Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần A: Khoa học tự nhiên, Công nghệ và Môi trường
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2026.001

PHÂN LẬP CÁC FLAVONOID CHÍNH PHỤC VỤ CÔNG TÁC KIỂM NGHIỆM DƯỢC LIỆU KINH GIỚI (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl., Lamiaceae)

Nguyễn Lê Yến Nhi và Nguyễn Thị Xuân Diệu*
Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): ntxdieu@ump.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 22/04/2025
Sửa bài (Revised): 04/05/2025
Duyệt đăng (Accepted): 24/11/2025

Title: *Isolation of Major Flavonoids for the Quality Control of Vietnamese Balm (Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl., Lamiaceae)*

Author: *Nguyen Le Yen Nhi and Nguyen Thi Xuan Dieu*

Affiliation(s): *School of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Viet Nam*

TÓM TẮT

Kinh giới (Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl.) thường được sử dụng để chữa cảm mạo, phong thấp, nôn ra máu, băng huyết, viêm dạ dày-ruột. Mặc dù Kinh giới đã được ghi nhận trong Dược điển Việt Nam, chuyên luận này hiện vẫn chưa có chất đối chiếu để phục vụ công tác kiểm nghiệm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các flavonoid chủ yếu từ Kinh giới để đề xuất làm chất đối chiếu phục vụ nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng. Năm flavonoid chính gồm pedalin, luteolin-7-O-β-D-glucopyranosid, chrysoeriol-7-O-β-D-glucopyranosid, 7,3'-dimethoxyluteolin-6-O-β-D-glucopyranosid và 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon đã được phân lập bằng phương pháp sắc ký từ phân đoạn ethyl acetat của dược liệu. Các hợp chất được xác định cấu trúc và được đánh giá độ tinh khiết bằng HPLC, đều đạt trên 96%. Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp nguồn chất đối chiếu tiềm năng, phục vụ xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và đáp ứng yêu cầu cập nhật chuyên luận Dược điển trong thời gian tới.

Từ khóa: *Chất đối chiếu, Elsholtzia ciliata, flavonoid, Kinh giới*

ABSTRACT

Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl. is commonly used to treat cold, rheumatism, hematemesis, metrorrhagia, and gastroenteritis. Although E. ciliata is already included in the Vietnamese Pharmacopoeia, its current monograph lacks official reference standards for quality control. This study aimed to isolate major flavonoids from E. ciliata to propose candidate reference standards for the improvement of quality specifications. Five major flavonoids, including pedalin, luteolin-7-O-β-D-glucopyranosid, chrysoeriol-7-O-β-D-glucopyranosid, 7,3'-dimethoxyluteolin-6-O-β-D-glucopyranosid, and 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon, were isolated by chromatographic methods from the ethyl acetate fraction of the plant. The compounds were structurally elucidated and their purity was evaluated by HPLC, all exceeding 96%. The findings provide potential reference materials that can support the development of in-house quality standards and contribute to the future revision of the Pharmacopoeia monograph.

Keywords: *Elsholtzia ciliata, flavonoid, reference standards, Vietnamese balm*

1. GIỚI THIỆU

Chi *Elsholtzia* có khoảng 42 loài, phân bố chủ yếu ở châu Á (Chen et al., 2022). Theo y văn, nhiều loài của chi này đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền từ rất lâu đời nhờ nhiều công dụng y học nổi bật. Kết quả ở các nghiên cứu hiện đại đã cho thấy thành phần hóa học của chi này khá đa dạng, chủ yếu chứa nhiều flavonoid, phenylpropanoid và terpenoid, trong đó flavonoid được xem là nhóm hợp chất chiếm ưu thế và đóng vai trò quan trọng chịu trách nhiệm cho các hoạt tính sinh học của nhiều loài *Elsholtzia* (Chen et al., 2022; Guo et al., 2012; Liu et al., 2007).

Kinh giới (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.) là một loại rau thơm quen thuộc của Việt Nam, đồng thời cũng là dược liệu tiêu biểu của chi *Elsholtzia* thường được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa cảm mạo, phong thấp, đau xương, viêm họng, mụn nhọt, nôn ra máu, băng huyết, viêm dạ dày, viêm ruột (Do et al, 2006). Loài này phân bố rộng khắp nước ta, dễ trồng, sản lượng đáng kể và đã được chứng minh có nhiều tác dụng dược lý rõ rệt (Wang et al., 2022). Ngoài ra, việc Kinh giới đã có chuyên luận trong Dược điển Việt Nam (dù còn sơ sài) cho thấy dược liệu này được công nhận có vai trò quan trọng trong hệ thống chăm sóc sức khỏe quốc gia.

Tuy nhiên, trong Dược điển Việt Nam V, chuyên luận Kinh giới hiện vẫn chưa có chất đối chiếu chuẩn để phục vụ công tác kiểm nghiệm chất lượng. Điều này gây ra nhiều trở ngại trong việc đánh giá một cách chính xác và khách quan chất lượng dược liệu Kinh giới trên thị trường. Flavonoid là thành phần không bay hơi chiếm ưu thế trong Kinh giới, đã được chứng minh là thành phần chịu trách nhiệm cho nhiều hoạt tính sinh học giá trị, góp phần quan trọng vào các tác dụng dược lý của dược liệu (Nguyen et al., 2021; Nugroho et al., 2019). Do đó, việc kiểm soát thành phần các flavonoid chính là một yếu tố then chốt để đảm bảo chất lượng và hiệu quả của dược liệu Kinh giới.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Dược liệu

Toàn cây Kinh giới tươi (*E. ciliata,* khoảng 35 kg) được thu mua tại chợ đầu mối nông sản Thủ Đức, thành phố Thủ Đức vào tháng 10/2021 (Hình 1). Mẫu được định danh bởi TS. Nguyễn Thị Xuân Diệu, Bộ môn Dược liệu - Dược học cổ truyền, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh và được lưu tại Bộ môn Dược liệu - Dược học cổ truyền với mã số KG-HCM-1021. Dược liệu tươi sau đó được phơi âm can, tránh ánh nắng trực tiếp để thu được khoảng 4 kg dược liệu khô. Dược liệu này được xay thành bột thô dùng cho chiết xuất.

Hình 1. Toàn cây Kinh giới

2.1.2. Dung môi, hóa chất, trang thiết bị

Dung môi chiết xuất dược liệu là ethanol 96% (cồn thực phẩm). Tất cả dung môi khác được dùng trong nghiên cứu đều đạt chuẩn phân tích và được cung cấp bởi nhà sản xuất Fisher.

Bản mỏng silica gel F254 (Merck) dùng cho phân tích và bản mỏng điều chế PLC silica gel 60 F254, 0,5 mm, 20 × 20 cm dùng trong sắc ký lớp mỏng điều chế. Silica gel cỡ hạt vừa 40 - 63 µm (Merck), Sephadex LH-20 (Cytiva) và resin HW-40C (Toyopearl) dùng cho sắc ký cột.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất cao toàn phần và phân tách các phân đoạn sơ bộ

Phần trên mặt đất của Kinh giới được chiết bằng phương pháp ngấm kiệt ngược dòng với cồn 96%. Dịch chiết được cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thành cao đặc. Cao này được phân tán vào lượng tối thiểu nước, sau đó chiết phân bố lỏng – lỏng với các dung môi có độ phân cực khác nhau nhằm loại bớt các tạp chất trong cao chiết ban đầu để thu được các phân đoạn giàu flavonoid.

