



Original Article

Anti-peptic Ulcer of the *N*-hexane Fraction from *Sanchezia nobilis* Hook.F. Leaves and its Isolated Compounds

Bui Thi Xuan^{1,2,*}, Tran Minh Ngoc³, Tran Thanh Ha²

¹VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Medicinal Materials, 3B Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³Ministry of Health, 138 Giang Vo, Ba Dinh, Hanoi, Vietnam

Received 20 July 2022

Revised 29 August 2022; Accepted 08 October 2022

Abstract: The *n*-hexane fraction of the *Sanchezia nobilis* Hook.f. leaves was evaluated for its effect on the gastric ulcer with pyloric ligation (Shay) rat model, analgesia effect on hot plate model and pain threshold meter, and inhibitory effect on *Helicobacter pylori* (*H.P.*). The data showed a significant reduction in ulcer score, gastric volume, and total acidity and tended to reduce free acidity and increase gastric pH. In addition, the *n*-hexane fraction had a central analgesic effect and *H.P.* inhibition. Chemical investigation of the *n*-hexane fraction resulted in the isolation of the four compounds (1 – 4). By using NMR and ESI-MS spectra, these compounds were identified chemical structures (3β , 5α , $22E$)-stigmasta-7,22-dien-3-ol (1), coccinic acid (2), 7-hydroxy-6-methoxy coumarin (3), and betulinic acid (4). All compounds were reported for the first time from the *Sanchezia* genus.

Keyword: *Sanchezia nobilis* Hook.f., *n*-hexane, compounds, anti-peptic ulcer, analgesia effect, *H.P.*

* Corresponding author.

E-mail address: sealotus82@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4424>

Tác dụng trên viêm loét dạ dày và phân lập các hợp chất từ phân đoạn *n*-hexan của lá cây *Sanchezia nobilis* Hook.f.

Bùi Thi Xuân^{1,2,*}, Trần Minh Ngọc³, Trần Thanh Hà²

¹Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Dược liệu Trung ương, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Bộ Y tế, 138 Giảng võ, Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 20 tháng 7 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 29 tháng 8 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 08 tháng 10 năm 2022

Tóm tắt: Phân đoạn *n*-hexan lá *Sanchezia nobilis* Hook.f., được đánh giá tác dụng trên loét dạ dày với mô hình thắt môn vị trên chuột cống trắng (Shay), giảm đau trung ương trên mô hình tấm nóng và máy đo ngưỡng đau, và tác dụng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H.P.*). Kết quả cho thấy phân đoạn *n*-hexan thể hiện tác dụng làm giảm điểm loét trung bình, thể tích dịch dạ dày, độ acid toàn phần và có xu hướng làm giảm độ acid tự do và tăng pH dịch vị. Ngoài ra, phân đoạn *n*-hexan có tác dụng giảm đau trung ương và ức chế vi khuẩn *H.P.* Nghiên cứu thành phần hóa học phân đoạn *n*-hexan bốn hợp chất (1-4) đã được phân lập. Bằng các phương pháp phổ NMR và ESI-MS, cấu trúc hóa học của chúng đã được xác định là (3 β , 5 α , 22E)-stigmasta-7,22-dien-3-ol (1), acid coccinic (2), 7-hydroxy-6-methoxy coumarin (3) và acid betulinic (4). Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ chi *Sanchezia*.

Từ khóa: *Sanchezia nobilis* Hook.f., *n*-hexan, các hợp chất, loét dạ dày, giảm đau trung ương, *H.P.*

1. Mở đầu

Sanchezia nobilis Hook.f. ở Việt Nam có các tên gọi như Xăng xê, Khôi đốm, Sàng xê, Lá ngũ sắc,... Cây có nguồn gốc từ Nam Mỹ, chủ yếu được trồng làm cảnh [1]. Ở nước ta cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. trồng ở một số nơi làm cảnh và làm hàng rào, ngoài ra còn được trồng ở một số vườn thuốc nam của các cơ quan, bệnh xá quân dân y. Dân gian từ lâu đã sử dụng lá cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. làm thuốc điều trị viêm loét dạ dày, cắt các cơn đau do bệnh dạ dày và bệnh đường tiêu hóa gây ra, tuy nhiên hiện nay chưa có nghiên cứu nào chứng minh tác dụng này. Cho đến nay các công trình công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của

cây còn tương đối ít. Năm 2013, Ahmed E. Abd Ellah và cộng sự đã phân lập và xác định được cấu trúc của 14 hợp chất [2, 3]. Năm 2017, Nusrat Shaheen và cộng sự [4] đã tách được 6 hợp chất từ cao chiết dichloromethane rễ cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. Thêm vào đó Juliana Mourao Ravasi và cộng sự [5] đã xác định được cấu trúc của 36 hợp chất được phân lập từ các bộ phận khác nhau của *Sanchezia* trồng ở Brazil như là quercetin, kaempferol-7-*O*-arabinosyl-3-*O*-glucoside, kaempferol-7-*O*-glucoside,... và các acid béo như là acid oleic, stearic, linoleic,... Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu của V. Đ. Lợi và cộng sự [6], đã phân lập được 4 hợp chất từ cao chiết ethanol lá *Sanchezia nobilis* Hook.f. là quercitrin, hyperoside, daucosterol và 3-methyl-

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: sealotus82@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4170>

1H-benz[f]indole-4,9-dione. Bằng phương pháp sắc kí khí khối phổ (GC-MS) Lê Thị Hồng Nhung [7] đã xác định được 14 acid béo từ cặn *n*-hexan lá. Cây cũng đã được nghiên cứu một số tác dụng như chống oxy hóa [5, 6], kháng khuẩn, kháng nấm [3], chống ung thư [4],... Bài báo là kết quả nghiên cứu phân lập một số hợp chất từ phân đoạn *n*-hexan của *Sanchezia nobilis* Hook.f. và đánh giá tác dụng trên loét dạ dày, giảm đau trung ương, và ức chế vi khuẩn *H.P.* Kết quả của nghiên cứu góp phần bổ sung thêm dữ liệu về thành phần hóa học cũng như cung cấp thêm bằng chứng cho việc sử dụng cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. trong thực tế.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. được thu hái vào tháng 01/2018 tại Cổ Lễ, Trực Ninh, Nam Định, được phơi sấy, bảo quản trong túi nilon kín. Được xác định tên khoa học bởi Thạc sĩ Nguyễn Quỳnh Nga, Viện Dược liệu, Bộ Y tế. Mẫu dược liệu được lưu tại phòng tiêu bản, Khoa Tài nguyên Cây thuốc, Viện Dược liệu (Phiếu giám định số 109DV18).

2.2. Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 20 ± 2 g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Chuột cống trắng chủng *Wistar*, cả hai giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 180- 250 g do trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng – Hà Nội cung cấp.

Động vật thí nghiệm được nuôi 7 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3. Thuốc, dung môi, hóa chất

i) Hóa chất dùng trong đánh giá tác dụng chống loét dạ dày tá tràng

Ranitidin viên nén 300 mg (Domesco – Việt Nam);

Nước muối sinh lý NaCl 0,9% (HD Pharma – Việt Nam);

Phenolphtalein, NaOH, Topfer;

Cloralhydrat;

Formaldehyd 5%, các hóa chất làm giải phẫu bệnh;

ii) Hóa chất dùng trong đánh giá tác dụng giảm đau

Codein phosphat của Viện Kiểm nghiệm Trung ương;

iii) Hóa chất dùng trong đánh giá tác dụng trên *H.P*

- Amoxicillin viên nén 500 mg (Domesco – Việt Nam);

iv) Dung môi, hóa chất dùng trong phân lập các hợp chất

Dung môi được sử dụng cho chiết xuất và phân lập được là các dung môi công nghiệp hoặc của Trung Quốc được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Sắc kí lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F254 (Merck) và được quan sát dưới bước sóng 254 nm và 360 nm. Sắc kí cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40-63 μ m (Merck).

