

Các hợp chất phân lập từ dịch chiết *n*-hexan của rễ Đảng sâm Việt Nam [*Codonopsis javanica* (blume) hook.F.] thu ở Lâm Đồng

Nguyễn Thị Thăng Long, Đinh Thị An, Trịnh Thị Diệp
Trường Đại học Đà Lạt

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đảng sâm Việt Nam [*Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., họ Campanulaceae] được khai thác tự nhiên và được sử dụng khá phổ biến ở Lâm Đồng nhưng còn ít được nghiên cứu về thành phần hóa học. Bài báo này trình bày kết quả phân lập và xác định cấu trúc các chất từ phân đoạn chiết *n*-hexan của rễ loài đảng sâm này. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Rễ đảng sâm *Codonopsis javanica* được thu hái ở Vườn quốc gia Bidoup – Núi Bà, Lâm Đồng vào tháng 5/2018. Các hợp chất được phân lập bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng. Cấu trúc hóa học của chúng được nhận dạng dựa vào phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối và phổ hồng ngoại. **Kết quả và Kết luận:** a-Spinasterol (1), acid arachidic (2) và acid 6-hydroxyoctadecanoic (3) đã được phân lập và xác định cấu trúc từ rễ đảng sâm Việt Nam. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài *Codonopsis javanica*.

Từ khóa: *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., a-spinasterol, arachidic acid, 6-hydroxyoctadecanoic acid.

Abstract

Chemical constituents of *n*-hexane extract from *Codonopsis javanica* (blume) hook.F. Roots collected in Lamdong province of Vietnam

Nguyen Thi Thang Long, Dinh Thi An, Trinh Thi Diep
Dalat University

Background: The roots of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., Campanulaceae were naturally exploited and used quite commonly in Lam Dong province but little research has been done on their chemical composition. This article reports the isolation and structural determination of 3 compounds from the *n*-hexane extract of this material. **Materials and method:** The roots of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. were collected from Bidoup – Nui Ba National Park, Lam Dong province in May 2018. Compounds were isolated by using various chromatographic methods. Their structures were determined by NMR, MS, and IR spectroscopic methods. **Results and Conclusion:** a-Spinasterol (1), arachidic acid (2), and 6-hydroxyoctadecanoic acid (3) were isolated and determined from the *n*-hexane extracts of the roots of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. F. These compounds were first isolated from the roots of this species.

Key-words: *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., a-spinasterol, arachidic acid, 6-hydroxyoctadecanoic acid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Codonopsis* thuộc họ Campanulaceae, là một chi bao gồm 42 loài cây hai lá mầm lâu năm, chủ yếu được tìm thấy ở Trung, Đông và Nam Á. Rễ củ của một số loài *Codonopsis* được sử dụng trong y học cổ truyền với tên gọi đảng sâm như *C. lanceolata*, *C. pilosula*, *C. ussuriensis*, *C. tangshen*, *C. subglobosa* [1]. Thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Codonopsis* bao gồm các hợp chất terpenoid, steroid, alkaloid, acid amin, polysaccharid. Một số polysaccharid trong các loài *Codonopsis* được chứng minh có các tác dụng đáng chú ý như tăng cường

miễn dịch, chống ung thư [2].

Đảng sâm Việt Nam [*Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f.] được phát hiện ở các tỉnh miền núi phía Bắc và khu vực Tây Nguyên, là vị thuốc bổ tỳ vị, ích khí đã được dùng từ lâu để điều trị suy nhược, thiếu máu, ho, mệt mỏi, vàng da, khó tiêu, viêm thận, phù nề, trĩ, băng huyết và bạch huyết hoặc phối hợp với một số vị thuốc khác trong các bài thuốc bổ dạ dày, chữa ho, tiêu đờm [3]. Về thành phần hóa học của loài đảng sâm *C. javanica*, chỉ có một số công bố cho thấy có chứa stigmasta-7,25-dien-3-ol [4], β -sitosterol, 2'-hydroxy-N-((E,2R)-1,3,4-trihydroxyoctadec-8-

en-2-yl) hexacosanamid (2), α -spinasterol 3-O- β -D-glucopyranosid [5], ampelopsin, hesperidin, adenosin và các oligosaccharid [6].