2.2.2. Phân lập các flavonoid chính

Cao toàn phần và các phân đoạn thu được từ lắc phân bố được phân tích trên HPLC để xác định các

flavonoid mục tiêu cần phân lập làm chất đối chiếu. Phân đoạn giàu các thành phần flavonoid chính của Kinh giới được tiếp tục phân tách bằng các kỹ thuật sắc ký cột (silica gel, rây phân tử) để thu các hợp chất tinh khiết.

2.2.3. Kiểm tra độ tinh khiết các chất phân lập

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Các chất phân lập được chấm tương đối đậm trên 3 bản mỏng riêng biệt, khai triển với 3 hệ dung môi khác nhau (về độ phân cực, về thành phần), phát hiện vết bằng mắt thường, bằng đèn UV 254 nm, UV 365 nm và bằng thuốc thử VS. Chất được xem là tinh khiết trên bản mỏng khi chỉ cho 1 vết gọn trên cả ba hệ dung môi ở tất cả các cách phát hiện.

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Chất phân lập được hòa tan trong methanol với nồng độ khoảng 100 µg/mL và được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Việc phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với đầu dò dãy diod quang PDA đã được thực hiện, kết hợp phần mềm EMPOWER 2, sử dụng cột sắc ký Kinetex 5 µm EVO C18 (100Å, 150 x 4,6 mm) với điều kiện sắc ký như sau: pha động: nước acid triflouroacetic 0,01% (B) - acetonitril (A), A: 2 - 100% (30 phút), 100% (10 phút), tốc độ dòng: 0,5 mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 10 µL, dãy bước sóng phát hiện: 210 - 400 nm, chế độ ghi sắc ký đồ: maxplot và thời gian phân tích: 40 phút. Dựa vào tỷ lệ diện tích các pic trên sắc ký đồ, có thể đánh giá độ tinh khiết sắc ký của chất phân lập.

2.2.4. Định tính xác định các chất đối chiếu

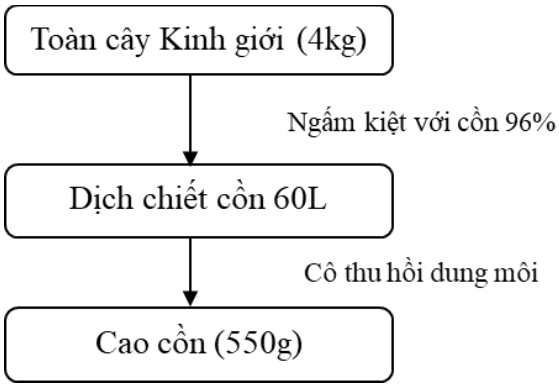
Các chất đối chiếu được xác định trên cơ sở tiến hành sắc ký so sánh với bộ các chất chuẩn làm việc là các flavonoid đã xác định trước đây (Nguyen et al., 2021). Ngoài ra, việc định danh chất đối chiếu còn được xác nhận thông qua sự trùng khớp về thời gian lưu, phổ UV, phổ MS tại cùng điều kiện phân tích HPLC-PDA-MS và dữ liệu phổ ^{1}H-NMR của chúng với các flavonoid tương ứng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết xuất cao toàn phần

Quy trình chiết được tóm tắt ở Hình 2.

Từ 4 kg toàn cây trên mặt đất Kinh giới, bằng phương pháp ngấm kiệt bằng cồn 96%, 60 L dịch chiết cồn đã được thu, cô thu hồi dung môi thu được 550g cao Kinh giới, độ ẩm của cao 25,23%.

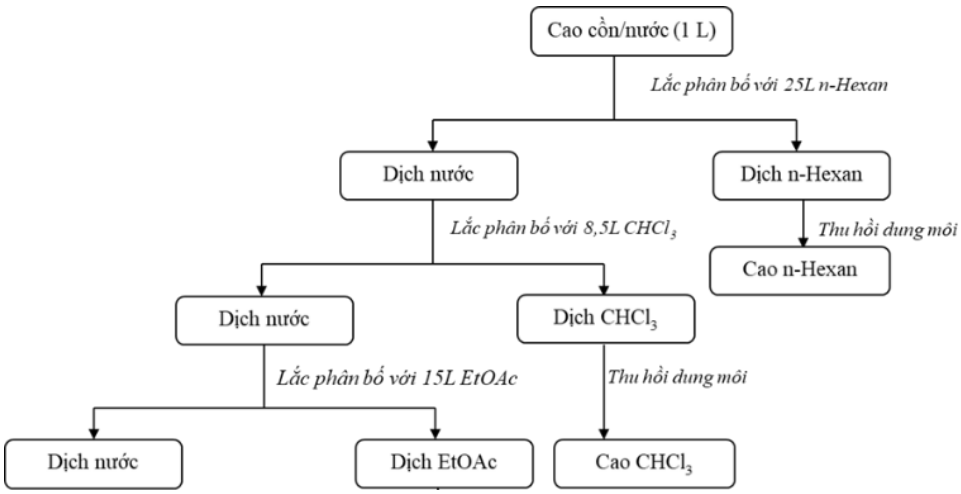


Hình 2. Quy trình chiết xuất cao toàn phần

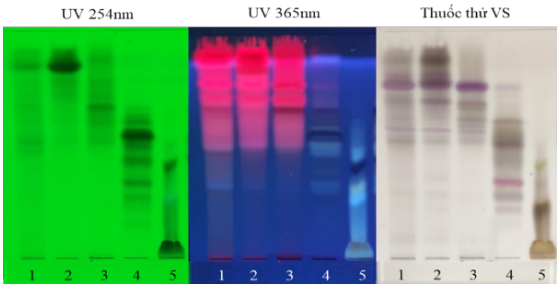
3.2. Phân tách các phân đoạn bằng kỹ thuật chiết phân bố lỏng – lỏng

Quy trình chiết phân bố lỏng – lỏng được tóm tắt ở Hình 3.

Sắc ký đồ phân tích thành phần các phân đoạn được thể hiện ở Hình 4.



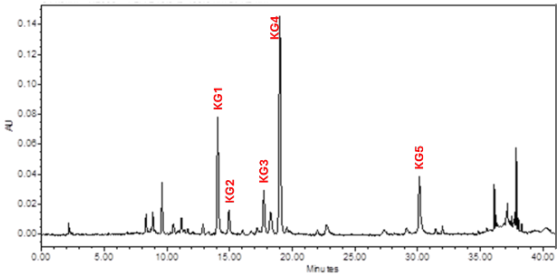
Hình 3. Quy trình chiết phân bố lỏng lỏng



Hình 4. Sắc ký đồ các phân đoạn chiết phân bố

Pha động: Chloroform – methanol – nước – acid formic (65:35:10:0,5, lớp dưới). 1: cao toàn phần (KG), 2: phân đoạn n-hexan (KG-H), 3: phân đoạn chloroform (KG-C), 4: phân đoạn ethyl acetat (KG-E), 5: phân đoạn nước (KG-W).

