

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Viên

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO
UNG THƯ VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI HUỆ BIỂN *CAPILLASTER
MULTIRADIATUS* (LINNAEUS, 1758) VÀ *COMANTHUS DELICATA*
(AH CLARK, 1909) Ở VÙNG BIỂN VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Lê Thị Viên

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO
UNG THƯ VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI HUỆ BIỂN *CAPILLASTER*
MULTIRADIATUS (LINNAEUS, 1758) VÀ *COMANTHUS DELICATA*
(AH CLARK, 1909) Ở VÙNG BIỂN VIỆT NAM

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9.42.01.16

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS.VS. Châu Văn Minh
2. TS. Nguyễn Xuân Cường

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.VS. Châu Văn Minh và TS. Nguyễn Xuân Cường. Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Lê Thị Viên

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện tại phòng Dược liệu biển, Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, với sự hỗ trợ kinh phí đề tài nghiên cứu trọng điểm cấp Viện Hàn lâm: “Nghiên cứu khai thác các hợp chất trao đổi thứ cấp từ dược liệu San hô và Da gai ở khu vực Nam Trung Bộ (vùng biển Khánh Hòa-Bình Thuận) theo định hướng hoạt tính gây độc tế bào ung thư, kháng viêm”, mã số đề tài: TĐDLB0.02/20-22. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc tới GS.VS. Châu Văn Minh và TS. Nguyễn Xuân Cường - những người Thầy người đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng Dược liệu biển - Viện Hóa Sinh biển đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ tôi trong việc thử hoạt tính sinh học.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi hoàn thành luận án này.

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả

Lê Thị Viên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Sơ lược về các hợp chất thiên nhiên.....	3
1.1.1 Phân loại các hợp chất thiên nhiên.....	3
1.1.2 Hợp chất thiên nhiên biển và các thuốc bắt nguồn từ sinh vật biển.....	4
1.2. Giới thiệu chung về ung thư.....	6
1.2.1. Ung thư và các phương pháp điều trị ung thư.....	6
1.2.2. Mối liên hệ giữa apoptosis và ung thư.....	8
1.3. Giới thiệu về bệnh viêm.....	12
1.3.1. Cơ chế của quá trình viêm.....	12
1.3.2. Các yếu tố chính tham gia vào quá trình viêm.....	13
1.3.3. Ức chế sự biểu hiện iNOS và COX-2 trong nghiên cứu hoạt tính kháng viêm.....	15
1.4. Giới thiệu chung về huệ biển.....	19
1.4.1. Cấu tạo cơ thể.....	19
1.4.2. Sinh sản và phát triển.....	21
1.4.3. Hoạt tính sinh học các hợp chất điển hình từ các loài huệ biển.....	21
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	29
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	29
2.1.1. Loài huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i> (Linnaeus, 1758).....	29
2.1.2. Loài huệ biển <i>Comanthus delicata</i> (AH Clark, 1909).....	29
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	30

2.2.1.	Quy trình xử lý, tạo cặn chiết các mẫu huệ biển.....	30
2.2.2.	Quy trình phân lập các hợp chất.....	31
2.2.3.	Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	38
2.3.	Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học.....	39
2.3.1.	Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	39
2.3.2.	Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm.....	42
	CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	46
3.1.	Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất.....	46
3.1.1.	Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i>	46
3.1.2.	Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển <i>Comanthus delicata</i>	48
3.2.	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	54
3.2.1.	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài <i>Capillaster multiradiatus</i>	54
3.2.2.	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài <i>Comanthus delicata</i>	55
3.2.3.	Nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư của CD7	56
3.3.	Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO.....	58
3.3.1.	Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài <i>Capillaster multiradiatus</i>	58
3.3.2.	Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất từ loài <i>Comanthus delicata</i>	58
3.3.3.	Kết quả đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của CM1	59
	CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	61
4.1.	Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	61
4.1.1.	Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i> (Linnaeus, 1758).....	61

4.1.2.	Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển <i>Comanthus delicata</i> (AH Clark, 1909).....	65
4.1.3.	Tổng hợp và nhận xét về kết quả xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	82
4.2	Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được	82
4.2.1.	Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được.....	82
4.2.2.	Đánh giá khả năng gây apoptosis của CD7 bằng kit Annexin V-FITC.....	85
4.3.	Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được..	88
4.3.1.	Đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO.....	88
4.3.2.	Đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của CM1	89
	CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	92
	TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	94
	DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA LUẬN ÁN.....	95
	TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	96
	PHỤ LỤC.....	

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
¹³ C-NMR	Carbon Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon
¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹ H Chemical Shift Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác proton-proton
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
CC	Columns chromatography	Sắc ký cột
CD	Circular dichroism Spectroscopy	Phổ lưỡng sắc tròn
COX-2	Cyclooxygenase-2	Cyclooxygenase-2
CTHH		Cấu trúc hóa học
CTPT		Công thức phân tử
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxide
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bò
GĐTB		Gây độc tế bào
Hep-G ₂	Human hepatocellular carcinoma cell	Tế bào ung thư biểu mô gan ở người
HL-60	Human promyelocytic leukemia cell	Tế bào ung thư máu ở người
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-TOF-MS	High Resolution Time of-Flight Mass Spectrometer	Phổ khối phân giải cao thời gian bay
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum	Phổ tương tác dị hạt nhân qua

	Coherence	một liên kết
HCTN		Hợp chất tự nhiên
HT SH		Hoạt tính sinh học
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế tối thiểu 50%
IL	Interleukin	Interleukin
INOS	Inducible Nitric-Oxide Synthase	Inducible Nitric-Oxide Synthase
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
KB	Human epidemic carcinoma	Tế bào ung thư biểu mô ở người
LC-MS	Liquid chromatography – mass spectrometry	Sắc kí lỏng - khối phổ
LnCaP	Lymph node Carcinoma of the Prostate	Tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
LU-1	Human lung carcinoma cell	Tế bào ung thư phổi ở người
MCF-7	Human breast carcinoma cell	Tế bào ung thư vú ở người
MS	Mass Spectroscopy	Phổ khối lượng
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B	Yếu tố nhân kappa B
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ NOESY
PI	Propidium iodide	Thuốc nhuộm Propidium iodide
RAW264.7	Macrophage cell line	Dòng tế bào đại thực bào
SK-Mel-2	Human Melanoma cell	Tế bào ung thư da ở người
SRB	Sulforhodamine B	Sulforhodamine B
TB UT		Tế bào ung thư
TCA	Trichloro acetic acid	Axit trichloroacetic
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TTLT		Tính toán lý thuyết

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các dạng của NOS.....	17
Bảng 3.1.	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất từ loài <i>Capillaster multiradiatus</i>	54
Bảng 3.2.	Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất từ loài <i>Comanthus delicata</i>	55
Bảng 3.3.	Tỉ lệ các loại tế bào apoptosis dưới tác động của CD7 trên dòng tế bào SK-Mel-2.....	56
Bảng 3.4.	Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các chất từ loài <i>Capillaster multiradiatus</i>	58
Bảng 3.5.	Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các chất từ loài <i>Comanthus delicata</i>	59
Bảng 4.1.	Giá trị phổ NMR của CM1	62
Bảng 4.2.	Giá trị phổ NMR của CM2	63
Bảng 4.3.	Giá trị phổ NMR của CM8	64
Bảng 4.4.	Giá trị phổ NMR của CD1	67
Bảng 4.5.	Giá trị phổ NMR của CD2	69
Bảng 4.6.	Giá trị phổ NMR của CD3	70
Bảng 4.7.	Giá trị phổ NMR của CD4	72
Bảng 4.8.	Giá trị phổ NMR của CD5	73
Bảng 4.9.	Giá trị phổ NMR của CD15	74
Bảng 4.10.	Giá trị phổ NMR của CD16	76
Bảng 4.11.	Giá trị phổ NMR của CD17	77
Bảng 4.12.	Giá trị phổ NMR của CD18	79
Bảng 4.13.	Giá trị phổ NMR của CD19	81

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Sơ đồ minh họa các con đường apoptosis ngoại bào và nội bào.	10
Hình 1.2.	Con đường hình thành NO từ các NOS.....	16
Hình 1.3.	Cấu tạo huệ biển.....	20
Hình 1.4.	Cấu trúc các sắc tố quinone (1-14) từ huệ biển.....	22
Hình 1.5.	Cấu trúc các sắc tố quinone (15-25) từ huệ biển.....	24
Hình 1.6.	Cấu trúc các naphthopyrone (26-43) từ huệ biển.....	26
Hình 1.7.	Cấu trúc một số bisanthrone và phenanthroperylene quinone (44-53) từ huệ biển.....	27
Hình 2.1.	Huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i> (Linnaeus, 1758).....	29
Hình 2.2.	Huệ biển <i>Comanthus delicata</i> (AH Clark, 1909).....	30
Hình 2.3.	Sơ đồ chiết phân lớp mẫu <i>Capillaster multiradiatus</i>	32
Hình 2.4.	Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phần Diclometan mẫu huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i>	32
Hình 2.5.	Sơ đồ chiết phân lớp mẫu <i>Comanthus delicata</i>	34
Hình 2.6.	Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn D3, D4 mẫu huệ biển <i>Comanthus delicata</i>	34
Hình 2.7.	Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn D5 mẫu huệ biển <i>Comanthus delicata</i>	35
Hình 2.8.	Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn nước mẫu huệ biển <i>Comanthus delicata</i>	37
Hình 3.1.	CTHH của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển <i>Capillaster multiradiatus</i>	46
Hình 3.2.	CTHH của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển <i>Comanthus delicata</i>	49
Hình 3.3.	Tác động của CD7 đến apoptosis ở tế bào SK-Mel-2 thông qua Kit Annexin V-FITC.....	57
Hình 3.4.	Khả năng kích thích sản sinh caspase-3 trong tế bào SK-Mel-2 dưới tác động của CD7	57
Hình 3.5.	Ảnh hưởng của CM1 ở các nồng độ 1, 3 và 10 μ M đến sự biểu	60

	hiện của protein iNOS, COX-2 trên dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS.....	
Hình 4.1.	CTHH và tương tác HMBC chính của CM1	61
Hình 4.2.	CTHH và tương tác HMBC chính của CM2	63
Hình 4.3.	CTHH của CM8	63
Hình 4.4.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD1	65
Hình 4.5.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD2	68
Hình 4.6.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD3	71
Hình 4.7.	CTHH và tương tác COSY (—) và HMBC (→) chính của CD4	71
Hình 4.8.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD5	72
Hình 4.9.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD15	74
Hình 4.10.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD16	76
Hình 4.11.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD17	77
Hình 4.12.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD18	78
Hình 4.13.	CTHH và tương tác HMBC chính của CD19	80
Hình 4.14.	CTHH của hai hợp chất mới CD1 và CD2	84
Hình 4.15.	CTHH CD20, CD21, CD22 và các chất so sánh.....	89

MỞ ĐẦU

Các đại dương bao phủ hơn 70% tổng diện tích của bề mặt trái đất và chiếm tới 90% không gian sinh sống của hành tinh. Nhiều quốc gia trên thế giới đã khai thác các chất có HT SH từ sinh vật biển nhằm phục vụ nghiên cứu tìm kiếm các loại thuốc chữa trị bệnh hiểm nghèo, đặc biệt là các bệnh phổ biến như ung thư và viêm. Hai căn bệnh đang có xu hướng gia tăng theo hàng năm, cướp đi sinh mạng của hàng triệu người trên thế giới mỗi năm. Cho đến nay nhiều hoạt chất bắt nguồn từ sinh vật biển đã được phát triển thành thuốc và cấp phép lưu hành điển hình như Ara-C, Trabectedin chữa ung thư; Ara-A điều trị bệnh Herpes, Ziconotide làm thuốc giảm đau... Ngoài ra còn có nhiều hoạt chất hiện đang được nghiên cứu lâm sàng và sẽ sớm có mặt trên thị trường [1]. Để có được kết quả này, các viện nghiên cứu hàng đầu trên thế giới đã thử nghiệm, tìm kiếm, sàng lọc HT SH của hàng triệu hợp chất từ các loài sinh vật biển, đồng thời chi nhiều triệu đô la cũng như đầu tư thời gian cho các giai đoạn nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng.

Các động vật Da gai (Echinoderm) trong đó có huệ biển phân bố khá phổ biến ở nhiều vùng biển trên toàn thế giới, đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm vì đối tượng này vẫn còn khá mới mẻ. Khoảng 25 loài huệ biển thuộc 16 chi từ lớp huệ biển được nghiên cứu trên tổng số 190 loài và chỉ được chấp nhận. Việt Nam thuộc vùng Thái Bình Dương có tới trên 3.260 km đường bờ biển và các vịnh, đảo rộng lớn là khu vực rất phong phú các loài sinh vật biển. Đây chính là tiềm năng, lợi thế của nước ta so với nhiều nước khác để tìm kiếm, nghiên cứu các hợp chất tiềm năng từ biển cả. Hiện có khoảng 60 loài huệ biển ở Việt Nam, tuy vậy vẫn chưa có một công trình nghiên cứu khoa học nào về thành phần hóa học cũng như HT SH của huệ biển được công bố.

Do đó, đề tài: “*Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758) và *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909) ở vùng biển Việt Nam*” được lựa chọn tiến hành.

Mục tiêu của luận án:

- Xác định được thành phần hóa học của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu thập tại vùng biển Việt Nam.

- Tìm kiếm các chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm có trong các loài nghiên cứu để ứng dụng vào nghiên cứu dược học.

Nội dung luận án bao gồm:

1. Phân lập các hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* ở vùng biển Việt Nam sử dụng các phương pháp sắc ký
2. Xác định CTHH của các hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu ở vùng biển Việt Nam
3. Đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất phân lập được
4. Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Sơ lược về các hợp chất thiên nhiên

1.1.1. Phân loại các hợp chất thiên nhiên

Hợp chất thiên nhiên (HCTN) là các chất hữu cơ từ động thực vật và vi sinh vật bắt nguồn chủ yếu từ sự chuyển hóa thứ cấp, theo nghĩa rộng hơn cũng từ sự chuyển hóa sơ cấp của chúng. Dựa vào đặc điểm về nguồn gốc có thể phân biệt hai nhóm HCTN – các chất chuyển hóa sơ cấp và các chất chuyển hóa thứ cấp [2].

Trong cơ thể sống, các hợp chất hóa học được tổng hợp và thoái biến nhờ một loạt các phản ứng, mỗi phản ứng được xúc tác bởi một enzym. Các quá trình này được gọi chung là sự chuyển hóa, bao gồm sự đồng hóa và sự dị hóa. Tất cả các sinh vật đều có các con đường chuyển hóa tương tự nhau, theo đó chúng tổng hợp và sử dụng một số loại chất hóa học thiết yếu như đường, amino acid, các nucleotid và các polyme bắt nguồn từ chúng (polysaccharid, protein, lipid, ARN, ADN...). Đó là sự chuyển hóa sơ cấp, các hợp chất thiết yếu cho sự sống sót và khỏe mạnh của sinh vật này là các chất chuyển hóa sơ cấp [2].

Ngoài ra, phần lớn sinh vật còn sử dụng các con đường chuyển hóa khác để sản xuất ra các hợp chất thường không có tính hữu dụng rõ ràng, chúng là các chất chuyển hóa thứ cấp, và các con đường tổng hợp và sử dụng chất này tạo thành sự chuyển hóa thứ cấp. Thuộc vào nhóm các chất chuyển hóa thứ cấp này là các hợp chất vòng thơm, terpen, steroid, alkaloid và các chất kháng sinh. Con đường chuyển hóa thứ cấp là một sản phẩm của bản chất di truyền của sinh vật như con đường chuyển hóa sơ cấp. Nếu như các chất chuyển hóa sơ cấp là những chất cơ bản và xuất hiện ở tất cả các sinh vật từ vi sinh vật đến động thực vật thì các chất chuyển hóa thứ cấp chỉ được tìm thấy ở các nhóm sinh vật nhất định hoặc thậm chí ở một số ít loài.

Không có ranh giới rõ ràng phân chia giữa các chất chuyển hóa sơ cấp và các chất chuyển hóa thứ cấp. Các đường phổ biến glucose, fructose, mannose được xếp vào nhóm các chất chuyển hóa sơ cấp, trong khi các đường hiếm như chalcose, streptose, mycaminose được phát hiện là thành phần của các chất kháng sinh lại xếp vào nhóm các chất chuyển hóa thứ cấp. Ngoài ra hai loại chuyển hóa này lại có mối

liên hệ với nhau. Sự chuyển hóa sơ cấp cung cấp một số lớn các phân tử nhỏ dùng làm nguyên liệu đầu cho tất cả các con đường chuyển hóa thứ cấp quan trọng.

1.1.2. Hợp chất thiên nhiên biển và các thuốc bắt nguồn từ sinh vật biển

Biển được biết đến như một nguồn dồi dào của các hợp chất hữu cơ phong phú. Điều kiện sống dưới biển sâu khắc nghiệt là tiền đề để tạo ra các chất có CTHH đa dạng và chưa từng được phát hiện ở các nguồn HCTN trên cạn. Đặc biệt, môi trường sống cạnh tranh khắc nghiệt dưới đại dương là yếu tố quan trọng kích thích các loài sinh vật biển tổng hợp các hoạt chất thứ cấp để tự bảo vệ và sinh sống trong cuộc đấu tranh sinh tồn giữa các loài. Các hoạt chất thứ cấp này có thể đóng vai trò như là “vũ khí” để chống lại kẻ thù hoặc thu hút các sinh vật khác để duy trì sự sống. Chính vì thế, các hoạt chất thứ cấp này thường có tác động trực tiếp lên cơ thể sống. Ngoài ra, các hoạt chất thường phải là những CTHH có HT SH mạnh ngay cả ở nồng độ thấp do bị pha loãng trong môi trường nước biển. Do vậy, các HCTN biển luôn được xem là nguồn các hợp chất có sự độc đáo về cấu trúc và HT SH quý giá.

Kể từ năm 2008, hơn 1000 hợp chất mới từ sinh vật biển được báo cáo mỗi năm, trong đó, bọt biển, sứa và vi sinh vật biển là các nguồn chính [3]. Dựa vào báo cáo và đánh giá số liệu, các nhà khoa học dự đoán rằng các hợp chất bắt nguồn từ biển có tỷ lệ tăng khoảng 10% mỗi năm [4]. Các HCTN biển đã được công bố là có nhiều HT SH như chống ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và kháng viêm [5], [6], [7].

Cho tới nay đã có 11 hợp chất bắt nguồn từ các loài sinh vật biển được phát triển thành công thành thuốc thương mại, với phần lớn được dùng để điều trị ung thư.

Cytarabine (arabinosyl cytosine, ara-C) là chất đầu tiên được FDA phê duyệt vào năm 1969 vẫn đang được sử dụng cho đến ngày nay để trị bệnh bạch cầu tủy cấp tính và bạch cầu lymphocytic cấp tính [1], [8]. Hợp chất này là một nucleoside được tìm thấy từ loài hải miên *Tectitethya crypta* vùng biển Caribe [9].

Vidarabine (arabinofuranosyladenine, ara-A) là hợp chất tương tự nucleoside bắt nguồn từ hải miên đã được FDA chấp thuận như một loại thuốc kháng vi rút vào năm 1976 để điều trị các bệnh nhiễm trùng do herpes và varicella vi rút zoster. Tuy nhiên, Vidarabine đã bị ngừng sản xuất ở Mỹ và châu Âu kể từ tháng 6 năm 2001.

Thuốc giảm đau Ziconotide (Prialt®) được tổng hợp từ một peptit ω -conotoxin MVIIA tìm thấy ở loài ốc nón *Conus magus* sống ở biển nhiệt đới. Năm 2004, Ziconotide được FDA chỉ định để điều trị các cơn đau mãn tính nghiêm trọng do tổn thương tủy sống [10], [11].

Trabectedin (Yondelis®) là một tetrahydroisoquinoline alkaloid bắt nguồn từ loài hải tiêu *Ecteinascidia turbinata* vùng Caribe được Cơ quan đánh giá Dược phẩm Châu Âu (EMA) phê duyệt vào năm 2007 để điều trị u mô mềm và điều trị ung thư buồng trứng vào năm 2009. Hợp chất này cũng được FDA phê duyệt năm 2015 như một loại thuốc chống ung thư [12], [13].

Eribulin mesylate là một dẫn xuất của macrolide halichondrin B từ hải miên *Halichondria okadai* của Nhật Bản. Thuốc này được FDA phê duyệt để điều trị ung thư vú di căn và liposarcoma vào năm 2009 [14].

Plitidepsin được phân lập từ loài hải tiêu *Aplidium albicans* đã được chứng minh là ức chế sự hoạt động của eEF1A2 (eukaryotic Elongation Factor 1 A2) – một protein biểu hiện quá mức trong các khối u ở người và có đặc tính gây ung thư, làm tăng sinh tế bào khối u trong khi ức chế quá trình apoptosis [15]. Cơ quan Quản lý Dược phẩm Úc đã phê duyệt việc kết hợp plitidepsin với dexamethasone để điều trị bệnh nhân đa u tủy vào năm 2018 [16].

Ba thuốc điều trị ung thư khác bắt nguồn từ biển là brentuximab vedotin, polatuzumab vedotin và enfortumab vedotin-ejfv là các liên hợp thuốc kháng thể (ADC: antibody-drug conjugate) của chất GĐTB chống phân bào monomethyl auristatin E (MMAE) - một dẫn xuất của dolastatin 10 nhận được từ động vật thân mềm *Dolabella auricularia*. Brentuximab vedotin là chất kết hợp giữa kháng thể đặc hiệu CD30 và MMAE được FDA công nhận vào tháng 11 năm 2018 để điều trị ung thư hạch tế bào T lớn và ung thư hạch Hodgkin [17], [18].

Polatuzumab vedotin là một ADC chứa một kháng thể đơn dòng đặc hiệu CD79b (thành phần thụ thể tế bào B) gắn với MMAE thông qua một liên kết có thể phân cắt. Sau khi liên kết với CD79b trên bề mặt tế bào B, Polatuzumab vedotin được xâm nhập vào bên trong, liên kết bị phân cắt và giải phóng MMAE vào trong tế bào ức chế sự phân chia và gây ra apoptosis. Thuốc này đã được sự chấp thuận của FDA vào tháng 6 năm 2019 để điều trị ung thư hạch tế bào B lớn [19].

Vào tháng 12 năm 2019, FDA đã phê duyệt cho enfortumab vedotin-ejfv là một ADC gồm kháng thể đơn dòng của người (AGS-22) đặc hiệu Nectin-4 được kết hợp với MMAE dùng điều trị cho bệnh nhân ung thư biểu mô di căn [20].

Lurbinectedin (Zepsyre®) là một dẫn xuất tổng hợp của trabectedin, có tác dụng chống ung thư thông qua sự ức chế quá trình phiên mã, làm đứt gãy DNA hoặc phân hủy RNA polymerase II [21]. Thuốc được FDA công nhận năm 2020 để điều trị ung thư phổi tế bào nhỏ di căn [22].

Một ADC khác là Belantamab mafodotin (Blenrep™) gồm monomethyl auristatin F (một trong những dẫn xuất của MMAE) được liên kết với kháng thể đặc hiệu BCMA (kháng nguyên trưởng thành tế bào B), thuốc được phê duyệt vào tháng 8 năm 2020 ở Hoa Kỳ dùng điều trị bệnh đa u tủy [23].

Ngoài ra, 22 hợp chất khác từ các sinh vật biển đang trong thời gian thử nghiệm lâm sàng I, II và III để phát triển thuốc [7]. Như vậy có thể thấy sinh vật biển là nguồn các hợp chất có HT SH quý giá và tiềm năng để nghiên cứu và phát triển nhiều loại thuốc trong tương lai để chữa trị nhiều bệnh trong đó ung thư và viêm là những căn bệnh đang rất phổ biến ở các nước.

1.2. Giới thiệu chung về ung thư

1.2.1. Ung thư và các phương pháp điều trị ung thư

Ngày nay mặc dù y học đã có nhiều tiến bộ vượt bậc tuy nhiên căn bệnh ung thư hàng năm vẫn cướp đi sinh mạng của hàng triệu người trên thế giới. Ung thư hiện là nguyên nhân dẫn đến tử vong đứng thứ hai sau bệnh tim mạch. Đây là một nhóm bệnh liên quan đến phân chia tế bào, trong đó có một số tế bào vượt khỏi kiểm soát, sự biệt hóa sinh lý và tiếp tục nhân số lượng lên. Chúng có thể xâm lấn, phá hoại các tổ chức xung quanh, di căn đến phát triển tiếp ở nhiều các cơ quan khác nhau để tạo nên khối u mới và gây tử vong do các biến chứng và rối loạn chức năng cơ thể [24].

Người ta biết được có đến hơn 200 loại ung thư khác nhau trên cơ thể người. Nguyên nhân gây ung thư có thể là do các tác nhân bên trong gồm yếu tố di truyền, yếu tố nội tiết tố hay các nguyên nhân bên ngoài bao gồm tác nhân vật lý, tác nhân hóa học hay các tác nhân sinh học. Theo các nghiên cứu dịch tễ học, trên 80% tác nhân sinh ung thư bắt nguồn từ môi trường sống và tỷ lệ rất nhỏ chỉ 1/10.000 ca ung thư có thể tự khỏi. Có thể ở những cơ thể cá biệt, hệ thống miễn dịch tự điều chỉnh,

tiêu diệt được các TB UT sau khi đã phát sinh. Nhưng cơ bản, ung thư nếu không điều trị sẽ sớm dẫn tới tử vong.

Hiện nay điều trị ung thư có nhiều phương pháp nhưng chủ yếu được chia làm hai nhóm: Phương pháp điều trị hệ thống và phương pháp điều trị tại chỗ [25], [26], [27].

1.2.1.1. *Phương pháp điều trị tại chỗ*

Đây là phương pháp tác động trực tiếp lên khối u của người bệnh theo hai cách: phẫu thuật cắt bỏ khối u hoặc sử dụng chùm tia có năng lượng cao tác động vào khối u giúp tiêu diệt, hạn chế sự phát triển của TB UT (Xạ trị). Phương pháp này vẫn là phương pháp chủ yếu và cơ bản nhất trong điều trị ung thư nhưng thường chỉ thực hiện với những người bệnh phát hiện sớm, TB UT chưa di căn.

1.2.1.2. *Phương pháp điều trị hệ thống*

Hiện nay khoảng 1/3 số bệnh nhân ung thư khi được khám phát hiện bệnh còn ở giai đoạn tại chỗ chưa di căn nên có thể chỉ cần điều trị bằng phương pháp tại chỗ. Nhưng 2/3 số bệnh nhân ung thư khi phát hiện đã ở giai đoạn muộn và di căn. Những trường hợp này cần có phương pháp điều trị hệ thống để đạt hiệu quả cao nhất. Ngày nay, phương pháp này càng được quan tâm nhiều hơn do nhu cầu tìm kiếm các thuốc chống ung thư mới hiệu quả mà ít tác dụng phụ. Điều trị hệ thống gồm ba phương pháp sau:

➤ *Phương pháp hóa chất:*

Phương pháp hóa trị (hóa chất) trong điều trị ung thư là phương pháp sử dụng các chất hóa học GĐTB để tiêu diệt các TB UT. Hóa trị thường được phối hợp với phương pháp khác trong phác đồ điều trị ung thư như hóa trị để làm giảm kích thước khối u trước khi phẫu thuật hoặc sử dụng sau các phương pháp khác để ngăn ngừa TB UT phát triển hay di căn.

Tuy nhiên mỗi TB UT lại nhạy cảm với một số hóa chất riêng và các thuốc điều trị ung thư thường hiệu quả đặc trị kém. Các thuốc này không chỉ gây độc tới TB UT mà tác động tới cả các tế bào lành như tế bào biểu mô đường tiêu hóa, do đó thường gây ra các hiện tượng tiêu chảy, táo bón, buồn nôn...

➤ *Phương pháp điều trị nội tiết*

Điều trị nội tiết là phương pháp ngăn chặn và loại bỏ các hormone nhằm kìm hãm sự phát triển của các khối u. Liệu pháp này có thể sử dụng thuốc đường uống,

tiêm hoặc đôi khi phải cắt bỏ tuyến hormone liên quan. Phương pháp này mới chỉ phát triển trong khoảng vài chục năm trở lại đây dựa trên những hiểu biết về hệ thống miễn dịch của cơ thể ngày càng tiến bộ.

Một số bệnh ung thư được áp dụng điều trị nội tiết phổ biến hiện nay như ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư tuyến giáp, ung thư nội mạc tử cung, ung thư buồng trứng... là các bệnh thường liên quan tới việc sản xuất hormone quá mức.

➤ *Phương pháp điều trị sinh học*

Liệu pháp sinh học trong điều trị bệnh ung thư là phương pháp sử dụng biện pháp sinh học hoặc các thuốc theo hai cách chính: một là trực tiếp tác động vào quá trình phát triển hoặc di căn của TB UT để chống u, hai là gián tiếp kích hoạt các tế bào trong hệ miễn dịch chống lại TB UT.

Phương pháp này có thể được sử dụng đơn lẻ để điều trị hoặc phối hợp với một số phương pháp đã nêu trên. Điều trị sinh học được coi là an toàn, ít gây ra các phản ứng phụ hơn nên đang là hướng quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu hiện nay trên thế giới.

1.2.2. *Mối liên hệ giữa apoptosis và ung thư*

Các tế bào bình thường luôn có vòng đời nhất định, sinh ra, lớn lên và phân chia để hình thành tế bào mới. Các tế bào cũ sẽ dần già đi hoặc bị tổn hại, chết đi để đảm bảo sự cân bằng nội mô. Tuy nhiên, khác với tế bào thường, các TB UT lại không tự chết đi mà phân chia, nhân lên vô độ, có thể xâm lấn sang các tổ chức xung quanh.

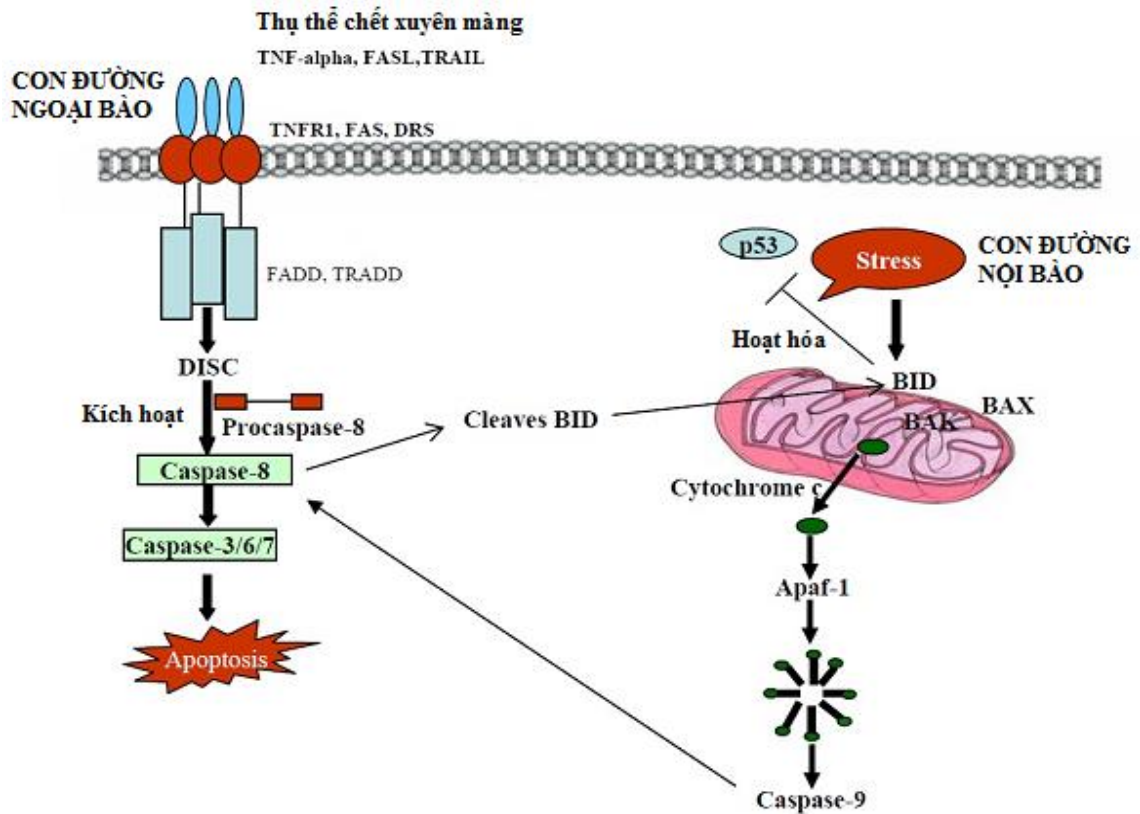
Apoptosis là quá trình lập trình gây chết tế bào xảy ra ở các sinh vật đa bào [28]. Trái ngược với hoại tử, một dạng chết tế bào do chấn thương tế bào cấp tính, apoptosis là một quá trình được kiểm soát chặt chẽ, tạo ra lợi thế trong vòng đời của sinh vật. Quá trình apoptosis khiếm khuyết liên quan đến rất nhiều loại bệnh bao gồm các bệnh thoái hóa thần kinh, rối loạn tự miễn dịch và ung thư. Nó vừa là nguyên nhân gây bệnh nhưng cũng là giải pháp chữa bệnh nhận được quan tâm của nhiều nhà khoa học. Ngay từ những năm 1970, nhóm tác giả Kerr và đồng nghiệp đã nghiên cứu mối liên quan giữa quá trình apoptosis tới loại bỏ những tế bào ác tính tiềm ẩn, tăng sinh và phát triển khối u [29]. Hiện nay, apoptosis vẫn được cho là đóng vai trò chính trong liệu pháp chống ung thư. Tổn thương tế bào thường dẫn

tới sự ngừng tăng trưởng và ức chế khối u bằng cách gây ra apoptosis, hoại tử và lão hóa. Việc tìm những hợp chất có thể tác động vào các đích trong quá trình apoptosis nhằm kích hoạt TB UT chết theo chương trình đã và đang tiếp tục phát triển.