2.4. Thiết bị dụng cụ

i) Thiết bị trong nghiên cứu tác dụng sinh học

- Cân điện tử (YMC.Co.Ltd, Nhật Bản);

- Bộ dụng cụ phẫu thuật, kính lúp;

- Máy đo pH, Burette (SI Analytics (Schott)

- Đức);

- Chỉ khâu loại 4.0, dao mổ;

- Máy chụp hình Sony (Nhật Bản);

- Kính hiển vi đọc giải phẫu bệnh;

- Máy Hot plate model - DS37 của hãng Ugo-Basile (Ý);

- Máy đo phản ứng đau Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 của hãng Ugo-Basile (Ý);

- Tủ ấm 37 °C có 10% CO₂ để nuôi cấy *H.P* (Binder - Đức);

ii) Thiết bị trong phân lập xác định cấu trúc

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR spectrometer và Bruker Avance NEO 600 NMR spectrometers của Thụy Sĩ, được đo trong dung môi MeOH-*d*₄, CDCl₃ và aceton-*d*₆ sử dụng TMS làm chất nội chuẩn;

- Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP3 của Anh;

- Phổ khối sắc kí lỏng ghép nối khối phổ LC-ESI MS được ghi trên máy Agilent 1100 LC/MSD của Mỹ.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Chiết xuất và phân lập

Lá của cây *Sanchezia Nobilis* Hook.f. được rửa sạch, thái nhỏ và phơi khô ở điều kiện thường (6,8 kg) sau đó tán thành bột thô, chiết bằng EtOH 80% (3 lần x 3 ngày, mỗi lần 30 L, 25 L, 20 L) ở nhiệt độ phòng. Gộp dịch chiết và tiến hành cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 567 g cao toàn phần. Cao toàn phần (316 g) được phân tán trong nước cất, và chiết lần lượt với dung môi có độ phân cực tăng dần từ *n*-hexan, ethyl acetat, thu được lần lượt các cao *n*-hexan (60 g), ethyl acetat (121 g) và cao nước (119 g). Một phần cao toàn phần (150 g) được chiết phân đoạn với các dung môi như trên và cô tới khối lượng không đổi thu được cao *n*-hexan (28,6 g), ethyl acetat (56,8 g) và cao nước (55,6 g) được sử dụng để đánh giá tác dụng sinh học.

Phần chiết *n*-hexan (60 g) được phân tách bằng sắc ký cột thường (CC) trên silica gel pha thường (Merck, 40-63 μ m). Rửa giải với hệ dung môi gradient từ *n*-hexan/ethyl acetat từ 100/1, 20/1, 10/1, 9/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (v/v) thu được 9 nhóm phân đoạn **H1** (1-29), **H2** (30-49), **H3** (50-79), **H4** (80-125), **H5** (126-150), **H6** (151-195), **H7** (196-214), **H8** (215-259), **H9** (260-300). Phân đoạn **H2** (1,02 g) được rửa bằng *n*-hexan sau đó rửa với hệ dung môi *n*-hexan/acetone (20/1), sau đó kết tinh lại trong acetone cho các tinh thể hình kim màu trắng thu được hợp chất **1** (30 mg). Phân đoạn **H4** (1,11 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc (3/1, v/v) cho tinh thể hình kim màu trắng hợp chất **3** (15 mg). Phân đoạn **H5** (1,21 g) được tinh chế bằng silica gel pha thường (Merck, 40-63 μ m) với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (10/1, v/v) thu được 3 phân đoạn từ **H5.1** đến **H5.3**. Phân đoạn **H5.2** được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột pha thường thu được hai phân đoạn **H5.2.1** và **H5.2.2**, phân đoạn **H5.2.1** rửa với dung môi acetone, kết tinh lại

trong hỗn hợp dung môi CH₂Cl₂/MeOH cho chất rắn màu trắng thu được hợp chất **2** (15 mg). Phân đoạn **H8** (2,11 g) được tinh chế trên silica gel pha thường (Merck, 40-63 μ m) với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (6/1), loại màu và kết tinh lại thu được chất rắn màu trắng thu được hợp chất **4** (27 mg).

2.5.2. Tác dụng sinh học

i) Phương pháp nghiên cứu tác dụng chống loét dạ dày mô hình thắt môn vị Shay trên chuột cống trắng

Nghiên cứu theo phương pháp gây mô hình loét dạ dày của Shay và cộng sự (1945) bằng cách thắt môn vị trên chuột cống trắng. Đây là phương pháp mô phỏng tình trạng tăng tiết acid cũng như làm chậm tháo rỗng dạ dày tương tự bệnh hẹp môn vị, từ đó gây loét dạ dày tá tràng [8-10]. Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học, n=10): uống dung môi pha mẫu nghiên cứu;

- Lô 2 (Mô hình, n=10): uống dung môi pha mẫu nghiên cứu;

- Lô 3 (Chứng dương, n=10): Ranitidin 50 mg/kg/ngày, uống 1 ml/100 g;

- Lô 4 (Mẫu cao *n*-hexan, n=10): uống mẫu cao *n*-hexan 50 mg/kg, uống 1 ml/100 g;

Chuột ở các lô được uống dung môi pha mẫu nghiên cứu/mẫu nghiên cứu liên tục trong thời gian 7 ngày. Chuột để nhịn đói 18-24 giờ nhưng vẫn cho uống nước trước khi gây mô hình. Ngày thứ 7 của nghiên cứu, sau uống mẫu nghiên cứu 2 giờ các lô chuột từ lô 2 đến lô 6 được tiến hành gây loét dạ dày bằng phương pháp thắt môn vị. Gây mê chuột bằng cloral hydrat (liều tiêm màng bụng 1 ml/100 g thể trọng), mở ổ bụng bộc lộ môn vị dạ dày chuột. Dùng chỉ phẫu thuật thắt môn vị (tránh thắt vào động mạch tạng), khâu đóng thành bụng. Chuột được nhốt vào các chuồng sạch, không có thức ăn được uống nước tự do, 6 giờ sau thắt môn vị, gây mê chuột, mở ổ bụng, cắt phần dạ dày ra khỏi ổ bụng. Dịch dạ dày đem li tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 20 phút rồi đo thể tích và lấy phần dịch trong tiến hành xác định độ acid bằng NaOH 0,1N. Dạ dày được mở dọc theo bờ cong lớn, rửa bằng nước muối sinh lý, thấm bề mặt dạ dày bằng

formaldehyd 5%, cố định dạ dày. Niêm mạc dạ dày được soi dưới kính lúp có độ phóng đại gấp 10 lần để đánh giá mức độ tổn thương. Chuột ở các lô nghiên cứu được tiến hành đánh giá các chỉ số sau:

Ti lệ chuột có loét dạ dày ở mỗi lô

Mức độ tổn thương: đếm số vết loét và đánh giá mức độ tổn thương theo phương pháp tính điểm [11, 12]; + 0 điểm: không loét. + 1 điểm: vết loét nông, loét bề mặt. + 2 điểm: các vết loét sâu. + 3 điểm: loét thủng niêm mạc.

Chỉ số loét Uj (Ulcer Index) được tính theo công thức:

$$U_i = U_n + U_s + U_p \times 0,1$$

+ U_n : số lượng vết loét trung bình của 1 lô chuột; + U_s : điểm số loét trung bình của một lô chuột; + U_p : phần trăm chuột bị loét của 1 lô chuột.

Thể tích dịch vị:

Thông số đánh giá là số ml dịch vị toàn phần tính trên 100 g động vật thí nghiệm (ml/100g).
 $V = V_{tp}/m \times 100$

+ V : thể tích dịch vị (ml); + V_{tp} : thể tích dịch vị toàn phần thu được (ml); + m : trọng lượng chuột (g).

Độ acid dịch vị:

+ Độ acid tự do: số ml dung dịch NaOH 0,1 N trung hòa lượng acid tự do có trong 10 ml dịch vị (ml/ 10 ml).