Việc định hướng phân lập các flavonoid chính, có hoạt tính sinh học đã được tiến hành nhằm cung cấp chất đối chiếu phục vụ công tác kiểm soát chất lượng dược liệu Kinh giới. Qua quá trình lắc phân bố với *n*-hexan và chloroform, tạp chlorophyll và một số tạp kém phân cực khác đã được loại đi đáng kể, thành phần flavonoid được làm giàu trong phân đoạn ethyl acetat. Do đó, phân đoạn ethyl acetat được chọn để tiếp tục phân lập các chất đối chiếu. Ngoài ra, trong quá trình lắc phân bố với ethyl acetat và cô loại dung môi có sự xuất hiện tủa (T-KG-E), nhận thấy phần tủa này có thành phần flavonoid khác với phân đoạn ethyl acetat nên tủa này cũng được chọn để tiếp tục phân tách bằng sắc ký cột nhanh. Sắc ký đồ HPLC định vị các flavonoid mục tiêu cần phân lập được thể hiện ở Hình 5. Trong đó các pic KG1-KG5 là các flavonoid mục tiêu cần phân lập.



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC thể hiện vị trí các flavonoid mục tiêu cần phân lập từ Kinh giới

3.3. Phân lập các flavonoid đối chiếu từ phân đoạn ethyl acetat

3.3.1. Phân tách các phân đoạn từ T-KG-E

Tủa từ phân đoạn ethyl acetat (T-KG-E, 21,05 g) được phân tách thành các phân đoạn nhỏ hơn bằng sắc ký cột cổ điển với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: Tủa thu từ phân đoạn ethyl acetat (T-KG-E, 21 g), nạp mẫu khô;

– Cột thủy tinh, kích thước 10 × 6 cm (chiều dài × đường kính trong); pha tĩnh: 200 g silica gel (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: Rửa giải tiệm tiến với dung môi nền *n*-hexan tăng dần tỉ lệ *n*-hexan – ethyl acetat, đến 100% ethyl acetat, sau đó 100% methanol;

– Thể tích hứng phân đoạn: 50 mL;

– Các phân đoạn được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi phân tích chloroform – methanol - nước - acid formic (65:35:10:0,5; lớp dưới);

– Phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện vết với thuốc thử VS.

Kết quả: Từ 21,05 g tủa T-KG-E bằng kỹ thuật sắc ký cột đã thu được 8 phân đoạn khác nhau (T1-T8).

Phân đoạn T7 (10 g) được phân tách bằng sắc ký cột cổ điển với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: 10 g phân đoạn T7, nạp mẫu khô;

– Cột thủy tinh kích thước: 50 × 4 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: 130 g silica gel (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: Rửa giải tiệm tiến với dung môi nền chloroform tăng dần tỉ lệ chloroform - ethyl acetat đến 100% ethyl acetat, ethyl acetat – methanol đến 100% methanol.

– Thể tích hứng phân đoạn: 50 mL;

– Theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi phân tích chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0.5), lớp dưới;

– Phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Từ 10 g phân đoạn T7, bằng kỹ thuật sắc ký cột thu được 20 phân đoạn (T7.1 – T7.20).

Phân đoạn T7.2 có kết tinh màu vàng, hình kim. Kết tinh được lọc qua phễu thủy tinh xốp, kết tinh được rửa lần lượt với *n*-hexan và chloroform lạnh thu được 67,50 mg tinh thể (kt-T7.2). Việc kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng đã được thực hiện, tinh thể cho 2 vết tắt quang dưới UV 254 nm và một số vết phát quang mờ dưới UV 365 nm, thành phần khá đơn giản nên được lựa chọn để tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột rây phân tử với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: Tủa thu từ phân đoạn T7.2 (kt-T7.2, 67 mg), nạp mẫu ướt;

– Cột: thủy tinh, kích thước 62 × 1,5 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: Sephadex LH – 20, nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: chloroform – methanol (8:2);

– Thể tích hứng phân đoạn: 1 mL

– Các phân đoạn được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi phân tích chloroform – ethyl acetat - acid formic (6:4:0,5);

– Phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện vết với thuốc thử VS.

Kết quả: Sắc ký rây phân tử kt-T7.2 thu được 3 phân đoạn, trong đó phân đoạn T7.2.3 (21 mg) cho 1 vết tắt quang dưới UV 254 nm, UV 365 nm và hiện màu vàng với thuốc thử VS, Rf =0,63 (hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới)). Việc kiểm tra với sắc ký lớp mỏng và HPLC đã được tiến hành, kết quả cho thấy T7.2.3 tinh khiết, có thời gian lưu của pic và phổ UV trùng với **KG5**.

Các phân đoạn T7.13 – T7.16 có kết tủa trắng, mịn. Việc ly tâm, rửa tủa được thực hiện nhiều lần với methanol lạnh, hòa tan các tủa sau khi rửa trong methanol, triển khai trên sắc ký lớp mỏng nhận thấy các tủa có các vết chính tương tự nhau nên được gộp chung, ký hiệu là kt-T7.13-16. **Tủa kt-T7.13-16** được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: Tủa kt-T7.13-16 (856 mg), nạp mẫu khô;

– Cột: thủy tinh, kích thước 48 × 1,5 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: 50 g silica gel, (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: chloroform – methanol - nước (8:2:1)

– Thể tích hứng phân đoạn: 15 mL

– Hệ phân tích sắc ký lớp mỏng: chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0.5), lớp dưới; phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Sắc ký cột tủa kt-T7.13-16 thu được 5 phân đoạn (kt-T7.13-16.1 đến kt-T7.13-16.5). Trong đó, phân đoạn kt-T7.13-16.2 xuất hiện tủa trắng, mịn. Tủa được ly tâm và rửa nhiều lần với methanol lạnh thu được tủa (7 mg) cho 1 vết tắt quang dưới UV 254 và 365 nm, hiện màu vàng với thuốc thử VS trên sắc ký lớp mỏng, có thời gian lưu và phổ UV tương đồng với pic **KG4**.

