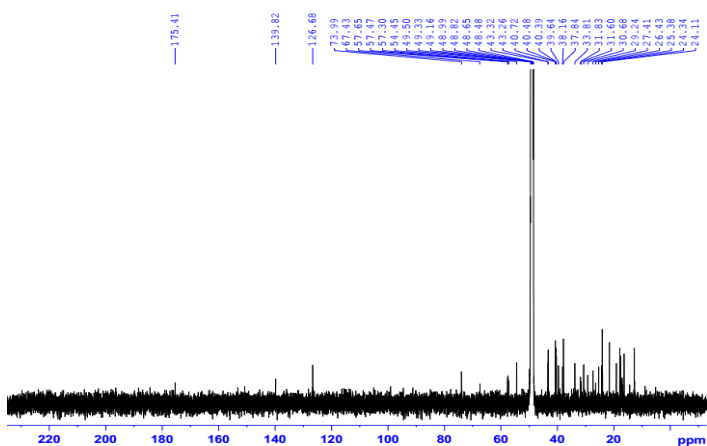
Hình P3.2.24c. Phổ ^1H -NMR của hợp chất AG3 (24)



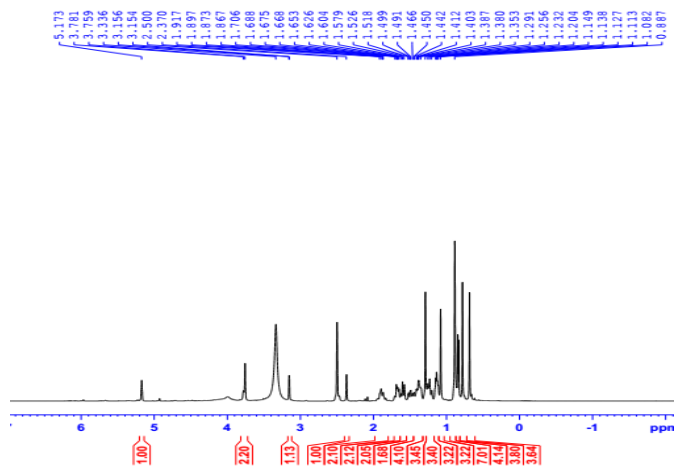
Hình P3.2.24d. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG3 (24)



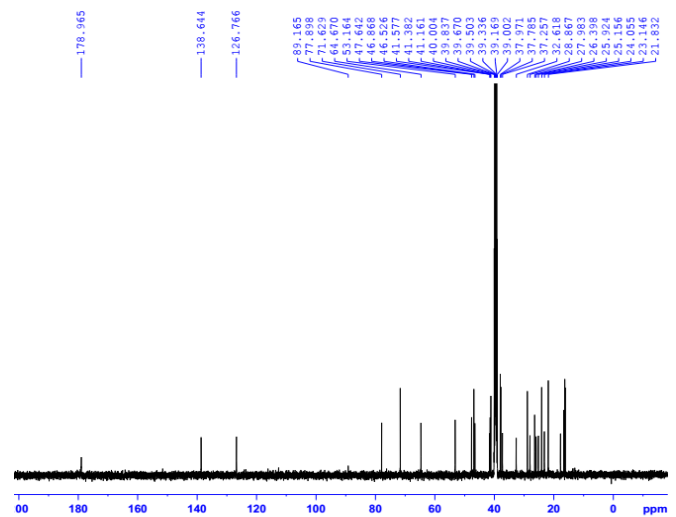
Hình P3.2.25c. Phổ ^1H -NMR của hợp chất AG28 (25)