Tế bào trải qua quá trình apoptosis sẽ biến đổi về hình thái: tế bào bị co rút lại, nhân tế của bào bị phân mảnh, các nhiễm sắc chất bị cô đặc lại tối đa. Người trưởng thành trung bình mất từ 50 đến 70 tỷ tế bào mỗi ngày do quá trình apoptosis. Đối với một đứa trẻ ở độ tuổi từ 8 đến 14 tuổi, trung bình khoảng 20 đến 30 tỷ tế bào chết mỗi ngày. Hiện tượng giảm apoptosis hoặc ức chế apoptosis giữ vai trò rất quan trọng trong việc sinh ung thư. Một tế bào ác tính có thể làm giảm apoptosis hoặc ức chế apoptosis theo ba cơ chế sau: phá vỡ sự cân bằng của các protein tiền apoptosis và chống apoptosis; làm giảm chức năng của caspase và làm giảm tín hiệu của thụ thể chết [30].

Các caspase là một trong các thành tố quan trọng để bắt đầu và thực hiện quá trình apoptosis. Do đó, mức độ thấp của caspase hoặc suy giảm chức năng caspase có thể dẫn đến giảm quá trình apoptosis và sinh ung thư. Các caspase có thể được phân loại thành hai nhóm: (1) nhóm liên quan đến caspase-1 (ví dụ: caspase-1, -4, -5, -13, và -14) và chủ yếu tham gia vào quá trình xử lý cytokine trong quá trình viêm; (2) nhóm giữ vai trò trung tâm trong apoptosis (ví dụ: caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 và -10). Nhóm (2) có thể phân nhỏ hơn thành nhóm các caspase khởi tạo (ví dụ: caspase-2, -8, -9 và -10) chịu trách nhiệm chính cho việc bắt đầu con đường apoptosis và nhóm các caspase phản ứng (caspase-3, -6 và -7) chịu trách nhiệm trong quá trình phân chia thực tế của các thành phần tế bào trong quá trình apoptosis [31].

Ở các động vật có vú có hai cách chính để kích hoạt caspase apoptosis liên quan bao gồm (1) con đường ngoại bào hay con đường thông qua thụ thể chết (extrinsic pathway), (2) con đường nội bào hay con đường qua trung gian ty thể (intrinsic pathway) (Hình 1.1). Ngoài ra còn một con đường thứ (3) ít phổ biến hơn là con đường lưới nội chất nội bào.



Hình 1.1. Sơ đồ minh họa các con đường apoptosis ngoại bào và nội bào [32]

➤ *Con đường apoptosis ngoại bào*

Con đường apoptosis ngoại bào bắt đầu ở bên ngoài tế bào, khi các điều kiện môi trường ngoại bào xác định một tế bào phải chết. Dựa trên các kích thích ngoại bào và bản chất của các thành phần liên quan, con đường apoptosis ngoại bào có thể chia làm hai loại, một loại liên quan đến hệ thống các thụ thể và một loại được kích hoạt bởi stress gây độc tế bào. Con đường qua trung gian thụ thể được khởi động bởi sự kích hoạt thụ thể chết là các protein xuyên màng như yếu tố hoại tử khối u (TNFR), bao gồm TNFR-1, Fas/CD95 và TRAIL (các thụ thể gây ra quá trình chết liên quan đến yếu tố hoại tử khối u), thụ thể DR-4 và DR-5. Họ thụ thể này chịu trách nhiệm cho các phản ứng sinh học đa dạng như viêm, chống tăng sinh, chống vi-rút và chết tế bào. Các phân tử chuyển đổi như FADD (Fas-Associated via Death Domain), TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Associated Death Domain) làm hoạt hoá trực tiếp các thụ thể tạo thành một phức hợp tín hiệu gây chết DISC (deathinducing signaling complex) ở bề mặt tế bào chất của màng bào tương. Phức hợp này kích hoạt tự động caspase khởi phát, tiền caspase-8. Caspase-8 hoạt động sau đó kích hoạt caspase-3, -6 và -7, phân giải protein chất nền dẫn đến tế bào tự chết [32].

Trong một cơ chế khác, tín hiệu từ thụ thể được kích hoạt không tạo ra tín hiệu caspase đủ mạnh để tự thực hiện quá trình apoptosis. Trong trường hợp này, tín hiệu cần được khuếch đại thông qua con đường apoptotic phụ thuộc vào ty thể, caspase-8 làm trung gian cho sự phân cắt protein tiền apoptotic (BID), sau đó giải phóng các yếu tố proapoptotic của ty thể liên kết con đường ngoại bào với con đường nội bào (Hình 1.1.)

➤ *Con đường apoptosis nội bào*

Con đường apoptosis nội bào bắt đầu khi một chấn thương xảy ra trong tế bào như tổn thương DNA, đột biến gen gây ung thư, stress oxy hóa... Khi nhận được các tín hiệu này, các protein proapoptotic trong tế bào chất BAX và BID sẽ liên kết với màng ngoài ty thể. BAK là một loại protein proapoptotic khác cư trú trong ty thể, tương tác với BAX và BID giải phóng Cytochrom c và các yếu tố proapoptotic ty thể khác vào bào tương dựa trên tính thấm hóa của màng ty thể MNP (Mitochondrial Membrane Permeabilization). Cytochrom c hoạt hóa yếu tố protease apoptotic Apaf-1 với sự có mặt ATP hoặc dATP của để hình thành phức hợp apoptosome. Phức hợp này kích hoạt caspase khởi đầu, tiền caspase-9. Caspase-9 được kích hoạt sau đó sẽ tiếp tục hoạt hóa caspase liên quan như caspase-3, caspase-7 và caspase-6, cuối cùng dẫn đến chết tế bào - apoptosis.

Khác với con đường apoptosis ngoại bào, protein p53 là một yếu tố kích hoạt quan trọng của con đường nội bào có tác dụng ức chế khối u là một cảm biến của stress tế bào. P53 bắt đầu quá trình chết theo chương trình bằng cách phiên mã kích hoạt BAX proapoptotic và những chất chống apoptosis thuộc họ protein Bcl2 [32].

BAX, BID, BAK không phải là tác nhân duy nhất có khả năng xúc tác MMP để giải phóng những yếu tố tiền apoptosis. Các tác nhân khác như Ca^{2+} , ceramide, ROS hoặc một số protease có thể cũng có khả năng này. Ngoài ra, MMP có thể lập trình một tế bào đi vào apoptosis ngay cả khi các caspase không được hoạt hóa. Cái chết không phụ thuộc caspase này có thể xảy ra do ty thể mất chức năng phục hồi phóng thích các chất tác động cái chết không phụ thuộc caspase gồm endonuclease G và yếu tố gây ra apoptosis AIF (apoptosis inducing factor). Cả hai chất này đi từ tế bào chất đến nhân làm đứt gãy DNA và cô đặc chất nhiễm sắc.

Caspase-3 được xem là có vai trò quan trọng bậc nhất trong apoptosis vì nó được kích hoạt bởi bất kì caspase khởi đầu nào (caspase-8, caspase-9, caspase-10) trong cả hai con đường apoptosis nội bào và ngoại bào [33].

1.3. Giới thiệu về bệnh viêm

1.3.1. Cơ chế của quá trình viêm

Viêm là căn bệnh rất phổ biến, thường gặp ở nước ta cũng như các nước trên thế giới hiện nay. Viêm là phản ứng của hệ thống miễn dịch đối với các kích thích có hại như mầm bệnh, tế bào bị tổn thương, các hợp chất độc hại hoặc chiếu xạ [34]. Đó vừa là các phản ứng bảo vệ của cơ thể kháng lại các yếu tố gây bệnh, cũng là phản ứng bệnh lý bởi vì quá trình viêm có thể gây nên hoại tử, các tổn thương hay rối loạn chức năng cơ quan. Thông thường, trong phản ứng viêm cấp tính, các tương tác giữa tế bào và phân tử sẽ giảm thiểu tổn thương hoặc nhiễm trùng sắp xảy ra. Quá trình giảm thiểu này góp phần phục hồi cân bằng nội môi của mô và giảm dần viêm cấp tính. Tình trạng viêm cấp tính không kiểm soát được có thể gây nên viêm mãn tính và nhiều bệnh khác như tim mạch, tiểu đường, ung thư... [35].

Nguyên nhân của bệnh viêm có thể là do nhiễm trùng hoặc các yếu tố không lây nhiễm như chấn thương, tác nhân hóa, lý... Ở cấp độ mô, viêm được đặc trưng bởi các dấu hiệu đỏ, sưng, nóng, đau và mất chức năng mô, là kết quả của phản ứng miễn dịch [36]. Các thay đổi xảy ra trong quá trình viêm bao gồm sự thay đổi tính thấm thành mạch, tập trung và tích tụ bạch cầu, đồng thời giải phóng ra những chất trung gian gây viêm [37]. Để đáp ứng với tổn thương mô, cơ thể bắt đầu truyền một dòng tín hiệu hóa học kích thích các phản ứng nhằm chữa lành các mô bị ảnh hưởng. Những tín hiệu này kích hoạt sự điều hòa của bạch cầu từ hệ tuần hoàn chung đến các vị trí bị tổn thương. Các bạch cầu được hoạt hóa này giải phóng các cytokine tham gia vào phản ứng viêm [7].

Phản ứng viêm là sự hoạt hóa phối hợp của các con đường tín hiệu điều chỉnh mức độ chất trung gian gây viêm trong các tế bào nội mô và các tế bào viêm từ máu [38]. Mặc dù các quá trình phản ứng viêm phụ thuộc vào bản chất chính xác của sự kích thích ban đầu và vị trí của nó trong cơ thể nhưng chúng đều có chung một cơ chế được tóm tắt theo các bước như sau: (1) các cơ quan thụ cảm trên bề mặt tế bào nhận diện các kích thích bất lợi; (2) kích hoạt các con đường truyền tín

hiệu viêm; (3) các tín hiệu viêm được giải phóng và (4) các tế bào viêm được tập chung [39].

1.3.2. Các yếu tố chính tham gia vào quá trình viêm

1.3.2.1. Các cytokine

Khi phản ứng viêm xảy ra, nhiều dạng tế bào sẽ được kích hoạt và tập trung đến khu vực viêm như các tế bào lympho, tế bào bạch cầu đa nhân, đơn nhân, tiểu cầu... Các tế bào này giải phóng ra các cytokine là các protein hay glycoprotein hoà tan tham gia vào các phản ứng viêm và miễn dịch.

Các cytokine đóng vai trò truyền thông tin giữa các tế bào bạch cầu với nhau cũng như giữa các tế bào khác với các bạch cầu. Đa phần các cytokine được gọi là interleukin trên cơ sở vai trò của chúng trong việc truyền thông tin giữa các tế bào bạch cầu. Các cytokine được phân loại dựa vào nguồn gốc của tế bào phân tiết và kết quả xét nghiệm sinh học. Chúng được phân làm các interleukine, interferon, cytotoxin, growth factor (yếu tố kích thích tăng trưởng) và chemokine. Có hơn 100 các yếu tố khác nhau trong cytokine đã được biết đến, trong đó có 22 loại interleukin và TNF như: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39, IL-40, IL-41, IL-42, IL-43, IL-44, IL-45, IL-46, IL-47, IL-48, IL-49, IL-50, IL-51, IL-52, IL-53, IL-54, IL-55, IL-56, IL-57, IL-58, IL-59, IL-60, IL-61, IL-62, IL-63, IL-64, IL-65, IL-66, IL-67, IL-68, IL-69, IL-70, IL-71, IL-72, IL-73, IL-74, IL-75, IL-76, IL-77, IL-78, IL-79, IL-80, IL-81, IL-82, IL-83, IL-84, IL-85, IL-86, IL-87, IL-88, IL-89, IL-90, IL-91, IL-92, IL-93, IL-94, IL-95, IL-96, IL-97, IL-98, IL-99, IL-100. Đáp ứng viêm bình thường là sự điều hoà quá trình tập trung, kết dính, xuyên mạch, hoá hướng động, thực bào của các bạch cầu đa nhân trung tính và tiêu diệt các vi khuẩn xâm nhập. Các quá trình này được kiểm soát chặt chẽ thông qua sự điều hoà các cytokine phóng thích bởi các đại thực bào được hoạt hoá. Trong hội chứng đáp ứng viêm hệ thống, phản ứng viêm phụ thuộc vào nồng độ của các cytokine [40].

IL-6 là một cytokine được giải phóng bởi nhiều loại tế bào, không những được sản sinh từ đại thực bào hoạt động mà còn bắt nguồn từ các tế bào T, B, tế bào gốc tuỷ xương, nội mạc thành mạch, nguyên sợi bào, tế bào keratin. IL-6 có tác dụng ở hầu hết các tế bào, giữ vai trò rất quan trọng trong biệt hoá tế bào B thành các tế bào tạo kháng thể, tập hợp các bạch cầu đã được biệt hoá, kích thích gan sản xuất các protein trong giai đoạn cấp tính của bệnh. Mặc dù chủ yếu được coi là một tác nhân gây viêm, IL-6 cũng có hoạt tính kháng viêm. IL-6 hoạt hoá các tế bào lympho, tăng sản xuất kháng thể [41].

IL-12 là một cytokine heterodimeric (dimer dị thể), mã hoá bởi hai gen riêng biệt IL-12A và IL-12B, được sản sinh từ các tế bào trình diện antigen chính như

monocyte, đại thực bào, tế bào răng cưa, tế bào B, tế bào keratin. IL-12 đóng vai trò trung tâm đối với khởi đầu và điều tiết của các tế bào miễn dịch [42], [43].

TNF- α (yếu tố gây hoại tử α) là một cytokine bắt nguồn chủ yếu từ các đại thực bào, giữ vai trò rất quan trọng trong cơ chế đáp ứng của các cơ quan trong cơ thể với các tổn thương và nhiễm trùng. TNF- α có cấu tạo trimer đồng thể được phân tiết từ đại thực bào, tế bào T, tế bào B, nguyên sợi bào. Chúng có tác động sinh học trên hầu hết các tế bào có nhân và có thể ở dạng hòa tan trong dịch chất hoặc ở dạng liên kết trên bề mặt màng. Nó có tác dụng gây độc trực tiếp đối với TB UT mà không có tác dụng đối với các tế bào bình thường. TNF- α không chỉ có tác dụng gây hoại tử khối u mà nó còn giữ vai trò rất quan trọng đối với sự phát triển của một đáp ứng viêm hữu hiệu, có tác dụng thanh lọc các tác nhân gây bệnh khác nhau xâm nhập vào cơ thể.

1.3.2.2. *Yếu tố nhân kappa B (NF- κ B)*

NF- κ B là yếu tố sao mã cân bằng thiết giữ vai trò kiểm soát sự biểu hiện gen mã hoá của các cytokine tiền viêm trong sinh lý của bệnh viêm, được bắt gặp ở nhiều loại tế bào. NF- κ B có thể được hoạt hoá bởi nhiều tín hiệu viêm khác nhau, dẫn tới sự biểu hiện phối hợp của các gen quy định nhiều cytokine, chemokine, các enzyme và các tế bào kết dính. NF- κ B gây tác động đến các gen quy định: các cytokine, các chemokine có lợi đối với quá trình viêm, các enzyme gây sản sinh các chất trung gian của quá trình viêm, các thụ thể miễn dịch, cũng như các phân tử dính kết có vai trò máu chốt trong sự tập hợp ban đầu các bạch cầu đến các vị trí viêm. Ở bệnh lý viêm, TNF- α có thể hoạt hóa NF- κ B và sau đó NF- κ B đóng vai trò như một yếu tố điều hoà gen quan trọng trên các gen liên quan tới nhiễm trùng, viêm và đáp ứng miễn dịch như IL-1B, iNOS, TNF- α và IL-6. NF- κ B từ lâu đã được coi là như là một đích cho các loại thuốc kháng viêm mới. NF- κ B không điều tiết sản xuất các cytokine tiền viêm, bạch cầu trung tính hoặc tế bào, mà đóng góp quan trọng đối với các phản ứng viêm. Tuy nhiên, các chức năng chống sự chết đi của tế bào của NF- κ B có thể vừa bảo vệ chống viêm vừa duy trì các phản ứng viêm thông qua hoạt hoá các bạch cầu.

1.3.2.3. *Nitric oxide (NO)*

NO là một yếu tố trung gian tiền viêm và cũng là một phân tử tín hiệu giữ vai trò rất quan trọng đối với quá trình hình thành bệnh viêm. NO có liên quan tới đáp

ứng miễn dịch tạo ra bởi các tế bào đại thực bào kích hoạt cytokine. Nó mang lại hiệu quả chống viêm trong điều kiện sinh lý bình thường.

Hiện nay, NO được biết đến là một trong các gốc tự do đơn giản nhất và đóng vai trò tín hiệu trung gian rất quan trọng trong cơ thể [44], [45]. NO tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý chẳng hạn như sự trương lực mạch máu, dẫn truyền thần kinh, kết tập tiểu cầu, sự co cơ, chuyển hóa, đáp ứng miễn dịch, quá trình biến đổi sau dịch mã của protein, phiên mã gen và dịch mã mRNA [45], [46].

Về đặc điểm cấu trúc và tính chất vật lý, NO là một gốc khí tự do nhỏ, không màu, nặng 30 Dalton, trong cấu trúc của nó có một electron tự do [45], [47]. Trong con đường tín hiệu của NO, một đặc tính quan trọng là nó có khả năng tạo phản ứng với các nguyên tố kim loại để tạo ra nitrosyl kim loại. Bên cạnh đó, NO kém tan trong nước, có thể dễ vượt qua màng tế bào để tham gia điều hòa các quá trình sinh lý. Tuy nhiên, khí này không bền cùng với thời gian bán thải ($T_{1/2}$) ngắn sẽ bị chuyển hóa nhanh trong cơ thể [45].

Những tác dụng không mong muốn của NO: nồng độ NO cao gây nên chứng viêm quá mức. NO còn tác động vào quá trình sinh bệnh viêm khớp, viêm ruột và viêm phổi. Do vậy, ức chế NO là sự tiến bộ quan trọng trong quá trình điều trị các bệnh viêm. Những tác dụng không mong muốn của NO là khiếm khuyết của quá trình sinh ra nó, bao gồm gây co mạch, viêm và tổn thương mô [48], [49].

Phản ứng đáp ứng viêm được khởi nguồn từ sự xâm nhập của mầm bệnh hay sự tổn thương mô gây ra từ các gốc tự do, là một chuỗi các phản ứng trong mạch và tế bào. Một số chất trung gian hoá học quan trọng gây viêm là interleukin IL-6, IL-1, IL-12, prostaglandin, TNF- α ... Các thuốc kháng viêm đều nhằm mục tiêu là hạn chế sự tạo ra các cytokine tiền viêm này [43].

1.3.3. Ức chế sự biểu hiện iNOS và COX-2 trong nghiên cứu hoạt tính kháng viêm

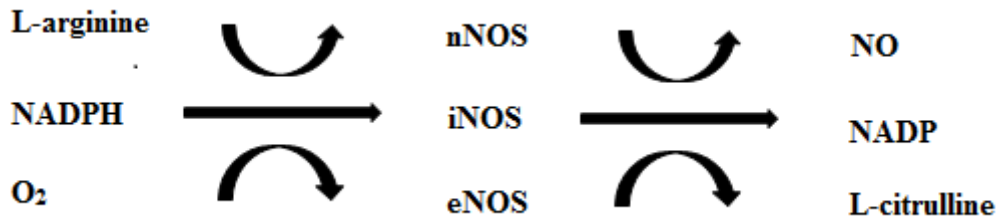
1.3.3.1. Enzyme iNOS

Trong cơ thể, NO được tạo ra thông qua hai con đường:

Con đường thứ nhất để tạo ra NO là thông qua phản ứng khử NO_2^- , phản ứng này được xúc tác bởi các enzym NO_2^- reductase ví dụ như các enzym chứa molybden (xanthin oxidase), NOS (Nitric oxide synthase) và nhiều thành phần của chuỗi vận chuyển điện tử ti thể. Phản ứng khử NO_2^- đóng vai trò quan trọng khi

thiếu oxy, khi đó hoạt động của NOS sẽ bị giới hạn. NO được chuyển hóa thông qua quá trình oxy hóa để tạo ra NO_2^- và NO_3^- trong cơ thể. Quá trình này có thể được xúc tác hoặc tự xảy ra. Trong stress oxy hóa, một phần NO bị bất hoạt, superoxid (O_2^-) kết hợp với NO để tạo ra peroxynitrit (ONOO^-) [45], [46].

Con đường thứ hai là thông qua các enzym NOS, enzym xúc tác cho phản ứng hình thành NO và L-citrullin từ O_2 và L-arginin [46].



Hình 1.2. Con đường hình thành NO từ các NOS

NOS ở động vật có vú có ba dạng chính bao gồm: NOS loại 1 hay NOS thần kinh (nNOS); NOS loại 2 hay NOS cảm ứng (iNOS) và NOS loại 3 hay NOS nội mạc (eNOS) (xem Bảng 1.1). Hai trong số các enzym NOS (nNOS và eNOS) là các thành phần được biểu hiện trong tế bào động vật có vú và tổng hợp NO theo phản ứng để tăng nồng độ canxi trong tế bào. Tuy nhiên trong một vài trường hợp, chúng có thể làm tăng sự giải phóng NO một cách gián tiếp, khi đáp ứng lại các kích thích như shear stress [49].

Hoạt động của iNOS không phụ thuộc vào nồng độ canxi trong tế bào; tuy nhiên hoạt động của nó giống như tất cả các đồng dạng NOS là phụ thuộc vào sự gắn kết của calmodulin. Nồng độ canxi trong tế bào tăng dẫn đến tăng nồng độ calmodulin và tăng liên kết của calmodulin với các eNOS và nNOS dẫn đến tăng sự tạo ra NO bởi các enzym này. Ngược lại với eNOS và nNOS, iNOS có thể liên kết chặt chẽ với calmodulin ngay cả ở nồng độ canxi trong tế bào rất thấp. iNOS được biểu hiện trong nhiều tế bào sau khi tiếp xúc với các tác nhân kích thích như các cytokine gây viêm ví dụ interleukin-1 (IL-1); yếu tố hoại tử khối u (TNF) và lipopolysaccharide (LPS); khi được biểu hiện, cảm ứng enzyme liên kết với calmodulin và tạo ra NO. Việc tạo ra NO bởi iNOS tồn tại lâu hơn nhiều so với các dạng đồng dạng khác của NOS, và có xu hướng tạo ra nồng độ NO cao hơn nhiều trong tế bào [49], [50].

Vì vậy ức chế sản sinh NO thông qua việc ức chế iNOS là một hướng đáng quan tâm để nghiên cứu trong việc sàng lọc các hợp chất có tác dụng kháng viêm hiện nay.

Bảng 1.1. Các dạng của NOS

Các dạng NOS	NOS-1	NOS-2	NOS-3
Tên phổ biến	nNOS (Neuronal NOS)	iNOS (Inducible NOS)	eNOS (Endothelial NOS)
Tế bào phổ biến	Neuron thần kinh và một số tế bào khác	Nhiều loại tế bào hệ thống miễn dịch như đại thực bào khi đáp ứng với lypopolysaccharid (LPS), cytokine và các chất khác	Tế bào nội mô
Gen	NST 12, 29 exon	NST 17, 26 exon	NST 7, 26 exon
Đặc điểm	Enzym cấu trúc	Enzym cảm ứng	Enzym cấu trúc
Chức năng và các quá trình sinh học	Ở hệ thần kinh trung ương: Có liên quan tới quá trình học tập, ghi nhớ; điều hòa huyết áp trung ương. Ở hệ thần kinh ngoại vi: Chất dẫn truyền thần kinh, giãn cơ trơn và mạch.	Tham gia vào sinh lý bệnh của quá trình viêm và hệ thống miễn dịch	Tham gia vào nhiều chức năng tim mạch quan trọng: Giãn mạch, điều hòa huyết áp, bảo vệ mạch máu, chống xơ vữa động mạch.

1.3.3.2. Enzyme COX-2

Bên cạnh nitric oxide synthase (NOS), Cyclooxygenase (COX) là một trong hai họ isoenzyme quan trọng có liên quan đến quá trình viêm.

Cyclooxygenase còn có tên gọi là Prostaglandin Endoperoxide Synthase (PGHS, EC1.14.99.1), xúc tác chuyển đổi axit béo Arachidonic Acid thành PGG₂, sau đó được chuyển thành PGH₂. Nó là một tiền chất cho một loạt các prostaglandin 2-series (PGs), thromboxan (TXA₂) và prostacyclin (PGI₂) được tạo ra thông qua các phản ứng xúc tác bởi enzyme [51]. Sự kìm hãm hoạt động của các enzyme cyclooxygenase COX-1 và COX-2, làm giảm tổng hợp các prostaglandin (PG-yếu tố trung gian quan trọng nhất gây nên phản ứng viêm) [52]. Trong phản ứng viêm, các PG còn làm khuếch đại các phản ứng viêm thông qua tăng cường và kéo dài các tín hiệu gây ra bởi các chất tiền viêm.

Về cơ bản COX có hai đồng dạng là COX-1 và COX-2. Enzym COX-1 được bắt gặp ở hầu hết các loại tế bào nhưng nhiều nhất ở thành mạch máu, dạ dày và thận. Vai trò của COX-1 là bảo vệ niêm mạc dạ dày, điều hòa sự kết tập tiểu cầu và trương lực mạch máu, là tín hiệu tăng cường và truyền cảm giác đau, điều chỉnh lưu lượng và tốc độ lọc máu thận.

Ngược lại với COX-1, COX-2 là một enzym cảm ứng, trong các mô bình thường nó không biểu hiện hoặc chỉ biểu hiện rất thấp. Khi chịu tác động kích thích của hormon, các yếu tố tiền viêm và yếu tố tăng trưởng, sự biểu hiện của COX-2 tăng lên đáp ứng để sản sinh ra các PG gây viêm từ đó tham gia vào quá trình hình thành bệnh viêm. Hoạt động của enzyme COX-2 có liên quan đến một số bệnh viêm mãn tính như hen suyễn, viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, xơ vữa động mạch, bệnh Alzheimer, bệnh viêm cấp tính và một số bệnh ung thư. Hoạt động này dựa trên phản ứng viêm bao gồm sự giãn mạch, tăng tính thấm thành mạch, hình thành mạch, miễn cảm tế bào thần kinh của các mô xung quanh, giãn phế quản, kết dính tế bào và tăng sinh tế bào [51]. Sự biểu hiện của COX-2 tăng đã được ghi nhận trên các mô hình gây viêm khớp ở động vật thí nghiệm cũng như tìm thấy trong hoạt dịch của bệnh nhân bị bệnh viêm khớp dạng thấp [53], [54]. Do đó, COX-2 trở thành đích phân tử và xu hướng nghiên cứu của các thuốc chống viêm không steroid hiện nay.

1.4. Giới thiệu chung về huệ biển

Ngành Da gai (Echinoderm) được chia làm 5 lớp: **Crinoidea** (Huệ biển), **Asteroidea** (Sao biển), **Holothuroidea** (Hải sâm), **Ophiuroidea** (Đuôi rắn) và **Echinoidea** (Nhím biển).

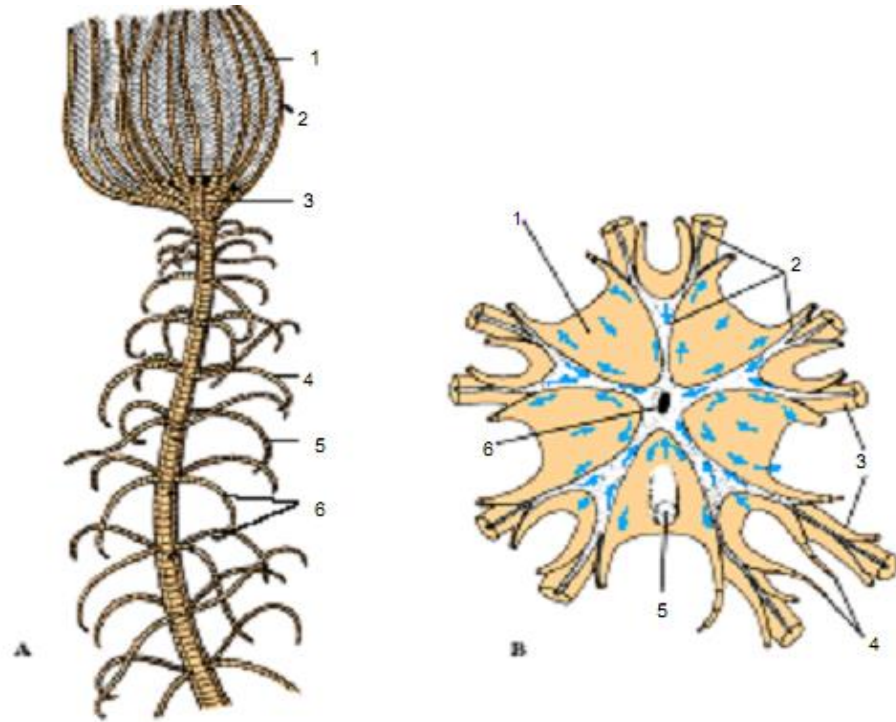
Cho đến nay, động vật da gai cổ nhất còn tồn tại chính là huệ biển, với khoảng 5000 loài đã hoá thạch và hơn 700 loài hiện sống (khoảng 100 loài có cuống và khoảng 600 loài không cuống). Các loài huệ biển có cuống xuất hiện trước, còn các loài không có cuống xuất hiện sau (đầu kỷ Jura). Huệ biển thường sống bám vào các tảng đá hoặc sống dưới đáy đại dương. Ở vùng biển nước ta, hiện ghi nhận khoảng 60 loài thuộc lớp huệ biển, trong đó các họ Comasteridae, Himerometridae, Mariometridae có số lượng loài nhiều hơn [55].

1.4.1. Cấu tạo cơ thể

Huệ biển sống dưới hai dạng, dạng bám với cuống dài chiếm phần lớn và chỉ một số ít loài sống dạng tự do (Hình 1.3A).

Ở các loài huệ biển sống bám, cơ thể được phân ra ba phần gồm đế bám, cánh (gồm đài hình đĩa cùng với các tua dài) và cuống. Đế là phần rễ bám chắc vào giá thể. Cuống bao gồm nhiều đốt khớp lại, có thể cử động được nhờ có hệ cơ điều khiển. Phần đài có hình đĩa, ở giữa đáy là đĩa trung tâm (tấm lưng) từ đó xuất phát các tay. Huệ biển có năm cánh tay tỏa tròn, mỗi cánh có chia đôi nhiều lần để hình thành lên số lượng cánh tay là bội số của 5 (10, 20, 40...). Các tay này khớp động với tấm lưng và có khả năng tái sinh cao và có thể dễ dàng cắt rời. Có 2 dãy gai trên cánh tay, giữa các cánh tay về phía trên là mặt miệng. Trên mặt miệng có lỗ miệng, lỗ hậu môn và các rãnh tỏa tròn tới các cánh tay [55]. Các loài huệ biển sống tự do có cấu trúc cơ thể bị mất phần cuống, có nhiều cành cong xếp tỏa tròn quanh tấm lưng. Phân loại huệ biển dựa trên hình thái và số lượng của gai cánh, đặc điểm các tấm xương (Hình 1.3).

Hệ thống ống dẫn nước gồm có vòng quanh miệng và năm ống tỏa tròn có nhánh tới các gai cánh. Từ vòng ống dẫn nước quanh miệng có nhiều (hoặc 5) ống đá mảnh treo trong thể xoang. Thể xoang tương tác với nước xung quanh nhờ vào hàng trăm lỗ nhỏ bao quanh miệng. Phần này tương đương với tấm sàng của các loài động vật da gai khác. Huệ biển di chuyển chủ yếu nhờ vào hoạt động của các cánh tay để di chuyển.



Hình 1.3. Cấu tạo huệ biển [55]

A. Toàn bộ thân: (1) Sợi tua; (2) Tay; (3) Đài; (4) Cánh; (5) Cuống; (6) Tấm xương

B. Nhìn mặt miệng: (1) Vùng gian phóng xạ; (2) Rãnh chân ống; (3) Tay; (4) Sợi tua; (5) Hậu môn; (6) Miệng

Ống tiêu hoá đi từ từ lỗ miệng, sang thực quản, tiếp đó là ruột uốn cong, cuộn khúc rồi đến hậu môn nằm cùng một phía với miệng.. Thức ăn chủ yếu của huệ biển là các động vật nhỏ, được thu thập nhờ vào dòng nước chảy theo các rãnh hướng về lỗ miệng. Các gai miệng cũng tham gia vào việc bắt mồi.