Phân đoạn T7.16 sau khi lọc tủa tiếp tục cho bay hơi dung môi thu được 969 mg cắn. Nhận thấy phân đoạn T7.16 có vết KG4 và thành phần khá đơn giản. Việc phân tách phân đoạn T7.16 được tiến hành bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển để làm giàu thêm chất KG4. Phân đoạn này được phân tách với các điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: T7.16 (960 mg), nạp mẫu khô;

– Cột: thủy tinh, kích thước 50 × 1,5 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: 40 g slica gel, (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: chloroform – methanol - nước (8:2:1);

– Thể tích hứng phân đoạn: 10 mL;

– Hệ phân tích sắc ký lớp mỏng: chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0,5; lớp dưới); phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Từ 969 mg phân đoạn T7.16 phân tách bằng sắc ký cột cổ điển thu được 8 phân đoạn (T7.16.1 – T7.16.8). Trong đó, phân đoạn T7.16.2 xuất hiện tủa trắng, mịn, tiến hành ly tâm, rửa tủa nhiều lần với methanol lạnh thu được 13 mg tủa. Việc khai triển được tiến hành trên sắc ký lớp mỏng, tủa cho 1 vết tắt quang dưới UV 254, 364 nm, hiện màu vàng với thuốc thử VS, Rf = 0,36 (hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới)), kết quả phân tích trên HPLC nhận thấy tủa trùng với KG4 nên gộp chung để thu được tổng cộng 20 mg **KG4**.

Phân đoạn T7.18 có vết flavonoid KG1, thành phần đơn giản hơn các phân đoạn trước, khối lượng phân đoạn nhiều (2,4448 g). Việc phân tách phân đoạn này với sắc ký cột cổ điển với các điều kiện sắc ký được tiến hành như sau:

– Mẫu: T7.18 (2,4 g), nạp mẫu khô;

– Cột: thủy tinh, kích thước 50 × 5 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: 100 g slica gel, (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: chloroform – methanol - nước (8:2:1);

– Thể tích hứng phân đoạn: 10 mL;

– Hệ phân tích sắc ký lớp mỏng: chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0,5; lớp dưới); phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Từ 2,4 g phân đoạn T7.18 sau khi phân tách thu được 15 phân đoạn (T7.18.1 đến T7.18.15). Phân đoạn T7.18.11 có tủa mịn, trắng ngà. Tủa được ly tâm và rửa nhiều lần với methanol lạnh thu được 1 chất (10 mg) tương đồng với pic **KG1** khi sắc ký so sánh (Rf = 0,21 ở hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới).

3.3.2. Phân tách các phân đoạn từ cao ethyl acetat

Phân đoạn ethyl acetat (KG-E, 16,03 g) được phân tách thành các phân đoạn nhỏ hơn bằng sắc ký cột cổ điển với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: Phân đoạn ethyl acetat (KG-E, 16,03 g), nạp mẫu khô;

– Cột thủy tinh, kích thước 70 × 5 cm (chiều dài × đường kính trong); pha tĩnh: 200 g silica gel (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: Rửa giải tiệm tiến với dung môi nền chloroform tăng dần tỉ lệ chloroform – ethyl acetat, đến 100% ethyl acetat, sau đó 100% methanol;

– Thể tích hứng phân đoạn: 50 mL;

– Các phân đoạn được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi phân tích chloroform – methanol - nước - acid formic (65:35:10:0,5; lớp dưới) dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện vết với thuốc thử VS.

Kết quả: Từ 16,03 g phân đoạn KG-E bằng kỹ thuật sắc ký cột cổ điển đã thu được 15 phân đoạn khác nhau (KG-E.1 đến KG-E.15). Trong đó, **phân đoạn KG-E.15** có các vết flavonoid định hướng phân lập, vì vậy việc phân tách được tiến hành bằng sắc ký cột cổ điển với điều kiện sắc ký như sau:

– Mẫu: KG-E.15 (5,9 g), nạp mẫu khô;

– Cột thủy tinh kích thước: 50 × 3 cm (chiều dài × đường kính trong);

– Pha tĩnh: 130 g silica gel (cỡ hạt 40 – 63 µm), nạp cột hỗn dịch;

– Pha động: chloroform – methanol - nước (8:2:1);

– Thể tích hứng phân đoạn: 50 mL;

– Hệ phân tích sắc ký lớp mỏng: chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0,5; lớp dưới); phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Phân đoạn KG-E.15 sau khi được phân tách bằng sắc ký cột cổ điển thu được 12 phân đoạn (KG-E.15.1 đến KG-E.15.12).

Phân đoạn KG-E15.2 có tủa trắng mịn. Tủa được ly tâm và rửa nhiều lần với methanol lạnh, thu được một chất có khối lượng 116 mg. Việc phân tích sắc ký so sánh nhận thấy tủa này trùng với **KG4**.

Phân đoạn KG-E15.8 và KG-E15.9 có tủa trắng mịn, việc ly tâm rửa tủa được tiến hành nhiều lần với methanol lạnh, thu được 400 mg chất **KG2** với Rf = 0,19 (hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới)).

Phân đoạn KG-E15.7 nhận thấy có vết flavonoid KG1, việc tinh chế phân đoạn này được tiến hành bằng sắc ký rây phân tử với điều kiện như sau:

– Mẫu: KG-E15.7 (467,6 mg), nạp mẫu ướt;

– Cột: thủy tinh, kích thước 2 × 120 cm (đường kính × chiều cao);

– Pha tĩnh: resin HW-40C

– Pha động: methanol;

– Thể tích hứng phân đoạn: 4,5 mL

– Hệ phân tích sắc ký lớp mỏng: ethyl acetat – methanol – nước – acid formic (8:2:1:0,5); phát hiện vết dưới UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử VS, UV 365 nm sau hiện màu với thuốc thử VS.

Kết quả: Thu được 4 phân đoạn (KG-E15.7.1 đến KG-E15.7.4). Trong quá trình bay hơi dung môi, phân đoạn KG-E15.7.2 xuất hiện tủa trắng, mịn. Tủa được ly tâm và rửa nhiều lần với methanol lạnh, tủa E15.7.2 cho 1 vết tắt quang dưới UV 254 nm, UV 365 nm, hiện màu vàng với thuốc thử VS có khối lượng là 9 mg, sắc ký so sánh cho thấy đây là chất **KG1** (Rf =0,21 ở hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới).

Phân đoạn KG-E15.3 xuất hiện tủa trắng, mịn. Việc ly tâm rửa tủa được tiến hành nhiều lần với methanol lạnh thu được 288,2 mg tủa, cho 2 vết tắt quang dưới UV 254 và 365 nm, hiện màu vàng với thuốc thử VS trên sắc ký lớp mỏng. Phân tích trên HPLC, nhận thấy chứa 2 pic ứng với KG3 và KG4. Sau khi tiến hành tinh chế bằng các cơ chế như sắc ký cột pha thuận, sắc ký cột pha đảo, sắc ký rây phân tử đều không tách được KG3. Do mẫu khó tan trong dung môi pha mẫu HPLC, nỗ lực tinh chế bằng HPLC điều chế cũng không đạt thành công. Vì vậy, KG3 được tiến hành phân lập bằng sắc ký lớp mỏng

điều chế. Tủa từ KG-E15.3 được khảo sát trên sắc ký lớp mỏng với các hệ dung môi khác nhau để thăm dò điều kiện phân lập. Hệ dung môi chloroform – methanol - nước - acid formic (75:25:10:0.5, lớp dưới) cho 2 vết gọn, tách nhau trên sắc ký lớp mỏng. Điều kiện tách bằng sắc ký lớp mỏng điều chế như sau:

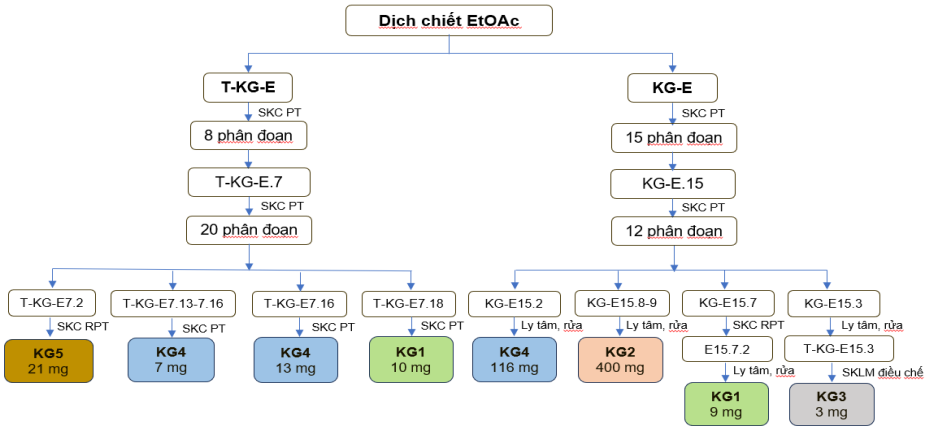
– Khối lượng mẫu tải lên bản: 10 mg/lần;

– Bản mỏng: PLC silica gel 60 F254, 0,5 mm, 20 × 20 cm;

– Pha động: chloroform – methanol - nước - acid formic (8:2:1:0,5; lớp dưới), khai triển 6 lần.

– Việc quan sát dưới UV 254 nm, UV 365 nm được thực hiện để phát hiện và xác định vùng silica gel chứa vết cần lấy. Băng chứa vết cần lấy sau khi cạo được giải hấp phụ bằng ethyl acetat. Kết quả thu được 3 mg chất **KG3** với Rf =0,32 ở hệ dung môi *chloroform – methanol - nước - acid formic* (7:3:1:0,5; lớp dưới).

Quá trình phân lập các chất đối chiếu được tóm tắt trong Hình 6

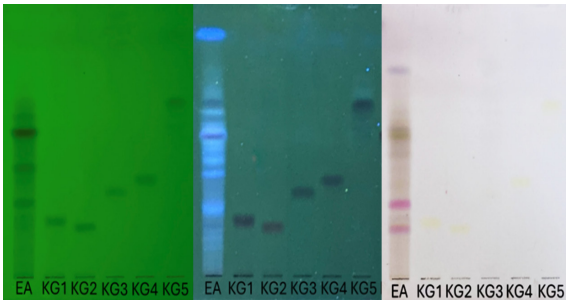


Hình 6. Quy trình phân lập các chất đối chiếu

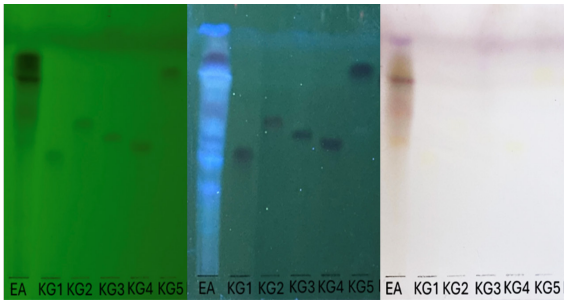
3.4. Kiểm tra độ tinh khiết các chất phân lập

3.4.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

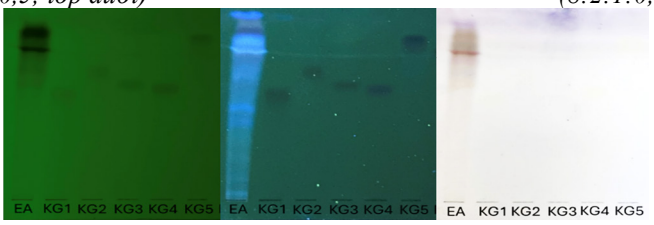
Các chất phân lập được kiểm tra độ tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng ở 3 hệ dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy các chất phân lập đều cho một vết gọn duy nhất trên bản mỏng ở cả 3 hệ dung môi khi quan sát dưới UV 254 nm, UV 365 nm và dưới ánh sáng thường sau khi nhúng bản mỏng với thuốc thử VS (Hình 6).



Hệ chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0,5; lớp dưới)



Hệ ethyl acetat – methanol - nước - acid formic (8:2:1:0,5)

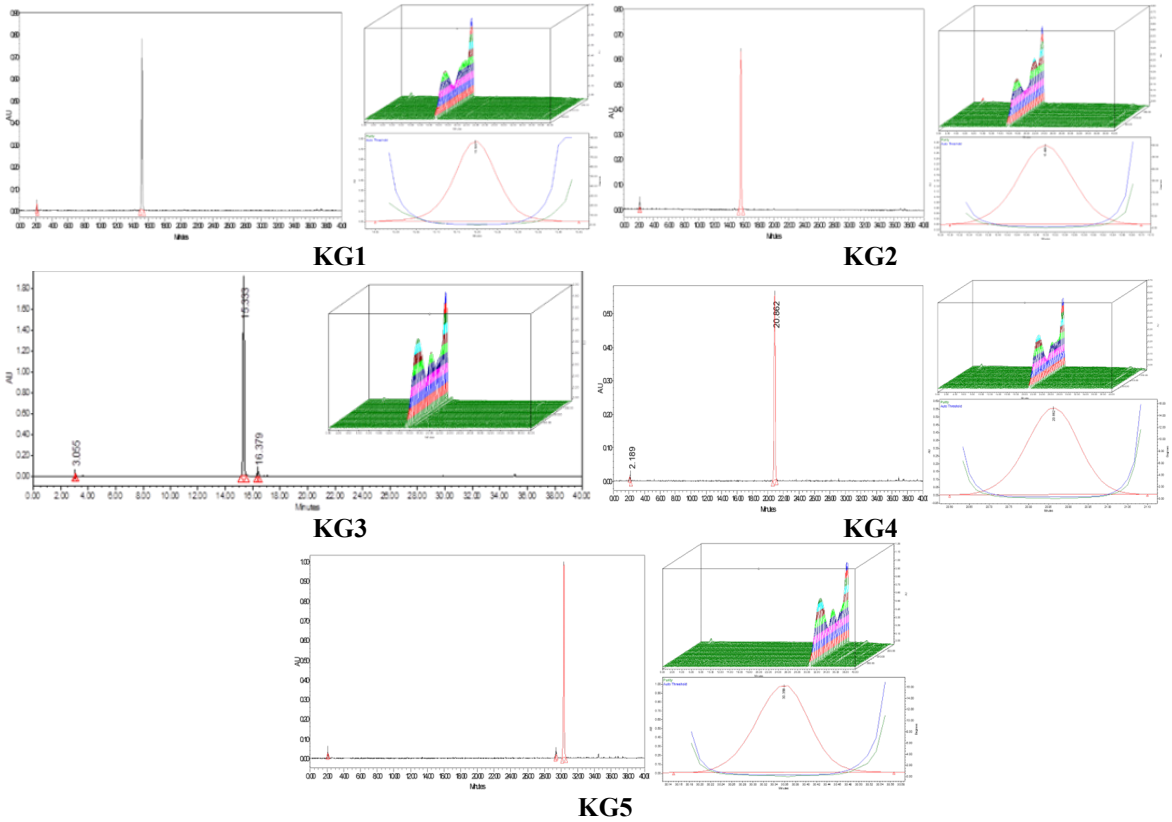


Hệ ethyl acetat – aceton - nước - acid formic (2,5:7,5:1,0,5)