Vài năm gần đây, ở Lâm Đồng, đảng sâm được khai thác tự nhiên và được người dân sử dụng khá phổ biến nhưng còn rất ít các công bố về thành phần hóa học của nguồn dược liệu này. Do đó, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất trong rễ loài đảng sâm *C. javanica* thu ở Lâm Đồng. Trong bài này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập các chất từ phân đoạn chiết *n*-hexan của rễ loài đảng sâm này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Rễ đảng sâm *Codonopsis javanica* được thu hái ở Vườn quốc gia Bidoup – Núi Bà, Lâm Đồng vào tháng 5/2018, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ 60°C. Mẫu nghiên cứu được TS. Lương Văn Dũng, Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt thẩm định tên khoa học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), silica gel RP (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 và 366 nm hoặc dùng thuốc thử hiện màu là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng trên bếp điện đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 40-63 μ m, 63-200 μ m, Merck), silica gel pha đảo RP-18 (Merck).

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Điểm nóng chảy đo trên máy Yanaco MP-S3. Phổ IR được ghi trên máy Nicolet IS5 FT-IR. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC được ghi trên máy Bruker Avance-500 MHz, chuẩn nội TMS. Phổ khối ESI-MS được ghi trên máy Agilent 1100 LC-MSD Trap.

2.3. Chiết xuất và phân lập

1kg rễ đảng sâm khô đã xay thô được chiết hồi lưu với 5 lít ethanol 90% ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ, chiết lặp lại 4 lần. Các dịch chiết được gộp lại và cất loại ethanol dưới áp suất giảm đến còn 0,3 lít dung dịch đậm đặc. Chuyển dung dịch đậm đặc này sang bình chiết quả lê, phân tán trong 0,5 lít nước và chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan và ethyl acetat. Cất loại hết các dung môi dưới áp suất giảm thu được các phân đoạn chiết tương ứng: *n*-hexan (13,54 g), ethyl acetat (5,16 g) và nước (131,29 g).

Cần chiết *n*-hexan (13,54 g) được tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silica gel (63-200 μ m, Merck); hệ dung môi giải hấp *n*-hexan: ethyl acetat theo tỉ lệ ethyl acetat tăng dần từ 0% đến 1%, 5%, 10%, 20%, 50% và 100% cho 48 phân đoạn (H1 – H48). Phân đoạn H26-29 (500 mg) để bay hơi dung môi và xảy ra sự kết tinh tự nhiên trong cốc. Phần tinh thể thu được cho kết tinh lại trong diclorometan, thu được 70 mg hợp chất **1**. Phân đoạn H22-23 (331,2 mg) tách bằng sắc ký cột silica gel (40-63 μ m, Merck), rửa giải với hệ dung môi methanol : acetone (8:2) thu được 20 phân đoạn H2223.1 – H2223.20. Phân đoạn H2223.9 được cô đến cần và kết tinh lại trong hệ dung môi *n*-hexan : acetone (9:1) thu được 10 mg chất **2**. Phân đoạn H31-36 (200 mg) để bay hơi dung môi và kết tinh lại trong methanol, thu được 45 mg hợp chất **3**.

Chất 1: Tinh thể hình kim màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 168°C. Phổ IR (KBr): $\nu_{\max}$, cm⁻¹: 3435 (OH); 1659 (C=C). Phổ ESI-MS: *m/z* 413,3 [M+H]⁺, M = 412 (C₂₉H₄₈O). Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ , ppm: bảng 1.

Chất 2: Bột vô định hình màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 75-76°C. Phổ ESI-MS: *m/z* 313,0 [M+H]⁺, M = 312 (C₁₉H₃₉COOH). Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 2,35 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,25 – 1,32 (-CH₂-). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 177,40 (C-1); 33,64 (C-2); 29,09 (C-3); 29,09 (C-4); 29,25 (C-5); 29,37 – 29,71 (C-6-17); 31,94 (C-18); 22,70 (C-19); 14,10 (C-20).