Hệ tuần hoàn của huệ biển có vòng quanh miệng, nơi tập trung nhiều máu được gọi là cơ quan xóp. Mạch máu phát triển trên đĩa thân và thành ruột. Không có hệ máu giả, thể xoang bị tiêu giảm chỉ còn lại một khoang có năm ngăn xếp tỏa tròn ở phía đối miệng. Không có hệ hô hấp và bài tiết.

Hệ thần kinh huệ biển gồm phần miệng và phần đối miệng xếp đối xứng nhau. Phần miệng có vòng thần kinh quanh miệng, có năm dây phóng xạ nằm trong lớp biểu mô dưới rãnh chân ống. Dây thần kinh phóng xạ có các nhánh đi tới các gai cánh. Vị trí của hệ thần kinh ở biểu mô là thể hiện tính chất nguyên thủy của các loài huệ biển. Hệ thần kinh đối miệng rất phát triển, có một khối thần kinh nằm

trong khoang năm ngăn, có năm dây thân kinh phóng xạ có nhánh từ đó đi tới gai cánh. Huệ biển không có các giác quan chuyên hoá [55].

Hệ sinh dục của huệ biển có cấu tạo phân tính đặc trưng. Từ khoang năm ngăn có cơ quan trụ hướng về phía miệng và cuối cùng là dải sinh dục. Tiếp theo, hướng về năm cánh là năm dải tế bào của tuyến sinh dục. Các dải tế bào này phân nhánh theo các tay và kết thúc bằng các túi trong gai cánh. Các túi này có lớp tế bào trong hình thành nên tế bào sinh dục do đó mỗi túi được coi là một tuyến sinh dục. Sản phẩm sinh dục trong túi được di chuyển vào trong nước nhờ các vết nứt ở vị trí cố định của gai cánh.

1.4.2. Sinh sản và phát triển

Huệ biển là loài thụ tinh ngoài. Trứng sẽ phát triển thành ấu trùng là doliolaria dạng thùy có năm vành tiêm mao. Sau khi bám vào giá thể, chúng phân hoá thành dạng ấu trùng cystoid gồm có đĩa trung tâm và cuống. Tiếp theo tạo nên dạng ấu trùng pentacrinus đối xứng toả tròn. Giai đoạn cuối cùng, ở loài huệ biển có cuống thì cuống kéo dài và sống bám, còn ở loài huệ biển sống tự do thì cuống được tự cắt rời rồi chuyển sang dạng sống tự do.

1.4.3. Hoạt tính sinh học các hợp chất điển hình từ các loài huệ biển

1.4.3.1. Các sắc tố quinone

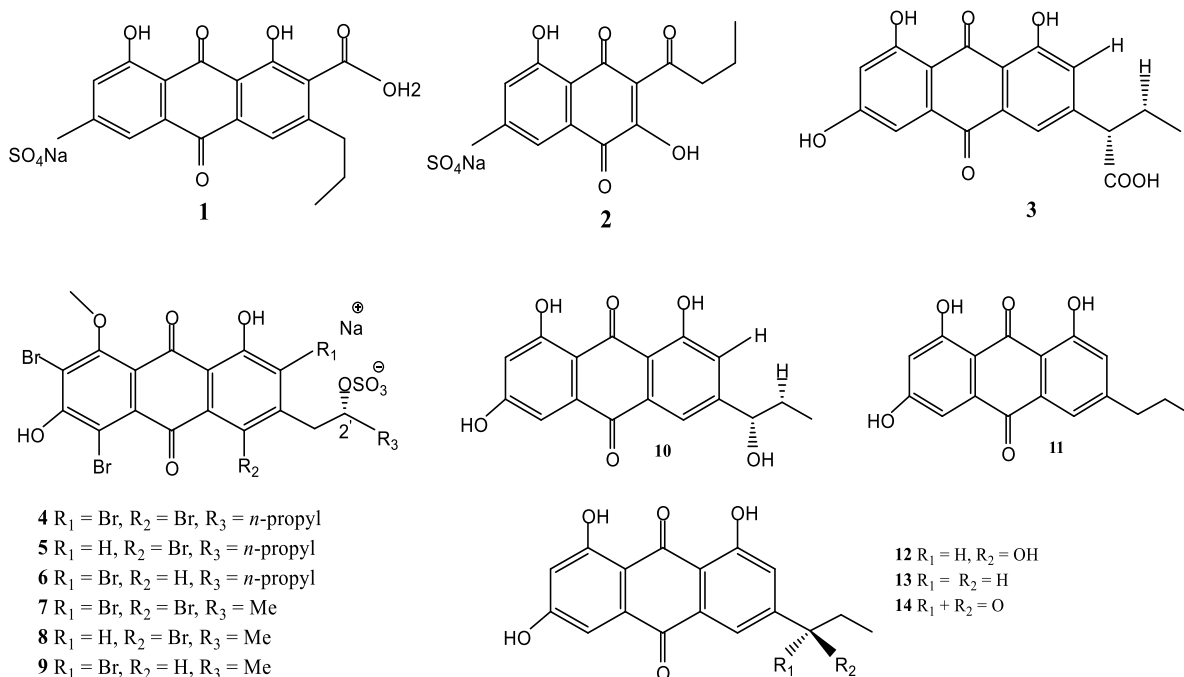
Các nghiên cứu về sắc tố của huệ biển đã được tiến hành bởi các nhà nghiên cứu người Úc Rideout và Sutherland từ những năm 1960, 1970 và 1980 [56-61] nhưng mãi về sau các nghiên cứu về HT SH của các hợp chất mới dần được công bố.

Năm 2002, hai hợp chất quinone sulfate mới gồm một dẫn xuất anthraquinone sulfate ptilometric acid (**1**) và một naphthoquinone (**2**) được công bố từ 2 loài huệ biển tương ứng là *Tropiometra afra macrodiscus* và *Oxycomanthus japonicus*. Hợp chất **1** gây hiện tượng ngán ăn ở cá (với nồng độ thêm vào thức ăn cho cá = 0,2-1,0% trên tổng khối lượng thức ăn) [62]. Thật thú vị rằng hợp chất khử gốc sulfate ptilometric acid **3** lại không thể hiện hoạt tính. Có thể thấy nhóm sulfate rất quan trọng đối với HT SH. Hợp chất ptilometric acid (**3**) là hợp chất đã được tìm thấy ở loài *Ptilometra australis* và loài *Tropiometra afra hartlaub* vùng biển Nam Úc từ năm 1967 [57].

Năm 2009, Wolkenstein và đồng nghiệp đã làm sạch được sáu hợp chất mới từ loài huệ biển *Proisocrinus ruberrimus* thu tại độ sâu 1800m ở vùng biển Okinawa Nhật Bản. Đó là các anthraquinone tan trong nước có chứa nhóm brom và sulfate được đặt tên proisocrinin A–F (**4-9**). Các proisocrinin có tính quang hoạt do sự có mặt trung tâm bất đối tại vị trí 2'. Mặc dù các proisocrinin không quyết định HT SH nhưng các tác giả cho rằng các hợp chất quinone được huệ biển sử dụng như một vũ khí hóa học trong phòng vệ của mình [63].

Từ loài huệ biển Australia (*Colobometra perspinosa*), Wright và đồng nghiệp đã phân tách được hai sắc tố là rhodoptilometrins (**10**), 1,6,8-trihydroxy-3-propyl-9,10-anthraquinone (**11**) [64]. Các hợp chất này có hoạt tính chống lại các dòng TB UT vú MCF-7, TB UT thần kinh SF-268 (CNS), TB UT phổi H460 trung bình với GI₅₀ tương ứng là 41, 21 và 25 μM với hợp chất **10**; 72, 20 và 25 μM với hợp chất **11** [64].

Năm 2014, từ loài huệ biển *Himerometra magnipinna*, ba anthraquinone (**12-14**) trong đó có một chất chuyển hóa mới (+)-rhodoptilometrins (**12**) được nhóm nhà khoa học Đài Loan công bố. Hợp chất **13** đã nghiên cứu là có tác dụng ức chế đáng kể sự tích tụ của protein tiền viêm iNOS trong các tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS [65].

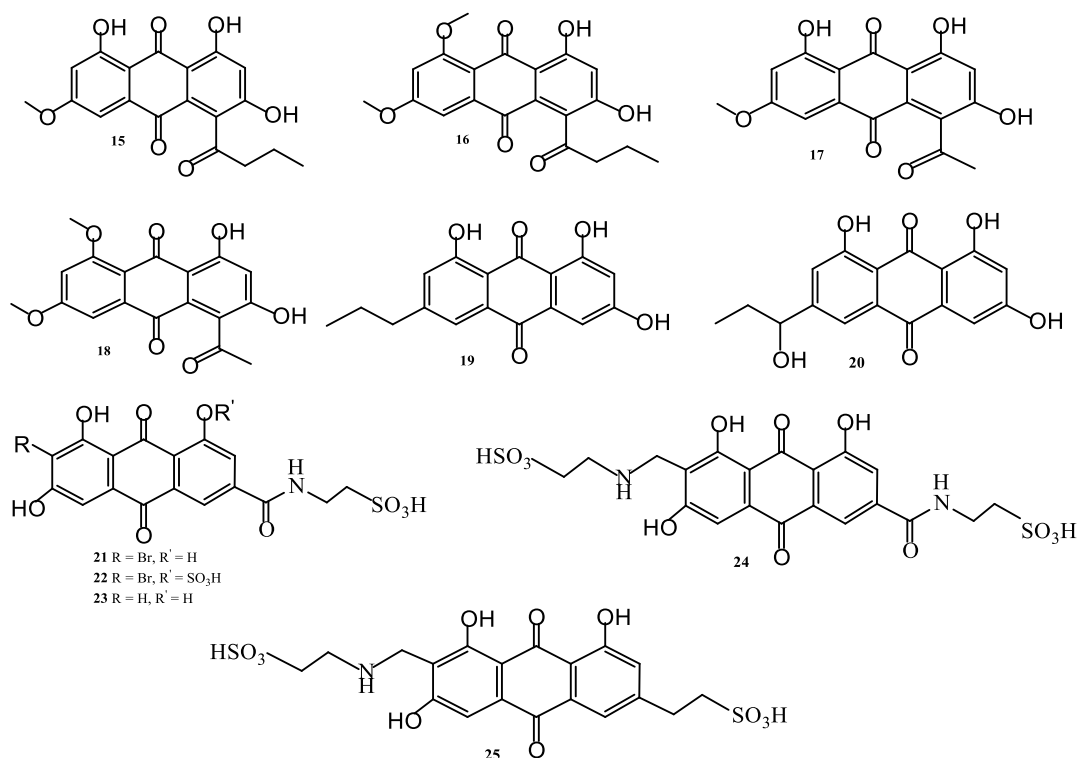


Hình 1.4. Cấu trúc các sắc tố quinone (**1-14**) từ huệ biển

Từ loài huệ biển *Comatula rotalaria* thu tại vùng eo biển Torres, bốn hợp chất đã được phân tách và xác định chính xác cấu trúc là rhodocomatulin 5,7-dimethyl ether (**15**), rhodocomatulin 7-methyl ether (**16**), 12-desethyl-rhodocomatulin 7-methyl ether (**17**) và 12-desethyl-rhodocomatulin 5,7-dimethyl ether (**18**). Trong đó **17**, **18** là hai chất mới. Nghiên cứu này cũng chỉ cho thấy hợp chất **16** tác động đáng kể tới các dòng TB UT phổi H460 và TB UT thần kinh SF-268 ở 10 μM . Tại nồng độ này, hợp chất **16** chỉ ức chế yếu sự phát triển của TB UT vú MCF-7 (9%) [66].

Năm 2017, một nhóm tác giả người Đức đã nghiên cứu khả năng GĐTB của các dẫn xuất anthraquinon 1'-deoxyrhodoptilometrins (**19**) và (S)-(-)-rhodoptilometrins (**20**) được phân lập từ loài *Comanthus* sp. trên hai dòng TB UT thần kinh C6 và TB UT biểu mô ruột kết HCT116. Cả hai hợp chất đều cho thấy tác dụng GĐTB. Hợp chất **19** có hiệu quả gây chết tế bào apoptosis và necrotic cao hơn với $\text{IC}_{50}=13,1 \mu\text{M}$ trên dòng tế bào HCT116. Đánh giá trên 23 kinase protein liên quan đến sự tăng sinh, tồn tại, di căn tế bào và hình thành mạch chỉ ra cả hai hợp chất đều là chất ức chế mạnh các kinase riêng biệt; ví dụ, IGF1-receptor kinase, focal adhesion kinase và EGF receptor kinase, hợp chất **19** ức chế mạnh hơn với IC_{50} tương ứng là 5, 18,4 và 4 μM . Hợp chất **19** gây ra sự giảm phosphoryl hóa ERK có thể là do tác dụng ức chế EGF receptor kinase của hợp chất này. Ức chế của con đường EGF receptor/ MAPK là mục tiêu quan trọng đối với các loại thuốc kìm tế bào đa dạng, các nhà khoa học đã đề xuất rằng dẫn xuất anthraquinone 1'-deoxyrhodoptilometrins (**19**) có thể là một cấu trúc tiềm năng để nghiên cứu và phát triển các loại thuốc trị ung thư mới [67].

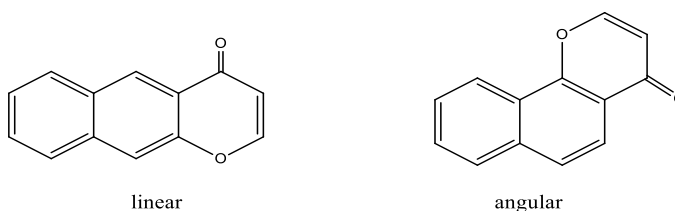
Gần đây, năm 2019, Wolkenstein và đồng nghiệp đã phân tách được 5 sắc tố mới amido- và amino-anthraquinone từ loài huệ biển *Hypalocrinus naresianus* là hypalocrinins A–E (**21–25**). Đây là các hợp chất rất hiếm gặp trong tự nhiên. Hoạt tính GĐTB của hypalocrinins A đã được đánh giá tuy nhiên ở nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất này không ức chế các dòng tế bào HT29, A549, MDA-MB-231 và PSN1 [68].



Hình 1.5. Cấu trúc các sắc tố quinone (15-25) từ huệ biển

1.4.3.2. Naphthopyrone

Các sắc tố naphthopyrone ở huệ biển tồn tại dưới dạng thẳng (linear) hoặc góc (angular), khác nhau bởi hướng của vòng pyrone so với nhóm naphthalene [69].



Các angular naphthopyrone cũng đã được Sutherland nghiên cứu từ năm 1971. Từ loài huệ biển màu xanh *Comanthus parvicirrus timorensis* thu tại Vịnh Moreton, Queensland, Australia, các sắc tố comaparvin 8-*O*-sulfate (**26**), 6-methoxycomaparvin 8-*O*-sulfate (**27**) và 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether sulfate (**28**) được phân lập [69]. Các sulfate ester (**26-28**) có khả năng xua đuổi cá, điều này chứng tỏ rằng các quinone đóng vai trò như chất phòng vệ hóa học của huệ biển [60].

Từ loài huệ biển *Comantheria briareus* thu tại phía Tây Úc, K. Francesconi đã phân lập được hai linear naphthopyrone là comantherin (**29**), neocomantherin (**30**), một angular naphthopyrone comaparvin (**31**) và một sắc tố mới có tên 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (**32**) [70].

Từ thế kỷ XX trở lại đây, nhiều nghiên cứu về hoạt tính các naphthopyrone từ huệ biển cũng mới được công bố. Năm 2007, từ loài huệ biển *Comantheria rotula* Papua New Guinean, các sắc tố benzochromenone mới đã được phân lập gồm benzo[g]chromenone dimer 9,9'-oxy-bisneocomantherin (**33**) và 8-O-methyl-neocomantherin (**34**). Hợp chất **33** ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u (điều khiển dòng tế bào 60) từ Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ với giá trị GI₅₀ từ 1,6-18,2 μ M. Các hợp chất đã biết gồm **29**, **30** cũng nhận được từ loài này. Tất cả các chất đều được chứng minh là ức chế nhân tố gây thiếu oxy HIF-1 nhưng không làm giảm việc sản xuất nhân tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) do HIF-1 tiết ra [71].

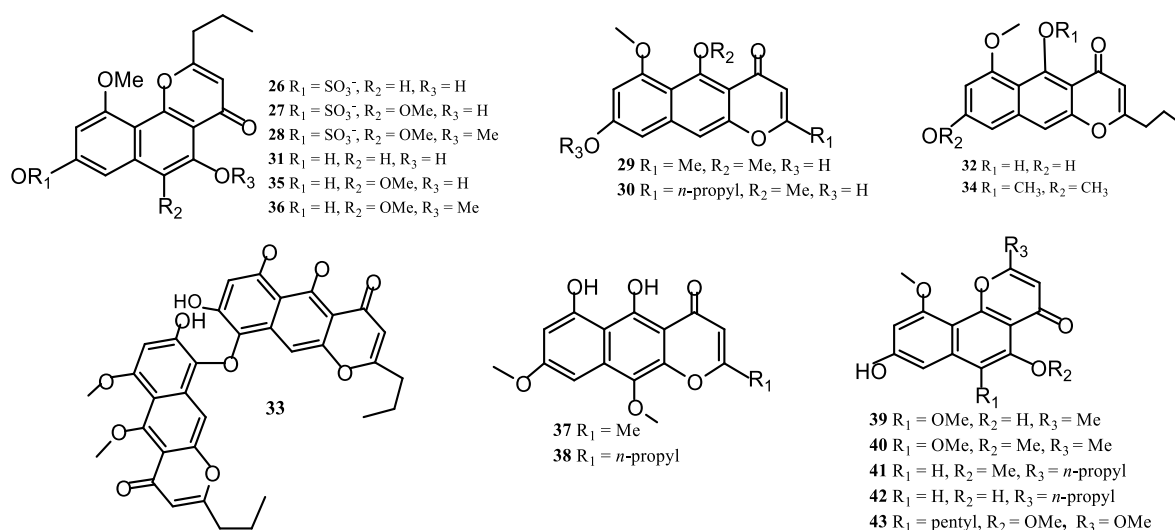
Năm 2008, từ loài huệ biển *Comanthus parvicirrus*, hai naphthopyrone là 6-methoxycomaparvin (**35**) và 6-methoxycomaparvin 5-methyl ether (**36**) đã được phân lập. Hai hợp chất đều có khả năng kìm hãm hoàn toàn sự hoạt hóa NF- κ B do TNF gây ra ở nồng độ 300 μ M thông qua ức chế enzym kinase IKK β [72].

Năm 2010, từ ba loài huệ biển *Comanthus parvicirrus*, *Capillaster multiradiatus* và một loài chưa được xác định, 05 hợp chất mới đã được làm sạch là [10-methoxyrubrofusarin (**37**), 5,6-dihydroxy-8,10-dimethoxy-2-propyl-4H-naphtho[2,3-b]pyran-4-one (**38**), 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-methyl-4H-naphtho[1,2-b]pyran-4-one (**39**), 8-hydroxy-5,6,10-trimethoxy-2-methyl-4H-naphtho[1,2-b]pyran-4-one (**40**), 5-O-methylcomaparvin (**41**); các hợp chất đã biết là **31**, **35**, **36** và TMC 256C1 (**42**). Các hợp chất phân lập được ức chế chất vận chuyển trung gian ABCG2-một protein chống lại ung thư vú liên quan tới việc kháng thuốc hóa trị liệu [73]. Các angular naphthopyrone **31**, **35**, **38**, **41**, **42** đều thể hiện hoạt tính yếu đến trung bình với IC₅₀ từ 5,9-20 μ M.

Năm 2015, từ loài huệ biển *Comanthus bennetti* đã tách được hợp chất comaparvin (5,8-dihydroxy-10-methoxy-2-propylbenzo[h]chromen-4-one) (**31**), hợp chất này làm giảm sự biểu hiện của protein cảm ứng iNOS và mRNA trong các đại thực bào đã được kích thích bằng LPS. Hơn nữa, comaparvin cũng ức chế đáng kể chứng rối loạn cơ học, chứng tăng nhiệt và giảm cân ở chuột bị viêm do carrageenan. Comaparvin cũng làm giảm sự thâm nhập bạch cầu và biểu hiện protein iNOS ở bàn chân bị viêm do carrageenan. Những kết quả này cho thấy rằng comaparvin là một chất điều trị chống viêm tiềm năng chống lại cơn đau do viêm [74].

Nghiên cứu cho thấy tác động của comaparvin ở các nồng độ 1, 10, 25 và 50 μM đối với sự biểu hiện của protein iNOS trong các đại thực bào được kích thích bằng LPS. Trong nhóm chỉ sử dụng LPS, sự tăng đáng kể biểu hiện protein iNOS kích thích bởi LPS đã được ghi nhận. Nếu biểu hiện protein iNOS do LPS gây ra được coi là 100%, thì việc sử dụng comaparvin ở các nồng độ 1, 10, 25 và 50 μM dẫn đến biểu hiện protein iNOS tương đối là $90,42\% \pm 1,1\%$, $77,95\% \pm 7,99\%$, $56,5\% \pm 1,2\%$ và $40\% \pm 0,99\%$ tương ứng. Comaparvin làm giảm đáng kể sự biểu hiện do LPS gây ra của protein iNOS trong tế bào đại thực bào. Sự biểu hiện của protein β -actin không có sai khác đáng kể dưới tác động ở các mức nồng độ của comaparvin (1, 10, 25 và 50 μM) hoặc LPS [74].

Sử dụng PCR định lượng để phân tích những thay đổi biểu hiện mRNA iNOS do comaparvin tạo ra trong các đại thực bào đã được gây kích thích bằng LPS. Kết quả cho thấy iNOS mRNA biểu hiện tại 4, 6, 8, 10 và 12 giờ sau khi kích thích bởi LPS cao hơn so với nhóm đối chứng. So với biểu hiện mRNA iNOS trong nhóm chỉ sử dụng LPS, comaparvin ở nồng độ 25 μM làm giảm đáng kể biểu hiện mRNA iNOS trong đại thực bào từ 4 đến 10 giờ. Không có thay đổi đáng kể nào trong biểu hiện iNOS giữa các thời điểm trong nhóm không có kích thích LPS [74].



Hình 1.6. Cấu trúc các naphthopyrone (26-43) từ huệ biển

Mới đây, năm 2021, từ huệ biển *Colobometra perspinosa* thu tại vùng biển Đông Trung Quốc, năm angular naphthopyrone đã được phân tách gồm có một chất mới 8-hydroxy-5,6,10-trimethoxy-2-pentyl-4*H*-naphtho[1,2-*b*]pyran-4-one (43) và các chất đã biết gồm 31, 36, 39, 41. Chúng được đánh giá thêm về hoạt tính kháng viêm trong các tế bào RAW264.7. Kết quả chỉ ra 36 có hoạt tính kháng viêm mạnh,

ức chế 83,74% iNOS ở nồng độ 10 μM [75]. Do đó, hợp chất **36** có hoạt tính kháng viêm tiềm năng.

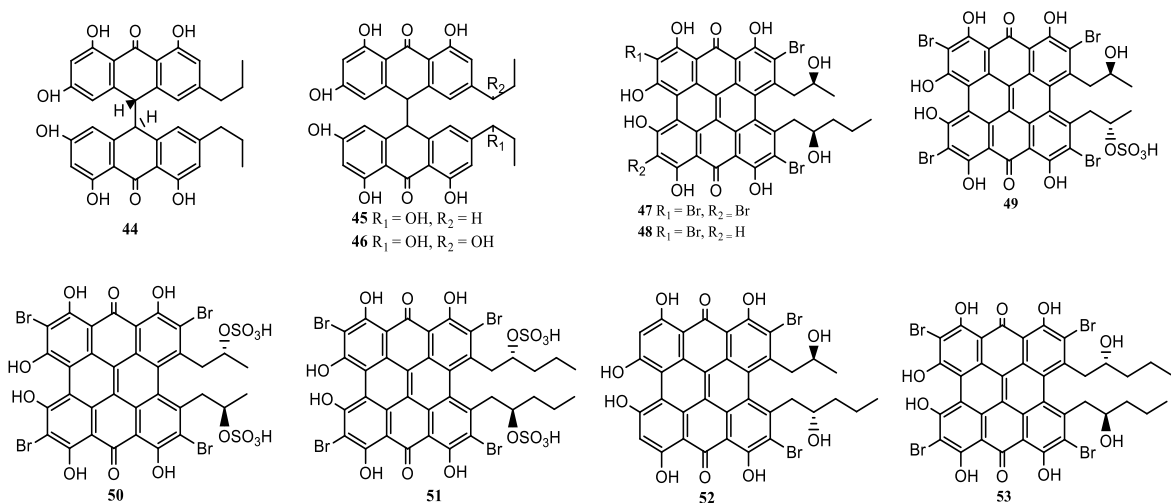
1.4.3.3. Bisanthrone và phenanthroperylene quinone

Từ loài huệ biển *Lamprometra palmata gyges* thu tại vịnh Moreton, Queensland, Australia ba bisanthrone đã được làm sạch. Cấu trúc của chúng được xác định là crinemodin bisanthrone (**44**), crinemodin-rhodoptilometrin bisanthrone (**45**), rhodoptilometrin bisanthrone (**46**) [61].

Hợp chất crinemodin-rhodoptilometrin bisanthrone (**45**) cũng được tìm thấy từ loài huệ biển *Himerometra magnipinna* thu tại vùng biển phía Bắc Trung Quốc [76].

Từ loài huệ biển có cuống *Gymnocrinus richeri* New Caledonian, 5 dẫn xuất brome phenanthroperylenequinone mới là gymnochrome A–D (**47–50**) và isogymnochrome D (**51**) đã được làm sạch [77]. Gymnochrome D (**50**) và isogymnochrome D (**51**) có khả năng chống lại sự hoạt động của virus sốt xuất huyết với mức giảm 50% ổ bệnh (RF50) ở nồng độ $<1 \mu\text{M}$ [78].

Năm 2010, gymnochrome E (**52**) và gymnochrome F (**53**) đã được tách từ huệ biển *Holopus rangii* thu tại vùng biển Tây Nam Curacao [79]. Hợp chất **52** được chứng minh là có hoạt tính GĐTB trung bình với NCI/ADR-Res và histone deacetylase-1, trong khi đó **53** ức chế yếu NCI/ADR-Res. Tuy nhiên hợp chất **53** còn ức chế ở mức trung bình với dòng tế bào bạch cầu myeloid 1 (MLC-1) [77], [79].



Hình 1.7. Cấu trúc một số bisanthrone và phenanthroperylene quinone (**44–53**) từ huệ biển

Như vậy, từ tổng quan các tài liệu nghiên cứu có thể thấy huệ biển chứa nhiều hợp chất có HT SH quý giá. Lớp chất chủ yếu từ loài huệ biển là các anthraquinone và naphthopyrone với tác dụng chống ung thư và kháng viêm tiềm năng. Loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* đã được nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học cũng như HT SH của một số hợp chất, tuy nhiên, ở Việt Nam cho tới nay chưa có một công trình nghiên cứu nào về loài này được công bố. Loài huệ biển *Comanthus delicata* theo như tra cứu tài liệu tham khảo thì cả trong và ngoài nước đều chưa có công bố khoa học nào về thành phần hóa học cũng như HT SH. Do đó, nghiên cứu thành phần các hợp chất và HT SH của hai đối tượng này sẽ đóng góp cơ sở dữ liệu khoa học cho những định hướng ứng dụng tiếp theo.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

Mẫu huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758) được thu thập tại Sơn Trà, Đà Nẵng vào tháng 8/2016. Tên loài được GS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển xác định (Xem Phụ Lục 1). Tiêu bản mẫu được lưu giữ tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Hải Phòng, Việt Nam.



Hình 2.1. Huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

Loài huệ biển nhiều cánh có tên khoa học *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758) thuộc ngành Da Gai (Echinodermata), lớp huệ biển Crinoidea, bộ Comatulida, họ Comatulidae. Loài này thường có màu đen, tím đôi lúc điểm vàng. Đế hình đĩa với 5 tấm lưng, từ đó hình thành 5 nhánh chính và mỗi nhánh lại phân đôi thành 10 nhánh phụ bậc 1 và tiếp tục phân nhánh thành 20 nhánh phụ bậc 2 và tiếp tục phân thành 40 nhánh phụ bậc 3 thậm chí nhiều hơn. Nhánh cong xuất phát từ gốc của nhánh chính thường rất linh hoạt và phần cuối của nhánh cong có hình răng lược. Miệng nằm ở mép đế; Ống hậu môn nằm gần chính giữa. Khớp nối (zigzag) xuất hiện ở 3 khoảng cách giữa nhánh chính + nhánh phụ 1, Phụ 1 +2 và phụ 2 +3. Có rất nhiều gai (Cirri) xuất hiện trên các nhánh.

2.1.2. Loài huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

Mẫu huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909) được thu thập tại Vân Phong, Khánh Hòa vào tháng 7 năm 2020. Tên loài được GS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển xác định (Xem Phụ lục 2). Tiêu bản mẫu được lưu giữ tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Hải Phòng, Việt Nam.



Hình 2.2. Huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

Loài huệ biển hoa có tên khoa học *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909), thuộc ngành Da Gai (Echinodermata), lớp Huệ biển Crinoidea, bộ Comatulida, họ Comatulidae. Loài này thường màu đen, đôi lúc điểm vàng. Đế hình đĩa với 5 tấm lưng, từ đó hình thành 5 nhánh chính và mỗi nhánh lại phân đôi thành 10 nhánh phụ bậc 1 và tiếp tục phân nhánh thành 20 nhánh phụ bậc 2 và tiếp tục phân thành 40 nhánh phụ bậc 3, bậc 4, tương đương 80 nhánh phụ thậm chí nhiều hơn. Nhánh cong xuất phát từ gốc của nhánh chính thường rất linh hoạt và phần cuối của nhánh cong có hình răng lược. Miệng nằm ở mép đế; Ống hậu môn nằm gần chính giữa. Khớp nối (zigzag) xuất hiện ở khoảng cách giữa nhánh phụ 2 + 3 và nhánh phụ 3 + 4, rất nhiều gai (Cirri) xuất hiện trên các nhánh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quy trình xử lý, tạo cặn chiết các mẫu huệ biển

Các mẫu huệ biển thu thập được được rửa sạch với nước để loại bỏ cát, vật bám sau đó thấm khô bằng giấy thấm. Phần mẫu làm tiêu bản được cố định trong cồn 96% để trong lọ nhựa, nút kín. Phần còn lại tiến hành đông khô mẫu bằng thiết bị đông khô mẫu của Viện Hóa sinh biển.

Mẫu huệ biển khô sau đó tiến hành cắt nhỏ, ngâm chiết ba lần với metanol trên máy siêu âm. Dịch chiết từng mẫu cô quay loại bỏ dung môi nhận được cặn chiết metanol tổng. Cặn MeOH này mang cân, ghi lại khối lượng để phục vụ nghiên cứu.

Cặn chiết MeOH tổng của mẫu nghiên cứu sau đó được hòa vào nước cất (khoảng 100-200g cặn chiết trong 1L nước cất). Dịch nước được chiết phân bố

lông/lông với một số dung môi hữu cơ kém tan trong nước với độ phân cực tăng dần từ hexan, chloroform, etyl axetat.

2.2.2. Quy trình phân lập các hợp chất

Các cặn chiết tiếp tục được chạy cột để phân cắt thành các phân đoạn bằng các phương pháp sắc ký phụ thuộc vào từng trường hợp cụ thể bao gồm: sắc ký cột silica gel pha đảo, sắc ký cột silica gel pha thuận, Diaion HP-20, Sephadex LH-20. Các vết chất trong các phân đoạn được nhận diện bằng sắc ký lớp mỏng TLC pha thường và pha đảo nhúng vào dung dịch hiện màu là axit sulfuric 10% rồi hơi nóng đến khi các vết chất lên rõ. Sử dụng kết quả hiển thị vết chất trên TLC để tiến hành gom và chia ra các phân đoạn đã được sắc ký. Các phân đoạn nhận được tiếp tục kiểm tra bằng TLC để lựa chọn phương pháp sắc ký phù hợp phân tách thành các đoạn nhỏ hơn. Lặp lại các công việc như trên cuối cùng sẽ nhận được các chất có độ tinh khiết đảm bảo đủ để đo phổ và xác định cấu trúc.

➤ Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng được thao tác trên bản mỏng RP18 F_{254S} (Merck) và DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck). Soi bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm hoặc nhúng bản mỏng vào thuốc hiện màu là sulfuric acid 10%, sấy khô và hơi nóng tới khi các vết chất hiện lên rõ hết.

➤ Sắc ký cột (CC)

Sử dụng các cột sắc ký nhồi ODS-A, 12 nm S-150 μ m (YMC Co., Ltd., Nhật Bản); silica gel (240-430 mesh); Diaion HP-20 (Sigma).

➤ Sắc ký lỏng trung áp (MPLC)

MPLC được thực hiện trên máy Biotage - Isolera One system của Viện Hóa sinh biển (SE-751 03 Uppsala, Sweden).