Hình 7. Sắc ký đồ TLC kiểm tinh khiết

3.4.2. Phương pháp HPLC

Kết quả cho thấy các chất phân lập đều cho một pic chính trên sắc ký đồ với độ tinh khiết sắc ký đều trên 96% (Hình 7 và Hình 8).

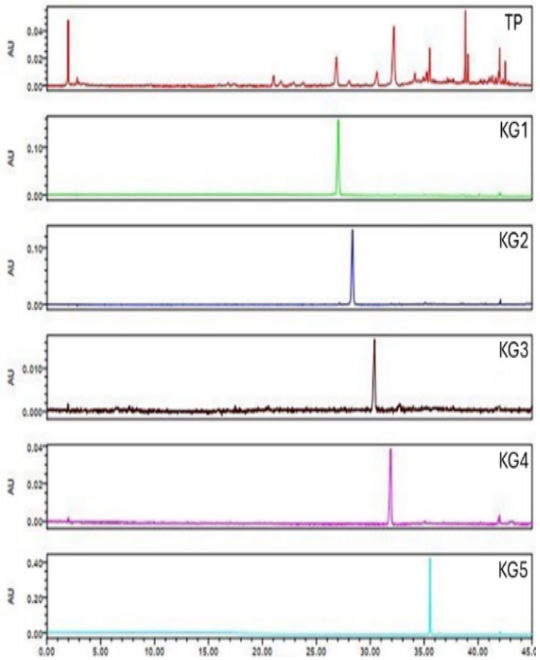


Hình 8. Sắc ký đồ HPLC kiểm tinh khiết

3.5. Định tính xác định các chất đối chiếu

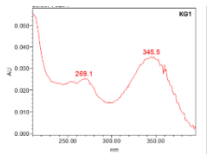
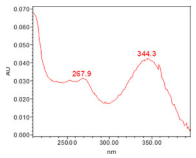
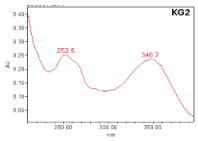
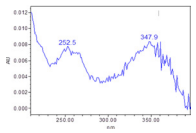
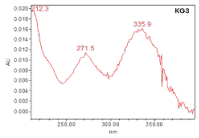
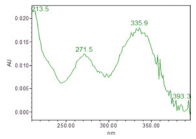
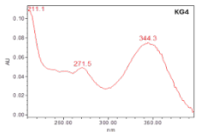
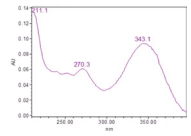
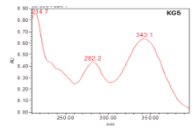
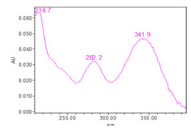
Các chất phân lập được phân tích so sánh ở cùng điều kiện HPLC-PDA-MS và sắc ký lớp mỏng với các chất chuẩn đã có trước đây của nhóm tác giả. Kết quả cho thấy các chất này đều có thời gian lưu, phổ UV và phổ khối (khối lượng phân tử) phù hợp với các chất mục tiêu tương ứng. Cấu trúc các chất KG1-KG5 được xác nhận thông qua việc so sánh dữ liệu phổ ^{1}H-NMR đối chiếu với tài liệu tham khảo là công bố trước đây của chính nhóm nghiên cứu (Nguyen et al., 2021).

Sau khi sắc ký so sánh kết hợp với đối chiếu các dữ liệu phổ, KG1, KG2, KG3, KG4 và KG5 (tương ứng với thời gian lưu lần lượt là 14.1 phút, 15 phút, 17.8 phút, 19 phút và 30.2 phút trên sắc ký đồ HPLC Hình 5) được xác nhận lần lượt là pedalin (Bolzani et al., 1995), luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid (Zhang et al., 2014); chrysoeriol-7- *O*-*β*-D-glucopyranosid (Chau et al., 2015); 7,3'-dimethoxyluteolin-6-*O*-*β*-D-glucopyranosid (Mathuram et al., 1976) và 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon (Maldonado & Ortega, 1997; Nguyen et al., 2021). Cấu trúc của các chất đã phân lập được thể hiện ở Hình 10. Kết quả tổng kết các chất đã phân lập được tóm tắt trong Bảng 4.



Hình 9. Sắc ký đồ HPLC so sánh các chất và cao toàn phần

Bảng 1. Kết quả đối chiếu phổ UV của chất đã phân lập và chất chuẩn mục tiêu tương ứng

	Chất phân lập	Chất chuẩn
KG1		
KG2		
KG3		
KG4		
KG5		

Bảng 2. Kết quả so sánh dữ liệu phổ khối của các chất phân lập được và chất chuẩn tương ứng

	Tên hợp chất	$[M-H]^-$	KLPT
1	KG1 Pedalin	477,1 477,3	478
2	KG2 Luteolin-7-O-β-D-glucopyranosid	447,1 447,2	448
3	KG3 Chrysoeriol-7- O-β-D-glucopyranosid	461,2 461,1	462
4	KG4 7,3'-dimethoxyluteolin-6-O-β-D-glucopyranosid	491,1 491,2	492
5	KG5 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon	329,1 329,1	330

Bảng 3. Kết quả so sánh dữ liệu phổ ^{1}H-NMR của các chất phân lập được và chất chuẩn tương ứng

	KG1 δ_H mult. (*J*)	pedalin δ_H mult. (*J*)	KG2 δ_H mult. (*J*)	luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid δ_H mult. (*J*)	KG3 δ_H mult. (*J*)	chrysoeriol-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid
2	-	-		-	-	-
3	1H 6.73 *s*	1H 6.73 *s*	1H 6.75 *s*	1H 6.75 *s*	1H 6.99 *s*	1H 6.99 *s*
4	-	-		-	-	-
5	-	-		-	-	-