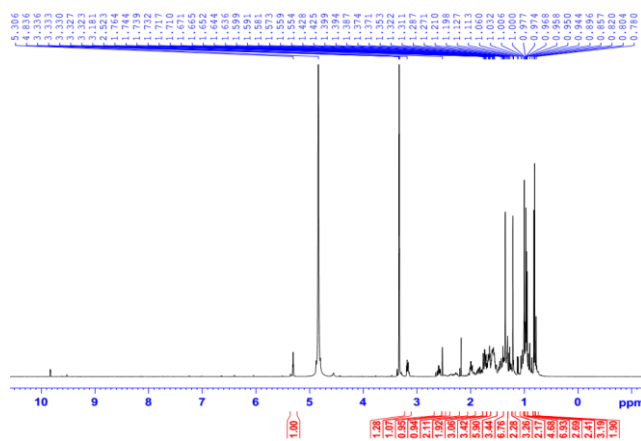
Hình P3.2.25d. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG28 (25)



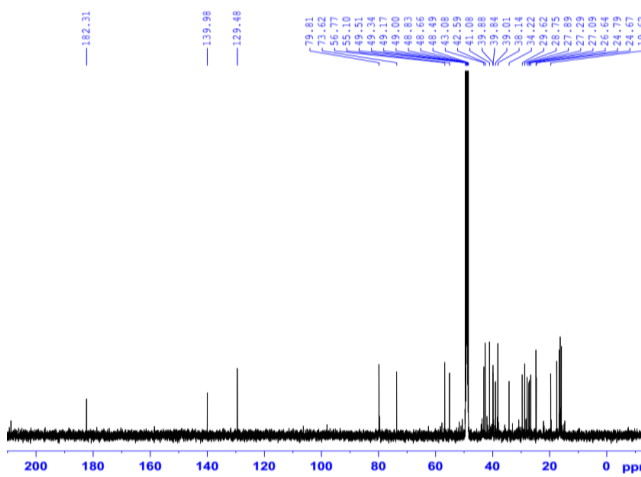
Hình P3.2.26b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **AG7 (26)**



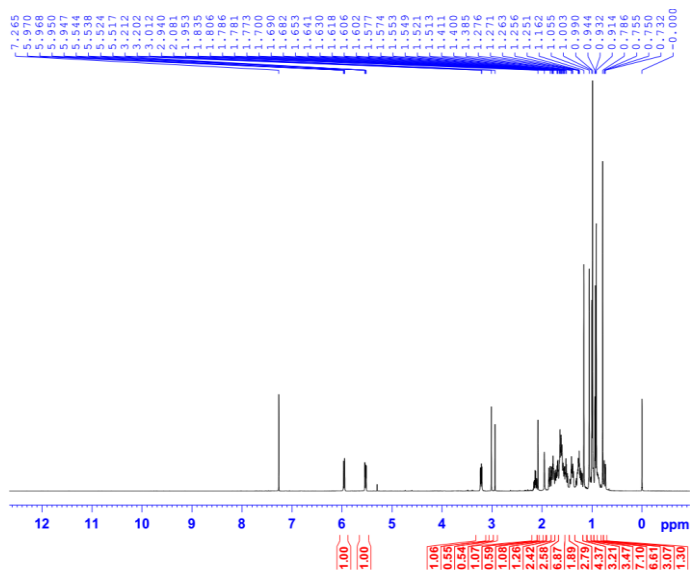
Hình P3.2.26c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG7 (26)



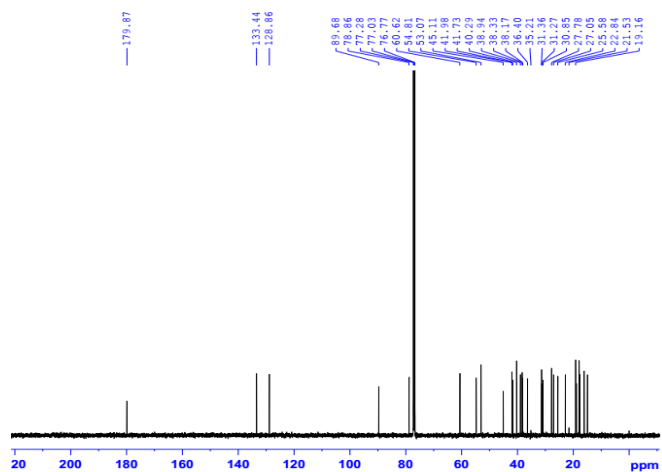
Hình P3.2.27b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **AG8** (27)