+ Độ acid toàn phần: số ml dung dịch NaOH 0,1 N trung hòa lượng acid HCl toàn phần có trong 10 ml dịch vị (ml/10 ml).

$$A_1 = n_1/n \times 10$$

$$A_2 = n_2/n \times 10$$

+ A_1 : độ acid tự do; + A_2 : độ acid toàn phần, + n : thể tích dịch vị đem định lượng, + n_1 : thể tích dung dịch NaOH 0,1 N trung hòa HCl tự do, + n_2 : thể tích dung dịch NaOH 0,1 N trung hòa HCl toàn phần.

Hình ảnh đại thể dạ dày chuột

Hình ảnh vi thể dạ dày của 30% số chuột cóng trắng ở mỗi lô

Xét nghiệm giải phẫu bệnh được đánh giá tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư thuộc Liên hiệp các hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam, kết quả do PGS. TS. Lê Đình Roanh đọc.

ii) Nghiên cứu tác dụng giảm đau bằng phương pháp tấm nóng (hot plate)

Chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 10 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học): uống nước cất 20 ml/kg/ngày;

- Lô 2 (thuốc chứng dương): uống codein liều phosphat 20 mg/kg/ngày;

- Lô 3: uống cao *n*-hexan liều 100 mg/kg/ngày;

- Lô 4: uống cao *n*-hexan liều 300 mg/kg/ngày;

Chuột các lô được uống nước cất/chứng dương/mẫu nghiên cứu mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 20 ml/kg/ngày trong 5 ngày liên tục.

Đo thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột trước khi uống mẫu nghiên cứu và sau khi uống mẫu nghiên cứu lần cuối cùng 1 giờ. Đặt chuột lên tấm nóng (Hot plate model-DS37, Ugo-Basile, Ý) luôn duy trì ở nhiệt độ 56 °C bằng hệ thống ổn nhiệt. Tính thời gian từ lúc đặt chuột lên tấm nóng đến khi chuột liếm chân sau. Loại bỏ những chuột phản ứng quá nhanh (trước 8 giây) hoặc quá chậm (sau 30 giây). So sánh thời gian phản ứng với kích thích nhiệt trước và sau khi uống thuốc thử [13, 14].

iii) Nghiên cứu tác dụng giảm đau bằng máy đo ngưỡng đau

Chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 10 lô, tương tự nghiên cứu trên, mỗi lô 10 con.

Chuột các lô được uống nước cất/chứng dương/ mẫu nghiên cứu mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 20 ml/kg/ngày trong 5 ngày liên tục.

Đo thời gian phản ứng với đau của chuột và lực gây đau đối với chuột (máy đo phản ứng đau Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 của Ugo-Basile, Ý) trước khi uống mẫu nghiên cứu và sau khi uống mẫu nghiên cứu lần cuối cùng 1 giờ. So sánh lực gây đau và thời gian phản ứng với kích thích đau trước và sau khi uống thuốc thử [15, 16].

iv) Nghiên cứu tác kháng *H.P* bằng phương pháp khoan giấy kháng khuẩn

Chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H.P*) được trải trên môi trường thạch BA, bổ sung

10% máu cừ, nuôi trong điều kiện yếm khí, 37 °C;

Mẫu cao được cân và hoà đều trong DMSO đến nồng độ stock là 20 mg/ml. Hút 5 µl dung dịch stock nhỏ lên khoanh giấy đã khử trùng, để khô khoanh giấy và bảo quản ở 4 °C. Mẫu đối chứng dương là khoanh giấy thấm kháng sinh amoxicilin với nồng độ 50 µg/khoanh giấy, đối chứng âm là khoanh giấy thấm DMSO 5%. Dùng nhíp gấp các khoanh giấy đã chuẩn bị sẵn, đặt lên bề mặt thạch và đặt đĩa ở điều kiện yếm khí, 37 °C;

Đọc kết quả: sau 7 ngày ủ đĩa, các khoanh giấy thấm mẫu kháng *H.P* có thể quan sát với vòng kháng khuẩn xung quanh [17, 18].

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 22.0 và phần mềm Excel 2010.

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± S.D. Các số liệu nghiên cứu trước và sau khi uống nước cất/chứng dương/thuốc thử của cùng một lô được xử lý thống kê theo paired t-test. So sánh giữa lô chứng sinh học và các lô uống chứng dương/thuốc thử sử dụng t-test-Student. Sự khác biệt được coi có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

Hợp chất 1

Là tinh thể màu trắng, T_{nc} 231-233 °C. $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 600 MHz) δ (ppm) 5,22 (1H, dd, $J = 8,5; 10,0$ Hz, H-22), 5,17 (1H, brs, H-7), 5,09 (1H, dd, $J = 9,0; 10,0$ Hz, H-23), 3,49 (1H, m, H-3), 1,65 (1H, m, H-9), 1,44 (1H, m, H-28), 1,18 (1H, m, H-28), 1,05 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-26), 0,87 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-27), 0,82 (3H, s, H-21), 0,81 (6H, s, H-19, H-29), 0,59 (3H, s, H-18).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): 140,2 (C-8), 139,2 (C-22), 130,3 (C-23), 118,4 (C-7), 70,7 (C-3), 56,7 (C-17), 55,9 (C-14), 52,2

(C-24), 50,4 (C-9), 43,9 (C-13), 41,6 (C-20), 41,1 (C-5), 40,3 (C-12), 38,9 (C-1), 38,0 (C-4), 34,9 (C-10), 32,7 (C-25), 32,3 (C-2), 30,5 (C-16), 29,3 (C-6), 26,0 (C-28), 22,2 (C-15), 21,8 (C-26), 21,4 (C-27), 20,8 (C-11), 19,3 (C-21), 13,4 (C-19), 12,6 (C-29), 12,4 (C-18). LC-ESI MS: m/z 412,3 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}^+$ m/z 412,4).

Hợp chất 2

Là tinh thể màu trắng hình kim, T_{nc} 151-152 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ (ppm): 2,11 (1H, m, H-1a), 1,82 (1H, td, $J = 5,4; 13,2$ Hz, H-1b), 2,74 (1H, ddd, $J = 6,32; 13,4; 15,4$ Hz, H-2a), 2,38 (1H, dq, $J = 3,16; 5,32; 15,4$ Hz, H-2b), 1,36 (1H, m, H-5a), 1,35 (1H, m, H-6a), 1,69 (1H, m, H-7a), 1,41 (1H, m, H-7b), 2,22 (1H, m), 5,28 (1H, d, $J = 6,04$ Hz, H-11), 2,08 (1H, m, H-12a), 1,90 (1H, m, H-12b), 1,34 (2H, m, H-15), 1,94 (1H, m, H-16a), 1,58 (1H, m, H-16b), 1,64 (1H, m, H-17), 0,68 (3H, s, H-18), 1,22 (3H, s, H-19), 1,42 (1H, m, H-20), 0,89 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-21), 1,55 (1H, m, H-22a), 1,15 (1H, m, H-22b), 2,56 (1H, m, H-23a), 6,08 (1H, td, $J = 1,18; 7,32$ Hz, H-24), 1,93 (3H, s, H-27), 1,07 (6H, s, H-28, H-29), 0,74 (3H, s, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ (ppm) 217,3 (C-3), 172,6 (C-26), 147,1 (C-24, C-13), 125,8 (C-25), 37,2 (C-12), 53,4 (C-5), 47,0 (C-14), 47,7 (C-4), 20,6 (C-27), 18,2 (C-21), 14,4 (C-18), 21,8 (C-19), 22,1 (C-29), 18,4 (C-30), 22,7 (C-6), 25,6 (C-28), 116,3 (C-11), 28,0 (C-16), 28,0 (C-23), 33,9 (C-15), 41,9 (C-8), 147,1 (C-9), 39,1 (C-10), 22,6 (C-7), 34,9 (C-2), 36,1 (C-20), 36,8 (C-1), 35,9 (C-22). LC-ESI MS: m/z 455,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3^+$), m/z 312,9 $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$ (calcd for $\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2$ m/z 313,3).