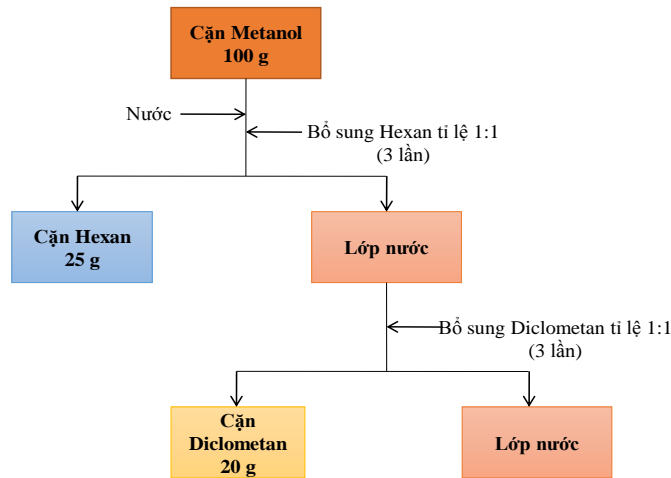
➤ Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

HPLC được triển khai trên máy Agilent 1260 Infinity II system (CA, USA) của Viện Hóa sinh biển.

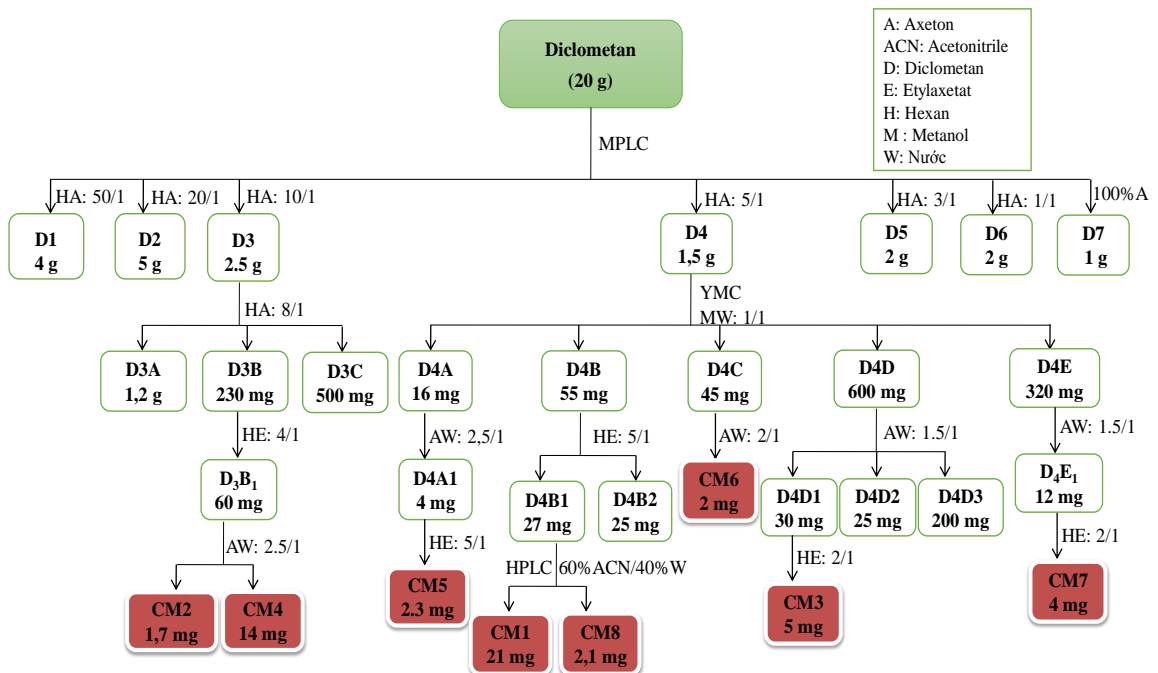
2.2.2.1. Phân lập các hợp chất từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*

Mẫu huệ biển *Capillaster multiradiatus* tươi được rửa sạch và tiến hành đông khô. Mẫu huệ biển khô (1,5kg) tiến hành cắt nhỏ và chiết ba lần với metanol trên máy siêu âm, dịch chiết sau đó được cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm nhận được cặn metanol (100g).

Cặn metanol (100g) hòa vào 2 lít nước cất, sau đó chiết phân lớp với các dung môi là hexan, diclometan nhận được các cặn chiết hexan (25g), cặn chiết diclometan (20g) và lớp nước (2 lít).



Hình 2.3. Sơ đồ chiết phân lớp mẫu *Capillaster multiradiatus*



Hình 2.4. Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phần Diclometan mẫu huệ biển *Capillaster multiradiatus*

Cặn diclometan (20g) được tách sơ bộ trên MPLC với cột nhồi silica gel pha thường, pha động gradient hệ hexan/axeton từ 50/1 → 1/1 gom thành bảy phân đoạn từ D1→D7. Phân đoạn D3 (2,5g) chạy tiếp cột sắc ký nhồi silica gel pha thường dùng pha động hexan/axeton (8/1) nhận được 3 phần D3A (1,2g), D3B (230mg) và D3C (500mg). Phân đoạn D3B (230mg) đưa lên cột sắc ký nhồi silica

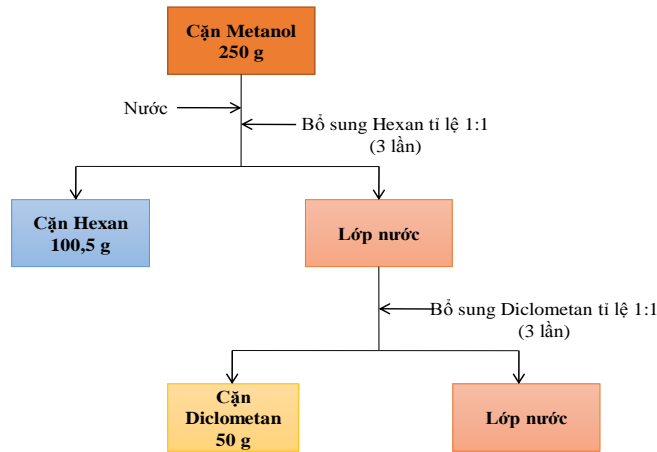
gel pha thường dùng pha động hexan/ethyl axetat (4/1), sau đó phân cắt tiếp trên cột sắc ký pha đảo sử dụng axeton/nước (2,5/1) nhận được hai hợp chất **CM2** (1,7mg) và **CM4** (14mg).

Phân đoạn D4 (1,5g) được tách trên cột nhồi YMC với pha động metanol/nước (1/1) gom thành 5 phân đoạn D4A→D4E. Phân đoạn D4A (16mg) đưa lên cột nhồi YMC dùng axeton/nước (2,5/1), sau đó chạy cột sắc ký nhồi silica gel pha thường dùng pha động hexan/ethyl axetat (5/1) nhận được **CM5** (2,3mg). Phân đoạn D4B (55 mg) được phân cắt trên cột sắc ký nhồi silica gel pha thường dùng pha động hexan/ethyl axetat (5/1) gom thành hai phân đoạn D4B1 (27mg) và D4B2 (25mg). Phân đoạn D4B1 (27mg) được làm sạch trên hệ thống HPLC với cột Cosmosil 5C18-MS-II, 250×4,6mm, 5µm, pha động ACN/nước 60/40, tốc độ dòng 0,6ml/phút nhận được chất sạch **CM1** (21mg) và **CM8** (2,1mg). Phân đoạn D4C (45mg) được phân cắt trên cột nhồi YMC với axeton/nước (2/1) nhận được **CM6** (2mg). Phân đoạn D4D (600mg) được chạy cột nhồi YMC với axeton/nước (1,5/1) gom thành 3 phân đoạn D4D1→D4D3. Phân đoạn D4D1 (30mg) được chạy cột nhồi silica gel pha thường và dung môi hexan/ethyl axetat (2/1) nhận được hợp chất **CM3** (5mg). Phân đoạn D4E (320mg) đưa lên cột nhồi YMC với axeton/nước (1,5/1) nhận được phân đoạn D4E1 (12mg). Phân đoạn D4E1 (12mg) được chạy tiếp cột nhồi silica gel pha thường sử dụng pha động hexan/ethyl axetat (2/1) nhận được **CM7** (4mg).

2.2.2.2. *Phân lập các hợp chất từ huệ biển Comanthus delicata*

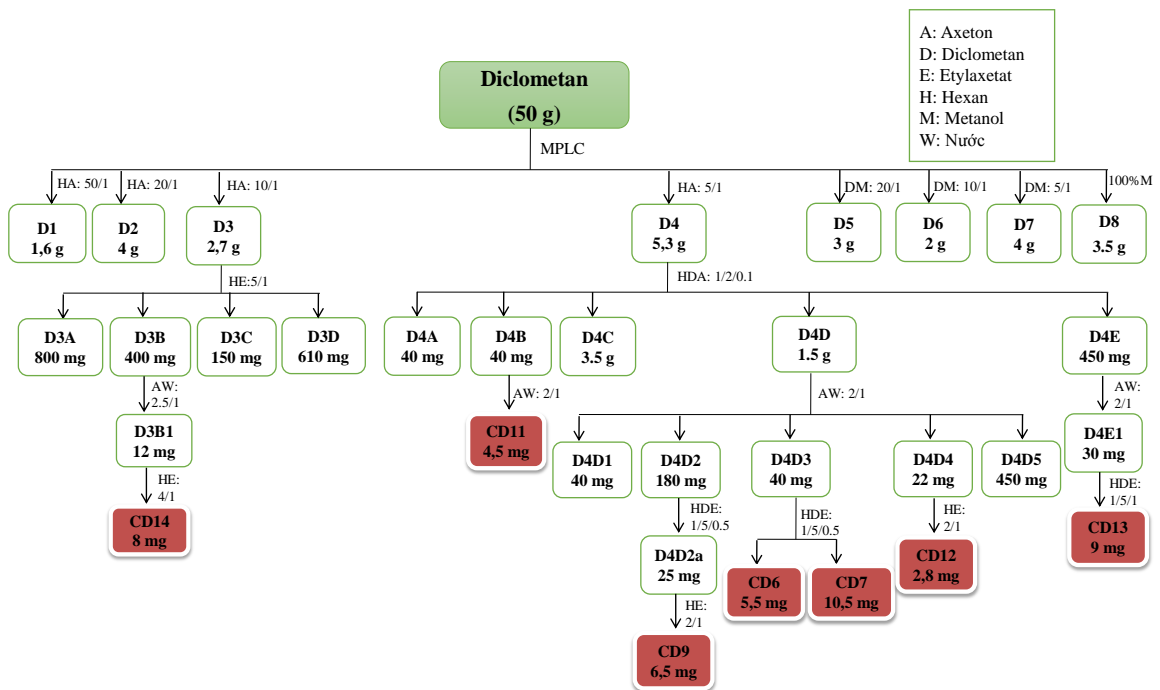
Mẫu huệ biển *Comanthus delicata* tươi được rửa sạch và tiến hành đông khô. Mẫu khô huệ biển (2kg) sau khi đông khô tiến hành cắt nhỏ và ngâm chiết MeOH ở nhiệt độ phòng, dịch chiết thu được cô quay dưới áp suất giảm nhận được cao chiết MeOH (250g).

Cao MeOH (250g) được hòa với 2 lít nước cất và tiến hành chiết phân lớp lỏng/lỏng với dung môi hexan và sau đó là diclometan nhận được cặn hexan (100,5g), cặn diclometan (50g) và lớp nước (2 lít).



Hình 2.5. Sơ đồ chiết phân lớp mẫu huệ biển *Comanthus delicata*

Cận diclofenac (50g, D) được phân cắt thành 8 phân đoạn, D1-D8, dùng MPLC với cột sắc ký pha thường và pha động là hexan:axeton (50:1, 20:1, 10:1, 5:1, v/v) sau đó là diclofenac:metanol (20:1, 10:1, 5:1, 1:1, v/v) như sơ đồ Hình 2.6.

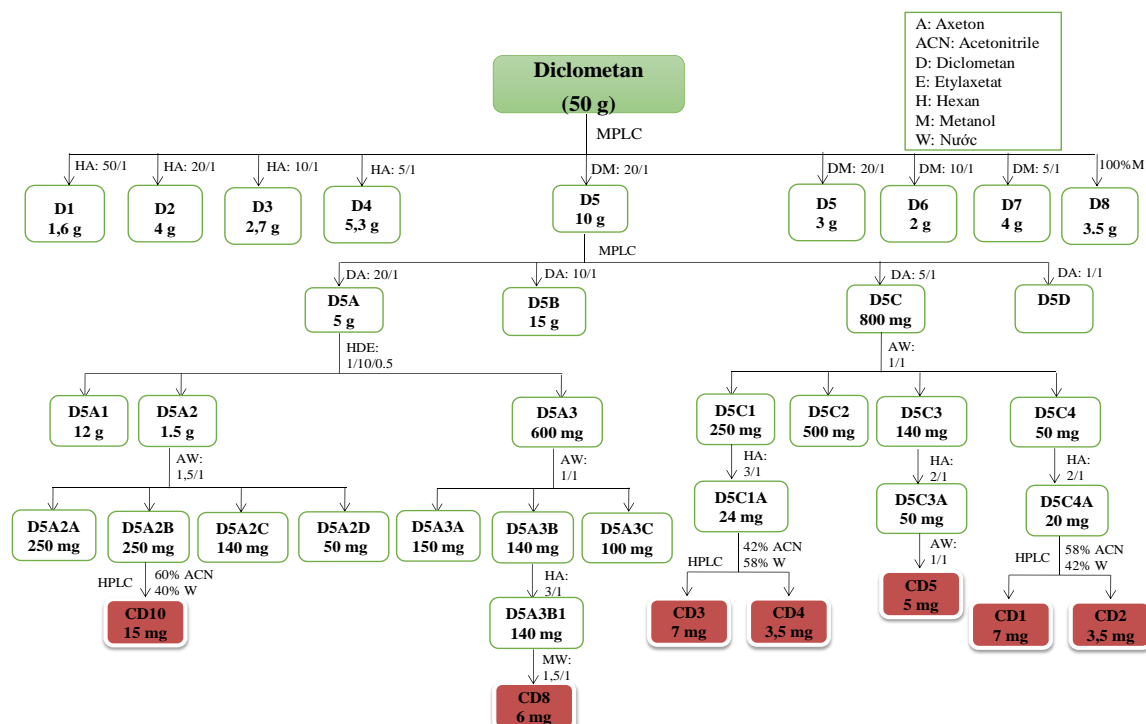


Hình 2.6. Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn D3, D4 mẫu huệ biển *Comanthus delicata*

Phân đoạn D3 (2,7g) được phân tách trên cột sắc ký nhồi silica gel pha thường dùng pha động hexan:etyl axetat (5:1, v/v) gom thành bốn phân đoạn D3A-D3D. Phân đoạn nhỏ D3B (0,4g) tiếp tục được phân cắt trên cột sắc ký nhồi YMC dùng dung môi axeton:nước (2,5:1, v/v), sau đó làm sạch tiếp bằng cột sắc ký nhồi

silica gel pha thường rửa giải bằng hexan:etyl axetat (4:1, v/v), nhận được **CD14** (8mg).

Phân đoạn D4 (5,3g) được phân thành năm phân đoạn nhỏ, D4A-D4E, sử dụng cột sắc ký nhồi silica gel pha thường và pha động chạy cột hexan:diclometan:axeton (1:2:0,1, v/v). Hợp chất **CD11** (4,5mg) nhận được từ phần D4B (40mg) sau khi tiến hành phân cắt trên cột nhồi YMC, sử dụng dung môi axeton:nước (2:1, v/v). Phân đoạn nhỏ D4D (1,5g) tiếp tục được phân cắt trên cột nhồi YMC dùng pha động axeton:nước (2:1, v/v) rồi gom thành 6 phân đoạn nhỏ hơn là D4D1-D4D6. Phân đoạn D4D2 (180mg) phân tách trên cột nhồi silica gel pha thường, pha động hexan:diclometan:etyl axetat (1:5:0,5, v/v); sau đó tinh chế tiếp trên cột nhồi silica gel pha thường, pha động hexan:etyl axetat (2:1, v/v) nhận được **CD9** (6,5mg). Phân đoạn D4D3 (40mg) được phân tách tương tự như đối với phân đoạn D4D2 nhận được các chất sạch **CD6** (5,5mg) và **CD7** (10,5mg). Hợp chất **CD12** (2,8mg) tinh chế từ phân đoạn D4D4 (22mg) sau khi tiến hành phân tách trên cột nhồi silica gel pha thường, pha động hexan:etyl axetat (2:1, v/v). Phân đoạn D4E (450mg) tiếp tục phân tách trên cột nhồi YMC với pha động axeton:nước (2:1, v/v), sau đó tinh chế tiếp trên sắc ký cột pha thường sử dụng pha động hexan:diclometan:etyl axetat (1:5:0,5, v/v) nhận được **CD13** (9mg) như Hình 2.6.

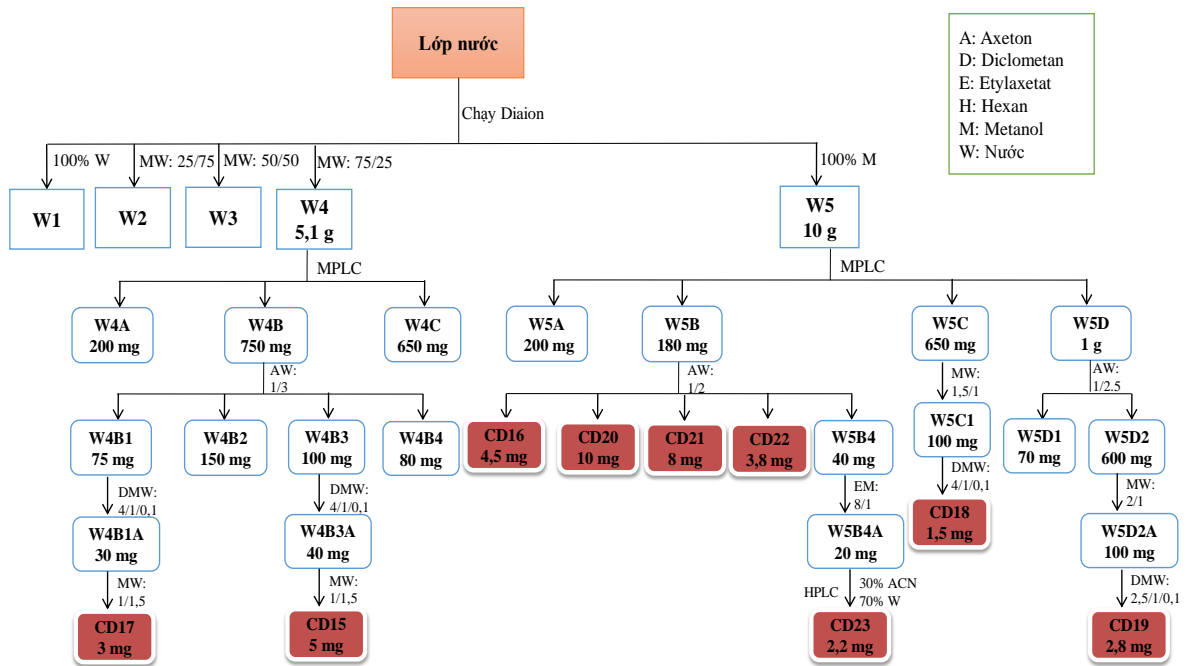


Hình 2.7. Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn D5 mẫu huệ biển

Comanthus delicata

Phân đoạn D5 (10g) được phân tách sơ bộ thành bốn phân đoạn đánh số D5A-D5D sử dụng MPLC với pha động là diclometan:axeton (20:1, 10:1, 5:1, 1:1, v/v). Phân đoạn D5A (5,0g) được phân cắt trên cột nhồi silica gel pha thường dùng dung môi hexan:diclometan:etyl axetat (1:10:0,5, v/v) gom thành 03 phân đoạn đánh số D5A1-D5A3. Phân đoạn D5A2 (1,5g) sau đó tách trên cột nhồi YMC với pha động axeton:nước (1,5:1, v/v) nhận được bốn phân đoạn nhỏ hơn đánh số D5A2A-D5A2D. Phân đoạn D5A2B (250mg) được tinh chế trên hệ thống HPLC (Cột: Cosmosil 5C18-MS-II, 250×20mm, 5 μ m; pha động: ACN:nước 60:40; tốc độ dòng: 3mL/phút) nhận được chất sạch **CD10** (15mg). Phân đoạn D5A3 (0,6g) tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột nhồi YMC sử dụng pha động axeton:nước (1:1, v/v), nhận được ba phân đoạn đánh số D5A3A-D5A3C. Hợp chất **CD8** (6mg) được tinh sạch từ phân đoạn D5A3B (140mg) sau khi chạy cột nhồi silica gel pha thường với pha động hexan:axeton (3:1, v/v), sau đó tinh chế tiếp trên sắc ký cột pha đảo sử dụng pha động metanol:nước (1,5:1, v/v). Phân đoạn D5C (0,8g) được tách thành bốn phân đoạn nhỏ hơn D5C1-D5C4, sử dụng sắc ký cột pha đảo và pha động axeton:nước (1:1, v/v). Phân đoạn D5C1 (250mg) được tách tiếp trên cột nhồi silica gel pha thường dùng dung môi hexane:axeton (3:1, v/v) sau đó tinh chế tiếp trên HPLC (Cột: Cosmosil 5C18-MS-II, 250×20mm, 5 μ m; pha động: ACN-H₂O 42:58; tốc độ dòng: 3mL/phút) nhận được **CD3** (7 mg) và **CD4** (3,5mg). Tinh chế phân đoạn D5C3 (140 mg) bằng cột nhồi silica gel pha thường dùng pha động hexan:axeton (2:1, v/v), sau đó làm sạch tiếp bằng sắc ký cột pha đảo sử dụng pha động axeton:nước (1:1, v/v), nhận được chất sạch **CD5** (5mg). Phân đoạn D5C4 (50mg) được tách tiếp trên cột nhồi silica gel pha thường với pha động hexan:axeton (2:1, v/v) sau đó tinh chế trên HPLC (Cột: Cosmosil 5C18-MS-II, 250×20mm, 5 μ m; pha động: ACN:nước 58:42; tốc độ dòng: 3mL/phút) nhận được **CD1** (7 mg) và **CD2** (3,5mg) như sơ đồ Hình 2.7 ở trên.

Sau khi kết thúc phân lập cặn diclometan, lớp nước đưa lên tách sơ bộ trên cột sắc ký Diaion HP-20 dùng MeOH/nước với tỷ lệ tăng dần (0, 25, 50, 75 và 100 %) gom thành bốn phân đoạn ký hiệu, W2–W5, sau khi loại bỏ phần rửa giải bằng 100 % nước (W1).



Hình 2.8. Sơ đồ phân tách các hợp chất từ phân đoạn nước mẫu huệ biển
Comanthus delicata

Phân đoạn W4 (5,1g) được tách thành ba phân đoạn nhỏ ký hiệu W4A-W4C, sử dụng MPLC với cột nhồi silica gel pha thường và pha động diclometan:metanol (10:1, 5:1, 1:1, v/v). Phân đoạn nhỏ W4B (750 mg) được tách tiếp trên cột nhồi YMC sử dụng pha động axeton:nước (1:3, v/v) nhận được 4 phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu W4B1-W4B4. Tinh chế phân đoạn W4B1 (75,0 mg) bằng cột nhồi silica gel pha thường sử dụng diclometan:metanol:nước (4:1:0,1, v/v), sau đó tiếp tục đưa lên cột nhồi YMC sử dụng metanol:nước (1:1,5, v/v) nhận được **CD17** (3mg). Phân đoạn W4B3 (100mg) được tiến hành tinh chế tương tự như đối với phân đoạn W4B1 nhận được **CD15** (5,0 mg). Phân đoạn W5 (10g) được tách thành bốn phân đoạn nhỏ W5A-W5D, sử dụng MPLC và pha động là diclometan:metanol (20:1, 10:1, 5:1, 1:1, v/v). Phân đoạn nhỏ W5B (180mg) được tinh chế trên sắc ký cột pha đảo sử dụng pha động axeton:nước (1:2, v/v) nhận được các chất sạch **CD16** (4,5mg), **CD20** (10mg), **CD21** (8mg), **CD22** (3,8mg) và phân đoạn nhỏ hơn W5B4 (40 mg). Hợp chất **CD23** (2,2 mg) được làm sạch từ phân đoạn W5B4 (40 mg) sau khi phân tách trên sắc ký cột pha thường rửa giải bằng pha động EtOAc–MeOH (8:1, v/v) và tinh chế bằng HPLC (Cột: Cosmosil 5C18-MS-II, 250×4.6mm, 5 μ m; pha động: ACN:nước 30:70; tốc độ dòng: 0,5mL/phút). Phân đoạn nhỏ W5C (650 mg) tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha đảo sử dụng pha động

metanol:nước (2:1, v/v) và sau đó trên cột nhồi silica gel pha thường với pha động diclometan:metanol:nước (4:1:0,1, v/v) nhận được **CD18** (1,5mg). Phân đoạn nhỏ W5D (1 g) được tách thành 2 phân đoạn nhỏ hơn W5D1 và W5D2, sử dụng cột nhồi YMC với pha động axeton:nước (1:2,5, v/v). Cuối cùng, phân đoạn W5D2 (600mg) được đưa lên cột nhồi YMC với pha động MeOH:nước (2:1, v/v) rồi tách tiếp trên cột nhồi silica gel pha thường với pha động diclometan:metanol:nước (2,5:1:0,1, v/v), nhận được chất sạch **CD19** (2,8mg).

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

Xác định CTHH của các hợp chất dựa trên sự kết hợp các phương pháp phổ hiện đại bao gồm:

- ✓ Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS)

Phổ HR-ESI-MS được đo bằng máy Agilent 6530 Accurate Mass QTOF LC-MS, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCNVN (Từ trường siêu dẫn: 4,7 Tesla, Ion hóa: ESI)

- ✓ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều

Phổ NMR được đo bằng máy Bruker AM500 FT-NMR, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm KHCNVN. Tần số cộng hưởng proton: 500 MHz. Chất chuẩn nội sử dụng là Tetrametyl Silan (TMS).

Phổ này gồm hai kỹ thuật sử dụng là:

- Phổ NMR một chiều: $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$.
- Phổ NMR hai chiều: HMBC, HSQC, COSY và NOESY.

Dung môi dùng đo phổ phải là dung môi hòa tan được chất cần đo, bao gồm các dung môi như DMSO- d_6 , Pyridine, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$... tùy thuộc từng chất.

- ✓ Phổ lưỡng sắc tròn (CD)

Phổ CD được đo bằng máy ChirascanTM CD spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK), Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KHCNVN (Thông số kỹ thuật: Nguồn sáng: đèn halogen. Độ mở ống kính: f 1,8; 3 và 8 mm. Thang đo góc quay: ± 900 . Tốc độ đáp ứng: 60/giây. Độ chính xác: 0,0020 (đến 10). Độ phân giải: 0,00010. Thời gian tích hợp: 1 – 100 giây. Đầu dò: ống nhân quang. Thang nhiệt độ hoạt động: 0 – 40°C. Nguồn sáng: đèn WI (Tungsten-Halogen lamp). Điều khiển thiết bị bằng bộ điều khiển thông minh iRM-800.

✓ Tính toán hóa lượng tử độ quay cực

TTLT hàm mật độ phức thuộc thời gian (TDDFT: time-dependent density functional theory) độ quay cực ($[\alpha]_D$) được tiến hành trên phần mềm Gaussian 16W [80]. Đầu tiên, phân tích cấu dạng được tiến hành trên phần mềm Spartan'18 sử dụng phương pháp MMFF. Các đồng phân cấu dạng (conformer) có đóng góp Boltzmann lớn hơn 1% được lựa chọn để tính toán $[\alpha]_D$ [81] và được tối ưu hóa lại sử dụng hàm tính toán B3LYP/6-31G(d,p) cho MeOH với mô hình IEFPCM. Sau đó tính toán $[\alpha]_D$ được thực hiện trong MeOH sử dụng TDDFT với hàm B3LYP/6-31G(d,p) cho tất cả các đồng phân cấu dạng của các hợp chất. Giá trị $[\alpha]_D$ của mỗi đồng phân cấu dạng được tính toán và tập hợp lại dựa trên mức độ đóng góp Boltzmann của nó.

Sau khi CTHH của chất được xác định, muốn kiểm tra xem đó là hợp chất mới hay cũ dựa vào cơ sở dữ liệu Scifinder.

2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

2.3.1.1. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư bằng phương pháp SRB

Phương pháp đánh giá độ độc tế bào *in vitro* đã được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI - National Cancer Institute) xác nhận là phép thử chuẩn nhằm phát hiện và sàng lọc các mẫu có khả năng ức chế sự phát triển hoặc tiêu diệt TB UT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được tiến hành theo phương pháp của Skekan và đồng nghiệp [82]. Phép thử dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) để tính hàm lượng protein tế bào tổng số đo được khi nhuộm thành phần protein của tế bào bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn vào phân tử protein, do vậy lượng tế bào càng nhiều (càng nhiều lượng protein) thì giá trị OD càng lớn.

➤ Vật liệu nghiên cứu:

- Các dòng TB UT người được cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection) bao gồm: KB: TB UT biểu mô (Human epidemic carcinoma), LNCaP: TB UT tiền liệt tuyến (human prostate carcinoma), SK-Mel-2: TB UT da (human melanoma), HepG2: TB UT gan (human hepatocellular carcinoma), MCF-7: TB UT vú (human breast carcinoma).

- Môi trường nuôi cấy tế bào sử dụng DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) (Invitrogen) có thêm thành phần L-glutamine (Invitrogen), sodium piruvat (Invitrogen), NaHCO_3 , antibiotic-antimycotic 1% (penicillin/streptomycin/amphotericin B, Invitrogen), FBS 10 % (Invitrogen), Trypsin-EDTA 0,05 % (Invitrogen).

- Kính hiển vi soi ngược (Axiovert 40 CFL), buồng đếm tế bào (Fisher, Mỹ), máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad), tủ ẩm CO_2 (Sanyo), tủ lạnh sâu -80°C (Biobase), bình nước lỏng (Trung Quốc), cân phân tích (Ohaus), máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.

- DMSO (Fisher); Nước cất khử trùng; TCA (Fisher); Tris base (Sigma); PBS (Gibco); SRB (Sigma); Camptothecin (AK scientific); Axit Axetic (Trung Quốc)...

➤ Các bước tiến hành thực nghiệm

Đầu tiên tế bào được trypsin hóa để tác động làm rời tế bào và đếm ở trong buồng đếm sau đó điều chỉnh đến mật độ phù hợp với yêu cầu thí nghiệm. Chất thử được pha trong DMSO 10% thành dãy các nồng độ giảm dần sau đó chuyển vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng có TB UT nhưng không có chất thử (190 μL) sẽ được dùng làm đối chứng ngày 0. Ủ trong tủ ẩm 37°C trong 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA 20% trong 1 giờ, nhuộm màu trong 15 phút bằng SRB 0,4% rồi rửa 3 lần bằng axit axetic 1% và để khô ở nhiệt độ phòng. Sử dụng 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan SRB, lắc nhẹ 10 phút rồi đọc kết quả đo OD trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) ở bước sóng 540 nm.

Chất đối chứng dương là elipticine pha trong DMSO 10% với nồng độ 0,01 mM. Chất đối chứng âm là DMSO 0,5%.

➤ Tính toán kết quả

Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt mẫu thử được tính toán như sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày0})}$$

Phép thử được thực hiện lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} tính toán dùng phần mềm TableCurve 2Dv4.

Hiện nay, chưa có quy định bắt buộc nào về ngưỡng giá trị IC_{50} được coi là có hoạt tính gây độc TB UT. Tuy nhiên, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới áp dụng ngưỡng: $IC_{50} < 100\mu\text{g/ml}$ (với dịch chiết thô và phân đoạn) hoặc $IC_{50} \leq 100\mu\text{M}$ (với chất tinh sạch) được coi là có tiềm năng GĐTB và có khả năng ức chế sự phát triển hoặc diệt TB UT.

2.3.1.2. Phương pháp nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư

❖ Đánh giá khả năng gây apoptosis bằng bộ kit Annexin V/PI

Thí nghiệm được thực hiện theo Kit Annexin V/cell dead apoptosis của hãng Invitrogen như sau: 5×10^5 tế bào được ủ với mẫu thử hoặc dung môi pha mẫu 24h được thu vào ống falcon. Sau khi ly tâm loại bỏ môi trường, tế bào được rửa lại bằng PBS. Cặn tế bào được hòa lại trong 100 μL binding buffer và bổ sung thêm 5 μL Annexin V và 1 μL Propidium iodide (PI) (1 mg/ml). Ủ tế bào với mẫu nhuộm 15 phút ở 37°C sau đó thêm vào các ống tế bào 400 μL binding buffer. Tổng số 10.000 tế bào/mẫu được phân tích bằng hệ thống flowcytometry Novocyte và phần mềm NovoExpress software (ACEA Bioscience Inc.) để xác định tỉ lệ tế bào biểu hiện apoptosis [83, 84].

❖ Nuôi cấy tế bào và xử lý mẫu cho thí nghiệm caspase-3

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvate, có bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO) và nuôi trong tủ ấm CO_2 với điều kiện 5% CO_2 ở 37°C. Thêm vào các giếng thí nghiệm của đĩa 24 giếng với lượng tế bào phù hợp và ủ ở 37°C qua đêm cho tế bào ổn định. Chất thử được pha trong DMSO 10% ở các nồng độ khác nhau được đưa vào các giếng. Giếng tế bào với DMSO 10% được sử dụng làm giếng đối chứng âm. Camptothecin được sử dụng làm đối chứng dương.