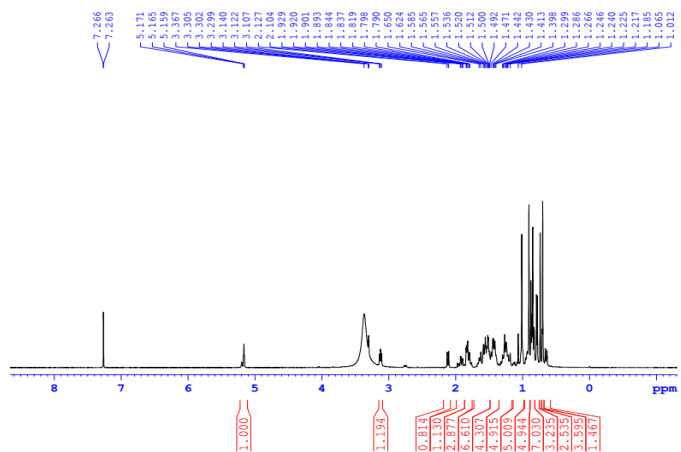
Hình P3.2.27c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG8 (27)



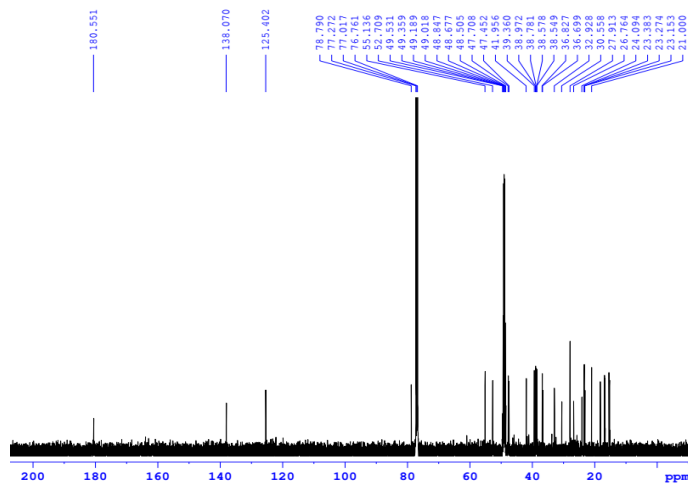
Hình P3.2.28b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **AG10** (**28**)



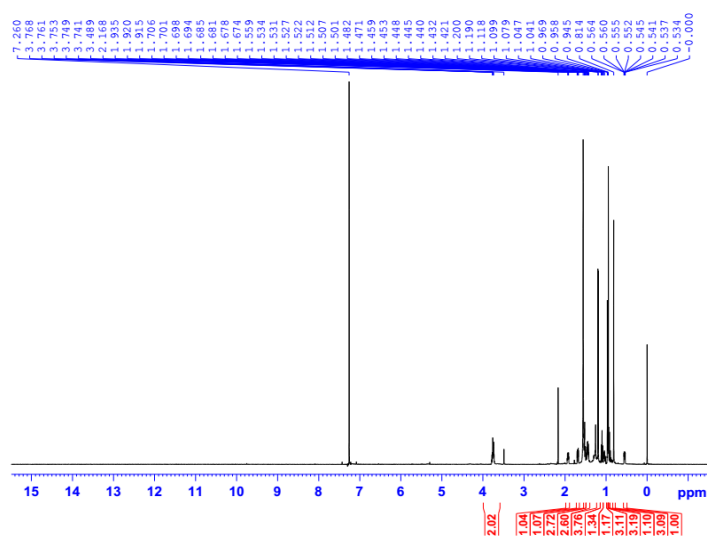
Hình P3.2.28c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG10 (28)