Chất 3: Bột vô định hình màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 90°C. Phổ IR (KBr): $\nu_{\max}$, cm⁻¹: 3432 (OH), 1720 (C=O). Phổ ESI-MS: *m/z* 299,1 [M-H]⁻, M = 300 (C₁₈H₃₆O₃). Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 0,92 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 3,52 (m, 1H); 2,29 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,62 (quint, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,25 – 1,33 (-CH₂-). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 177,90 (C-1); 35,11 (C-2); 26,15 (C-3); 26,75 (C-4); 38,42 (C-5); 72,47 (C-6); 38,40 (C-7); 26,75 (C-8); 30,24 – 30,81 (C-9-15); 33,03 (C-16); 23,66 (C-17); 14,38 (C-18).

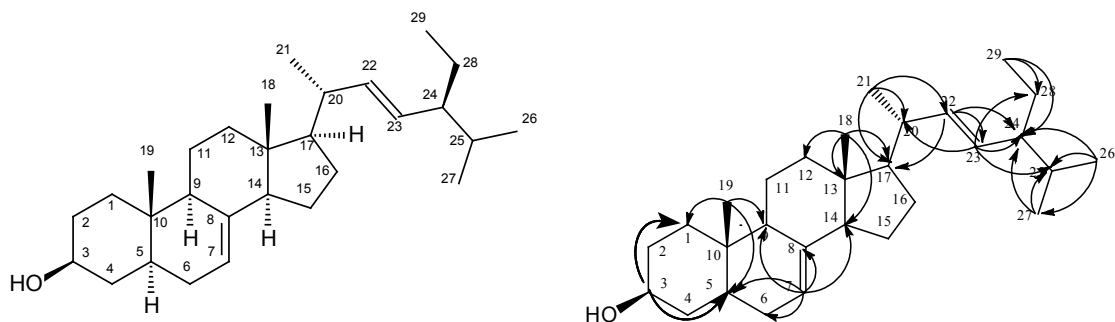
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất 1: Tinh thể hình kim màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 168°C. Phổ IR (KBr): $\nu_{\max}$, cm⁻¹: 3435 (OH); 1659 (C=C). Phổ ¹H-NMR của **1** cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 3 proton olefin ở δ_H 5,16 (dd, 1H, *J* = 8,5; 15,0 Hz), 5,15 (br s, 1H) và 5,03 (dd, 1H, *J* = 8,5; 15,0 Hz), một proton liên kết với -C-OH ở 3,59 (m) và 6 proton methyl ở δ_H 1,03 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz), 0,85 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz), 0,81 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,80 (s, 3H) và 0,55 (s, 3H). Tín hiệu proton methyl ở vùng trường cao tại δ_H 0,55 (s, 3H) rất đặc trưng cho khung sterol [7]. Phổ ¹³C-NMR và

phổ DEPT của **1** thể hiện tín hiệu cộng hưởng của 29 carbon, trong đó có 4 carbon olefin tại δ_c 139,59; 138,17; 129,51 và 117,49 ppm, 1 carbon liên kết với oxy tại δ_c 71,09 ppm, 7 nhóm CH no, 2 C, 9 CH₂ và 6 nhóm CH₃. Đó là những tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho hợp chất sterol chứa một nhóm OH và 2 liên kết đôi. Từ các đặc trưng phổ nói trên, dự kiến hợp chất **1** là một sterol có tên gọi là a-spinasterol. Các số liệu phổ NMR của hợp chất **1** được so sánh với số liệu đã công bố cho a-spinasterol là hoàn toàn phù hợp [8]. Các giá trị phổ ¹H- và ¹³C-NMR của các vị trí được gán chính xác nhờ vào các phổ hai chiều 2D-NMR. Phổ HSQC đã giúp xác định các giá trị độ dịch chuyển hoá học δ_H từ các giá trị δ_c của các carbon có mang proton trong cấu trúc và được thể hiện ở bảng 1. Các tương tác xa (HMBC) giữa H với C khẳng định các giá trị độ dịch chuyển hóa học của các vị trí C và H như ở bảng 1 là hoàn toàn phù hợp. Phổ ESI-MS của **1** với pic ion [M+H]⁺ tại m/z 413,3 cho thấy khối lượng phân tử của **1** là M = 412, tương ứng với công thức phân tử C₂₉H₄₈O của a-spinasterol. Từ các bằng chứng phổ nói trên, hợp chất **1** được xác định là (3 β , 5 α , 22E)-stigmasta-7,22-dien-3-ol hay a-spinasterol. Hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng giảm đau, hoạt tính độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư vú, ung thư tử cung [9, 10, 11].