Sau 24 giờ, thu tế bào đã được ủ với chất thử để xác định sự có mặt của caspase-3 có trong tế bào.

❖ Đánh giá khả năng gây apoptosis của chất thử thông qua xác định sự kích thích sản sinh caspase-3

Xác định caspase-3 theo Kit colorimetric assay của Biovision theo đúng hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

Tế bào đã được ủ với mẫu thử sẽ được ly giải với 50 μL cell lysis buffer trong 10 phút sau đó ly tâm thu dịch tế bào. Xác định hàm lượng protein trong dịch tế bào và pha loãng protein với nồng độ 50 μg trong 50 μL đệm cell lysis cho mỗi phản ứng. Cho 50 μL dung dịch 2x Reaction Buffer. Cho 5 μL cơ chất DEVD-pNA (nồng độ 200 μM) và ủ 37°C trong 1 tiếng. Đọc kết quả trên máy microplate reader BioTek ExL800 ở bước sóng 405 nm.

Tính toán kết quả: Mức độ kích thích sản sinh caspase-3 (SI) được tính theo công thức sau:

$$SI = \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{đối chứng}) - OD(\text{blank})}$$

2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm

2.3.2.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

➤ Nguyên tắc

Hoạt tính kháng viêm được đánh giá qua khả năng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS của các chất cần thử nghiệm. Nồng độ NO trong môi trường thực nghiệm được xác định thông qua phản ứng Griess. Phản ứng dựa trên sự tạo phức màu của NO trong thí nghiệm ở dạng nitrit với thuốc thử Griess (sulfanilamide và n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride trong môi trường axit). Sử dụng thiết bị đo sự thay đổi mật độ quang tại bước sóng 525nm.

➤ Thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng viêm

Để đánh giá khả năng ức chế sinh NO của các hợp chất đã phân lập trên tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS, các tế bào được cấy trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 5×10^4 tế bào/mL. Sau 3 giờ, các tế bào được xử lý với các hợp chất ở các nồng độ khác nhau trong 24 giờ trong điều kiện có hoặc không có LPS với nồng độ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nồng độ nitrite trong môi trường được xác định bởi phản ứng Griess.

Trước tiên, các hợp chất được đánh giá độ độc trên các tế bào ở nồng độ 20, 40 và 80 μM . Sau đó, mỗi hợp chất được sàng lọc về tác dụng của chúng đối với sự sinh NO của tế bào RAW264.7 khi đã bị kích thích với LPS. Quá trình sàng lọc này được thực hiện ở các nồng độ của các hợp chất không có tác dụng độc tính đáng kể nào được ghi nhận trên các tế bào. Trong điều kiện không có mặt của các chất thử và LPS, NO được sản sinh với nồng độ rất ít ($3,16 \pm 0,27 \mu\text{M}$). LPS có tác dụng làm

tăng mạnh sản sinh NO với nồng độ $14,48 \pm 0,43 \mu\text{M}$. Sau khi sàng lọc, các hợp chất có tác dụng được tiếp tục thử nghiệm để xác định giá trị IC_{50} . Để có được giá trị IC_{50} của các chất, tiến hành thí nghiệm kiểm tra hoạt tính phụ thuộc nồng độ. Các nồng độ kiểm tra thích hợp của mỗi hợp chất được ước lượng từ các kết quả sàng lọc.

Các bước thử nghiệm đánh giá tác dụng kháng viêm *in vitro* đối với các hợp chất cần nghiên cứu như sau:

Đầu tiên, tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bổ sung FBS 10% (GIBCO), penicilin (100 unit/mL), streptomycin (100mg /mL) và L-glutamine (2 mM) trong 3-5 ngày ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 .

Tiếp theo, kiểm tra độc tính của các chất thử với tế bào RAW264.7 theo phương pháp so màu MTT: các mẫu thử được pha trong DMSO và pha loãng bằng môi trường nuôi cấy tế bào đến nồng độ phù hợp. Chất thử (200 μl) được hút bơm vào các ô của khay 96 giếng. Sau đó, điều chỉnh đến mật độ phù hợp của tế bào, hút 180 μl dịch tế bào vào các ô đã chứa chất thử của khay 96 giếng. Bố trí một số giếng đối chứng chỉ có dung môi pha mẫu, không có mẫu thử trên cùng một đĩa thử. Đặt đĩa nuôi cấy vào tủ ấm CO_2 với điều kiện 5% CO_2 ở 37°C . Sau 72 giờ, 20 μl dung dịch MTT pha trong PBS (để nồng độ cuối là 5mg/mL) được bổ sung vào mỗi giếng. Sau 4 giờ, loại bỏ môi trường, kết tủa formaran được hòa tan bằng 50 μl (DMSO) và đo độ hấp thụ (OD) ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ. Phần trăm tế bào sống sót tính như sau:

$$\text{CS \%} = \frac{\text{OD (chất thử)} - \text{OD (đối chứng trắng)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (đối chứng trắng)}} \times 100\%$$

Cuối cùng là đánh giá khả năng ức chế sinh NO theo các bước:

Đưa các tế bào vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 5% CO_2 và 37°C trong 24 giờ. Loại bỏ môi trường, bổ sung môi trường DMEM không chứa FBS trong 3 giờ. Sau đó, tế bào được thêm vào chất cần nghiên cứu ở các giải nồng độ trong 2 giờ trước khi được kích thích sinh NO bằng LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) trong 24 giờ. Các giếng đối chứng âm sử dụng dung dịch pha mẫu. Các giếng đối chứng dương dùng L-NMMA.

Nitrite (NO_2^-) là chất chỉ thị sinh NO, sẽ được xác định bằng bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, Mỹ). Cụ thể: 100 μL môi trường nuôi tế bào (đã được ủ mẫu trên) chuyển sang đĩa 96 giếng mới và bổ sung 100 μL Griess reagent gồm 50 μL sulfanilamide 1% (w/v) trong axit phosphoric 5% (v/v) và 50 μL n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,1% (w/v) pha trong nước [85]. Hỗn hợp này sau đó mang ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng, đo hàm lượng nitrite bằng máy ELISA plate reader ở 525nm. Giếng trắng (blank) là môi trường DMEM không có FBS.

Hàm lượng nitrite của các mẫu thí nghiệm được tính toán dựa trên đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh phần trăm với mẫu chứng âm (LPS). Cardamonin (10 μM) được sử dụng làm chất đối chứng dương trong quá trình thử nghiệm. Tác dụng ức chế sinh NO của mẫu được tính như sau:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{\text{Hàm lượng NO (mẫu)}}{\text{Hàm lượng (LPS)}} \times 100\%$$

➤ *Phương pháp xử lý số liệu*

Các thí nghiệm đánh giá tác động của các hợp chất đến sự sản sinh NO của tế bào RAW264.7 kích thích bằng LPS được thực hiện 3 lần và lấy trung bình. Phân tích số liệu, xây dựng đồ thị và tính toán IC_{50} (áp dụng phương pháp hồi qui Sigmoidal dose-response) được tiến hành trên phần mềm Microsoft Excel và GraphPad Prism 6.0.

2.3.2.2. *Phương pháp Western blot*

Western blot là phương pháp phân tích dùng để phát hiện các protein chuyên biệt trong các mẫu mô hoặc dịch chiết xuất mô đã được giới thiệu bởi Towbin và đồng nghiệp [86].

Các bước thực hiện bao gồm:

Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong các đĩa petri đường kính 60mm trong môi trường DMEM ở 37°C, 5% CO_2 , 10% FBS, penicillin (100 units/mL) và streptomycin sulphate (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) với mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào. Sau 24 giờ, tế bào được ủ với các hợp chất pha sẵn và kích thích bởi LPS (1mg/mL). Sau 24 giờ, thu phần tế bào bám dính bằng que cào và ly tâm 1000xg, 5 phút trong PBS để thu cặn tế bào. Hút bỏ dịch nổi, thu protein tế bào bằng lysis buffer trong 30 phút. Dung

dịch chứa protein được ly tâm (15,000 vòng/phút, 5 phút, 4°C) để loại bỏ phần không tan. Nồng độ protein trong dịch nổi được xác định bằng dung dịch Bradford Reagent 5x (SERVA Electrophoresis GmbH, Germany). Độ hấp thụ của protein được đo bằng máy Elisa (Epoch, Biotek, USA) ở 595 nm và nồng độ protein được tính dựa theo đường chuẩn BSA trong khoảng từ 0 đến 1 mg/mL. Dịch tách chiết protein được ủ ở 95°C trong 10 phút và chạy điện di bằng gel polyacrylamide 8% SDS. Sau khi chạy điện di, protein được chuyển vào màng nitrocellulose (0,45 mm) bằng transfer buffer trong 45 phút. Màng được cố định bằng skim milk 3% trong PBS-Tween 20 trong 1 giờ ở máy lắc 100 vòng/phút, nhiệt độ phòng, sau đó rửa bằng PBS-T 3 lần (mỗi lần 10 phút). Màng được cắt theo kích thước phân tử của các protein thử nghiệm và ủ với kháng thể bậc một [iNOS (Mouse/IgG1, Invitrogen, USA), COX-2 (Goat/IgG, Invitrogen, USA), tubulin (Rabbit/IgG, Invitrogen, USA) pha loãng tỉ lệ 1:2000] qua đêm ở 4°C, 100 vòng/phút. Màng được rửa với PBS-T 3 lần (10 phút/lần, 100 vòng/phút) trước khi ủ với kháng thể bậc hai tương ứng (Anti-mouse antibody, anti-goat antibody, anti-rabbit antibody, tỉ lệ 1:2000) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó tiếp tục rửa 3 lần với PBS-T, mỗi lần 10 phút.

Sự biểu hiện của protein được kiểm tra bằng bộ kit tăng cường phát quang (GE healthcare, UK). Tubulin được sử dụng làm đối chứng để đảm bảo lượng protein đồng đều ở các mẫu [87]. Biểu hiện của các protein được chụp bằng máy Azure c300 và định lượng bằng phần mềm ImageJ.

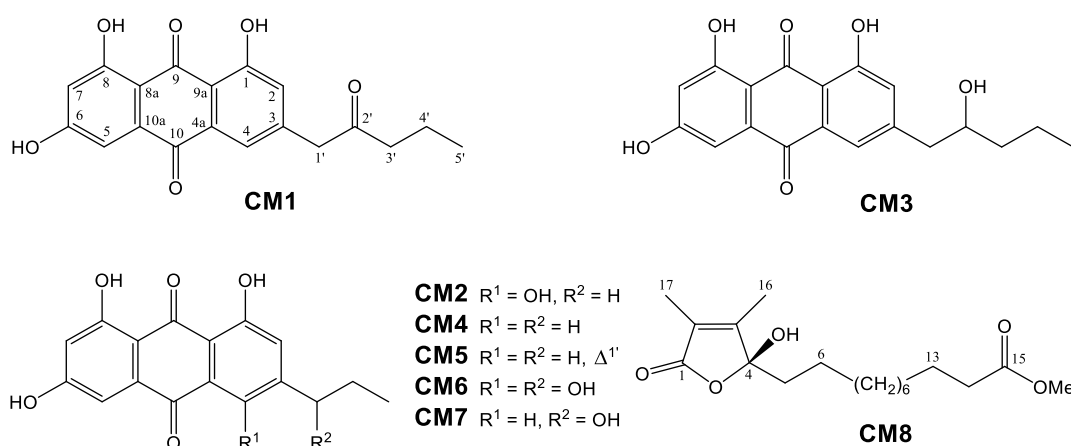
Các thử nghiệm đánh giá HT SH được thực hiện tại Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ - Viện Hóa sinh biển và Phòng thử nghiệm sinh học - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm KHCVN.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

3.1.1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*

Dùng các phương pháp sắc ký, từ dịch chiết loài *Capillaster multiradiatus* 08 hợp chất sạch được làm sạch và chứng minh cấu trúc. Trong đó có 03 hợp chất mới. CTHH của các hợp chất này được tổng hợp ở Hình 3.1.



Hình 3.1. CTHH của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*

Các số liệu về hằng số vật lý và giá trị phổ của các chất sạch thu được cụ thể như sau:

➤ **Hợp chất CM1: Capillasterquinone A (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 341,0998 [M+H]⁺ (TTLT cho ion C₁₉H₁₇O₆⁺, 341,1014) và 363,0818 [M+Na]⁺ (TTLT cho ion C₁₉H₁₆NaO₆⁺, 363,0839).

➤ **Hợp chất CM2: Capillasterquinone B (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ

Phổ HR-QTOF-MS m/z 315,0863 [M+H]⁺ (TTLT cho ion C₁₇H₁₅O₆⁺, 315,0863).

➤ **Hợp chất CM3: 3-(2'-hydroxy-n-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Chất dạng bột màu đỏ, $[\alpha]_D^{25} - 11,5$ (c; 0,05; MeOH)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,15 (1H, dd, $J = 1,0, 5,0$ Hz, H-2), 7,52 (1H, dd, $J = 1,0, 5,0$ Hz, H-4), 7,09 (1H, dd, $J = 1,0, 2,5$ Hz, H-5), 6,56 (1H, dd, $J = 1,0, 2,5$ Hz, H-7), 2,65 (1H, m, H_a-1'), 2,77 (1H, m, H_b-1'), 3,70 (1H, m, H-2'), 1,35 (1H, m, H-3'), 1,33 (1H, m, H_a-4'), 1,45 (1H, m, H_b-4'), 0,86 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-5').

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 161,11 (C-1), 124,70 (C-2), 150,31 (C-3), 120,96 (C-4), 132,43 (C-4a), 108,75 (C-5), 165,55 (C-6), 107,86 (C-7), 164,41 (C-8), 108,92 (C-8a), 189,68 (C-9), 113,50 (C-9a), 181,39 (C-10), 135,09 (C-10a), 43,56 (C-1'), 70,03 (C-2'), 39,16 (C-3'), 18,38 (C-4'), 13,97 (C-5').

➤ **Hợp chất CM4: 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Chất bột màu đỏ

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,01 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-2), 7,33 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-4), 6,98 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-5), 6,47 (1H, br s, H-7), 2,58 (2H, br t, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 1,60 (2H, m, H-2'), 0,91 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3'), 11,78 (1H, s, 1-OH), 11,94 (1H, s, 8-OH).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 161,35 (C-1), 123,28 (C-2), 152,27 (C-3), 119,53 (C-4), 132,62 (C-4a), 108,74 (C-5), 165,52 (C-6), 107,73 (C-7), 164,36 (C-8), 108,67 (C-8a), 189,41 (C-9), 113,31 (C-9a), 180,95 (C-10), 134,81 (C-10a), 37,17 (C-1'), 22,94 (C-2'), 13,48 (C-3').

➤ **Hợp chất CM5: 3-(trans-prop-1'-enyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Chất bột màu đỏ

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,27 (1H, br s, H-2), 7,63 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-4), 7,12 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5), 6,58 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,52 (1H, br d, $J = 16,0$ Hz, H-1'), 6,65 (1H, m, H-2'), 1,91 (3H, dd, $J = 1,5, 6,5$ Hz, H-3'), 12,03 (1H, s, 1-OH), 12,08 (1H, s, 8-OH).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 161,77 (C-1), 119,91 (C-2), 145,61 (C-3), 116,76 (C-4), 133,30 (C-4a), 108,83 (C-5), 165,58 (C-6), 107,91 (C-7), 164,42 (C-8), 108,98 (C-8a), 189,24 (C-9), 113,98 (C-9a), 181,27 (C-10), 135,09 (C-10a), 129,29 (C-1'), 132,31 (C-2'), 18,51 (C-3').

➤ **Hợp chất CM6: 3-(1'-hydroxypropyl)-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone**

Chất bột màu đỏ, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 9,0$ (*c*, 0.05, MeOH)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,41 (1H, s, H-2), 7,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5), 7,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 4,87 (2H, m, H-1'), 1,53 (1H, m, H_a-2'), 1,78 (1H, m, H_b-2'), 0,91 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3').

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 156,17 (C-1), 125,47 (C-2), 147,31 (C-3), 154,70 (C-4), 112,08 (C-4a), 108,45 (C-5), 165,69 (C-6), 108,27 (C-7), 164,50 (C-8), 109,11 (C-8a), 187,94 (C-9), 110,80 (C-9a), 186,53 (C-10), 135,00 (C-10a), 67,12 (C-1'), 29,57 (C-2'), 9,77 (C-3').

➤ **Hợp chất CM7: 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Chất bột màu vàng cam, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 15,0$ (*c*, 0.05, MeOH)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,26 (1H, dd, $J = 0,5, 1,5$ Hz, H-2), 7,66 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-4), 7,12 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-5), 6,57 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-7), 4,58 (1H, dd, $J = 5,5, 7,0$ Hz, H-1'), 1,65 (2H, m, H-2'), 0,86 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3').

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 161,31 (C-1), 121,01 (C-2), 156,11 (C-3), 117,08 (C-4), 132,88 (C-4a), 108,90 (C-5), 165,72 (C-6), 107,89 (C-7), 164,48 (C-8), 108,95 (C-8a), 189,64 (C-9), 114,15 (C-9a), 181,43 (C-10), 135,19 (C-10a), 72,57 (C-1'), 31,35 (C-2'), 9,72 (C-3').

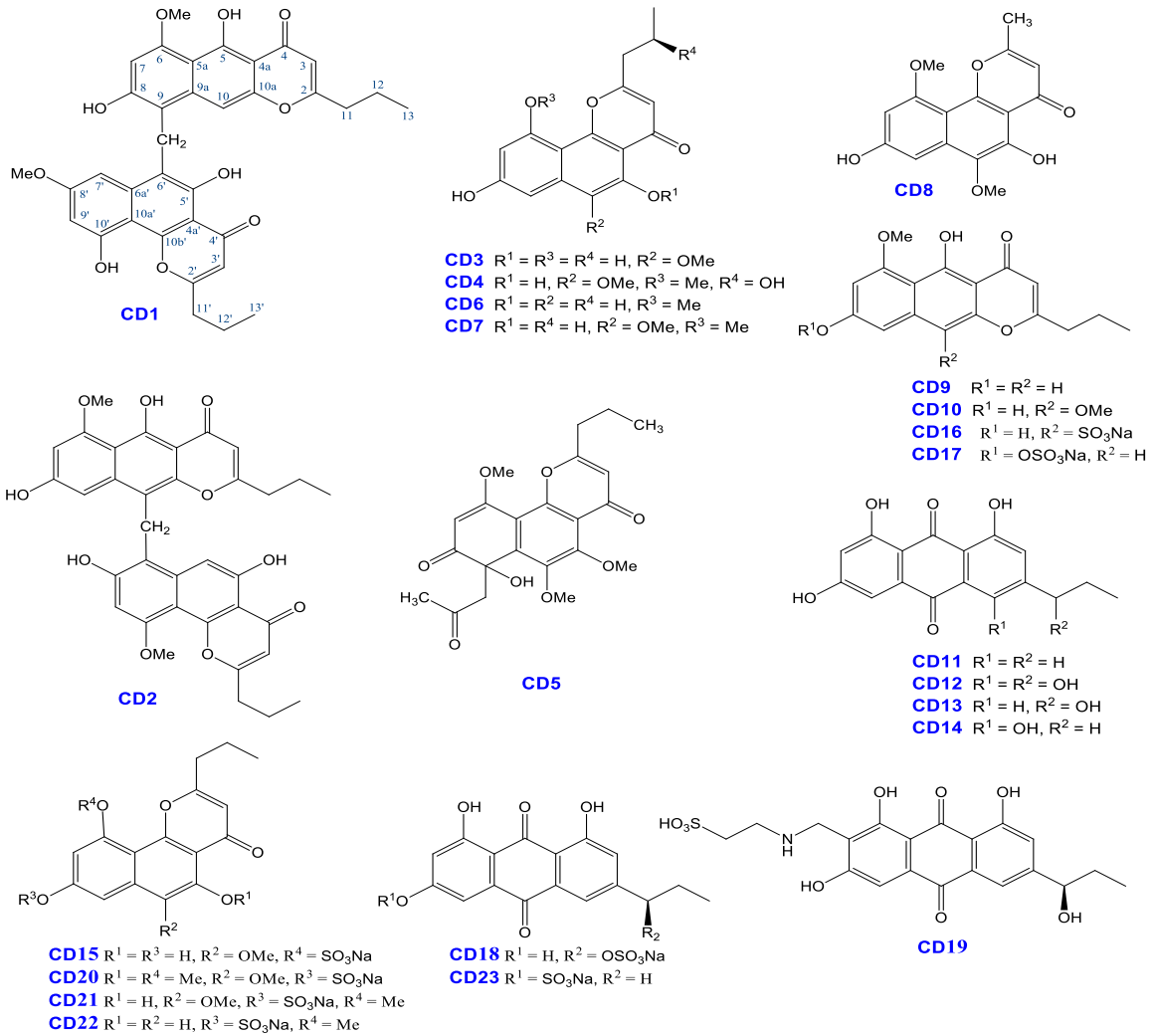
➤ **Hợp chất CM8: Capillasterolide (chất mới)**

Chất dầu không màu, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 8,5$ (*c*, 0.05, MeOH)

Phổ HR-QTOF-MS m/z 349,1991 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (TTLT cho ion $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NaO}_5^+$, 349,1985) và 675,4079 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (TTLT cho ion $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{NaO}_{10}^+$, 675,4079).

3.1.2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Comanthus delicata*

Dùng các phương pháp sắc ký, 23 hợp chất đã được làm sạch từ dịch chiết mẫu huệ biển *Comanthus delicata*. Trong đó có 10 hợp chất mới. Cấu trúc của các hợp chất này tổng hợp ở Hình 3.2.



Hình 3.2. CTHH của các hợp chất phân lập được từ loài huệ biển

Comanthus delicata

Các số liệu về hằng số vật lý và giá trị phổ của các hợp chất thu được cụ thể như sau:

➤ **Hợp chất CD1: Delicapyron A (chất mới)**

Chất bột màu đỏ sẫm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 613.2076 $[M+H]^+$ (TTLT cho ion $C_{35}H_{33}O_{10}^+$, 613.2068).

➤ **Hợp chất CD2: Delicapyron B (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ sẫm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 613,2073 $[M+H]^+$ (TTLT cho ion $C_{35}H_{33}O_{10}^+$, 613,2068).

➤ **Hợp chất CD3: Delicapyron C (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ sẫm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 317,1028 $[M+H]^+$ (TTLT cho ion $C_{17}H_{17}O_6^+$, 317,1020).

➤ **Hợp chất CD4: Delicapylon D (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ sẫm, $[\alpha]_D^{25} + 16$ (c , 0.05, MeOH)

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 347,1134 $[M+H]^+$ (TTLT cho ion $C_{18}H_{19}O_7^+$, 347,1125).

➤ **Hợp chất CD5: Delicapylon E (chất mới)**

Chất dạng bột màu đỏ sẫm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 417,1553 $[M+H]^+$ (TTLT cho ion $C_{22}H_{25}O_8^+$, 417,1544).

➤ **Hợp chất CD6: Comaparvin**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_H 6,42 (1H, s, H-3), 6,76 (1H, s, H-6), 6,61 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,46 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9), 2,73 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-11), 1,82 (2H, m, H-12), 0,97 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-13), 12,84 (1H, s, 5-OH), 3,92 (3H, s, 10-OMe).

Phổ ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_C 170,20 (C-2), 109,30 (C-3), 182,09 (C-4), 107,55 (C-4a), 155,52 (C-5), 104,12 (C-6), 140,71 (C-6a), 101,08 (C-7), 159,94 (C-8), 97,26 (C-9), 158,98 (C-10), 103,15 (C-10a), 155,43 (C-1b), 35,17 (C-11), 19,11 (C-12), 13,22 (C-13), 55,85 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD7: 6-methoxycomaparvin**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_H 6,42 (1H, s, H-3), 6,91 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,52 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9), 2,74 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-11), 1,81 (2H, m, H-12), 0,97 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-13), 13,06 (1H, s, 5-OH), 3,84 (3H, s, 6-OMe), 10,37 (1H, s, 8-OH), 3,94 (3H, s, 10-OMe).

Phổ ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_C 170,17 (C-2), 108,79 (C-3), 182,43 (C-4), 107,68 (C-4a), 145,73 (C-5), 133,53 (C-6), 135,40 (C-6a), 95,32 (C-7), 160,20 (C-8), 97,57 (C-9), 159,41 (C-10), 103,08 (C-10a), 151,54 (C-10b), 35,17 (C-11), 19,14 (C-12), 13,19 (C-13), 59,44 (6-OMe), 55,99 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD8: 5,8-Dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-methyl-4H-naphtho[1,2-b]pyran-4-one**

Chất bột màu vàng cam

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 6,40 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-3), 6,90 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,50 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9), 2,45 (3H, s, H-11), 3,84 (3H, s, 6-OMe), 3,92 (3H, s, 10-OMe).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 167,33 (C-2), 109,12 (C-3), 182,40 (C-4), 107,50 (C-4a), 145,72 (C-5), 133,49 (C-6), 135,36 (C-6a), 95,29 (C-7), 160,16 (C-8), 97,56 (C-9), 159,40 (C-10), 103,00 (C-10a), 151,48 (C-10b), 19,89 (C-11), 59,41 (6-OMe), 55,99 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD9: 5,8-Dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4H-naphtho[2,3-b]pyran-4-one**

Chất bột màu vàng cam

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 6,11 (1H, s, H-3), 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,63 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9), 7,02 6,11 (1H, s, H-10), 2,59 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-11), 1,69 (2H, m, H-12), 0,96 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-13), 14,83 (3H, s, 5-OH), 3,86 (3H, s, 6-OMe).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 171,06 (C-2), 105,97 (C-3), 183,58 (C-4), 102,94 (C-4a), 162,28 (C-5), 106,53 (C-5a), 160,56 (C-6), 97,43 (C-7), 159,95 (C-8), 101,01 (C-9), 140,85 (C-9a), 99,78 (C-10), 152,38 (C-10a), 35,14 (C-11), 19,49 (C-12), 13,22 (C-13), 55,65 (6-OMe).

➤ **Hợp chất CD10: 5,8-Dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-propyl-4H-naphtho[2,3-b]pyran-4-one**

Chất bột màu vàng cam

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 6,12 (1H, s, H-3), 6,45 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 6,88 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9), 2,65 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-11), 1,73 (2H, m, H-12), 0,98 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-13), 14,55 (1H, s, 5-OH), 10,38 (1H, s, 8-OH), 3,86 (3H, s, 6-OMe), 3,84 (3H, s, 10-OMe).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 170,78 (C-2), 106,07 (C-3), 183,65 (C-4), 102,38 (C-4a), 157,94 (C-5), 106,46 (C-5a), 161,11 (C-6), 97,67 (C-7),

160,27 (C-8), 94,84 (C-9), 135,39 (C-9a), 130,24 (C-10), 143,34 (C-10a), 35,20 (C-11), 19,54 (C-12), 13,26 (C-13), 55,80 (6-OMe), 60,67 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD11: 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Hợp chất **CD11** trùng với hợp chất **CM4** được phân lập từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

➤ **Hợp chất CD12: 3-(1'-hydroxypropyl)-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone**

Hợp chất **CD12** trùng với hợp chất **CM6** được phân lập từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

➤ **Hợp chất CD13: 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone**

Hợp chất **CD13** trùng với hợp chất **CM7** được phân lập từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

➤ **Hợp chất CD14: Capillasterquinone B**

Hợp chất **CD14** trùng với hợp chất **CM2** được phân lập từ huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

➤ **Hợp chất CD15: Delicapylon F (chất mới)**

Chất dạng bột màu vàng nhạt

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 441,0239 $[M+Na]^+$ (TTLT cho ion $C_{17}H_{15}Na_2O_9S^+$, 441,0227).

➤ **Hợp chất CD16: Delicapylon G (chất mới)**

Chất dạng bột màu vàng đậm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 441,0236 $[M+Na]^+$ (TTLT cho ion $C_{17}H_{15}Na_2O_9S^+$, 441,0227).

➤ **Hợp chất CD17: Delicapylon H (chất mới)**

Chất dạng bột màu vàng đậm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 425,0289 $[M+Na]^+$ (TTLT cho ion $C_{17}H_{15}Na_2O_8S^+$, 425,0278).

➤ **Hợp chất CD18: Delicaquinon A (chất mới)**

Chất dạng bột màu vàng đậm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z 439,0078 $[M+Na]^+$ (TTLT cho ion $C_{17}H_{13}Na_2O_9S^+$, 439,0070).

➤ **Hợp chất CD19: Delicaquinon B (chất mới)**

Chất dạng bột màu vàng đậm

Phổ HR-QTOF-MS: m/z m/z 450,0867 [M-H]⁻ (TTLT cho ion C₂₀H₂₀NO₉S⁻, 450,0864).

➤ **Hợp chất CD20: 6-methoxycomaparvin-5-methylether-8-O-sodium sulfate**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ_H 6,20 (1H, s, H-3), 7,56 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-7), 6,98 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-9), 2,66 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, H-11), 1,81 (2H, m, H-12), 0,97 (3H, t, *J* = 7,0 Hz, H-13), 3,81 (3H, s, 5-OMe), 3,88 (3H, s, 6-OMe), 3,95 (3H, s, 10-OMe).

Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ_C 166,34 (C-2), 111,37 (C-3), 175,83 (C-4), 114,74 (C-4a), 146,00 (C-), 143,40 (C-6), 133,28 (C-6a), 102,05 (C-7), 155,45 (C-8), 102,27 (C-9), 158,37 (C-10), 108,73 (C-10a), 152,40 (C-10b), 34,75 (C-11), 19,15 (C-12), 13,28 (C-13), 61,52 (5-OMe), 61,16 (6-OMe), 56,34 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD21: 6-Methoxycomaparvin-8-O-sodium sulfate**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ_H 6,48 (1H, s, H-3), 7,48 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-7), 6,85 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-9), 2,77 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, H-11), 1,83 (2H, m, H-12), 0,98 (3H, t, *J* = 7,0 Hz, H-13), 13,07 (1H, s, 5-OH), 3,85 (3H, s, 6-OMe), 3,95 (3H, s, 10-OMe).

Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ_C 170,67 (C-2), 109,03 (C-3), 182,67 (C-4), 108,83 (C-4a), 145,76 (C-5), 134,43 (C-6), 134,48 (C-6a), 101,02 (C-7), 155,94 (C-8), 100,16 (C-9), 158,49 (C-10), 104,98 (C-10a), 151,21 (C-10b), 35,25 (C-11), 19,19 (C-12), 13,25 (C-13), 59,76 (6-OMe), 56,19 (10-OMe).

➤ **Hợp chất CD22: Comaparvin-8-O-sodium sulfate**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ_H 6,50 (1H, s, H-3), 6,90 (1H, s, H-6), 7,18 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-7), 6,80 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-9), 2,78 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, H-11), 1,85 (2H, m, H-12), 0,99 (3H, t, *J* = 7,0 Hz, H-13), 12,87 (1H, s, 5-OH), 3,94 (3H, s, 6-OMe).

Phổ ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 170,68 (C-2), 109,57 (C-3), 182,34 (C-4), 108,58 (C-4a), 155,38 (C-5), 105,16 (C-6), 139,72 (C-6a), 106,62 (C-7), 155,70 (C-8), 99,79 (C-9), 158,14 (C-10), 105,08 (C-10a), 155,26 (C-10b), 35,23 (C-11), 19,15 (C-12), 13,26 (C-13), 56,06 (6-OMe).

➤ **Hợp chất CD23: 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone-6-O-sodium sulfat**

Chất dạng bột màu vàng cam

Phổ ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 7,22 (1H, br s, H-2), 7,57 (1H, br s, H-4), 7,54 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5), 7,08 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 2,69 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H-11), 1,65 (2H, m, H-12), 0,92 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-13).

Phổ ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_{C} 161,53 (C-1), 123,55 (C-2), 152,85 (C-3), 119,87 (C-4), 133,09 (C-4a), 111,10 (C-5), 160,81 (C-6), 112,25 (C-7), 163,29 (C-8), 111,22 (C-8a), 190,31 (C-9), 113,84 (C-9a), 181,28 (C-10), 134,54 (C-10a), 37,22 (C-11), 23,21 (C-12), 13,49 (C-13).

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

3.2.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Mẫu thử	IC ₅₀ (μM)				
	KB	SK-Mel-2	HepG2	LNCaP	MCF7
CM1	-	-	-	-	-
CM2	49,13±2,52	53,68±2,51	79,86±6,67	73,97±4,71	65,75±3,02
CM3	-	-	-	-	-
CM4	-	-	-	-	-
CM5	86,38±5,02	86,65±4,86	98,68±6,48	86,30±5,16	90,87±3,61
CM6	-	-	-	-	-
CM7	-	-	-	-	-
CM8	-	-	-	-	-
Ellipticine*	1,62±0,24	1,38±0,08	1,54±0,08	1,38±0,08	1,67±0,12

*: đối chứng dương; "-": không có hoạt tính

08 hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus* đã được thử hoạt tính GĐTB *in vitro* trên 05 dòng TB UT ở người là TB UT biểu mô KB, TB UT da SK-Mel-2, TB

UT gan HepG2, TB UT phổi LNCaP và TB UT vú MCF7. Kết quả được thống kê ở Bảng 3.1.