Hợp chất 3

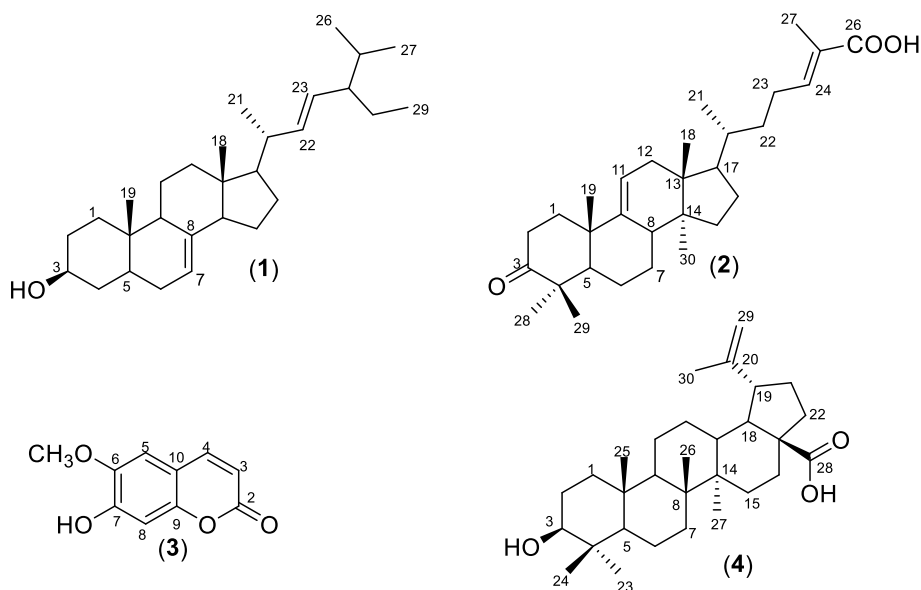
Là chất rắn màu vàng nhạt, T_{nc} 202-204 °C. $^1\text{H NMR}$ (acetone- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 7,83 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4), 7,18 (1H, s, H-5), 6,79 (1H, s, H-8), 6,16 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3), 3,90 (3H, s, 6-OCH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (acetone- d_6 , 125 MHz) δ (ppm): 161,2 (C-2), 151,9 (C-7), 151,1 (C-9), 145,97 (C-6), 144,6 (C-4), 113,3 (C-5), 112,1 (C-10), 109,99 (C-3), 103,7 (C-8), 56,7 (OCH₃).

Hợp chất 4

Là tinh thể màu trắng, T_{nc} : 316-318 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ_{H} (ppm): 4,60 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-29b), 4,74 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-29a), 3,19 (1H, dd, $J = 4,8; 12,0$ Hz, H-3), 3,00 (1H, ddd, $J = 7,2; 12,6$ Hz, H-19), 1,69 (3H, s, H-30), 1,03 (3H, s, H-27), 0,98 (3H, s, H-23), 0,97 (3H, s, H-24), 0,82 (3H, s, H-25), 0,75 (3H, s, H-26), 0,68 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ_{C} (ppm): 179,3 (C-28), 150,4 (C-20), 109,7 (C-29), 79,0 (C-3), 56,3 (C-17), 55,4 (C-5), 50,4 (C-9), 49,3 (C-18), 46,9 (C-19), 42,5 (C-14), 40,7 (C-8), 38,9 (C-4), 38,7 (C-1), 38,4 (C-13), 37,3 (C-10), 37,0 (C-22), 34,4 (C-7), 32,2 (C-16), 30,6 (C-21), 29,7 (C-15), 28,0 (C-23), 27,4 (C-2), 25,6 (C-12), 20,9 (C-11), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,2 (C-25), 16,1 (C-24), 15,4 (C-26), 14,7 (C-27). ESI-MS: m/z 457,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_3$ m/z 457,4).



Hình 1. Cấu trúc của các hợp chất được phân lập (1 - 4).

Hợp chất **1** kết tinh dưới dạng tinh thể màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 231-233 °C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử m/z 412,3 $[\text{M}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **1** cho nhận định về cấu trúc một steroid của hợp chất này với các tín hiệu proton đặc trưng của sáu nhóm methyl ở δ_{H} 0,59 (3H, s), 0,81 (2 x 3H, s), 0,82 (3H, s), 1,05 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 0,87 (3H, d, $J = 6,0$ Hz). Một nổi đôi thể ba lần ở δ_{H} 5,17 (1H, brs), một nổi đôi khác cho hiệu ứng mái nhà ở δ_{H} 5,22 (1H, dd, $J = 8,5, 10,0$ Hz) và δ_{H} 5,09 (1H, dd, $J = 9,0; 10,0$ Hz). Trên phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất **1** cho thấy sự xuất hiện của các tín hiệu carbon tại δ_{C} 118,2; 140,2; 139,2 và 130,3 là dấu hiệu nhận biết của

một khung stigmast-7 (22)-dien, sự dịch chuyển về phía trường thấp của nhóm methin ở δ_{C} 70,7 và δ_{H} 3,49 cho thấy carbon có liên kết với nhóm chức hydroxyl. Trên cơ sở của các phân tích phổ NMR, kết hợp với tài liệu tham khảo cấu trúc của hợp chất **1** được xác định là (3 β , 5 α , 22 *E*)-stigmasta-7,22-dien-3-ol hay α -spinasterol (**1**) [19].

Hợp chất **2** là tinh thể hình kim, không màu, nhiệt độ nóng chảy 151-152 °C, kết tinh lại trong hệ dung môi dichlometan/aceton (10:1, v/v) dưới dạng tinh thể hình kim không màu, hiện màu nâu với thuốc thử H_2SO_4 10%/t $^\circ$.

Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử m/z 455 $[\text{M} + \text{H}]^+$ cùng với 30 tín hiệu carbon trên phổ

^{13}C -NMR phù hợp với công thức phân tử của **2** là $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$. Phổ ^1H -NMR của **2** cho tín hiệu cộng hưởng của 7 nhóm methyl với 5 nhóm methyl bậc 4, một nhóm methyl bậc 2 và một nhóm methyl liên kết với nối đôi đầu mạch, hai nhóm methin ở δ_{H} 6,08 (1H, td, $J = 4,2, 7,8$ Hz) và 5,28 (1H, d, $J = 6,0$ Hz). Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **2** chỉ ra sự có mặt của hai carbon carbonyl ở δ_{C} 217,3 và 172,6. Các tín hiệu trên cho phép dự đoán về khung cấu trúc 3-aceto-tetracyclic triterpenoid của hợp chất **2**. Ngoài ra, một tín hiệu proton olefinic ở δ_{H} 6,08 (1H, td, $J = 1,2; 7,3$ Hz) và proton methyl δ_{H} 0,91 (3H, d, $J = 6,0$ Hz) cho phép dự đoán về sự có mặt của cấu trúc nhánh $\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{Me})\text{COOH}$. Điều này được khẳng định qua tín hiệu m/z 312,9 [$\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2$] trên phổ ESI-MS. Trên phổ HMBC chỉ ra các tương tác giữa H-2 (δ_{H} 2,74) với C-3 (δ_{C} 217,3), H-29 (δ_{C} 1,07) với C-3 (δ_{C} 217,3) cho phép ta khẳng định vị trí của nhóm carbonyl và hai nhóm methyl, ngoài ra tương tác giữa H-11 (δ_{H} 5,28) với C-8 (δ_{C} 41,9), H-24 (δ_{H} 6,08) với C-26 (δ_{C} 172,6), H-27 (δ_{H} 1,93) với C-26 (δ_{C} 172,6) cho phép xác định các vị trí các liên kết đôi và nhóm carbonyl còn lại. Phổ COSY của hợp chất **2** chỉ ra tương tác chính giữa H-23 (δ_{H} 2,56) với H-24 (δ_{H} 6,08), H-11 (δ_{H} 5,28) với H-12 (δ_{H} 2,08). Từ các phân tích trên cùng với tham khảo tài liệu cho phép kết luận về cấu trúc của hợp chất **2** là 3-oxolanosta-11,24-dien-26-oic acid (heilaohuacid F) hay acid coccinic[20].