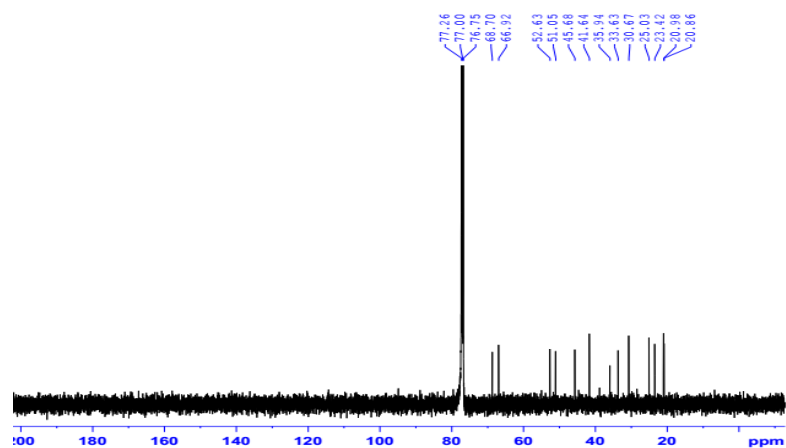
Hình P3.2.29b. Phổ ^1H -NMR của hợp chất AG15 (29)



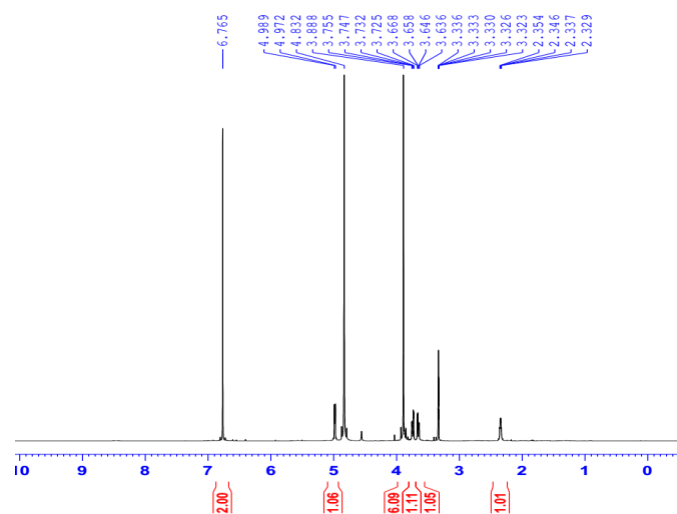
Hình P3.2.29c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG15 (29)



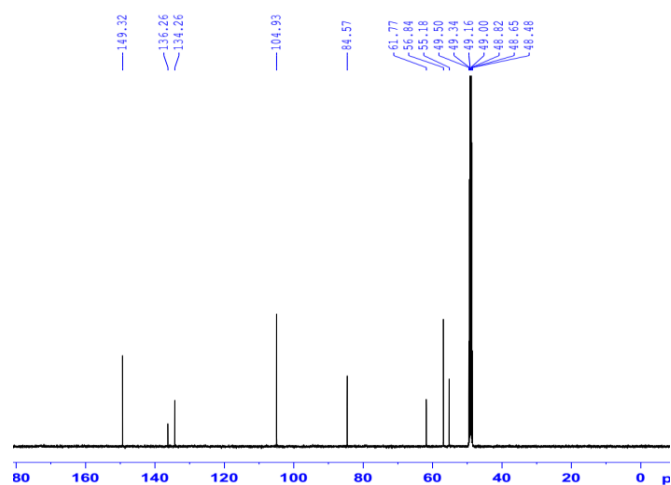
Hình P3.2.30b. Phổ ¹H-NMR của hợp chất AG18 (30)



Hình P3.2.30c. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất AG18 (30)