Theo đó, chỉ có **CM2** và **CM5** có hoạt tính GĐTB trên cả 05 dòng TB UT thử nghiệm. Các hợp chất khác không có biểu hiện hoạt tính ở nồng độ đã được thử nghiệm.

3.2.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Bảng 3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Mẫu thử	IC ₅₀ (μM)				
	KB	SK-Mel-2	HepG2	LNCaP	MCF7
CD1	52,20±6,01	44,45±2,86	55,53±5,16	54,53±1,82	64,28±2,03
CD2	-	11,99±0,69	-	-	14,90±2,25
CD3	-	47,03±2,66	-	-	-
CD4	80,12±3,54	8,51±0,98	79,03±2,29	63,57±2,69	39,98±4,47
CD5	-	38,15±4,24	-	-	-
CD6	-	12,03±0,54	-	-	-
CD7	-	11,68±0,88	-	-	25,76±3,85
CD8	-	10,49±1,25	-	-	84,49±7,24
CD9	-	36,01±2,08	-	-	-
CD10	-	31,46±3,36	-	-	60,26±2,81
CD15	-	76,92±5,85	-	-	-
CD16	-	74,53±7,27	-	-	-
CD17	-	64,78±1,97	-	-	-
CD18	-	-	-	-	-
CD19	-	49,96±1,74	-	-	-
CD20	-	61,98±1,45	-	20,29±2,43	-
CD21	-	70,05±4,62	-	66,16±1,26	-
CD22	-	68,86±4,73	-	54,64±4,14	-
CD23	-	-	-	-	-
Ellipticine*	1,46±0,12	1,22±0,12	1,63±0,16	1,67±0,16	1,42±0,16

*: đối chứng dương; "-": không có hoạt tính

23 hợp chất từ loài huệ biển *Comanthus delicata* đã được đánh giá hoạt tính GĐTB *in vitro* trên 05 dòng TB UT ở người là TB UT biểu mô KB, TB UT da SK-

Mel-2, TB UT gan HepG2, TB UT phổi LNCaP và TB UT vú MCF7. Kết quả được thống kê trong Bảng 3.2.

Theo đó, **CD1** và **CD4** có hoạt tính GĐTB trên cả 05 dòng TB UT thử nghiệm; các hợp chất **CD2**, **CD7**, **CD8**, **CD10** thể hiện hoạt tính GĐTB trên 2 dòng TB UT thử nghiệm SK-Mel-2 và MCF7; các hợp chất **CD19**, **CD20**, **CD21**, **CD22** thể hiện hoạt tính GĐTB trên 2 dòng TB UT thử nghiệm SK-Mel-2 và LNCaP; các hợp chất **CD3**, **CD5**, **CD6**, **CD9**, **CD15**, **CD16**, **CD17**, **CD19** chỉ thể hiện hoạt tính GĐTB chọn lọc trên dòng TB UT da SK-Mel-2; hai hợp chất còn lại **CD18** và **CD23** không thể hiện hoạt tính với cả 05 dòng TB UT thử nghiệm.

Các hợp chất **CD11** (trùng **CM4**), **CD12** (trùng **CM6**), **CD13** (trùng **CM7**), **CD14** (trùng **CM2**) là các hợp chất phân lập từ loài *Capillaster multiradiatus* đã được đánh giá và trình bày ở mục 3.2.1.

3.2.3. Nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào ung thư của CD7

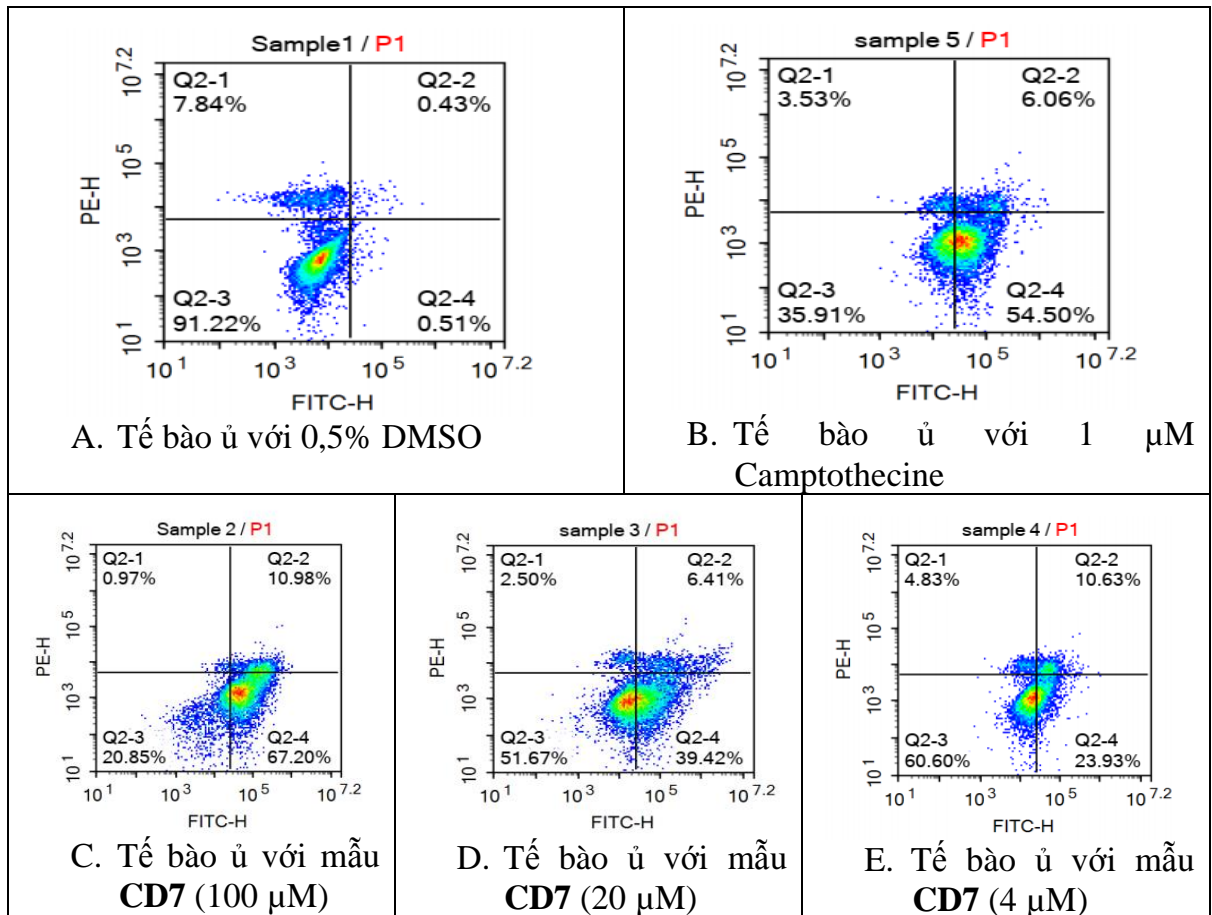
3.2.3.1. Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào SK-Mel-2 của CD7

Kết quả thu được ở Bảng 3.3 và Hình 3.3 chỉ ra tỉ lệ tế bào apoptosis sớm và muộn đã thay đổi dưới tác động của **CD7**.

Bảng 3.3. Tỉ lệ các loại tế bào apoptosis dưới tác động của **CD7** trên dòng tế bào SK-Mel-2

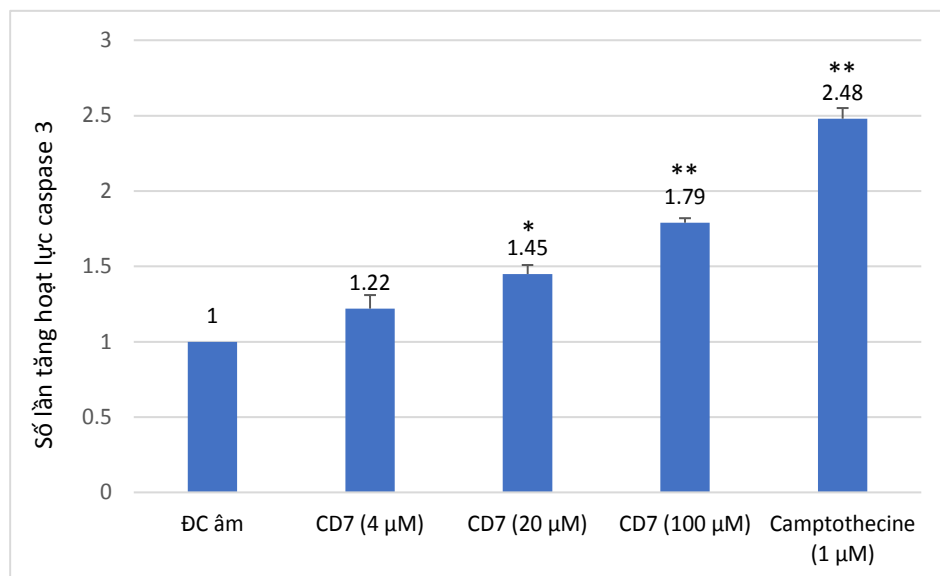
Mẫu thí nghiệm	% tế bào sống	% tế bào apoptosis sớm	% tế bào apoptosis muộn	% tế bào hoại tử
Đối chứng âm (DMSO)	91,22	0,51	0,43	7,84
CD7 (100 μ M)	20,85	67,20	10,98	0,97
CD7 (20 μ M)	51,67	39,42	6,41	2,50
CD7 (4 μ M)	60,60	23,93	10,63	4,83
Camptothecine* (1 μ M)	35,91	54,50	6,06	3,53

“*”: đối chứng dương



Hình 3.3. Tác động của **CD7** đến apoptosis ở tế bào SK-Mel-2 thông qua Kit Annexin V-FITC và PI (Trục x là mức độ nhuộm màu Annexin V-FITC, trục y là mức độ nhuộm màu PI tính theo đơn vị Log)

3.2.3.2. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh caspase-3 của **CD7**



Hình 3.4. Khả năng kích thích sản sinh caspase-3 trong tế bào SK-Mel-2 dưới tác động của **CD7**; (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ so với đối chứng âm)

Số lần kích thích tạo ra caspase-3 của **CD7** và các mẫu đối chứng được chỉ ra ở Hình 3.4. Theo đó, **CD7** có khả năng cảm ứng TB UT da SK-Mel-2 sản sinh caspase-3.

3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

3.3.1. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sinh NO của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Hoạt tính ức chế sinh NO của 08 hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus* được thể hiện trong Bảng 3.4. Kết quả cho thấy **CM1**, **CM2**, **CM3**, **CM4**, **CM5** và **CM7** thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO. Trong khi **CM6** và **CM8** không thể hiện hoạt tính.

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sinh NO của các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus*

Ký hiệu chất	Giá trị IC ₅₀ (µM)
CM1	5,89 ± 0,11
CM2	12,02 ± 0,45
CM3	20,89 ± 0,76
CM4	13,18 ± 0,15
CM5	19,05 ± 0,32
CM6	-
CM7	16,98 ± 0,98
CM8	-
Cardamonin*	2,59 ± 0,18

*: đối chứng dương; "-": không có hoạt tính

3.3.2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sinh NO của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

Hoạt tính ức chế sinh NO của 23 hợp chất từ loài *Comanthus delicata* được thể hiện trong Bảng 3.5. Theo đó, **CD3**, **CD4**, **CD6**, **CD7**, **CD8** và **CD23** thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO. Trong khi đó, các hợp chất còn lại đều không thể hiện hoạt tính.

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sinh NO của các hợp chất từ loài *Comanthus delicata*

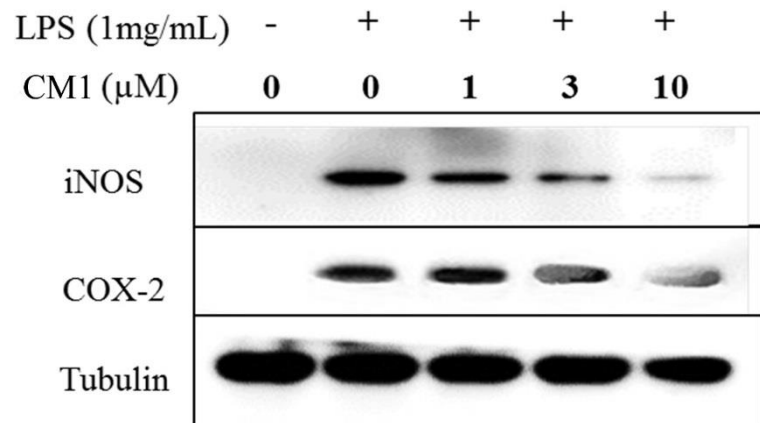
Ký hiệu chất	Giá trị IC ₅₀ (μM)
CD1	-
CD2	-
CD3	63,55±4,08
CD4	36,18±2,98
CD5	-
CD6	24,98±1,13
CD7	55,44±2,77
CD8	31,25±3,09
CD9	-
CD10	-
CD15	-
CD16	-
CD17	-
CD18	-
CD19	-
CD20	-
CD21	-
CD22	-
CD23	60,33±2,82
L-NMMA*	2,59 ± 0,18

*: đối chứng dương; "-": không có hoạt tính

Các hợp chất **CD11** (trùng **CM4**), **CD12** (trùng **CM6**), **CD13** (trùng **CM7**), **CD14** (trùng **CM2**) là các hợp chất từ loài *Capillaster multiradiatus* đã được đánh giá hoạt tính và trình bày ở mục 3.3.1.

3.3.3. Kết quả đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của CM1

Kết quả đánh giá sự ức chế biểu hiện COX-2 và iNOS trong các tế bào RAW264.7 được chỉ ra ở Hình 3.5. Theo đó, **CM1** có tác động lên sự biểu hiện của COX-2 và iNOS trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của **CM1** ở 1, 3 và 10 μ M đến sự biểu hiện của protein iNOS, COX-2 trên dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS

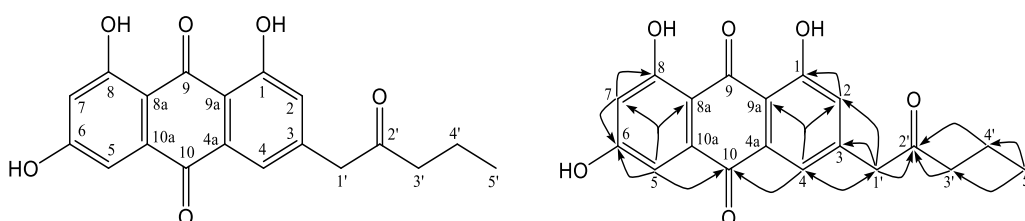
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

4.1.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

4.1.1.1. Hợp chất **CM1**: *Capillasterquinone A* (chất mới)

Hợp chất **CM1** nhận được ở dạng chất bột màu đỏ. Phổ HR-QTOF-MS của **CM1** có pic ion tại m/z 341,0998 $[M+H]^+$ (TTLT cho $C_{19}H_{17}O_6^+$, 341,1014) và 363,0818 $[M+Na]^+$ (TTLT cho ion $C_{19}H_{16}NaO_6^+$, 363,0839) cho phép xác định CTPT là $C_{19}H_{16}O_6$.



Hình 4.1. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CM1**

Phổ 1H -NMR của **CM1** cho thấy các pic của 4 proton vòng thơm có tương tác *meta* với nhau [δ_H 7,17 (H-2), 7,51 (H-4), 7,10 (H-5) và 6,54 (H-7), 1H, br s], 3 nhóm metylen [δ_H 3,96 (2H, s, H-1'), 2,54 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3') và 1,52 (2H, m, H-4')] và một nhóm methyl ở đầu mạch [δ_H 0,86 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-5')].

Ngoài ra, trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của chất **CM1** chỉ ra sự tồn tại của 19 cacbon gồm có 4 nhóm metin vòng thơm, 3 nhóm metylen, 1 nhóm methyl và 11 cacbon bậc bốn [trong đó có 3 nhóm keton tại δ_C 189,15 (C-9), 181,60 (C-10) và 206,74 (C-2')]. Các giá trị phổ 1H - và ^{13}C -NMR của chất **CM1** tương đồng các giá trị của 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone [88] ngoại trừ một số khác biệt ở các tín hiệu của mạch nhánh (Bảng 4.1). Tương tác HMBC của H-4 với C-10; H-1' với C-2, C-3, C-4 và C-2'; H-4' với C-2' và H-5' với C-3' và C-4' cho thấy vị trí gắn của mạch nhánh tại C-3 và nhóm keton C-2'. Phân tích cụ thể các tín hiệu HMBC khác cho phép xác định CTHH của **CM1** là 3-(2'-one-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone, một **hợp chất mới** và được gọi tên là capillasterquinone A.

Bảng 4.1. Giá trị phổ NMR của **CM1**

C	δ_C^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	163,6	161,08	-	
2	124,7	125,20	7,17 br s	1, 4, 9a, 1'
3	154,2	144,66	-	
4	121,2	121,05	7,51 br s	
4a	134,7	132,75	-	
5	109,1	109,57	7,10 br s	6, 7, 9, 10
6	166,6	166,10	-	
7	110,1	107,92	6,54 br s	5, 6, 8, 8a
8	167,2	164,59	-	
8a	110,5	108,50	-	
9	191,9	189,15	-	
9a	115,0	114,20	-	
10	183,2	181,60	-	
10a	136,9	135,07	-	
1'	39,2	48,31	3,96 s	2, 3, 4, 2'
2'	24,8	206,74	-	
3'	14,0	43,96	2,54 t (7,5)	2'
4'		16,54	1,52 m	2'
5'		13,47	0,86 t (7,5)	3', 4'

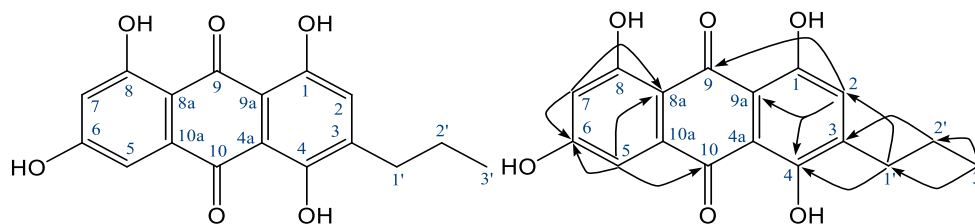
^a δ_C của 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone trong CD₃OD [88], ^bđo trong DMSO-*d*₆, ^c125 MHz, ^d500 MHz.

4.1.1.2. Hợp chất **CM2**: Capillasterquinone B (chất mới)

Các giá trị phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **CM2** tương đồng với các giá trị phổ tương ứng của 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone [88] ngoại trừ sự cho thấy các pic của ba nhóm metin vòng thơm [δ_C 128,4 (C-2), 108,5 (C-5) và 108,2 (C-7)/ δ_H 7,25 (1H, s, H-2), 7,18 (1H, br s, H-5) và 6,60 (1H, br s, H-7)] và một cacbon vòng thơm gắn với oxi [δ_C 156,44 (C-4)] trên các phổ của **CM2** thay cho các tín hiệu của 4 nhóm metin vòng thơm ở hợp chất 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone. Điều này cũng được khẳng định bằng phổ HR-QTOF-MS với sự có mặt của pic ion tại m/z 315,0863 [M+H]⁺ (TTLT cho ion C₁₇H₁₅O₆⁺, 315,0863) tương ứng với CTPT của **CM2** là C₁₇H₁₄O₆.

Tương tác HMBC của H-1' với C-2, C-3 và C-4 cùng với tương tác xa ⁴*J* của H-2 với C-9 mà không có tương tác ³*J* của H-2 với C-10 cho thấy cho vị trí nhóm OH xuất hiện thêm tại C-4. Phân tích cụ thể các tín hiệu HMBC khác (Bảng 4.2)

chứng minh CTHH của **CM2** là 3-propyl-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone, một **hợp chất mới** và được gọi tên là capillasterquinone B.



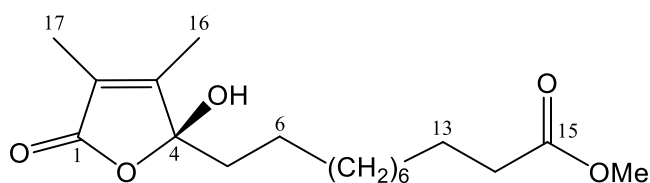
Hình 4.2. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CM2**

Bảng 4.2. Giá trị phổ NMR của **CM2**

C	δ_C^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng pic (<i>J</i> in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	163,6	156,06	-	
2	124,7	128,43	7,25 s	1, 4, 9a, 1'
3	154,2	143,53	-	
4	121,2	156,44	-	
4a	134,7	111,84	-	
5	109,1	108,47	7,18 br s	6, 7, 9, 10
6	166,6	165,78	-	
7	110,1	108,21	6,60 br s	5, 6, 8, 8a
8	167,2	164,47	-	
8a	110,5	108,99	-	
9	191,9	187,74	-	
9a	115,0	110,33	-	
10	183,2	186,38	-	
10a	136,9	134,88	-	
1'	39,2	31,15	2,64 br t (7,5)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	24,8	21,45	1,63 m	3, 1', 3'
3'	14,0	13,66	0,94 t (7,5)	1', 2'

^a δ_C của 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone trong CD_3OD [88], ^bđo trong $DMSO-d_6$, ^c125 MHz, ^d500 MHz.

4.1.1.3. Hợp chất **CM8**: Capillasterolide (chất mới)



Hình 4.3. CTHH của **CM8**

Hợp chất **CM8** nhận được ở dạng chất dầu không màu. Trên phổ ^1H và ^{13}C NMR của **CM8** cho thấy các pic của 2 nhóm cacbonyl, một nối đôi bị thế hoàn toàn, một cacbon bậc 4 mang oxy, hai nhóm *tert*-metyl, một nhóm metoxi và các nhóm metilen của một mạch dài.

Bảng 4.3. Giá trị phổ NMR của **CM8**

C	$^a\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	173,2	174,54	-	
2	159,2	160,38	-	
3	125,7	125,69	-	
4	108,1	109,18	-	
5	36,9	36,95	1,77 m/1,97 m	
6	24,1	24,08	1,15 m/1,31 m	
7-12	30,64	30,49	1,31 br s	
	30,57	30,46	1,31 br s	
	30,54	30,31	1,31 br s	
	30,51	30,15	1,31 br s	
13	26,0	26,02	1,62 m	
14	34,8	34,81	2,33 t (7,5)	13, 15
15	176,1	176,06	-	
16	8,2	8,22	1,80 d (1,0)	2, 3, 4
17	10,8	10,79	1,95 d (1,0)	1, 2, 3
OMe	52,0	51,94	3,67 s	15

$^a\delta_{\text{C}}$ của 13-(2-hydroxy-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl) tridecanoic acid methyl ester [89], b đo trong CD_3OD , c 125 MHz, d 500 MHz,

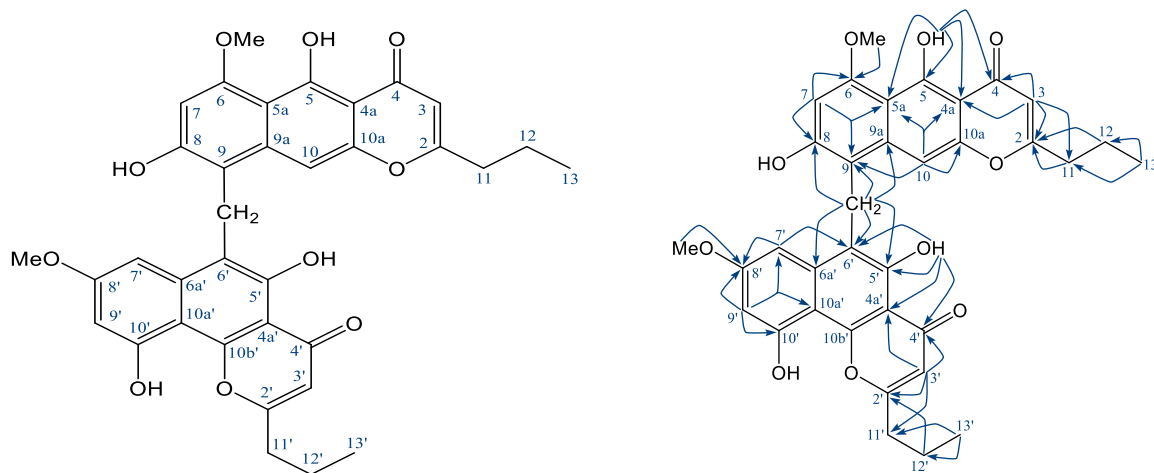
So sánh giá trị phổ ^{13}C NMR của **CM8** với các giá trị tương ứng của 13-(2-hydroxy-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl) tridecanoic acid methyl ester [89] cho thấy sự phù hợp hoàn toàn ở toàn bộ các vị trí. Tuy nhiên, xem xét giá trị tích phân của các proton metilen mạch dài tại δ_{H} 1,31 (12H, br s, H-7 đến H-12) cho phép dự đoán mạch cacbon no ở **CM8** ngắn hơn so với 13-(2-hydroxy-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl) tridecanoic acid methyl ester hai nhóm metilen. Nhận định này được khẳng định bằng phổ HR-QTOF-MS với các pic ion xuất hiện tại m/z 349,1991 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (TTLT cho ion $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NaO}_5^+$, 349,1985) và 675,4079 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (TTLT cho ion $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{NaO}_{10}^+$, 675,4079), tương ứng với CTPT $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_5$. Như vậy, CTHH của **CM8** được chứng minh là 11-(2-hydroxy-3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl) undecanoic acid methyl ester, một **hợp chất mới** và được gọi tên là capillasterolide.

4.1.1.4. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất khác

Bằng cách tương tự như đã thực hiện nêu trên, kết hợp các giá trị phổ một chiều, hai chiều và so sánh với các giá trị đã công bố, các chất còn lại từ huệ biển *Capillaster multiradiatus* được xác định là: 3-(2'-hydroxy-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CM3**) [90-92], 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone [88, 91, 92] (**CM4**), 3-(*trans*-prop-1'-enyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CM5**) [93], 3-(1'-hydroxypropyl)-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (**CM6**) [90], 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CM7**) [88, 92]. Hợp chất 3-(*trans*-prop-1'-enyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone đã thu nhận được từ sản phẩm phụ của quá trình tổng hợp hữu cơ [93], tuy nhiên trong nghiên cứu của luận án **CM5** lần đầu được phân lập từ thiên nhiên và các số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR đầy đủ của hợp chất này được ghi nhận.

4.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài huệ biển *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

4.1.2.1. Hợp chất **CD1**: Delicapyron A (chất mới)



Hình 4.4. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD1**

Hợp chất **CD1** được tách sạch dưới dạng chất bột màu vàng đậm, CTPT của **CD1** được khẳng định là $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ dựa vào phổ HR-QTOF-MS với pic ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ tại m/z 613,2076 (TTLT cho ion $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{O}_{10}^+$ là 613,2068).

Bảng 4.4. Giá trị phổ NMR của **CD1**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	171,18	-	
3	106,04	6,00 s	2, 4, 4a, 11
4	183,51	-	
4a	102,70	-	
5	162,13	-	
5a	107,06	-	
6	158,56	-	
7	96,98	6,63 s	5a, 6, 8, 9
8	156,69	-	
9	109,74	-	
9a	139,53	-	
10	98,08	7,55 s	4a, 5, 5a, 9, 9a, 10a
10a	152,07	-	
11	35,00	2,51 t (7,0)	2, 12, 13
12	19,20	1,58 m	2, 11, 13
13	13,17	0,85 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	14,56 s	4, 4a, 5, 5a
6-OMe	55,52	3,85 s	6
CH ₂	19,67	4,38 s	8, 9, 9a, 5', 6', 6a'
2'	170,13	-	
3'	109,22	6,49 s	2', 4', 4a', 11'
4'	182,22	-	
4a'	106,67	-	
5'	152,24	-	
6'	113,38	-	
6a'	139,92	-	
7'	99,93	7,06 d (2,0)	6', 6a', 8', 9', 10a'
8'	159,28	-	
9'	96,87	6,45 d (2,0)	7', 8', 10', 10a'
10'	154,46	-	
10a'	103,21	-	
10b'	159,63	-	
11'	35,18	2,72 t (7,0)	2', 12', 13'
12'	19,24	1,79 m	2', 11', 13'
13'	13,19	0,94 t (7,0)	11', 12'
5'-OH	-	14,10 s	4', 4a', 5', 5a'
8'-OMe	55,86	3,84 s	8'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz.

Trên phổ ¹H-NMR của **CD1** cho thấy tín hiệu hai proton hydroxy [δ_H 14,10 và 14,56, mỗi tín hiệu 1H, s], bốn proton vòng thơm bị cô lập [δ_H 6,00, 6,49, 6,63

và 7,54, mỗi tín hiệu 1H, s], hai proton thơm tương tác *meta* [δ_{H} 6,45 và 7,06, mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 2,0$ Hz], hai nhóm metoxi [δ_{H} 3,84 và 3,85, mỗi tín hiệu 3H, s], năm nhóm metilen [δ_{H} 4,38 (2H, s), 2,72 (2H, t, $J = 7,0$ Hz), 2,51 (2H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,79 (2H, m) và 1,58 (2H, m)] và hai nhóm methyl ở cuối mạch [δ_{H} 0,85 và 0,94, mỗi tín hiệu 3H, t, $J = 7,0$ Hz)]. Phổ ^{13}C NMR và HSQC xác nhận 35 cacbon, bao gồm 2 nhóm metoxi, 2 nhóm methyl, 5 nhóm metilen, 6 nhóm metin và 20 cacbon không liên kết với hydro (có 2 nhóm keton tại δ_{C} 182,2 và 183,5).

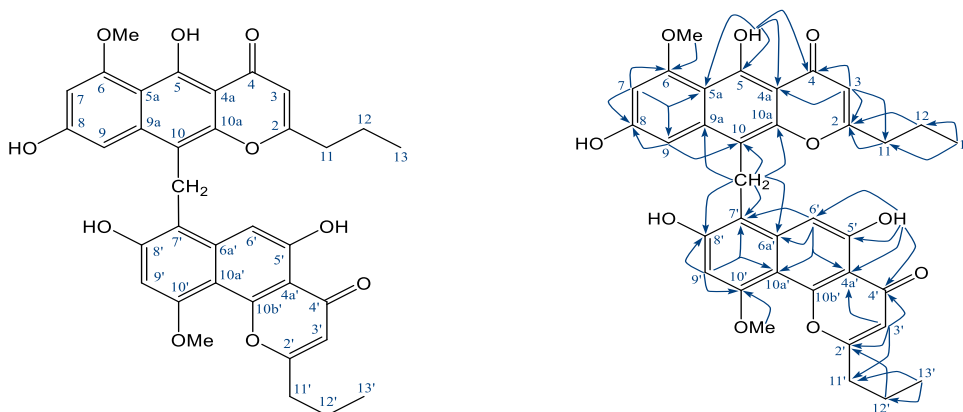
Sự xuất hiện hai nhánh *n*-propyl dựa trên cơ sở các tương tác ở phổ HMBC. Dữ kiện nhận được gợi ý cho một dẫn xuất bisnaphthopyrone, tương tự như benzo[*g*]chromenone dimer 9,9'-oxybis-neocomantherin đã phát hiện từ loài huệ biển Papua New Guinean *Comantheria rotula* [94, 95]. Giá trị phổ ^{13}C NMR của đơn vị cấu trúc thứ nhất (Bảng 4.4) tương đồng các giá trị tương ứng của 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one, ngoài việc có một cacbon bậc bốn thuộc vòng thơm ở hợp chất **CD1** thay cho một nhóm metin thuộc vòng thơm ở hợp chất 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one cho thấy cấu trúc khung naphthopyrone thẳng. Các tương tác HMBC của H-3 (δ_{H} 6,00) với C-2 (δ_{C} 171,18), C-4 (δ_{C} 183,51), C-4a (δ_{C} 102,70) và C-11 (δ_{C} 35,00) và của H-13 (δ_{H} 0,85) với C-11 (δ_{C} 35,00) và C-12 (δ_{C} 19,20) chứng minh chính xác cấu trúc liên kết *n*-propyl γ -pyrone. Proton hydroxy tại δ_{H} 14,56 có tương tác HMBC với C-4 (δ_{C} 183,51), C-4a (δ_{C} 102,70), C-5 (δ_{C} 162,13) và C-5a (δ_{C} 107,06) xác định vị trí của proton này tại C-5.

Vị trí của H-10 (δ_{H} 7,54) được gán bằng tương tác HMBC của H-10 với C-4a. Các vị trí của proton H-7, 6-OMe và cacbon C-9 được chứng minh bằng tương tác xa HMBC của 6-OMe (δ_{H} 3,85) với C-6 (δ_{C} 158,56), H-7 (δ_{H} 6,63) với C-5a (107,06) và C-6 (δ_{C} 158,56) và của H-10 (δ_{H} 7,54) với C-9 (δ_{C} 109,74). Ngoài ra, giá trị phổ ^{13}C NMR của đơn vị cấu trúc thứ hai (bảng 4.4) tương đồng các giá trị tương ứng của comaparvin [96], ngoài việc có một cacbon bậc bốn thuộc vòng thơm ở **CD1** thay cho một nhóm metin thuộc vòng thơm ở comparvin, cho thấy cấu trúc naphthopyrone góc. Sự xuất hiện của 2 proton thơm tương tác *meta* ở đơn vị cấu trúc thứ hai cho phép dự đoán cacbon bậc 4 xuất hiện thêm tại C-6'. Nhận định này được chứng minh qua tương tác HMBC của proton 5'-OH (δ_{H} 14,10) và H-7'

(δ_H 7,06) với C-6' (δ_C 113,38). Vị trí của nhóm metoxi tại C-8' được chứng minh qua tương tác HMBC của H-7' (δ_H 7,06) và 8'-OMe (δ_H 3,84) với C-8' (δ_C 159,28). Cuối cùng, vị trí liên kết giữa hai đơn vị naphthopyrone với nhau thông qua một nhóm metylen ở C-9 và C-6' được gán qua các tương tác xa HMBC của proton của nhóm metylen tại (δ_H 4,38) với C-8 (δ_C 156,69), C-9 (δ_C 109,74), C-9a (δ_C 139,53), C-5' (δ_C 152,24), C-6' (δ_C 113,38) và C-6a' (δ_C 139,92). Từ cá dữ kiện đã nêu, **CD1** được chứng minh là một **hợp chất mới** và được gọi tên là delicapyron A.