Hợp chất số **3** là chất rắn màu vàng nhạt. Phổ ^1H NMR của hợp chất **3** cho các tín hiệu đặc trưng của một dẫn xuất 6,7-dioxy-benzopyrone (coumarin), cụ thể là tín hiệu ở δ_{H} 6,16 (1H, d, $J = 9,5$ Hz) và 7,83 (1H, d, $J = 9,5$ Hz) thuộc về proton của vòng pyrone. Hai tín hiệu proton singlet ở δ_{H} 6,79 (1H, s) và δ_{H} 7,18 (1H, s) là của một vòng benzen bốn lần thế. Sự có mặt của nhóm methoxy trên vòng thơm thể hiện qua tín hiệu proton singlet xuất hiện ở δ_{H} 3,90 (3H, s, 6-OCH₃). Kết hợp với phổ ^{13}C NMR và DEPT cho thấy xuất hiện 10 tín hiệu 10 carbon, trong đó 4 nhóm CH, 1 nhóm CH₃, 1 nhóm C=O lacton, và 4 C bậc 4 (không có liên kết với hydro). Từ các dữ kiện trên, so sánh với tài liệu tham khảo hợp

chất **3** được khẳng định là (7-hydroxy-6-methoxy coumarin) hay scopoletin [21].

Hợp chất **4** kết tinh lại trong hệ dung môi dichlormethan/acetone (20:1, v/v) dưới dạng tinh thể hình kim không màu, hiện màu vàng cam với thuốc thử H_2SO_4 10%. Không hiện UV ở bước sóng 254 nm, tuy nhiên hiện vết màu xanh nhạt với bước sóng 365 nm. Phổ ESI-MS cho thấy xuất hiện pic ion giả phân tử m/z 457,0 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, kết hợp với phổ ^{13}C -NMR cho thấy sự xuất hiện 30 tín hiệu carbon, phù hợp với công thức phân tử của hợp chất **4** là $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ ($M = 456,4$).

Phổ ^1H -NMR của **4** cho tín hiệu cộng hưởng của một carbinolic proton vị trí axial định hướng α ở δ_{H} 3,19 (1H, dd, $J = 4,8, 12,0$ Hz), tín hiệu proton vinylic của nhóm methylen đầu mạch δ_{H} 4,74 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 4,60 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) sáu tín hiệu proton methyl ở δ_{H} 0,98 (3H, s), 0,97 (3H, s), 0,82 (3H, s), 0,75 (3H, s), 1,03 (3H, s) và 1,69 (3H, s) cho chúng ta một giả thiết về một hợp chất lupin-triterpenoid của **4**. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt của 30 C với các tín hiệu đặc trưng của carbon carbonyl ở δ_{C} 179,3, một carbon olefin methin ở δ_{C} 109,7 và carbon methin ở δ_{C} 79,0 cùng với 6 tín hiệu của carbon methyl ở δ_{C} 28,0; 16,1; 16,2; 15,4; 14,7 và 19,4. Ngoài ra trên phổ còn chỉ rõ sự có mặt của 10 nhóm methylen, 5 nhóm methin và 5 carbon không liên kết với hydro. Hai carbon lai hóa sp^2 ở δ_{C} 150,4 và 109,7 đặc trưng cho sự có mặt của một triterpen khung lupan. Từ những phân tích ở trên cùng với việc so sánh các dữ kiện phổ thực nghiệm với các tài liệu đã được công bố cho phép khẳng định hợp chất **4** là acid 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic hay acid betulinic [22].

3.2. Kết quả tác dụng sinh học

3.2.1 Kết quả tác dụng chống loét dạ dày của cao n-hexan lá Sanchezia nobilis Hook.f.

Ảnh hưởng của cao n-hexan lên đặc điểm tổn thương loét.

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 1 cho thấy không có hình ảnh loét ở chuột lô chứng sinh học. Lô mô hình và lô dùng mẫu cao n-hexan liều 50 mg/kg có tỷ lệ chuột bị loét dạ dày sau thắt môn vị là 100%, lô dùng ranitidin tỷ lệ chuột có loét

sau thất môn vị là 90%. Không có sự khác biệt về tỷ lệ chuột bị loét giữa các lô uống thuốc khi so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Bảng 1. Tỷ lệ chuột có loét sau thất môn vị

Lô nghiên cứu	n	Tỷ lệ chuột có loét
Lô 1: chứng sinh học	10	0/10
Lô 2: mô hình	10	10/10
Lô 3: ranitidin	10	9/10
Lô 4: mẫu cao <i>n</i> -hexan liều 50 mg/kg	10	10/10
$p > 0,05$ so với lô mô hình (test khi bình phương)		

Từ Bảng 2 cho thấy lô mô hình: tỷ lệ tổn thương loét sâu (13,64%) cao nhất trong 3 lô có tiến hành thất môn vị dạ dày. Tỷ lệ tổn thương loét nông ở lô mô hình là 86,36%. Lô uống ranitidin: mức độ tổn thương loét có sự cải thiện hơn so với lô mô hình với giảm tỷ lệ tổn thương loét sâu (3,23%), tỷ lệ tổn thương loét nông là 96,77%. Lô uống mẫu cao *n*-hexan cũng có sự

cải thiện mức độ loét hơn so với lô mô hình giảm tỷ lệ tổn thương loét sâu (12,20%) và gia tăng tỷ lệ tổn thương loét nông (87,70%) nhưng chưa được như lô dùng ranitidin.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các mẫu cao phân đoạn đến mức độ nặng của tổn thương loét

Lô nghiên cứu	Loét nông, loét bề mặt (%)	Loét sâu (%)	Loét thủng (%)
Lô 1: chứng sinh lý	0	0	0
Lô 2: lô chứng bệnh	72,46	27,54	0
Lô 3: ranitidin	93,18	6,82	0
Lô 4: mẫu cao <i>n</i> -hexan 50 mg/kg	87,50	12,50	0

Bảng 3 cho thấy ranitidin làm giảm số điểm loét trung bình và chỉ số loét so với lô mô hình. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Mẫu cao *n*-hexan liều 50 mg/kg/ngày làm giảm số điểm loét trung bình ($p < 0,05$) và có xu hướng giảm chỉ số loét so với lô mô hình.

Bảng 3. Ảnh hưởng của mẫu cao *n*-hexan đến số điểm loét trung bình, chỉ số loét

Lô nghiên cứu	n	Số điểm loét trung bình	Chỉ số loét UI
Lô 2: mô hình	10	8,80 ± 1,93	16,70 ± 2,91
Lô 3: ranitidin	10	4,70 ± 2,06***	10,00 ± 3,93**
Lô 4: mẫu cao <i>n</i> -hexan 50 mg/kg	10	5,90 ± 2,13*	12,20 ± 4,08
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình (one way ANOVA)			

Bảng 4. Ảnh hưởng của mẫu cao *n*-hexan đến thể tích dịch vị, độ acid tự do, độ acid toàn phần và pH

Lô nghiên cứu	Thể tích dịch vị (mL)	Độ acid tự do (meq/l)	Độ acid toàn phần (meq/l)	pH
Lô 2: mô hình	3,77 ± 0,97	21,53 ± 4,81	50,73 ± 7,25	2,52 ± 0,83
Lô 3: ranitidin	1,43 ± 0,28**	17,33 ± 3,20*	47,00 ± 12,86	3,25 ± 0,49*
Lô 4: mẫu cao <i>n</i> -hexan liều 50 mg/kg	1,34 ± 0,40***	20,12 ± 5,91	41,83 ± 11,07*	3,04 ± 0,67
$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình				