Chất 2: Hợp chất **2** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 75-76°C.

Phổ ¹H-NMR của **2** có dạng phổ của một acid no mạch dài với tín hiệu proton của một nhóm methyl tại δ_H 0,88 ppm (t, J = 7,0 Hz, 3H), một nhóm CH₂ liên kết với COOH tại δ_H 2,35 ppm (t, J = 7,5 Hz, 2H) và cụm tín hiệu chồng chất của các proton methylen tại δ_H 1,25 – 1,32 ppm. Phổ ¹³C-NMR của **2** một lần nữa khẳng định sự có mặt của một nhóm methyl tại δ_c 14,10 ppm, nhóm COOH tại δ_c 177,40 ppm cùng với các nhóm CH₂ trong vùng δ_c 29,09 – 29,71 ppm. Phổ DEPT chỉ rõ sự có mặt của 1 nhóm CH₃, 1 C của COOH, còn tất cả các carbon còn lại đều là CH₂. Như vậy hợp chất **2** phải là một acid béo no mạch thẳng. Các tín hiệu tại δ_c 22,70 và 31,94 ppm thuộc về hai carbon ở vị trí ω -2 và ω -3, còn tín hiệu tại δ_c 33,64 và 22,75 ppm là của C-2 và C-3. Để xác định có bao nhiêu nhóm CH₂ trong phân tử, số proton methylen trong cụm tín hiệu của phổ ¹H-NMR tại δ_H 1,25 – 1,32 ppm được xem xét nhưng do mẫu chất vẫn còn lẫn tạp nên chỉ có thể xác định số nhóm CH₂ không nhiều hơn 23.. Phổ ESI-MS của **2** đã cung cấp thêm thông tin để xác định khối lượng phân tử của hợp chất này. Trên phổ ESI-MS có thể thấy mảnh ion [M+H]⁺ tại m/z 313,0 tương ứng với công thức phân tử C₁₉H₃₉COOH của acid arachidic, M = 312. Nhiệt độ nóng chảy của hợp chất này là 75-76°C cũng hoàn toàn phù hợp với acid arachidic. Như vậy, từ các bằng chứng phổ nêu trên, hợp chất **2** được xác định là acid arachidic hay acid eicosanoic có cấu trúc như hình 2.



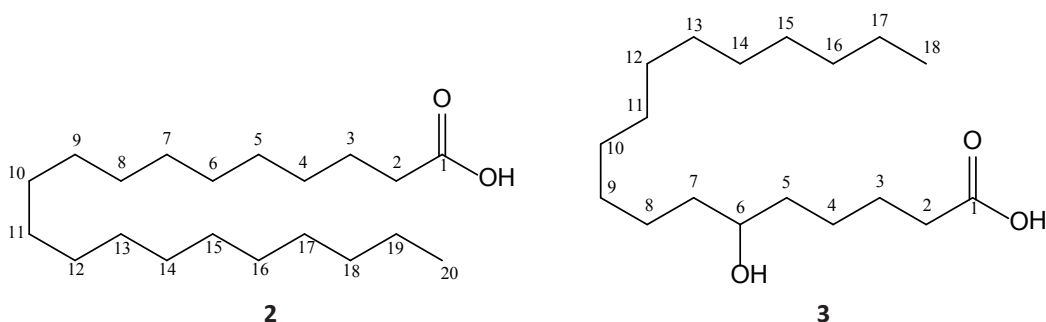
Hình 1. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chủ yếu của **1**