4.1.2.2. Hợp chất **CD2**: Delicapyron B (chất mới)

CTPT của **CD2** được chứng minh trùng khớp với **CD1** dựa trên phổ HR-QTOF-MS với pic ion $[M+H]^+$ ở m/z 613,2073 (TTLT cho ion $C_{35}H_{33}O_{10}^+$ là 613,2068). Các giá trị phổ 1H và ^{13}C NMR của **CD2** tương đồng các giá trị tương ứng của **CD1** cho thấy hợp chất này cũng là một dẫn xuất bisnaphthopyrone.



Hình 4.5. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD2**

Xem xét các tín hiệu trên phổ HMBC xác định sự xuất hiện của 2 proton thơm tương tác *meta* H-7 và H-9 ở đơn vị cấu trúc naphthopyrone thẳng với sự ghi nhận các tương tác của proton 5-OH (δ_H 15,01), H-7 (δ_H 6,45) và H-9 (δ_H 7,09) với C-5a (δ_C 106,71) và của H-9 với C-10 (δ_C 108,64). Vị trí của nhóm metoxi tại C-6 của đơn vị naphthopyrone này được chứng minh bằng tương tác HMBC của proton 6-OMe (δ_H 3,83) và H-7 (δ_H 6,45) với C-6 (δ_C 161,23).

Ở đơn vị naphthopyrone góc, vị trí của proton vòng thơm H-6' (δ_H 6,81) được gán bằng tương tác HMBC của proton hydroxy 5'-OH (δ_H 12,62) với C-6' (δ_C 101,69). Proton vòng thơm H-9' (δ_H 6,66) được gán qua tương tác HMBC của nó với cacbon C-10a' (δ_C 103,58).

Bảng 4.5. Giá trị phổ NMR của **CD2**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	171,01	-	
3	105,72	6,08 s	2, 4, 4a, 11
4	184,02	-	
4a	102,51	-	
5	161,15	-	
5a	106,71	-	
6	161,23	-	
7	97,08	6,45 d (2,0)	5a, 6, 8, 9
8	159,90	-	
9	98,92	7,09 d (2,0)	5a, 7, 8, 10
9a	139,96	-	
10	108,64	-	
10a	157,19	-	
11	35,34	2,39 t (7,0)	2, 12, 13
12	20,04	1,50 m	2, 11, 13
13	13,40	0,86 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	15,01 s	4, 4a, 5, 5a
6-OMe	55,75	3,83 s	6
CH ₂	21,34	4,45 s	9a, 10, 10a, 6a', 7', 8'
2'	170,34	-	
3'	109,28	6,39 s	2', 4', 4a', 11'
4'	181,89	-	
4a'	107,01	-	
5'	155,07	-	
6'	101,69	6,81 s	4', 4a', 5', 6a', 7', 10a'
6a'	139,20	-	
7'	109,67	-	
8'	149,73	-	
9'	96,84	6,66 s	7', 10', 10a'
10'	157,04	-	
10a'	103,58	-	
10b'	155,78	-	
11'	35,24	2,71 t (7,0)	2', 12', 13'
12'	19,17	1,80 m	2', 11', 13'
13'	13,19	0,95 t (7,0)	11', 12'
5'-OH	-	12,62 s	4', 4a', 5', 5a'
10'-OMe	55,75	3,92 s	10'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz.

Cuối cùng, các tương tác xa HMBC nhận được của các proton H-9' (δ_{H} 6.66) và 10'-OMe (δ_{H} 3,92) với C-10' (δ_{C} 157,04) cùng với các tương tác của các proton nhóm metilen (δ_{H} 4,45) với C-9a (δ_{C} 139,96), C-10 (δ_{C} 108,64), C-10a (δ_{C} 157,19), C-6a' (δ_{C} 139,20), C-7' (δ_{C} 109,67) và C-8' (δ_{C} 149,73) chứng minh nhóm metoxi tại C-10' và liên kết giữa hai đơn vị naphthopyrone qua cầu metilen tại các vị trí C-10 và C-7' (Hình 4.15). Như vậy, hợp chất **CD2** được chứng minh là một hợp chất mới và được gọi tên là delicapyron B.

4.1.2.3. Hợp chất **CD3**: Delicapyron C (chất mới)

Hợp chất **CD3** nhận được ở dạng bột màu vàng với CTPT là $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ được tính bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ tại m/z 317,1028 (TTLT cho ion $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6^+$ là 317,1020).

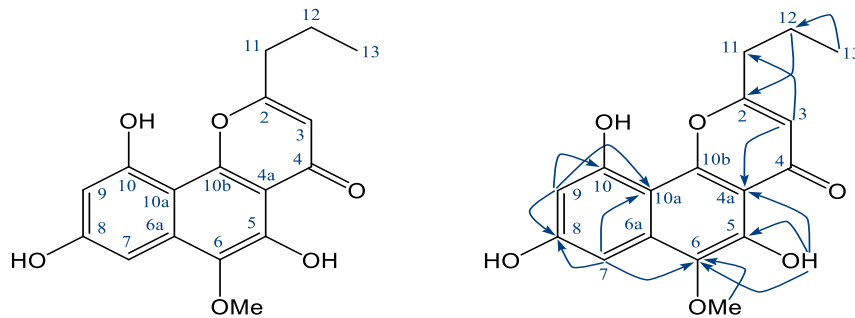
Bảng 4.6. Giá trị phổ NMR của **CD3**

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,02	-	
3	108,76	6,40 s	2, 4, 4a, 11
4	182,33	-	
4a	107,30	-	
5	145,19	-	
6	133,46	-	
6a	135,52	-	
7	94,61	6,76 d (2,5)	6, 8, 9, 10a
8	160,33	-	
9	100,76	6,45 d (2,5)	7, 8, 10, 10a
10	158,04	-	
10a	102,81	-	
10b	152,17	-	
11	35,22	2,72 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	19,15	1,83 m	2, 11, 13
13	13,23	0,95 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	12,96 s	4a, 5, 6
6-OMe	59,34	3,82 s	6

^ađo trong DMSO- d_6 , ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Các dữ kiện phổ NMR nó cho thấy một dẫn xuất naphthopyrone góc, một lớp chất chính từ các loài huệ biển thuộc giống *Comanthus* [73, 96, 97]. Các giá trị phổ ^1H và ^{13}C NMR của **CD3** tương đồng các giá trị của 6-methoxycomaparvin [96, 97], ngoài việc mất đi các pic của một nhóm metoxi. Vị trí của nhóm metoxi còn lại tại C-6 được gán dựa trên phổ HMBC với các tín hiệu nhận được của các proton H-

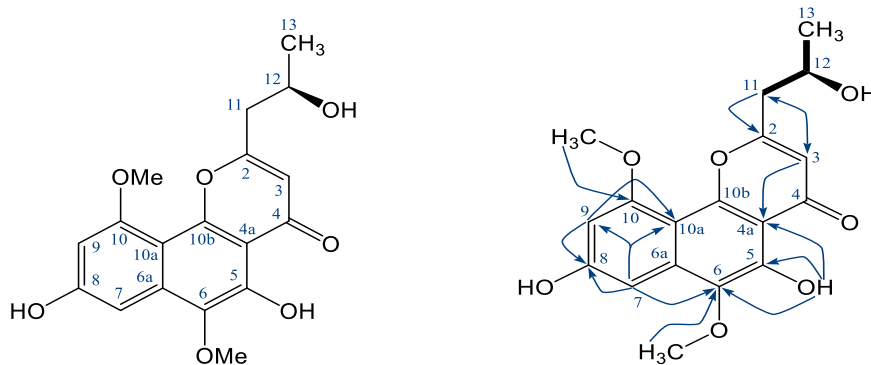
7 (δ_H 6,76), 5-OH (δ_H 12,96) và 6-OMe (δ_H 3,82) với C-6 (δ_C 133,46). Như vậy, **CD3** được chứng minh là một hợp chất mới và được gọi tên là delicapyron C.



Hình 4.6. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD3**

4.1.2.4. Hợp chất **CD4**: Delicapyron D (chất mới)

Các giá trị phổ 1H và ^{13}C NMR của **CD4** cũng tương đồng các giá trị tương ứng của 6-methoxycomaparvin [96, 97], ngoài việc có một nhóm oximetin tại δ_C 63,90 (CH)/ δ_H 4,26 (1H, m) ở **CD4** thay cho một nhóm metilen ở 6-methoxycomaparvin. Điều này cũng được khẳng định bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion $[M+H]^+$ tại m/z 347,1134 (TTLT cho ion $C_{18}H_{19}O_7^+$, 347,1125), tương ứng với CTPT là $C_{18}H_{18}O_7$.



Hình 4.7. CTHH và tương tác COSY (—) và HMBC (→) quan trọng của **CD4**

So sánh giá trị phổ ^{13}C NMR phần nhánh bên của **CD4** với các giá trị tương ứng của 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone [98] gợi ý vị trí của nhóm OH xuất hiện thêm tại C-12. Ngoài ra, các tương tác trên phổ COSY của H_2 -11/H-12/ H_3 -13 và tương tác HMBC của proton H-13 (δ_H 1,20) với các carbon C-11 (δ_C 43,58) và C-12 (δ_C 63,90) chứng minh chính xác vị trí của nhóm oximetin C-12 (hình 3.3.2.4.b). Cấu hình *R* tại C-12 được xác định trên cơ sở độ quay cực của **CD4** ($[\alpha]_D^{25} + 16$, trong MeOH), phù hợp với giá trị TTLT cho đồng phân *R* ($[\alpha]_D + 24$, trong MeOH) và ngược với giá trị TTLT cho đồng phân *S* ($[\alpha]_D - 24$, trong MeOH),

sử dụng hàm tính toán B3LYP/6-31g(d,p) cho MeOH với mô hình IEFPCM (dùng phần mềm tính toán lượng tử: Gaussian16W, Revision C.01, Gaussian, Inc, Wallingford, CT). Như vậy, hợp chất **CD4** được chứng minh là một hợp chất mới và được gọi tên là delicapyron D.

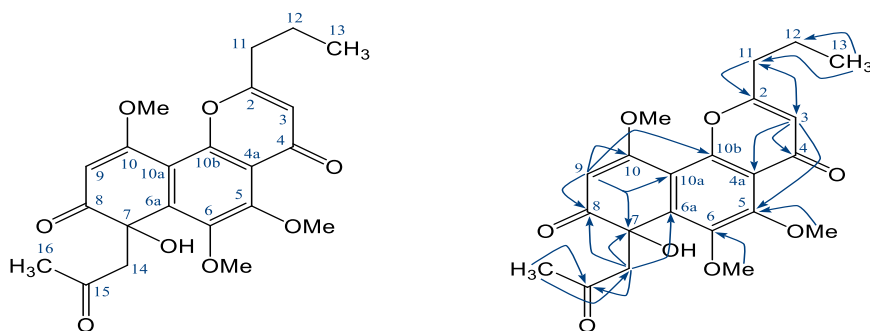
Bảng 4.7. Giá trị phổ NMR của **CD4**

C	δ_C^a	δ_C^b	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2		170,1	168,37	-	
3		108,7	110,00	6,42 s	2, 4a, 11
4		182,1	182,41	-	
4a		107,5	107,72	-	
5		145,8	145,75	-	
6		133,5	133,49	-	
6a		135,4	135,39	-	
7		95,3	95,33	6,91 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8		160,2	160,29	-	
9		97,5	97,59	6,53 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10		159,4	159,42	-	
10a		103,1	103,07	-	
10b		151,5	151,60	-	
11	42,7	35,2	43,58	2,80 m	2, 3, 12, 13
12	64,0	19,1	63,90	4,26 m	
13	23,2	13,3	23,35	1,20 d (6,0)	11, 12
5-OH			-	13,10 s	4a, 5, 6
6-OMe		59,4	59,45	3,84 s	6
10-OMe		55,9	56,01	3,94 s	10

^a δ_C phần nhánh 2'-hydroxypropyl của 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychrome trong DMSO-*d*₆ [98], ^b δ_C của 6-methoxycomparvin trong DMSO-*d*₆ [99], ^cđo trong DMSO-*d*₆, ^d125 MHz, ^e500 MHz.

4.1.2.5. Hợp chất **CD5**: Delicapyron E (chất mới)

CTPT của **CD5** được khẳng định là C₂₂H₂₄O₈ bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion [M+H]⁺ tại *m/z* 417,1553.



Hình 4.8. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD5**

Các giá trị phổ ^1H và ^{13}C NMR của **CD5** tương đồng các giá trị của 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether [73], ngoại trừ sự xuất hiện của một cacbon bậc bốn gắn với oxi [δ_{C} 73,69], một nhóm ketone [δ_{C} 199,58] và một nhánh 2-oxopropyl [δ_{C} 54,20 (CH_2), 208,46 (C) và 30,52 (CH_3)/ δ_{H} 4,02 (1H, d, $J = 16,5$ Hz), 3,60 (1H, d, $J = 16,5$ Hz) và 2,05 (3H, s)] ở **CD5** thay thế cho một cacbon metin và một cacbon bậc bốn thuộc vòng thơm ở hợp chất 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether.

Bảng 4.8. Giá trị phổ NMR của **CD5**

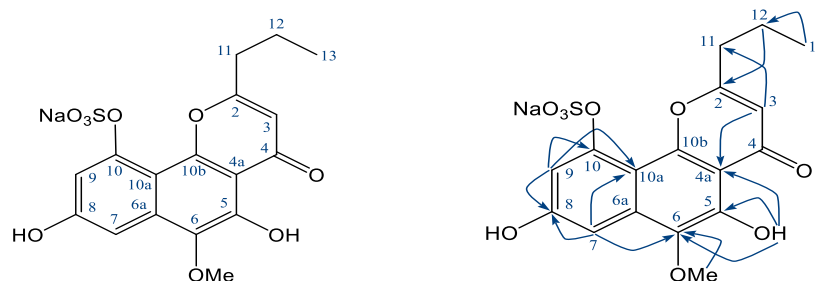
C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c,d}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c,e}}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2		165,9	170,84	-	
3		111,2	111,23	6,19 s	2, 4, 4a, 5, 11
4		175,7	179,22	-	
4a		113,5	120,15	-	
5		146,0	156,48	-	
6		142,6	150,97	-	
6a		134,2	144,86	-	
7	77,6	96,3	73,69	-	
8	198,5	159,7	199,58	-	
9	97,0	99,5	100,42	5,82 s	7, 8, 10, 10a, 10b
10	170,9	159,2	170,90	-	
10a	109,9	106,7	115,21	-	
10b	161,5	152,8	152,56	-	
11		34,7	36,74	2,70 t (7,5)	2, 3, 12, 13
12		19,1	21,02	1,87 m	
13		13,3	13,71	1,07 t (7,5)	11, 12
14	57,7		54,20	3,60 d (16,5) 4,02 d (16,5)	7, 8, 9, 15
15	205,0		208,46	-	
16	32,1		30,52	2,05 s	14, 15
5-OMe		61,4	62,27	3,93 s	5
6-OMe		60,9	62,66	3,98 s	6
10-OMe		56,1	57,52	4,06 s	10

^a δ_{C} của bennepyron A trong acetone- d_6 [100], ^b δ_{C} của 6-methoxycomaparvin-5-methyl ether [73], ^cđo trong CD_3OD , ^d125 MHz, ^e500 MHz.

So sánh giá trị phổ ^1H và ^{13}C NMR của **CD5** với các giá trị của bennepyron A [100] cho phép gợi ý vị trí của cacbon bậc bốn gắn với oxi C-7, nhóm ketone C-8 và nhánh 2-oxopropyl tại C-7. Nhận định này được minh chứng bằng các tương tác xa HMBC của H-9 với C-7, C-8, C-10, C-10a và C-10b và các tín hiệu của H-14 với C-6a, C-7 và C-8 (Hình 4.18). Hợp chất **CD5** không có giá trị độ quay cực

($[\alpha]^{20}_D = 0$ c 0,05 MeOH) và phổ CD của nó không có các hiệu ứng Cotton cho chứng minh hợp chất này là một hỗn hợp racemic. Như vậy, hợp chất **CD5** được chứng minh là một hợp chất mới và được gọi tên là delicapyron E.

4.1.2.6. Hợp chất **CD15**: Delicapyron F (chất mới)



Hình 4.9. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD15**

Bảng 4.9. Giá trị phổ NMR của **CD15**

C	δ_C^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,1	171,32	-	
3	108,7	108,48	6,41 s	2, 4, 4a, 11
4	182,1	182,59	-	
4a	107,5	107,99	-	
5	145,8	145,16	-	
6	133,5	133,50	-	
6a	135,4	134,79	-	
7	95,3	98,32	7,03 d (2,5)	6, 8, 9, 10a
8	160,2	159,42	-	
9	97,5	108,69	7,16 d (3,5)	7, 8, 10, 10a
10	159,4	152,35	-	
10a	103,1	105,88	-	
10b	151,5	151,21	-	
11	35,2	35,19	2,75 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	19,1	19,86	1,85 m	2, 11, 13
13	13,3	13,33	0,94 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	-	13,00 s	4a, 5, 6
6-OMe	59,4	59,52	3,84 s	6
10-OMe	55,9	-	-	-

^a δ_C của 6-methoxycomparvin [99], ^bđo trong CD₃OD, ^d125 MHz, ^c500 MHz.

Hợp chất **CD15** nhận được ở dạng bột màu vàng nhạt. Phổ ¹H-NMR cho thấy các pic của một nhánh *n*-propyl [δ_H 2,75 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H-11), 1,85 (2H, m, H-12) và 0,94 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-13)], một nhóm methoxy [δ_H 3,84 (3H, s, 6-OMe)], một proton vòng thơm bị cô lập [δ_H 6,41 (1H, s, H-2)], hai proton vòng thơm tương tác *meta* [δ_H 7,03 (H-7) and 7,16 (H-9), mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 2,5$ Hz]

và một proton OH có tạo liên kết hydro với nhóm ketone [δ_{H} 13,00 (1H, s, 5-OH)], cho thấy một hợp chất naphthopyrone.

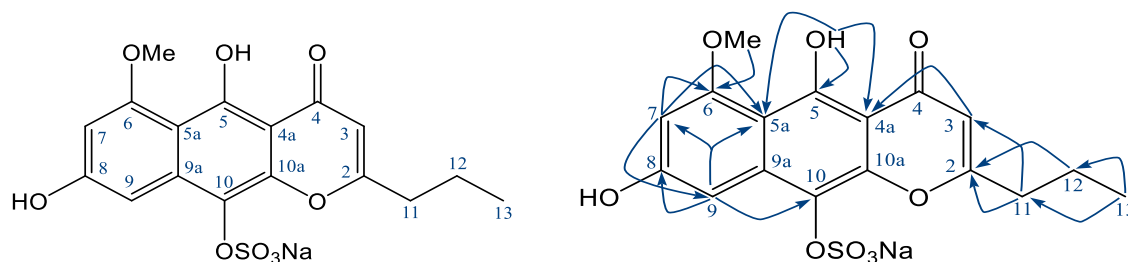
Phổ ^{13}C -NMR của **CD15** cho thấy tín hiệu của 17 cacbon với các tín hiệu đặc trưng của một nhóm ketone [δ_{C} 182,59 (C-4)], một nhóm methoxy [δ_{C} 59,52 (6-OMe)], một nhánh *n*-propyl [δ_{C} 35,19 (CH₂, C-11), 19,86 (CH₂, C-12) và 13,33 (CH₃, C-13)], 12 cacbon thuộc vòng thơm và nối đôi. Bảng 4.9 giá trị phổ ^{13}C -NMR của **CD15** phù hợp với các giá trị phổ của 6-methoxycomaparvin [99] ngoài sai khác lớn tại các vị trí xung quanh C-10. Phổ ^{13}C -NMR của **CD15** cho thấy sự chuyển dịch rất mạnh về vùng trường cao lên đến 7,1 ppm tại C-10 và về phía vùng trường thấp tương ứng 11,2 và 2,8 ppm tại C-10a và C-9 khi so sánh với 6-methoxycomaparvin [99]. Điều này phù hợp với hiệu ứng sulfat hóa trên phổ ^{13}C -NMR và cho thấy nhóm OMe tại C-10 đã được thay thế bằng nhóm sulphate [101]. Sự có mặt của nhóm sulfate được chứng minh bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion giả phân tử tại m/z 441,0239 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (TTLT cho ion C₁₇H₁₅Na₂O₉S⁺, 441,0227), tương ứng với CTPT của **CD15** là C₁₇H₁₄NaO₉S. Vị trí của nhóm sulfate tại C-10 cũng được chứng minh bằng các tương tác xa HMBC của H-7 với C-6 và C-8 cũng như của H-9 với C-8 và C-10. Như vậy, hợp chất **CD15** được chứng minh là một **hợp chất mới** và được gọi tên là delicapyron F.

4.1.2.7. Hợp chất **CD16**: Delicapyron G (chất mới)

CTPT của **CD16** được xác định trùng với **CD15** dựa trên phổ HR-QTOF-MS với pic ion [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ tại m/z 441,0236 (TTLT cho ion C₁₇H₁₅Na₂O₉S⁺, 441,0227).

Giá trị phổ ^1H -NMR của **CD16** tương đồng các giá trị đã công bố của 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one [102], ngoại trừ sự thiếu hụt tín hiệu của một nhóm methoxy. Các tín hiệu đặc trưng của 1 nhánh *n*-propyl [δ_{H} 2,56 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H-11), 1,79 (2H, m, H-12) và 0,95 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-13)], một nhóm methoxy [δ_{H} 3,85 (3H, s, 6-OMe)], một proton của nối đôi bị cô lập [δ_{H} 6,08 (1H, s, H-2)], hai proton thơm tương tác *meta* [δ_{H} 6,39 (H-7) and 7,20 (H-9), mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 2,0$ Hz] và một proton OH có tạo liên kết hydro với ketone [δ_{H} 14,66 (1H, s, 5-OH)] được ghi nhận trên phổ ^1H -NMR của **CD16**. Các tương tác xa HMBC của proton 5-OH (δ_{H} 14,66) với C-4a (δ_{C} 102,44), C-5 (δ_{C} 158,02), C-5a (δ_{C} 106,41); H-7 (δ_{H} 6,39) với C-5a (δ_{C} 106,41), C-6 (δ_{C}

160,28), C-8 (δ_C 159,30); H-9 (δ_H 7,20) với C-5a (δ_C 106,41), C-7 (δ_C 97,51), C-8 (δ_C 159,30), C-10 (δ_C 124,93); và tương tác của 6-OMe (δ_H 3,85) với C-6 (δ_C 160,28) chứng minh vị trí của 02 nhóm OH tại C-5, C-8 và nhóm methoxy tại C-6.



Hình 4.10. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD16**

Bảng 4.10. Giá trị phổ NMR của **CD16**

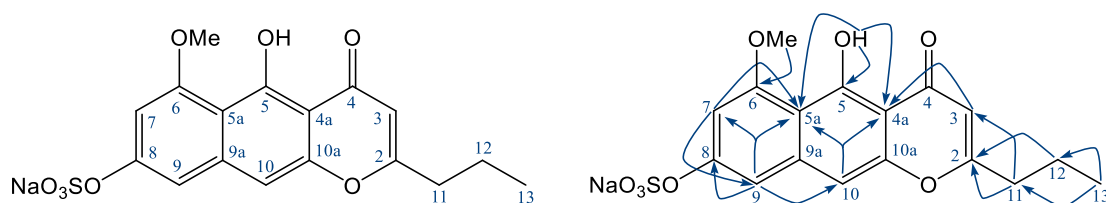
C	δ_H^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2		171,22	-	
3	5,98 s	105,60	6,08 s	2, 4a, 11
4		183,81	-	
4a		102,44	-	
5		158,02	-	
5a		106,41	-	
6		160,28	-	
7	6,42 d (2,0)	97,51	6,39 d (2,0)	5a, 6, 8, 9
8		159,30	-	
9	6,94 d (2,0)	97,97	7,20 d (2,0)	5a, 7, 8, 10
9a		136,91	-	
10		124,93	-	
10a		144,06	-	
11	2,73 t (7,0)	35,54	2,56 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	1,87	19,17	1,79 m	2, 11, 13
13	1,10 t (7,0)	13,38	0,95 t (7,0)	11, 12
5-OH		-	14,66 s	4a, 5, 5a
8-OH		-	10,23 s	
6-OMe	3,97 s	55,76	3,85 s	6
10-OMe	3,93 s			

^a δ_H của 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one đo trong CDCl₃/CD₃OD [102], ^cđo trong DMSO-*d*₆, ^d125 MHz, ^e500 MHz.

Tương tự như ở hợp chất **CD15**, tín hiệu ¹³C-NMR tại C-10 của **CD16** bị chuyển dịch rất mạnh về vùng trường cao tại δ_C 124,93 so với tín hiệu tương ứng của 5,6-dihydroxy-8,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one [73] tại δ_C 130,3 (C-10) chứng minh vị trí liên kết của gốc sulfate tại C-10. Như vậy, **CD16** được chứng minh là một chất mới và được gọi tên là delicapyron G.

4.1.2.8. Hợp chất **CD17**: *Delicapyrone H* (chất mới)

Hợp chất **CD17** nhận được dưới dạng bột màu vàng sẫm. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy một dẫn xuất naphthopyrone với sự cho thấy các pic đặc trưng của một nhánh *n*-propyl [δ_{H} 2,63 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H-11), 1,72 (2H, m, H-12) và 0,97 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-13)], một nhóm methoxy [δ_{H} 3,86 (3H, s, 6-OMe)], hai proton thuộc nối đôi hoặc vòng thơm bị cô lập [δ_{H} 6,17 (H-2) và 7,18 (H-10), mỗi tín hiệu 1H, s], hai proton thơm tương tác *meta* [δ_{H} 6,73 (H-7) và 7,21 (H-9), mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 2,0$ Hz], và một proton OH có hình thành liên kết hydro với ketone [δ_{H} 14,85 (1H, s, 5-OH)].



Hình 4.11. CTHH và các tương tác HMBC quan trọng của **CD17**

Bảng 4.11. Giá trị phổ NMR của **CD17**

C	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2		171,62	-	
3	6,08 s	106,17	6,17 s	2, 4a, 5, 11
4		183,91	-	
4a		103,94	-	
5		162,07	-	
5a		108,34	-	
6		159,68	-	
7	6,41 d	99,80	6,73 d (2,0)	5a, 9
8		155,65	-	
9	6,62 d	106,82	7,21 d (2,0)	5a, 7, 8, 10
9a		139,81	-	
10	6,97 s	101,14	7,18 s	
10a		152,24	-	
11	2,60 t	35,24	2,63 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	1,72 m	19,58	1,72 m	2, 11, 13
13	0,99 t (7,0)	13,30	0,97 t (7,0)	11, 12
5-OH	14,75 s	-	14,85 s	4a, 5, 5a
6-OMe	3,89 s	55,84	3,86 s	6

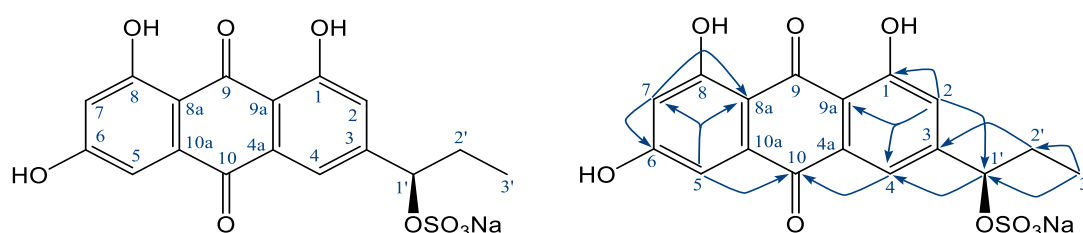
^a δ_{H} của 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one đo trong $\text{DMSO-}d_6$ [70], ^cđo trong $\text{DMSO-}d_6$, ^d150 MHz, ^e600 MHz.

Phân tích so sánh cho thấy giá trị phổ $^1\text{H-NMR}$ của **CD17** tương đồng các giá trị đã công bố của 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-

4-one [70]. Trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy 17 tín hiệu cacbon với một nhánh *n*-propyl [δ_{C} 35,24 (CH_2 , C-11), 19,17 (CH_2 , C-12) và 13,38 (CH_3 , C-13)], một nhóm ketone [δ_{C} 183,81 (C-4)], một nhóm methoxy [δ_{C} 55,84 (6-OMe)], 8 cacbon bậc bốn và 4 cacbon metin. Phân tích cụ thể các tín hiệu trên phổ HMBC chứng minh chính xác nhóm OH tại C-5 và nhóm OMe tại C-6 (Hình 4.21). Tương tự như ở hợp chất **CD15** và **CD16**, tín hiệu cacbon tại C-8 của **CD17** bị chuyển dịch mạnh về vùng trường cao tại δ_{C} 155,65 so với tín hiệu tương ứng của 5,6-dihydroxy-8,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one [73] tại δ_{C} 161,6 chứng minh nhóm sulfate tại C-8. Sự tồn tại của nhóm sulfate cũng được chứng minh bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion giả phân tử tại m/z 425,0289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (TTLT cho ion $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}^+$, 425.0278), phù hợp với CTPT của **CD17** là $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NaO}_9\text{S}$. Từ các dữ kiện trên, **CD17** được chứng minh là một **hợp chất mới** và được gọi tên là delicapyron H.

4.1.2.9. Hợp chất **CD18**: *Delicaquinon A* (chất mới)

Trên phổ ^1H -NMR của **CD18** cho thấy các tín hiệu của 4 proton thơm tương tác *meta* [δ_{H} 7,26 (1H, br s, H-2), 7,65 (1H, br s, H-4), 7,14 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5) và 6,58 (1H, br s, H-7)], một nhóm oxymethine [δ_{H} 5,09 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1')], một nhóm methylene [δ_{H} 1,75 (2H, m, H-2')] và một nhóm methyl ở cuối mạch [δ_{H} 0,82 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-3')]. Ngoài ra, trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy các pic của hai nhóm ketone tại δ_{C} 189,35 (C-9) và 181,53 (C-10), gợi ý cho một hợp chất anthraquinone, một lớp chất chính từ các loài huệ biển [94].



Hình 4.12. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD18**

Phân tích cụ thể các tín hiệu trên phổ HSQC cho phép gán giá trị phổ ^1H -NMR với các giá trị phổ ^{13}C -NMR tương ứng như đưa ra ở Bảng 4.1.2.9. Các giá trị phổ ^{13}C -NMR của **CD18** tương đồng các giá trị đã được công bố của 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone [88] ngoài sự khác biệt lớn về độ chuyển dịch hóa học tại C-1'. Tín hiệu C-1' trên phổ ^{13}C -NMR của **CD18** đo

trong dung môi DMSO-*d*₆ bị chuyển dịch mạnh về vùng trường thấp tại δ_C 77,24 so với tín hiệu tương ứng của 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone đo trong CD₃OD [88] tại δ_C 75,4 (C-1'), chứng minh cho sự xuất hiện của một nhóm sulfate tại cacbon này [103].

Bảng 4.12. Giá trị phổ NMR của **CD18**

C	δ_C^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H → C)
1	163,6	161,08	-	
2	122,3	121,66	7,26 br s	1, 4, 9a, 1'
3	156,6	152,91	-	
4	118,4	117,48	7,65 br s	2, 9a, 10, 1'
4a	134,9	132,74	-	
5	110,4	109,20 ^e	7,14 d (2,0)	7, 8a, 10
6	166,7	165,30 ^e	-	
7	109,1	107,89	6,58 br s	6, 8a
8	167,9	164,52	-	
8a	110,5	109,10 ^e	-	
9	191,7	189,35	-	
9a	115,9	114,28	-	
10	183,2	181,53	-	
10a	136,9	135,19	-	
1'	75,4	77,24	5,09 t (6,5)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	32,6	29,58	1,75 m	3, 2, 3'
3'	10,2	9,19	0,82 t (7,0)	1', 2'

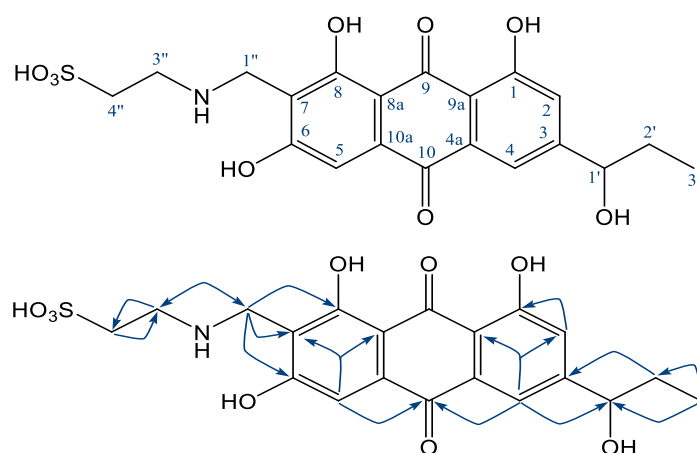
^a δ_C của 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone đo trong CD₃OD [88], ^bđo trong DMSO-*d*₆, ^c125 MHz, ^d500 MHz, ^e δ_C số liệu được xác định bằng phổ HSQC và HMBC.