- Kết quả nghiên cứu ở Bảng 4: ranitidin liều 50 mg/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê thể tích dịch vị, độ acid tự do, làm tăng pH so với lô mô hình ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). Cao *n*-hexan liều 50 mg/kg/ngày làm giảm đáng kể thể tích dịch vị, độ acid toàn phần so với lô mô hình ($p < 0,001$

và $p < 0,05$), và có xu hướng làm giảm độ acid tự do và tăng pH dịch vị so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

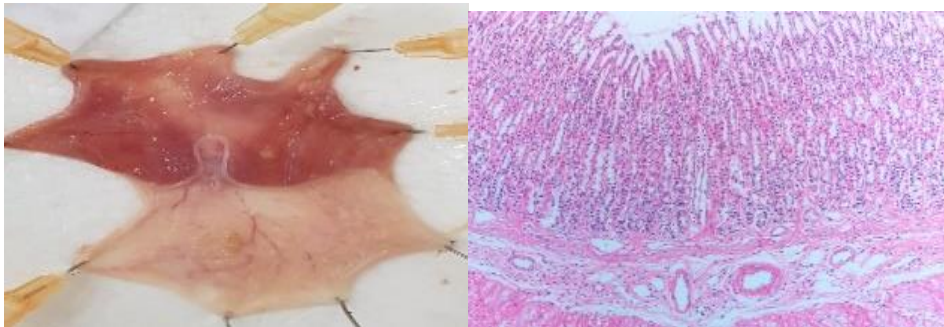
Hình ảnh đại thể, vi thể dạ dày chuột ở mỗi lô:

Lô chứng sinh học: trên các mảnh cắt thấy niêm mạc dạ dày bao gồm vùng biểu mô không tuyến và biểu mô tuyến. Các vùng biểu mô có cấu trúc và hình thái trong giới hạn bình thường. Không thấy xâm nhập viêm. Mô dạ dày trong giới hạn bình thường (Hình 2).

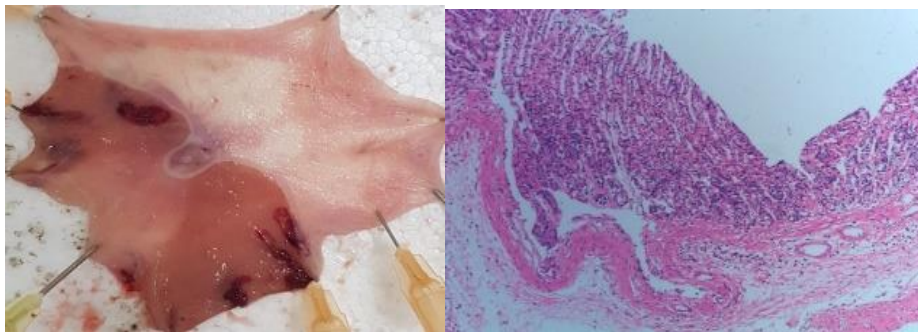
Lô mô hình: trên các mảnh cắt thấy dạ dày có những ô loét mất lớp niêm mạc chỉ còn lại tuyến, vùng dưới niêm mạc có nhiều chỗ giãn rộng, ít huyết quản (Hình 3).

Lô ranitidin: cấu trúc dạ dày bình thường, một số vùng có quá sản lớp biểu mô tuyến. Phần hạ niêm mạc bình thường, có ít tế bào viêm, nhiều huyết quản (Hình 4).

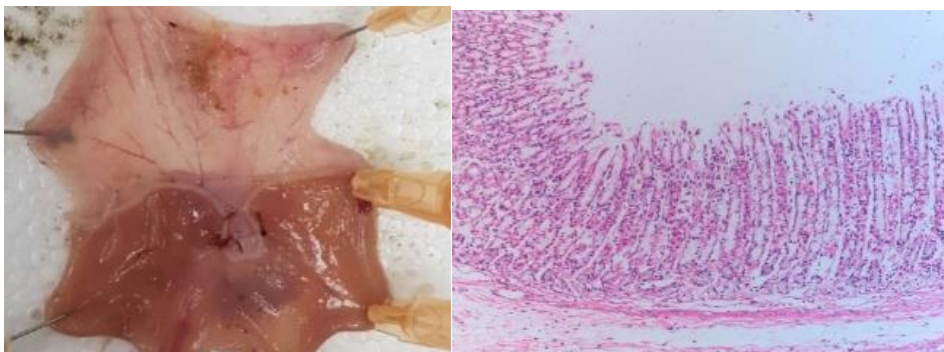
Lô mẫu cao phân đoạn *n*-hexan liều 50 mg/kg: mô dạ dày rải rác có ít viêm xơ, tạo thành ổ loét xuất phát từ dưới phần cơ niêm. Dạ dày có viêm loét nhẹ (Hình 5).



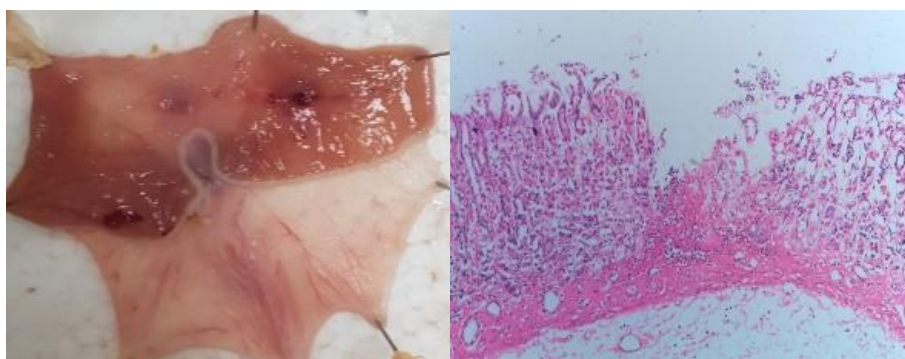
Hình 2. Hình ảnh đại thể, vi thể dạ dày chuột ở lô chứng sinh học (Chuột # 03, nhuộm HEx40).



Hình 3. Hình ảnh đại thể, vi thể dạ dày chuột ở lô mô hình (Chuột # 12, nhuộm HE x 40).



Hình 4. Hình ảnh đại thể, vi thể dạ dày chuột ở lô dùng ranitidin (Chuột #26, nhuộm HE x 40).



Hình 5. Hình ảnh đại thể, vi thể dạ dày chuột ở lô dùng cao *n*-hexan (Chuột #55, nhuộm HE x 40).

Bảng 5. Ảnh hưởng mẫu cao *n*-hexan lên thời gian phản ứng với nhiệt độ

Lô chuột	n	Thời gian phản ứng với nhiệt độ (giây)		P _{trước-sau}
		Trước	Sau	
Lô 1: chứng sinh học	10	18,89 ± 2,86	19,64 ± 2,18	> 0,05
Lô 2: codein phosphat 20mg/kg	10	18,71 ± 3,72	25,98 ± 2,87***	< 0,001
% thay đổi so với chứng			↑ 32,3	
Lô 3: cao <i>n</i> -hexan liều 100 mg/kg/ngày	10	18,26 ± 3,06	22,86 ± 2,73**	< 0,01
% thay đổi so với chứng			↑ 16,4	
Lô 4: cao <i>n</i> -hexan liều 300 mg/kg/ngày	10	18,86 ± 3,72	23,05 ± 2,53**	< 0,001
% thay đổi so với chứng			↑ 17,4	
Khác biệt so với lô chứng sinh học (lô 1): *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001				