Bảng 1. Dữ kiện phổ ¹H, ¹³C-NMR của **1**

C	$\delta_c^{a,b}$ (ppm)	$\delta_H^{a,c}$ (ppm) (J, Hz)	C	$\delta_c^{a,b}$ (ppm)	$\delta_H^{a,c}$ (ppm) (J, Hz)
1	37,20	1,81 (m, 1H) 1,03 (m, 1H)	16	28,51	1,27 (m, 1H) 1,72 (m, 1H)
2	31,53	1,79 (m, 1H) 1,38 (m, 1H)	17	55,98	1,24 (m, 1H)
3	71,10	3,59 (m, 1H)	18	12,08	0,55 (s, 3H)
4	38,05	1,70 (m, 1H) 1,26 (m, 1H)	19	13,05	0,80 (s, 3H)

5	40,33	1,39 (m, 1H)	20	40,81	2,04 (m, 1H)
6	29,68	1,77 (m, 2H)	21	21,39	1,03 (d, $J = 6,5$, 3H)
7	117,49	5,16 (dd, $J = 2,5$; 4,5, 1H)	22	138,17	5,16 (dd, $J = 8,5$; 15,0, 1H)
8	139,60	-	23	129,51	5,03 (dd, $J = 8,5$; 15,0, 1H)
9	49,52	1,64 (m, 1H)	24	51,28	1,24 (m, 1H)
10	34,27	-	25	31,90	1,51 (m, 1H)
11	21,59	1,58 (m, 1H) 1,46 (m, 1H)	26	21,08	0,85 (d, $J = 6,0$, 3H)
12	39,52	1,99 (m, 1H) 1,24 (m, 1H)	27	19,03	0,80 (d, $J = 6,0$, 3H)
13	43,33	-	28	25,41	1,41 (m, 1H) 1,18 (m, 1H)
14	55,17	1,81 (m, 1H)	29	12,24	0,81 (t, $J = 7,5$, 3H)
15	23,05	1,50 (m, 1H) 1,38 (m, 1H)			

^a Đo trong CDCl₃, ^b 125MHz, ^c 500MHz



Hình 2. Cấu trúc hóa học của 2 và 3

Chất 3: Hợp chất **3** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 90°C. Phổ ¹H-NMR của **3** cho thấy tín hiệu proton của một nhóm methyl tại δ_H 0,92 ppm (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), một nhóm CH-OH tại δ_H 3,52 ppm (m, 1H), 2 tín hiệu của proton methylen bị dịch chuyển về phía trường thấp hơn do ảnh hưởng của nhóm COOH tại δ_H 2,29 ppm (t, $J = 7,5$ Hz, 2H) và 1,62 ppm (quint, $J = 7,5$ Hz, 2H) và cụm tín hiệu chồng chất của các proton methylen tại δ_H 1,25 – 1,33 ppm. Phổ ¹³C-NMR và phổ DEPT của **3** cho tín hiệu cộng hưởng của 18 C, bao gồm một nhóm CH₃ tại δ_C 14,38 ppm, một nhóm COOH tại δ_C 177,90 ppm, một carbon liên kết với oxy tại δ_C 72,47 ppm và 15 nhóm CH₂ trong vùng δ_C 23,66 – 38,42 ppm. Như vậy hợp chất **3** dự kiến là một hydroxyacid mạch dài có 18 C. Các tín hiệu tại δ_C 38,40 và 38,42 ppm thuộc về hai nhóm CH₂ liên kết trực tiếp với nhóm CH-OH, còn tín hiệu tại δ_C 33,11 ppm là của nhóm CH₂ bên cạnh COOH.