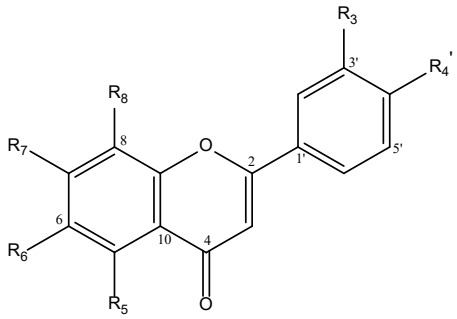
	KG1 δ_H mult. (*J*)	pedalin δ_H mult. (*J*)	KG2 δ_H mult. (*J*)	luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid δ_H mult. (*J*)	KG3 δ_H mult. (*J*)	chrysoeriol-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid
6	-	-	1H 6.44 *d* (2.2)	1H 6.44 *d* (2.1)	1H 6.45 *d* (2.1)	1H 6.45 *d* (2.1)
7	-	-		-	-	-
8	1H 6.88 *s*	1H 6.88 *s*	1H 6.79 *d* (2.2)	1H 6.79 *d* (2.1)	1H 6.87 *d* (2.1)	1H 6.87 *d* (2.1)
9	-	-		-	-	-
10	-	-		-	-	-
1′	-	-		-	-	-
2′	1H 7.44 *d* (2.3)	1H 7.44 *d* (2.3)	1H 7.42 *d* (2.2)	1H 7.42 *d* (2.1)	1H 7.59 *brs*	1H 7.59 *brs*
3′	-	-		-	-	-
4′	-	-		-	-	-
5′	1H 6.90 *d* (8.2)	1H 6.90 *d* (8.2)	1H 6.9 *d* (8.4)	1H 6.91 *d* (8.3)	1H 6.94 *d* (8.1)	1H 6.94 *d* (8.1)
6′	1H 7.46 *dd* (8.2, 2.3)	1H 7.46 *dd* (8.2, 2.3)	1H 7.45 *dd* (8.4, 2.3)	1H 7.45 *dd* (8.4, 2.2)	1H 7.60 *dd* (8.1, 2.2)	1H 7.60 *dd* (8.1, 2.2)
4-OCH_3	-	-		-	-	-
6-OCH_3	-	-		-	-	-
7-OCH_3	3H 3.91 *s*	3H 3.91 *s*		-	-	-
8-OCH_3	-	-		-	-	-
3′-OCH_3	-	-		-	-	-
4′-OCH_3	-	-		-	-	-
5-OH	-	-	1H 12.98 *s*	1H 12.98 *s*	1H 12.97 *s*	1H 12.97 *s*
6-OH	-	-		-	-	-
7-OH	-	-		-	-	-
4′-OH	-	-		-	-	-
1″	1H 5.04 *d* (7.1)	1H 5.04 *d* (7.1)	1H 5.08 *d* (7.5)	1H 5.08 *d* (7.5)	1H 5.06 *d* (7.5)	1H 5.06 *d* (7.5)
2″	1H 3.22 *m*	1H 3.22 *m*	1H 3.26 *t* (8.9)	1H 3.26 *t* (7.7)	1H 3.26 *m*	1H 3.26 *m*
3″	1H 3.21 *m*	1H 3.21 *m*	1H 3.31 *t* (8.9)	1H 3.31 *t* (8.8)	1H 3.30 *m*	1H 3.30 *m*
4″	1H 3.13 *m*	1H 3.13 *m*	1H 3.18 *t* (8.9)	1H 3.18 *t* (9.1)	1H 3.17 *m*	1H 3.17 *m*
5″	1H 3.06 *m*	1H 3.06 *m*	1H 3.45 *m*	1H 3.45 *m*	1H 3.44 *m*	1H 3.44 *m*
6′	1H 3.58 *dd* (10.9, 1.1) 1H 3.40 *m*	1H 3.58 *dd* (10.9, 1.1) 1H 3.40 *m*	1H 3.71 *d* (11.3) 1H 3.48 *m*	1H 3.71 *d* (11.0) 1H 3.48 *m*	1H 3.72 *dd* (10.0, 5.2) 1H 3.46 *m*	1H 3.72 *dd* (10.0, 5.2) 1H 3.46 *m*

Bảng 3. Kết quả so sánh dữ liệu phổ ^{1}H-NMR của các chất phân lập được và chất chuẩn tương ứng (tiếp theo)

	KG4 δ_H mult. (*J*)	7,3'-dimethoxyluteolin-6-*O*-*β*-D-glucopyranosid δ_H mult. (*J*)	KG5 δ_H mult. (*J*)	5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon δ_H mult. (*J*)
2	-	-	-	-
3	1H 6.9 *s*	1H 6.88 *s*	1H 6.91 *s*	1H 6.91 *s*
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	1H 6.88 *s*	1H 6.87 *s*	1H 6.93 *s*	1H 6.93 *s*
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1′	-	-	-	-
2′	1H 7.56 *s*	1H 7.54 *s*	1H 7.58 *s*	1H 7.58 *s*
3′	-	-	-	-
4′	-	-	-	-
5′	1H 6.93 *d* (8.0)	1H 6.92 *d* (7.8)	1H 6.94 *d* (8.9)	1H 6.94 *d* (8.9)
6′	1H 7.56 *d* (7.9)	1H 7.55 *d* (7.8)	1H 7.59 *dd* (8.9, 2)	1H 7.59 *dd* (8.9, 2)
4-OCH$_3$	-	-	-	-
6-OCH$_3$	-	-	-	-
7- OCH$_3$	3H 3.89 *s*	3H 3.88 *s*	3H 3.92 *s*	3H 3.93 *s*
8-OCH$_3$	-	-	-	-
3′-OCH$_3$	3H 3.90 *s*	3H 3.89 *s*	3H 3.90 *s*	3H 3.90 *s*
4′-OCH$_3$	-	-	-	-
5-OH	1H 13.08 *s*	1H 13.07 *s*	-	-
6-OH	-	-	-	-
7-OH	-	-	-	-
4′-OH	-	-	-	-
1″	1H 5.08 *d* (6.4)	1H 5.08 *d* (6.4)		
2″	1H 3.26 *m*	1H 3.26 *m*		
3″	1H 3.25 *m*	1H 3.25 *m*		
4″	1H 3.16 *m*	1H 3.17 *t* (8.1)		
5″	1H 3.11 *m*	1H 3.11 *m*		
6′	1H 3.62 *d* (11.0) 1H 3.44 *m*	1H 3.62 *d* (10.9) 1H 3.44 *m*		

Kết quả phân lập thành công năm flavonoid chính từ phân đoạn ethyl acetat phần trên mặt đất cây Kinh giới và xác định cấu trúc với độ tinh khiết cao (trên 96%) là cơ sở quan trọng để xây dựng chất đối chiếu phục vụ kiểm nghiệm. Các hợp chất này, bao gồm pedalin, luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid; chrysoeriol-7- *O*-*β*-D-glucopyranosid; 7,3'-dimethoxyluteolin-6-*O*-*β*-D-glucopyranosid và 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon, đều là những flavonoid đã được báo cáo trong một số nghiên cứu trước, tuy nhiên, đa phần chỉ dừng lại ở mức độ định tính, phân lập lượng nhỏ để đánh giá hoạt tính sinh học (Kim et al., 2025; Nguyen et al., 2021; Seo et al., 2020). Kết quả ở tài liệu nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy đây là thành phần hoạt chất chính của Kinh giới Việt Nam, chịu trách nhiệm chính cho tác dụng chống oxy hóa và kháng viêm của dược liệu này (Nguyen et al., 2021). Do đó, việc đề xuất sử dụng năm chất này làm chất đối chiếu trong kiểm soát chất lượng dược liệu Kinh giới là có cơ sở khoa học và thực tiễn, đặc biệt trong bối cảnh chuyên luận Dược điển về Kinh giới vẫn chưa có quy định cụ thể về chất đối chiếu phục vụ kiểm nghiệm dược liệu này. Nhìn chung, kết quả nghiên cứu không chỉ cung cấp nguồn chất đối chiếu đáng tin cậy mà còn có thể làm cơ sở dữ liệu tham khảo

trong xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và chuyên luận Dược điển Việt Nam trong tương lai.