Bảng 6. Ảnh hưởng mẫu cao *n*-hexan lên lực gây đau trên máy đo ngưỡng đau

Lô chuột	n	Lực gây đau (gam)		P _{trước-sau}
		Trước	Sau	
Lô 1: chứng sinh học	10	6,29 ± 1,41	6,53 ± 1,06	> 0,05
Lô 2: codein phosphat 20mg/kg	10	6,54 ± 1,07	8,79 ± 1,38***	< 0,001
% thay đổi so với chứng			↑ 34,6	
Lô 3: cao <i>n</i> -hexan liều 100 mg/kg/ngày	10	6,64 ± 1,50	7,73 ± 1,34*	<0,05
% thay đổi so với chứng			↑ 18,4	
Lô 4: cao <i>n</i> -hexan liều 300 mg/kg/ngày	10	6,42 ± 1,93	8,00 ± 1,2*	< 0,05
% thay đổi so với chứng			↑ 22,5	
Khác biệt so với lô chứng sinh học (lô 1): *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001				

3.2.2. Kết quả đánh giá tác dụng giảm đau của các mức liều cao tổng

i) Kết quả đánh giá tác dụng giảm bằng phương pháp mâm nóng

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy: codein có tác dụng kéo dài rõ rệt thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Mẫu cao *n*-hexan liều 100 và 300 mg/kg/ngày đều thể hiện tác dụng kéo dài thời gian phản ứng

với nhiệt độ của chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$).

ii) Kết quả đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy đo ngưỡng đau

Kết quả ở Bảng 6: Codein có tác dụng làm tăng rõ rệt lực gây phản xạ đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Mẫu cao *n*-hexan liều 100 và 300 mg/kg/ngày đều thể hiện tác dụng tăng lực gây phản xạ đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

Bảng 7. Ảnh hưởng mẫu cao *n*-hexan lên thời gian phản ứng đau trên máy đo ngưỡng đau

Lô chuột	n	Thời gian phản ứng đau (giây)		P _{trước-sau}
		Trước	Sau	
Lô 1: chứng sinh học	10	3,55 ± 0,84	3,68 ± 0,65	> 0,05
Lô 2: codein phosphat 20mg/kg	10	3,70 ± 0,65	4,84 ± 0,69***	< 0,001
% thay đổi so với chứng			↑ 31,5	
Lô 3: cao <i>n</i> -hexan liều 100 mg/kg/ngày	10	3,76 ± 0,90	4,41 ± 0,80*	< 0,05
% thay đổi so với chứng			↑ 19,8	
Lô 4: cao <i>n</i> -hexan liều 300 mg/kg/ngày	10	3,51 ± 1,02	4,58 ± 0,81*	< 0,05
% thay đổi so với chứng			↑ 24,5	
Khác biệt so với lô chứng sinh học (lô 1): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$				

Kết quả ở Bảng 7: Codein có tác dụng làm kéo dài rõ rệt thời gian đáp ứng với đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$). Mẫu cao *n*-hexan liều 100 và 300 mg/kg/ngày đều thể hiện tác dụng kéo dài thời gian đáp ứng với đau của chuột có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

3.2.3. Kết quả thử hoạt tính kháng *Helicobacter pylori* của cao *n*-hexan trên *in vitro*

Sau khi lấy các đĩa thạch ra khỏi tủ ẩm. Đo và ghi kích thước vòng vô khuẩn thu được kết quả như Bảng 8.

Từ Bảng 8 ta có thể thấy vi khuẩn mọc đầy trên đĩa thạch, có thể quan sát vòng kháng vi khuẩn *H.P* của các mẫu. DMSO 5% được sử dụng làm chứng âm và kết quả cho thấy không xuất hiện vòng kháng khuẩn nên sử dụng DMSO 5% để hòa tan các cao ở các dung môi khác nhau

sẽ không gây ảnh hưởng đến kết quả kháng khuẩn. Tại nồng độ 20 mg/ml cao *n*-hexan có đường kính vòng vô khuẩn là 8 mm tương đương đường kính vòng vô khuẩn của chứng dương 7 mm.

Bảng 8. Kết quả ức chế vi khuẩn *H.P* của cao phân đoạn *n*-hexan

Mẫu	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
Cao <i>n</i> -hexan	8
Đối chứng âm	5
Đối chứng dương	7

4. Bàn luận

Mức liều cao phân đoạn *n*-hexan sử dụng tương đương với mức liều dược liệu dùng trên

người được tính toán dựa vào hiệu suất chiết, độ ẩm cao và hệ số ngoại suy trên chuột cống hoặc chuột nhắt. Với mức liều này cho thấy hiệu quả trên loét dạ dày: giảm mức độ tổn thương, giảm chỉ số loét, giảm số điểm loét trung bình, giảm thể tích dịch vị và tăng pH dạ dày. Đau trong loét dạ dày là đau theo cơ chế thần kinh. Cả 2 mô hình sử dụng trong nghiên cứu đều đánh giá tác dụng giảm đau trung ương. Dùng 2 mô hình trong nghiên cứu tác dụng giảm đau làm tăng độ tin cậy của kết quả nghiên cứu. Phân đoạn *n*-hexan cho thấy hiệu quả giảm đau trên cả hai mô hình. Vi khuẩn *H.P* là một trong những nguyên nhân chính gây loét dạ dày tá tràng. Phân đoạn *n*-hexan cho thấy hiệu quả trên vi khuẩn *H.P* thì chưa được mạnh, nhưng điều này tương tự với các nghiên cứu cao được liệu khác trước đây. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao *n*-hexan có hiệu quả trên cả triệu chứng và nguyên nhân của loét dạ dày, điều này góp phần minh chứng cho kết quả sử dụng lá *Sanchezia nobilis* Hook.f. của người dân.

Từ phân đoạn *n*-hexan lá *Sanchezia nobilis* Hook.f. đã phân lập được 4 hợp chất. Trong đó α -spinasterol ức chế hoạt động COX-1 và COX-2 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 16,17 μ M và 7,76 μ M [23] và chất cũng được đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* [24]. Scopoletin đã được chứng minh là có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa [25, 26]. Đặc biệt acid betulinic cho thấy sự ức chế tuyệt vời các đặc tính chống viêm với IC₅₀ 10,34 μ g/mL (COX-1), 12,92 μ g/mL (COX-2), 15,53 μ g/mL (5-LOX), 15,21 μ g/mL (Nitrit), 16,65 μ g/mL (TNF- α), và cũng thể hiện mạnh hoạt động chống oxy hóa với IC₅₀ là 18,03 μ g/mL [27, 28]. Các hợp chất phân lập được đều cho thấy tác dụng chống viêm, chống oxy hóa tốt trên *in vitro*. Có thể tác dụng của các hoạt chất này góp phần tạo nên tác dụng của phân đoạn *n*-hexan lá *Sanchezia nobilis* Hook.f.

5. Kết luận

Từ phân đoạn *n*-hexan của lá cây *Sanchezia nobilis* Hook.f. đã phân lập được 4 hợp chất là (3 β , 5 α , 22E)-stigmasta-7,22-dien-3-ol (**1**), acid coccinic (**2**), 7-hydroxy-6-methoxy coumarin (**3**) và acid betulinic (**4**). Cấu trúc các hợp chất được

xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như phổ 1D, 2D-NMR và ESI-MS. Kết quả cho thấy 4 hợp chất trên là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Sanchezia*. Phân đoạn *n*-hexan thể hiện tác dụng làm giảm số điểm loét trung bình, thể tích dịch vị, độ acid toàn phần, có xu hướng làm giảm độ acid tự do, tăng pH dịch vị, có tác dụng giảm đau trung ương và ức chế vi khuẩn *H.P*. Kết quả nghiên cứu này bổ sung thêm cơ sở dữ liệu hóa học của loài *Sanchezia nobilis* Hook.f. tại Việt Nam cũng như góp phần minh chứng cho kinh nghiệm sử dụng của người dân trong viêm loét dạ dày, cắt các cơn đau do bệnh dạ dày và bệnh đường tiêu hóa.