Phổ HSQC và HMBC của **3** đã giúp gắn chính xác độ dịch chuyển hóa học của từng carbon và hydro trong phân tử. Từ tín hiệu tương tác HMBC giữa H thuộc nhóm CH-OH với các nguyên tử C cách đó 1 đến 2 liên kết xác định được độ dịch chuyển hóa học của 4 nguyên tử C thuộc 4 nhóm CH₂ gần đó. Nhóm OH được xác định liên kết với C-6 nhờ xuất hiện tín hiệu tương tác HMBC yếu giữa H-4 với C-1. Trên phổ ESI-MS của **3** có thể thấy các mảnh ion [M-H]⁻ tại m/z 299,1 tương ứng với công thức phân tử C₁₈H₃₆O₃ của acid hydroxyoctadecanoic, M = 300. Phổ ESI-MS cho thấy các mảnh cấu trúc có chứa cả nhóm COOH và nhóm OH dạng [HO-(CH₂)_n-COOH+H]⁺ cách nhau 14 đơn vị (tương ứng với 1 nhóm CH₂), trong đó mảnh bé nhất có m/z 134 tương ứng với mảnh ion [HO-(CH₂)₅-COOH+H]⁺. Điều này một lần nữa cho thấy nhóm OH phải liên kết với C-6. Như vậy, từ các bằng chứng phổ nêu trên, hợp chất **3** được xác định là acid 6-hydroxyoctadecanoic có cấu trúc như hình 2.

4. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phổ, đã phân lập và nhận dạng cấu trúc 3 chất là α -spinasterol, acid arachidic và acid 6-hydroxyoctadecanoic từ phân đoạn chiết *n*-hexan

của rễ đẳng sâm Việt Nam [*Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f.]. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài *Codonopsis javanica*.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài mã số KYTH-95.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jing Y.H., Na M., Shu Z., Katsuko K. (2015), The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control, *Journal of Natural Medicines*, 69: 1-21.
2. Yang C., Gou Y., Chen J., An J., Chen W., Hu F. (2013), Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. *Carbohydrate Polymers*, 98: 886-895.
3. Viện Dược Liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Phần 1, 739-743.
4. Hoàng Minh Chung, Chu Đình Kính, Phạm Xuân Sinh (2010), Phân lập, nhận dạng một dẫn xuất glycosid trong đẳng sâm Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 15(3): 182-186.
5. Trần Thanh Hà, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Minh Khởi, Nguyễn Thị Hà & Nguyễn Văn Nghi (2014), Thành phần hóa học của rễ đẳng sâm. *Tạp chí Dược liệu*, 19(4): 211-215.
6. Trần Thanh Hà, Đỗ Thị Hà, Hà Văn Oanh (2016), Thành phần hóa học của phân đoạn chiết bằng *n*-butanol rễ loài đẳng sâm Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, 56: 35-38.
7. Takashi, I., Toshitake T., and Taro M. (1980), Proton nuclear magnetic resonance identification and discrimination of side chain isomers of phytosterols using a lanthanide shift reagent. *Journal of Lipid Research*, 21, 326-338.
8. Daiane. M., Lillian. L. C., Daniela. F. R., Kahlil. S. S., Pedro. E. A., Silva. A. B., Cecilia. V. N. (2013), Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae), *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/605831.
9. Brusco, I., Camponogara, C., Carvalho, F. B., Schetinger, M. R. C., Oliveira, M. S., Trevisan, G., Ferreira, J., Oliveira S. M. (2017), α -Spinasterol: A COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. *British Journal of Pharmacology*, 174(23): 4247-4262. doi: 10.1111/bph.13992.
10. Meneses, S. S., Navarro, N. M., Ruiz, B. E., Del, T. S., Jimenez, E. M., Robles, Z. R. E. (2017), Antiproliferative activity of spinasterol isolated of *Stegnosperma halimifolium* (Benth, 1844). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8): 1137-1143. doi: 10.1016/j.jsps.2017.07.001.
11. Sedky, N. K., El-Gammal, Z. H., Wahba, A. E., Mosad, E., Waly, Z. Y., El-Fallal, A. A., Arafa, R. K., El-Badri, N. (2018), The molecular basis of cytotoxicity of α -spinasterol from *Ganoderma resinaceum*: Induction of apoptosis and overexpression of p53 in breast and ovarian cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(5): 3892-3902. doi: 10.1002/jcb.26515.