	R_3'	R_4'	R_5	R_6	R_7	R_8
KG1 (pedalin)	OH	OH	OH	O-*β*-D-glc	OMe	H
KG2 (luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid)	OH	OH	OH	H	O-*β*-D-glc	H
KG3 (chrysoeriol-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid)	OMe	OH	OH	H	O-*β*-D-glc	H
KG4 (7,3′-dimethoxyluteolin-6-*O*-*β*-D-glucopyranosid)	OMe	OH	OH	O-*β*-D-glc	OMe	H
KG5 (5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon)	OMe	OH	OH	OH	OMe	H

Hình 10. Cấu trúc của các chất đã phân lập

Bảng 4. Kết quả tóm tắt dữ liệu các chất đã phân lập

Mã	Tên hợp chất	Rf*	CTPT	KLPT	Độ tinh khiết
KG1	Pedalin	0,21	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478	98,62%
KG2	Luteolin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid	0,19	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448	98,38%
KG3	Chrysoeriol-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid	0,32	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462	96,02%
KG4	7,3'-dimethoxyluteolin-6-*O*-*β*-D-glucopyranosid	0,36	$C_{23}H_{24}O_{12}$	492	97,88%
KG5	5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavon	0,63	$C_{17}H_{14}O_7$	330	96,31%

**Pha động: chloroform – methanol - nước - acid formic (7:3:1:0,5; lớp dưới).*

4. KẾT LUẬN

Từ phân đoạn ethyl acetat phần trên mặt đất của cây Kinh giới (*E. lsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.), năm flavonoid chính đã được phân lập và xác định cấu trúc với độ tinh khiết cao (trên 96%). Các hợp chất này có tiềm năng được sử dụng làm chất đối chiếu phục vụ công tác quản lý chất lượng dược liệu Kinh giới và các chế phẩm liên quan. Kết quả nghiên cứu là bước khởi đầu quan trọng trong việc xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, hướng đến hoàn thiện chuyên luận Dược điển cho dược liệu này một cách khoa học và chặt chẽ hơn.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 32/2021/HĐ-ĐHYD ngày 30 tháng 3 năm 2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Bolzani, V. D. S., Gunatilaka, A. A. L., & Kingston, D. G. I. (1995). Bioactive Guanidine Alkaloids from Pterogyne nitens. *Journal of Natural Products*, *58*(11), 1683–1688. https://doi.org/10.1021/np50125a006

Chen, S., Chen, J., Xu, Y., Wang, X., & Li, J. (2022). *Elsholtzia*: A genus with antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory advantages. *Journal of Ethnopharmacology*, *297*, 115549. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115549

Guo, Z., Liu, Z., Wang, X., Liu, W., Jiang, R., Cheng, R., & She, G. (2012). *Elsholtzia*: Phytochemistry and biological activities. In *Chemistry Central Journal*, *6*(1), 147-155. https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-147

Do, I. H. et al. (2006). *Medicinal Plants and Animals Used in Medicine in Vietnam* (Vol. 2). Science and Technology.

Kim, J. H., Park, J. H., Han, K. S., Lee, E. S., Kim, Y. G., Kim, Y. Il, Koo, S. C., & Cho, B. O. (2025). Inhibitory Activity of Glycosides from *Elsholtzia ciliata* against Soluble Epoxide Hydrolase and Cytokines in RAW264.7 Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*, e2410011. https://doi.org/10.4014/jmb.2410.10011

Liu, A., Ming-Yuen Lee, S., Du, G.-H., Liu, A.-L., Lee, S. M., & Wang, Y.-T. (2007). *Elsholtzia: Review of traditional uses, chemistry and pharmacology*, *16*, 73–78. https://www.jcps.ac.cn

Maldonado, E., & Ortega, A. (1997). Neo-clerodane diterpenes from *Salvia thymoides*. *Phytochemistry*, *46*(7), 1249–1254. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)80021-0

Mathuram, S., Purushothaman, K. K., Sarada, A., & Connolly, J. D. (1976). A new flavone 6-glucoside from *Citharexylum subserratum*. *Phytochemistry*, *15*, 838. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94475-3

Chau, M. V., Nguyen, N. X., Hoang, Y. T., Phan, K. V., et al (2015). Chemical constituents of Trichosanthes kirilowii and their cytotoxic activities. *Archives of Pharmacal Research*, *38*(8), 1443–1448. https://doi.org/10.1007/s12272-014-0490-6

Nguyen, D. T. X., Tran, H., Schwaiger, S., Stuppner, H., & Marzocco, S. (2021). Effect of Non-Volatile Constituents of *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl. from Southern Vietnam on Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Release in Macrophages. *Chemistry and Biodiversity*, *18*(1), e2000577. https://doi.org/10.1002/cbdv.202000577

Nugroho, A., Jong-Hyuk, P., Jae Sue, C., Kyoung-Sik, P., Joon-Pyo, H., & Park, H.-J. (2019). Structure determination and quantification of a new flavone glycoside with anti-acetylcholinesterase activity from the herbs of *Elsholtzia ciliata*. *Natural Product Research*, *33*(6), 814–821. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1413556

Seo, Y. H., Trinh, T. A., Ryu, S. M., Kim, H. S., Choi, G., Moon, B. C., Shim, S. H., Jang, D. S., Lee, D., Kang, K. S., & Lee, J. (2020). Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Elsholtzia ciliata* and Their Protective Activities on Glutamate-Induced HT22 Cell Death. *Journal of Natural Products*, *83*(10), 3149–3155. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00756

Wang, F., Liu, X., Chen, Y., An, Y., Zhao, W., Wang, L., Tian, J., Kong, D., Xu, Y., Ba, Y., & Zhou, H. (2022). *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Molecules*, *27*(19), 6411 - 6459. https://doi.org/10.3390/molecules27196411

Zhang, Q., Lu, Z., Ren, T., Ge, Y., Zheng, Y., Yao, D., He, X., Gu, Y., Shi, Q., & Huo, C. (2014). Chemical Composition of Achillea alpina. *Chemistry of Natural Compounds*, *50*(3), 534–536. https://doi.org/10.1007/s10600-014-1006-9