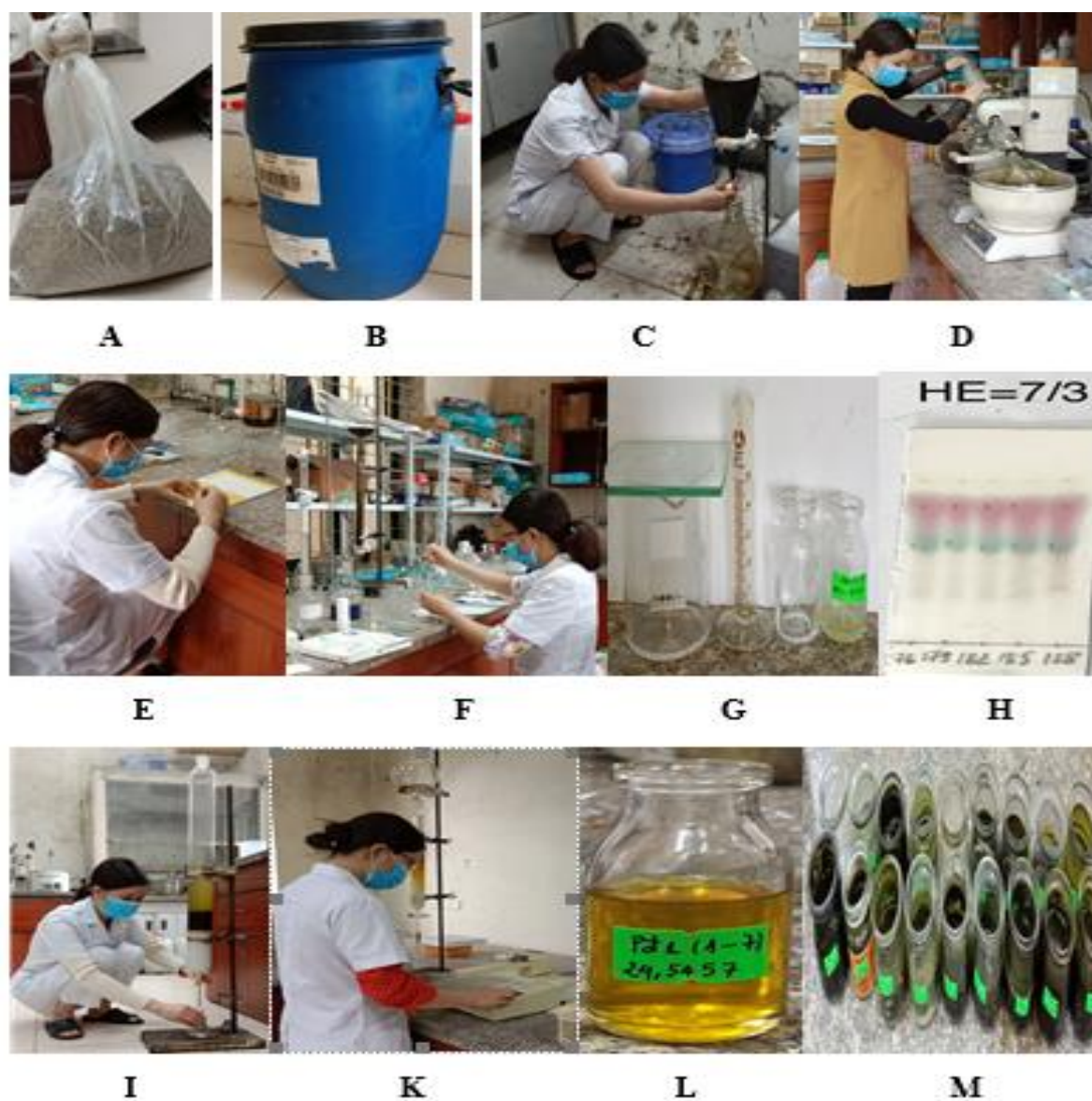


Hình P3.2.31b. Phổ ¹H-NMR của hợp chất AG21 (31)



Hình P3.2.31c. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AG21 (31)