Tài liệu tham khảo

- [1] P. H. Ho, An Illustrated Flora of Vietnam, Youth Publishinh House, Ho Chi Minh City, Vol. 39, 2000, pp. 3 (in Vietnamese).
- [2] A. E. Ellah, K. M. Mohamed, E. Y. Backheet, M. H. Mohamed, Matsutake Alcohol Glycoside from *Sanchezia nobilis*, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 48, No. 6, 2013, pp. 930-933, <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0431-5>.
- [3] A. E. Ellah, K. M. Mohamed, E. Y. Backheet, M. H. Mohamed, Mohamed *Cinnamyl Alcohol, Benzyl Alcohol and Flavonoid Glycosides from Sanchezia nobilis*, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 50, No. 5, 2014, pp. 823-826, <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1092-8>.
- [4] N. Shaheen, Phytochemical and Biological Evaluation of *Sanchezia speciosa* and *Polygonum plebeium*, Faculty of Pharmacy, Bahauddin Zakariya University, Multan, Vol. 14, 2017, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00012-8>.
- [5] M. R. Juliana, G. N. A. Salatino, M. L. F. Salatino, M. A. S. Mayworm, GC-MS and HPLC-ESI-MS-MS Characterization of *Sanchezia oblonga* (*Acanthaceae*) Extracts, Journal of Food Research, Vol. 9, 2020, pp. 57-71, <https://doi.org/10.5539/jfr.v9n1p57>.
- [6] V. D. Loi, T. B. Tung, H. V. Hoang, N. M. Tuyen, Phytochemical and Anti-Inflammatory Effect from The Leaf of *Sanchezia speciosa* Leonard Growing in Vietnam, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Vol. 8, No. 7, 2016, pp. 309-315, <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0086>.

- [7] L. T. H. Nhung, Chemical Composition and Biological Activity of *n*-Hexan Extract from *Sanchezia speciosa*, Science and Technology, Vol. 45, 2018, pp. 110-113 (in Vietnamese).
- [8] I. T. K. Szelenyi et al., Distention Ulcer as a Model for Testing of Drugs for Ulcerogenic Side Effects, Arch Toxicol, Vol. 41, No. 1, 1978, pp. 99-105.
- [9] P. M. D. Ghosh, T. Ghosh, P. K. Mitra, Anti-peptic Ulcer Activity of The Leaves of *Amaranthus Spinousus L. in Rats*. Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences, Corpus ID: 79956207, Vol. 2, No. 3, 2013, pp. 52-53.
- [10] T. G. P. Mitra, P. K. Mitra, Anti-peptic Ulcer Activity of TLC Separated Fractions of Root Extract of *Astilbe rivularis* in Rats, European Journal of Biotechnology and Bioscience, Corpus ID: 77028642, Vol. 1, No. 1, 2013, pp. 37-42,
- [11] K. Ashokan, M. Kurane, M. Pillai, Effect of Overiectomy and of Estrogen Administration Upon Duodenal Ulceration Induced By Cysteamine. IUFS J Biol, Vol. 69, No. 1, 2010, pp. 7-16.
- [12] B. A. Michael, C. A. I. Galyuon, N. Alexander, *In Vivo* Models Used for Evaluation of Potential Antigastrroduodenal Ulcer Agents, Ulcer, Vol. 2013, No. 4, 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/796405>.
- [13] A. W. Herling, Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays, Part VIII: Analgesic, Anti-Inflammatory, Anti- Pyretic Activity, Hot Plate Menthol, Springer, 2016, pp. 1827-1829.
- [14] P. K. Patel, S. S. Chandel, A Detailed Review on Nociceptive Models for the Screening of Analgesic Activity in Experimental Animals. International Journal of Neurologic Physical Therapy, Vol. 2. No. 6, 2016, pp. 44-50, <https://doi.org/10.11648/J.IJNPT.20160206.11>.
- [15] Y. Funai, P. A. Uta et al., Systemic Dexmedetomidine Augments Inhibitory Synaptic Transmission in the Superficial Dorsal Horn Through Activation of Descending Noradrenergic Control: An In Vivo Patch-Clamp Analysis of Analgesic Mechanisms, Pain, Vol. 155, No. 3, 2014, pp. 617-628, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.018>.
- [16] V. G. R. Nirogi, D. Shanmuganathan et al., Comparison of Manual and Automated Filaments for Evaluation of Neuropathic Pain Behavior in Rats, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol. 66, 2012, pp. 8-13, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.04.006>.
- [17] M. C. Souza, D. C. Martins et al., *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Helicobacter Pylori Activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. J. Ethnopharmacol, Vol. 123, No. 3, 2009, pp. 452-458, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.030>.
- [18] D. Trung, T. T. H. Nhai., N. T. Ha, N. T.H. Nhu, et al., Identification of Anti-Helicobacter Pylori Compounds From *Usnea undulata*. Natural Product Communications, 2019, pp. 1-3. <https://doi.org/10.1177/1934578X19864212>.
- [19] M. Henry, I. C. Dublanche, Isolation of Spinasterol and Its Glucoside from Cell Suspension Cultures of *Saponaria officinalis*: 13C-NMR Spectral Sata and Batch Culture Production, Planta Medica, Vol. 51, No. 4, 1985, pp. 322-325, <https://doi.org/10.1055/s-2007-969502>.
- [20] W. Wu, H. Ruan, Triterpenoids and Lignans from the Stems of *Schisandra Glaucescens*, Natural Product Research, Vol. 33, No. 3, 2019, pp. 328-334, <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1448980>.
- [21] N. Khan, M. S. Hossain, Scopoletin and β -sitosterol Glucoside from Roots of *Ipomoea digitata*, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, Corpus ID: 32094549, Vol. 4, No. 2, 2015, pp. 05-07.
- [22] A. Ikuta, H. Itokawa, Triterpenoids of *Paeonia japonica* Callus Tissue, Phytochemistry, Vol. 27, No. 9, 1988, pp. 2813-2815, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80668X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80668X).
- [23] B. Indiarra, C. C. Fabiano, B. C. Maria, R. C. S. Mauro et al., α -Spinasterol: a Cyclooxygenase Inhibitor and a TRPV1 Antagonist Presents an Antinociceptive Effect in Clinically Relevant Models of Pain in Mice, British Journal of Pharmacology, Vol. 174, No.23, 2017, pp. 4247-4262, <https://doi.org/10.1111/bph.13992>.
- [24] F. R. Borges, M. D. Silva, M. M. Córdova et al., Anti-inflammatory Action of Hydroalcoholic Extract, Dichloromethane Fraction and Steroid α -Spinasterol From *Polygala sabulosa* in LPS-induced Peritonitis in Mice, J. Ethnopharmacol, Vol. 1, 2014, pp. 144-150, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.009>.
- [25] M. Basu, K. Mayana, S. Xavier, S. Balachandran, N. Mishra, Effect of Scopoletin on Monoamine Oxidases and Brain Amines, Neurochem. Int, Vol. 93, 2016, pp. 113-117, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.01.001>.
- [26] N. M. Shalan, N. M. Mohamed, *Morinda citrifolia* Leaf Enhanced Performance by Improving Angiogenesis, Mitochondrial Biogenesis, Antioxidant, Anti-inflammatory & Stress

- Responses, *Food Chem*, Vol. 212, 2016, pp. 443-452, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.179>.
- [27] B. N. Karana, B. C. Pal et al., Betulinic Acid, the First Lupane-type Triterpenoid Isolated via Bioactivity-guided Fractionation, and Identified by Spectroscopic Analysis from Leaves of *Nyctanthes arbor-tristis*: its Potential Biological Activities *In Vitro Assays, Natural Product Research*, Vol. 33, No. 22, 2018, pp. 3287-3292, <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1470171>.
- [28] J. F. O. Costa, M. C. Neves, D. Reis, M. B. P. Soares, Anti-Inflammatory Activities of Betulinic Acid: A Review, *Inflammation Pharmacology*, Vol. 23, No. 13, 2022, pp. 883857, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.883857>.