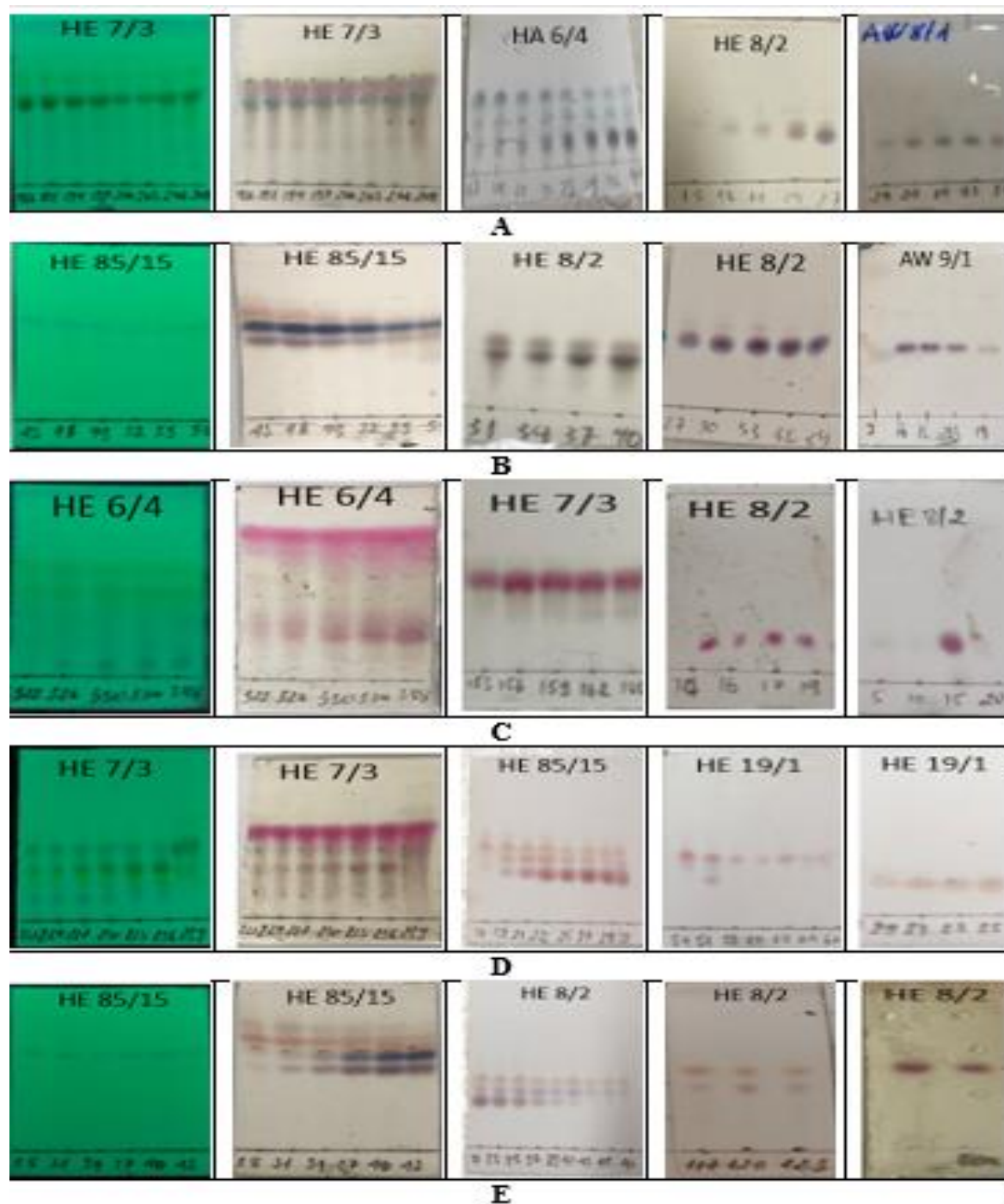
Phụ lục 3.3. Một số hình ảnh phân lập các hợp chất từ ba loài *Adinandra* tại viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình P3.3. Hình ảnh phân lập và tinh sạch các chất từ 3 loài *Adinandra*

A. Mẫu bột *Adinandra* khô; B. Ngâm mẫu trong MeOH; C. Chiết phân lọc; D. Cô quay cất đuổi dung môi; E. Tra mẫu trên bản mỏng; D. Chuẩn bị dung môi; G. Khai triển bản mỏng; H. Phân tích bản mỏng sau hiện vết; I, K. Sắc ký cột; L, M: Các phân đoạn thu được sau sắc ký cột.

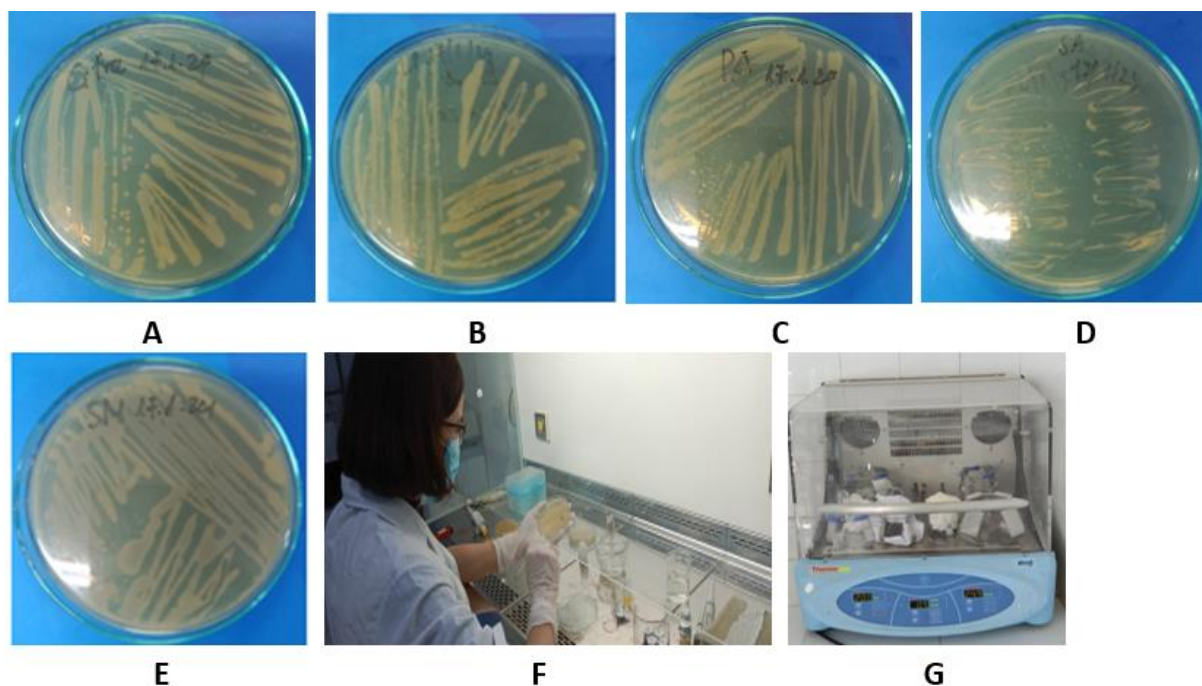
Phụ lục 3.4. Hình ảnh TLC sử dụng trong phân lập một số chất sạch



Hình P3.4. Hình ảnh TLC sử dụng trong phân lập một số chất sạch

A: Chất AHL15 (Dibutyldorycnic acid); B: WAM11.5 (Adinanquercetiside); C: Chất BA5 (ursolic acid); D: Chất AG28 (23-hydroxyursolic acid); E: Chất AG19 (isoquercetine).

Phụ lục 4. Thử hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập từ lá của ba loài nghiên cứu



Hình P4. Nuôi cấy các chủng vi khuẩn từ chủng gốc chuẩn bị cho thử hoạt tính kháng khuẩn

A: Vi khuẩn *Citrobacter freundii*; B. Vi khuẩn *Escherichia coli*; C: Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*; D: Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*; E: Vi khuẩn *Streptococcus milleri*; F: Nuôi cấy khuẩn trên đĩa thạch; G: Hoạt hóa khuẩn.