Sự có mặt của nhóm sulfate được chứng minh thêm bằng phổ HR-QTOF-MS với ghi nhận pic ion $[M+Na]^+$ tại m/z 439,0078 (TTLT cho ion C₁₇H₁₃Na₂O₉S⁺, 439,0070) tương ứng với CTPT của **CD18** là C₁₇H₁₃NaO₉S. Các proton H-4 và H-5 có tương tác với cacbon keton C-10 chứng minh nhóm ketone tại C-10. Proton H-2 có tương tác với C-1 và C-1' cho thấy nhóm OH tại C-1 và mạch nhánh tại C-3. Cấu hình tại C-1' được gán là *R* dựa trên độ quay cực của **CD18** ($[\alpha]_D^{25} +39.5$, trong MeOH), tương tự như độ quay cực của (+)-rhodoptilometrín ($[\alpha]_D^{25} +18$, trong MeOH) [65] và ngược dấu với độ quay cực của (*S*)-(-)-rhodoptilometrín ($[\alpha]_D^{25} -8$, trong MeOH) [104]. Điều này được khẳng định thêm bằng sự phù hợp về giá trị độ quay cực thực nghiệm đo được với giá trị tính toán hóa lượng tử cho đồng phân *R* ($[\alpha]_D +70.2$, trong MeOH) và ngược với giá trị tính toán cho đồng phân *S* ($[\alpha]_D -69.91$, trong MeOH), sử dụng hàm tính toán B3LYP/6-31g(d,p) trong MeOH với

mô hình IEFPCM trên phần mềm Gaussian16W - Revision C.01 (Gaussian, Inc, Wallingford, CT). Như vậy, hợp chất **CD18** được chứng minh là một **hợp chất mới** và được gọi tên là delicaquinon A.

4.1.2.10. Hợp chất **CD19**: Delicaquinon B (chất mới)

Các giá trị phổ ^{13}C -NMR của **CD19** cũng tương đồng các giá trị của 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone [105], ngoài việc có một nhánh *N*-methylenetaurine [δ_{C} 40,79 (CH_2 , C-1''), 34,41 (CH_2 , C-3''), and 46,76 (CH_2 , C-4'')/ δ_{H} 4,02 (2H, s, H-1''), 3,17 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-3'') và 2,81 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-4'')] [106] và một cacbon bậc bốn ở **CD19** thay thế một nhóm methine ở 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone. Điều này cũng được khẳng định bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion giả phân tử ở m/z 450,0867 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (TTLT cho ion $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_9\text{S}^-$, 450,0864), phù hợp với CTPT của **CD19** là $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_9\text{S}$.



Hình 4.13. CTHH và tương tác HMBC quan trọng của **CD19**

Tương tác xa HMBC của proton H-5 (δ_{H} 6,68) với C-7 (δ_{C} 108,48), C-8a (δ_{C} 101,00), và C-10 (δ_{C} 183,41) cũng như tương tác của H-1'' (δ_{H} 4,02) với C-6 (δ_{C} 178,50), C-7 (δ_{C} 108,48) và C-8 (δ_{C} 164,17) chứng minh chính xác vị trí liên kết của nhánh *N*-methylenetaurine tại C-7. Tương tự như ở hợp chất **CD18**, cấu hình *R* tại C-1' của **CD19** được xác định dựa trên giá trị độ quay cực thực nghiệm ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 73,6$, trong MeOH), phù hợp với giá trị tính toán của đồng phân *R* ($[\alpha]_{\text{D}} + 91,6$, trong MeOH) và ngược với giá trị tính toán của đồng phân *S* ($[\alpha]_{\text{D}} - 79,6$, trong MeOH), sử dụng hàm tính toán B3LYP/6-31g(d,p) trong MeOH với mô hình IEFPCM trên phần mềm Gaussian16W - Revision C.01 (Gaussian, Inc,

Wallingford, CT). Như vậy, hợp chất **CD19** được chứng minh là một **hợp chất mới** và được gọi tên là *delicaquinon B*.

Bảng 4.13. Giá trị phổ NMR của **CD19**

C	δ_C^a	δ_C^b	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,3	161,0	160,66	-	
2	121,0	123,4	120,57	7,16 d (1,5)	1, 4, 1'
3	156,1	140,0	153,61	-	
4	117,1	118,1	116,14	7,59 d (1,5)	2, 9a, 10, 1'
4a	132,9	133,2	132,82	-	
5	108,9	112,8	116,65	6,68 s	7, 8a, 10
6	165,7	171,4	178,50 ^f	-	
7	107,9	110,8	108,48	-	
8	164,5	164,1	164,17	-	
8a	108,9	106,7	101,00 ^f	-	
9	189,6	187,2	Nd	-	
9a	114,1	118,0	115,20	-	
10	181,4	182,5	183,41	-	
10a	135,2	134,5	134,00	-	
1'	72,6		72,70	4,54 t (6,5)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	31,3		31,40	1,63 m	3, 1', 3'
3'	9,7		9,78	0,86 t (7,0)	1', 2'
1''		40,7	40,79	4,02 s	6, 7, 8, 3''
3''		43,5	43,41	3,17 t (6,5)	1'', 4''
4''		47,2	46,76	2,81 t (6,5)	3''

^a δ_C của 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone trong DMSO-*d*₆ [105], ^b δ_C của hypalocrinin D trong DMSO-*d*₆ [106], ^b δ_O trong DMSO-*d*₆, ^c125 MHz, ^d500 MHz, ^f δ_C số liệu được xác định bằng phổ HMBC; nd: tín hiệu không ghi nhận được.

4.1.2.11. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất khác

Bằng cách tương tự như đã thực hiện nêu trên, kết hợp các giá trị phổ NMR 1 chiều, 2 chiều và so sánh với các giá trị đã công bố các hợp chất khác được khẳng định là: comaparvin (**CD6**) [96], 6-methoxycomaparvin (**CD7**) [96, 97], 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-methyl-4*H*-naphtho[1,2-*b*]pyran-4-one (**CD8**) [73], 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (**CD9**) [70, 95], 5,8-dihydroxy-6,10-dimethoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (**CD10**) [73, 107], 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**CD11**, trùng với hợp chất **CM4** từ huệ biển - *Capillaster multiradiatus*) [88, 91, 92], 3-(1'-hydroxypropyl)-1,4,6,8-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (**CD12**, trùng với **CM6** từ huệ biển - *Capillaster multiradiatus*) [90], 3-(1'-hydroxypropyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-

anthraquinone (**CD13**, trùng với **CM7** từ huệ biển - *Capillaster multiradiatus*) [88, 92], capillasterquinone B (**CD14**, trùng với **CM2** từ huệ biển - *Capillaster multiradiatus*), 6-methoxycomaparvin-5-methylether-8-*O*-sodium sulfate (**CD20**) [108-110], 6-methoxycomaparvin-8-*O*-sodium sulfate (**CD21**) [110], comaparvin-8-*O*-sodium sulfate (**CD22**) [109] và 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone-6-*O*-sodium sulfate (**CD23**) [111]. Các dữ liệu phổ của các hợp chất này được trình bày ở phụ lục của luận án.

4.1.3. Tổng hợp và nhận xét về kết quả xác định CTHH các hợp chất

Đối với loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*, 07 trong số 08 hợp chất phân lập được là dẫn xuất anthraquinone trong đó có 2 chất mới là capillasterquinone A (**CM1**), capillasterquinone B (**CM2**) và một dẫn xuất butenolide mới là capillasterolide (**CM8**) (Hình 3.1). Trên thế giới, các nghiên cứu về loài huệ biển này đã công bố sự có mặt của các dẫn xuất naphthopyrone và pyrano[2,3-*f*]chromene [73, 112]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên các dẫn xuất anthraquinone và butenolide được phát hiện từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

Đối với loài huệ biển *Comanthus delicata* trong số 23 hợp chất phân lập được (Hình 3.2) có 2 dẫn xuất bisnaphthopyrone mới là delicapyron A (**CD1**) và B (**CD2**); 8 dẫn xuất naphthopyrone trong đó có 3 chất mới là delicapyron C-E (**CD3-CD5**); 6 dẫn xuất naphthopyrone sulfate trong đó có 03 chất mới là delicapyron F-H (**CD15-CD17**); 4 dẫn xuất anthraquinone và 3 dẫn xuất anthraquinone sulfate trong đó có 2 chất mới là delicaquinon A (**CD18**) và B (**CD19**). Hai hợp chất mới **CD1**, **CD2** có cấu trúc khung bisnaphthopyrone rất hiếm gặp chứa một đơn vị naphthopyrone góc và một đơn vị naphthopyrone thẳng liên kết với nhau qua một nhóm CH₂. Theo tra cứu, đây là lần đầu cấu trúc này được phát hiện và công bố. Hợp chất delicaquinon B (**CD19**) có chứa nhánh *N*-methylenetaurine hiếm gặp và lần đầu được phát hiện từ các loài huệ biển thuộc giống *Comanthus*. Đây cũng là lần đầu các nghiên cứu về thành phần hóa học và HT SH của loài huệ biển *Comanthus delicata* được thực hiện. Thành phần chính từ loài này đều là các dẫn xuất naphthopyrone và anthraquinone cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu về huệ biển trên thế giới.

4.2. Đánh giá hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất phân lập được

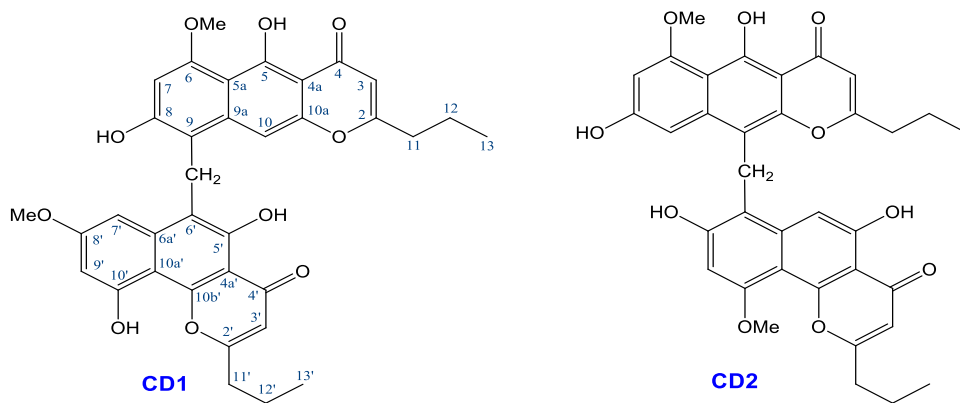
4.2.1. Hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất phân lập được

Khi nghiên cứu các chất chống ung thư, việc sàng lọc và đánh giá các chất có khả năng ức chế và tiêu diệt TB UT là vô cùng quan trọng, chủ yếu được thực hiện dựa trên tác dụng gây độc các dòng TB UT thực nghiệm. Có nhiều phương pháp được sử dụng để xác định ảnh hưởng của một hoạt chất lên sự sống sót của các dòng tế bào nuôi cấy *in vitro*. Từ những phép thử đơn giản, đánh giá khả năng sống sót của tế bào sau khi tiếp xúc với chất thử qua việc sử dụng thuốc nhuộm để đánh giá tính toàn vẹn của màng (đếm tế bào), đến các phép thử xác định khả năng sống sót của tế bào một cách gián tiếp thông qua việc xác định khả năng khử các hợp chất như MTT, MTS, SRB... hoặc khả năng tạo ATP. Ưu điểm của các phép thử này là có thể thực hiện đơn giản, nhiều hợp chất hay nhiều nồng độ có thể được thử nghiệm nhanh chóng trên đĩa 96 giếng.

Kết quả đánh giá hoạt tính GĐTB trên 05 dòng TB UT người là KB, SK-Mel-2, HepG2, LNCaP và MCF7 cho thấy **CD2** thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng TB UT da SK-Mel-2 và ung thư vú MCF7 với IC_{50} tương ứng là $11,99 \pm 0,69$ và $14,90 \pm 2,25 \mu M$. Các hợp chất **CD4**, **CD6**, **CD7**, **CD8** có hoạt tính mạnh với dòng TB UT da SK-Mel-2 với IC_{50} tương ứng là $8,51 \pm 0,98$, $12,03 \pm 0,54$, $11,68 \pm 0,88$, $10,49 \pm 1,25 \mu M$. Hoạt tính GĐTB đáng kể cũng nhận được ở **CD7** trên dòng TB UT vú MCF7 ($IC_{50} = 25,76 \pm 3,85 \mu M$) và **CD20** trên dòng TB UT LNCaP ($IC_{50} = 20,29 \pm 2,43 \mu M$). Các hợp chất **CD1**, **CD3**, **CD5**, **CD9**, **CD10** có hoạt tính trung bình với dòng tế bào SK-Mel-2 với IC_{50} tương ứng là $44,45 \pm 2,86$, $47,03 \pm 2,66$, $38,15 \pm 4,24$, $36,01 \pm 2,08$, $31,46 \pm 3,36 \mu M$ và hợp chất **CD4** trên dòng tế bào MCF7 với IC_{50} là $39,98 \pm 4,47 \mu M$. Hoạt tính GĐTB yếu nhận được ở các hợp chất **CM2** và **CM5** trên cả 05 dòng TB UT được thử nghiệm (IC_{50} trong khoảng từ $49,13 \pm 2,52$ đến $98,68 \pm 6,48 \mu M$); hợp chất **CD1** và **CD4** trên dòng tế bào KB (IC_{50} tương ứng là $52,20 \pm 6,01$ và $80,12 \pm 3,54 \mu M$); các hợp chất **CD15-CD17** và **CD19-CD22** trên dòng tế bào SK-Mel-2 (IC_{50} trong khoảng từ $49,96 \pm 1,74$ đến $76,92 \pm 5,85 \mu M$); hợp chất **CD1** và **CD4** trên dòng tế bào HepG2 (IC_{50} tương ứng là $55,53 \pm 5,16$ và $79,03 \pm 2,29 \mu M$); các hợp chất **CD1**, **CD4**, **CD21**, **CD22** trên dòng tế bào LNCaP (IC_{50} trong khoảng từ $54,53 \pm 1,82$ đến $66,16 \pm 1,26 \mu M$); và các hợp chất **CD1**, **CD8**, **CD10** trên dòng MCF7 (IC_{50} tương ứng là $64,28 \pm 2,03$, $84,49 \pm 7,24$,

60,26±2,81µM). Các hợp chất **CM1**, **CM3**, **CM4**, **CM6-CM8**, **CD18** và **CD23** không có hoạt tính ở tất cả 05 dòng TB UT được đánh giá với $IC_{50} > 100 \mu M$.

Từ kết quả trên có thể cho thấy các hợp chất khung bisnaphthopyrone gồm một đơn vị naphthopyrone góc và một đơn vị naphthopyrone thẳng liên kết với nhau qua một nhóm CH_2 , trong đó vị trí nối của cầu CH_2 có thể quyết định tới HT SH của hợp chất. Điều này được thể hiện khi hợp chất **CD2** có hai đơn vị naphthopyrone liên kết qua cầu metilen tại các vị trí C-10 và C-7' có hoạt tính mạnh hơn so với hợp chất **CD1** có cầu metilen liên kết tại vị trí C-9 và C-6' (Hình 4.14). Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính GĐTB của chúng.



Hình 4.14. CTHH của hai hợp chất mới **CD1** và **CD2**

Với 14 naphthopyrone phân lập được, 08 dẫn xuất naphthopyrone bao gồm **CD3**, **CD4**, **CD5**, **CD6**, **CD7**, **CD8**, **CD9**, **CD10** đều có hoạt tính mạnh và trung bình trên dòng TB UT da SK-Mel-2, trong khi đó 06 dẫn xuất naphthopyrone sulfate gồm **CD15**, **CD16**, **CD17**, **CD20**, **CD21**, **CD22** lại có hoạt tính GĐTB yếu (Bảng 3.2). Điều này cho thấy việc có mặt của nhóm sulfate trong cấu trúc naphthopyrone có thể làm giảm hoạt tính gây độc TB UT của các hợp chất. Trước đây, nhóm propyl trong các naphthopyrone cũng đã từng được cho là có vai trò quan trọng trong hoạt động sinh học khi các nhà khoa học người Australia nhận thấy nhóm propyl ở vị trí C-2 của một số các naphthopyrone từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* có hoạt tính GĐTB yếu hơn các hợp chất có nhóm methyl tại vị trí này [73], [112]. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cũng đã góp phần vào cơ sở dữ liệu mối liên quan giữa cấu trúc và HT SH của các hợp chất naphthopyrone. Hợp chất **CD6**, **CD9** có khả năng ức chế sự nhân lên của HIV-1 trong nghiên cứu *in vitro* theo Kah Yean Lum và đồng nghiệp chỉ ra dạng

naphthopyrone góc (**CD6**) hoạt tính mạnh hơn gấp hai lần so với naphthopyrone thẳng (**CD9**). Ở nghiên cứu của tác giả cũng chỉ ra sự phù hợp khi **CD6** có hoạt tính GĐTB mạnh hơn gấp ba lần hợp chất **CD9** trên dòng TB UT da SK-Mel-2 (Bảng 3.2). Hợp chất **CD8** theo nghiên cứu trước đây có khả năng ức chế chất vận chuyển trung gian ABCG2-một protein chống lại ung thư vú liên quan tới việc kháng thuốc hóa trị liệu với IC_{50} là $11,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$ [73]. Trong nghiên cứu của luận án, **CD8** lại có hoạt tính GĐTB yếu với dòng TB UT vú MCF7 ($IC_{50}=84,49 \pm 7,24 \mu\text{M}$) nhưng có hoạt tính GĐTB mạnh với dòng TB UT da SK-Mel-2 ($IC_{50}=10,49 \pm 1,25 \mu\text{M}$).

Hợp chất anthraquinone **CM4** đã được nghiên cứu là có tác dụng GĐTB mạnh với TB UT thần kinh đệm C6 và ung thư biểu mô ruột kết Hct116 [67]; **CM4** và **CM7** GĐTB không chọn lọc với 3 dòng TB UT thần kinh SF-268, ung thư vú MCF-7 và ung thư phổi H460 [64] còn trong nghiên cứu của luận án, **CM4** lại không có hoạt tính ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) với cả 5 dòng TB UT thử nghiệm. Các anthraquinone khác đã nhận được là **CM1**, **CM2**, **CM6**, **CD18**, **CD19** và **CD23** cũng đều có hoạt tính yếu hoặc không thể hiện hoạt tính GĐTB với các dòng TB UT thử nghiệm.

Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng **CD7** ức chế hoàn toàn TNF- α gây ra bởi NF- κB (một yếu tố phiên mã cảm ứng có vai trò quan trọng trong tiến triển ung thư và viêm) ở nồng độ $300 \mu\text{M}$ qua ức chế enzym kinase $IKK\beta$ [72]. Ngoài ra, **CD7** còn có khả năng ức chế chất vận chuyển trung gian ABCG2-một protein chống lại ung thư vú liên quan tới việc kháng thuốc hóa trị liệu [73]. Từ huệ biển *Comanthus delicata* chúng tôi đã thu được hợp chất **CD7** với khối lượng khá nhiều (10,5 mg). Dựa trên các nghiên cứu đã có về khả năng chống ung thư của hợp chất này, **CD7** được lựa chọn để nghiên cứu thêm về khả năng cảm ứng apoptosis trên dòng TB UT da SK-Mel-2.

4.2.2. Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của CD7 trên dòng tế bào ung thư SK-Mel-2

4.2.2.1. Xác định khả năng gây apoptosis của CD7 bằng kit Annexin V-FITC

Apoptosis là quá trình gây chết tế bào theo chương trình đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các tế bào bệnh, tế bào ác tính và các tế bào không mong muốn khác từ cơ thể [29]. Dựa trên một số nghiên cứu cho rằng các khiếm khuyết

trong quá trình apoptosis có thể góp phần gây bệnh như ung thư nên mỗi quan tâm đến việc kiểm soát quá trình apoptosis đã phát triển theo cấp số nhân giữa các nhà nghiên cứu ung thư.

Một biểu hiện sớm của quá trình apoptosis đó là sự chuyển dịch của phosphatidylserine (PS) màng từ trong màng nguyên chất ra ngoài bề mặt tế bào. Annexin V là một protein liên kết với phospholipid phụ thuộc vào ion Ca^{++} có ái lực mạnh với PS nên được dùng rộng rãi để phát hiện các tế bào apoptosis. Vì vậy, Annexin V thường được gắn với chất hiện màu huỳnh quang FITC để xác định sự biểu hiện của PS thông qua phương pháp Flow cytometry. Sự chuyển dịch của PS thường xảy ra trước khi màng tế bào bị phá hủy trong quá trình chết của tế bào do apoptosis hoặc hoại tử. Vì vậy nhuộm annexin V thường kết hợp với PI để xác định apoptosis sớm và muộn. Thông qua phương pháp này, những tế bào sống không nhuộm với bất kì loại màu nhuộm nào do màng tế bào toàn vẹn. Tế bào biểu hiện apoptosis sớm bắt màu với annexin V-FITC, tế bào biểu hiện apoptosis muộn bắt màu với annexin V-FITC và PI; tế bào chết do hoại tử chỉ bắt màu với thuốc nhuộm PI.

Kết quả đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của mẫu nghiên cứu dùng kĩ thuật Flow cytometry ở Hình 3.3 và Bảng 3.3 cho thấy: Ở mẫu đối chứng âm, số lượng tế bào sống cao lên đến 91,22% và chỉ có 0,94% tế bào có dấu hiệu apoptosis (Hình 3.3A). Dưới tác động của Camptothecine được dùng làm chất đối chứng dương, quần thể tế bào sống suy giảm chỉ còn 35,91%, tổng số lượng tế bào apoptosis là 60,56% (Hình 3.3B). Hợp chất **CD7** với các nồng độ thử nghiệm đều làm tỉ lệ tế bào thuộc giai đoạn apoptosis sớm tăng mạnh, apoptosis muộn đều tăng lên khi so sánh với chất đối chứng. Ở tế bào đối chứng, tỷ lệ % tế bào apoptosis sớm chỉ là 0,51% tuy nhiên tỷ lệ này tăng lên đến 67,20% dưới tác động của **CD7** ở 100 μ M. Khi giảm nồng độ chất thử xuống 20 và 4 μ M thì tỷ lệ tế bào apoptosis sớm tương ứng là 39,42% và 23,93%. Tổng % tế bào apoptosis tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý **CD7** ở nồng độ 4 μ M là 34,56% đã tăng lên 45,83% khi sử dụng nồng độ 20 μ M và tăng đến 78,18% khi nồng độ **CD7** là 100 μ M.

Như vậy, **CD7** thể hiện rõ khả năng gây chết TB UT da ở người SK-Mel-2 thông qua quá trình apoptosis do đó được thử nghiệm tiếp để đánh giá khả năng kích hoạt caspase-3.

4.2.2.2. *Đánh giá tác dụng kích hoạt caspase-3 của CD7*

Một trong ba thay đổi sinh hóa chính của quá trình apoptosis là kích hoạt các caspase [30]. Caspase là một nhân tố quan trọng để bắt đầu và thực hiện apoptosis. Trong quá trình apoptosis, các caspase phản ứng bao gồm caspase-3, caspase-6, caspase-7 đóng vai trò phân cắt các chất nền khác nhau như cytokeratins, protein tế bào màng sinh chất alpha fodrin... cuối cùng gây ra đặc điểm hình thái và những thay đổi sinh hóa trong các tế bào apoptosis. Caspase-3 được xem là quan trọng nhất vì nó được kích hoạt bởi bất kì caspase khởi đầu nào (caspase-8, caspase-9, caspase-10) trong cả 2 con đường apoptosis nội bào và ngoại bào [33]. Caspase-3 còn có thể được kích hoạt bởi các tín hiệu gây chết khác nhau, bao gồm cả các tác nhân hóa trị liệu [113].

Do **CD7** có khả năng gây chết tế bào SK-Mel-2 thông qua apoptosis so với đối chứng âm nên chúng tôi đánh giá tác dụng kích hoạt caspase-3 của **CD7** để tiếp tục nghiên cứu cơ chế gây độc TB UT của hợp chất này.

Kết quả ở Hình 3.4 cho thấy:

Ở 100 μ M và 20 μ M, **CD7** đã thể hiện rõ khả năng cảm ứng caspase-3 ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$ và $P < 0,05$). Số lần kích thích sinh caspase-3 tăng 1,45 lần so với chất đối chứng âm khi sử dụng **CD7** ở 20 μ M và tăng 1,79 lần so với chất đối chứng âm khi sử dụng **CD7** ở 100 μ M.

Ở nồng độ 4 μ M, **CD7** cho thấy đã làm tăng hoạt tính caspase-3 gấp 1,22 lần khi so sánh với chất đối chứng âm nhưng chưa ở mức có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Chất đối chứng dương (camptothecin 1 μ M) hoạt động ổn định với hoạt tính kích thích caspase-3 tăng 2,48 lần khi so sánh với chất đối chứng âm ($P < 0,05$).

Như vậy **CD7** gây độc TB UT da SK-Mel-2 thông qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3.

Trước đây, Devarajan và đồng nghiệp của mình đã chỉ ra rằng mức mRNA caspases-3 trong RNA tổng số không thể phát hiện được (ở tế bào khối u vú và cổ tử cung) hoặc giảm đáng kể (ở tế bào khối u buồng trứng). Quá trình apoptosis có thể được tăng cường bằng cách khôi phục biểu hiện caspase-3 cho thấy sự mất biểu hiện và chức năng của caspase-3 có thể góp phần vào thời gian sống của TB UT vú [113].

Nghiên cứu của luận án lần đầu tiên công bố về tác dụng kích hoạt caspase-3 của **CD7** trên dòng TB UT da ở người SK-Mel-2. Điều này góp phần khẳng định hợp chất **CD7** là hợp chất tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo với định hướng điều trị ung thư.

4.3. Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập được

4.3.1. Đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO

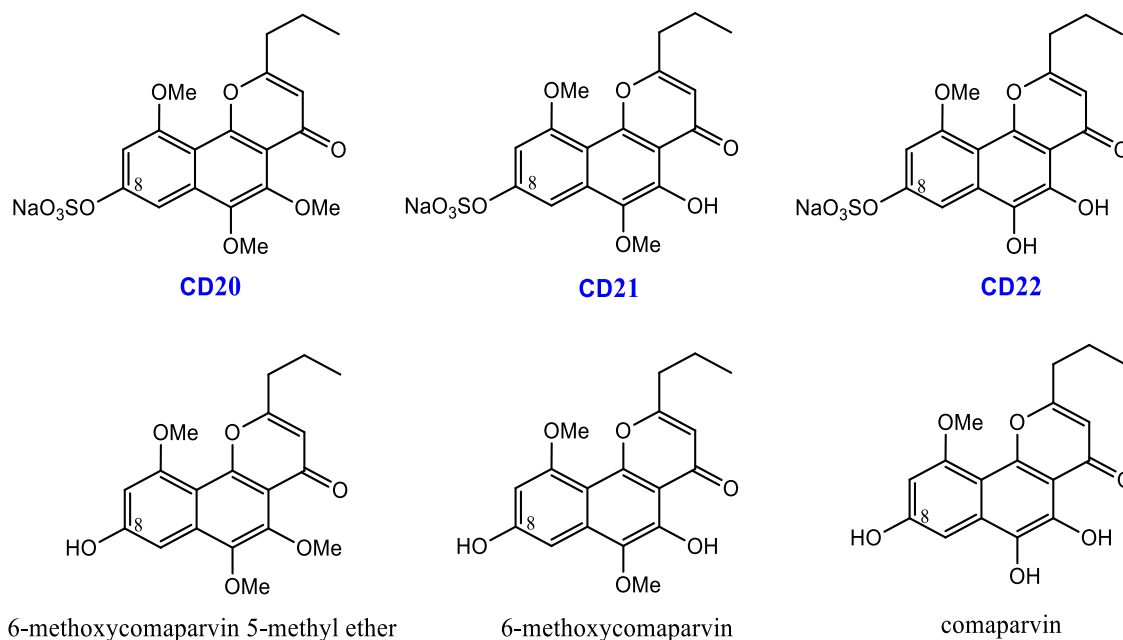
NO là một trong những yếu tố trung gian gây viêm có mặt trong quá trình sinh bệnh viêm. Do đó, phương pháp sàng lọc hoạt tính kháng viêm khá hiệu quả của các mẫu nghiên cứu là ức chế sự hoạt động hay lượng NO tạo ra ở các tế bào đại thực bào có sử dụng chất gây viêm để kích thích.

Kết quả đánh giá khả năng ức chế sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 ở mục 3.2.1 cho thấy **CM1** thể hiện hoạt tính mạnh nhất với IC_{50} là $5,89 \pm 0,11 \mu\text{M}$. Các hợp chất **CM2**, **CM4**, **CM7** có hoạt tính tốt với IC_{50} tương ứng là $12,02 \pm 0,45$, $13,18 \pm 0,15$, $16,98 \pm 0,98 \mu\text{M}$. Trong khi đó, các hợp chất **CM3**, **CM5**, **CD4**, **CD6**, **CD8** có hoạt tính đáng kể với IC_{50} tương ứng là $20,89 \pm 0,76$, $19,05 \pm 0,32$, $36,18 \pm 2,98$, $24,98 \pm 1,13$, $31,25 \pm 3,09 \mu\text{M}$. Các hợp chất **CD3** ($IC_{50} = 63,55 \pm 4,08 \mu\text{M}$), **CD7** ($IC_{50} = 55,44 \pm 2,77 \mu\text{M}$), **CD23** ($IC_{50} = 60,33 \pm 2,82 \mu\text{M}$) thể hiện hoạt tính yếu và các hợp chất còn lại không có hoạt tính ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Hợp chất **CM4** và **CM7** theo như nghiên cứu trước đây đã được chứng minh là có tác dụng ức chế đáng kể sự tích tụ của protein iNOS gây viêm trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS ở nồng độ 10-50 μM [114]. Ở nghiên cứu của luận án cũng cho thấy sự phù hợp khi hai hợp chất **CM4** và **CM7** bước đầu được đánh giá là có hoạt tính tốt khi ức chế đáng kể sự sản sinh chất trung gian tiền viêm NO.

Các bisnaphthopyrone mới (**CD1**, **CD2**) lần đầu tiên được đánh giá tác dụng ức chế sự sinh NO tuy nhiên chúng đều không có hoạt tính mặc dù hợp chất **CD2** có hoạt tính GĐTB đáng kể với hai dòng TB UT da SK-Mel-2 và TB UT vú MCF7 như đã trình bày ở mục 4.2.1.

Các hợp chất **CD20**, **CD21**, **CD22** chúng tôi phân lập được với sự xuất hiện của nhóm sulfat tại vị trí C-8 lại không có hoạt tính trong khi các hợp chất tương ứng có nhóm OH tại vị trí C-8 là 6-methoxycomaparvin 5-methyl ether, 6-methoxycomaparvin và comaparvin đã được nghiên cứu là có hoạt tính kháng viêm

tiềm năng [74], [75]. Kết quả này gợi ý sự thay thế của nhóm sulfat tại vị trí C-8 trong các angular naphthopyrone có thể làm ảnh hưởng tới hoạt tính kháng viêm của hợp chất cũng tương tự như kết quả đánh giá hoạt tính GĐTB của các dẫn xuất naphthopyrone sulfat đã trình bày ở mục 4.2.1.



Hình 4.15. CTHH **CD20**, **CD21**, **CD22** và các chất so sánh

Hiện nay, việc tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế NO để chữa trị bệnh viêm một cách an toàn đang được quan tâm nhiều hơn của các ngành y dược học. Hợp chất mới **CM1** có cấu trúc tương tự hợp chất 3-propyl-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinone - đã được xác định có hoạt tính kháng viêm tiềm năng thông qua sự chức chế biểu hiện iNOS trong tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS [114]. Với lượng chất nhận được nhiều (21 mg) và hoạt tính mạnh, hợp chất **CM1** được lựa chọn để đánh giá thêm tác dụng ức chế sự biểu hiện các protein tiền viêm iNOS và COX-2 ở tế bào RAW264.7.

4.3.2. Đánh giá sự ức chế biểu hiện iNOS và COX-2 của **CM1**

Bạch cầu đơn nhân và đại thực bào đóng một vai trò quan trọng trong quá trình viêm. Lipopolysaccharides (LPS), một thành phần của màng ngoài vi khuẩn Gram âm, đã được dùng rộng rãi để kích thích phản ứng viêm cũng như kích hoạt các đại thực bào. Các tế bào này được kích hoạt sản sinh ra một số chất trung gian như nitric oxide (NO), các cytokine như interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, và yếu tố hoại tử khối u α (TNF- α)... iNOS và COX-2 được biết đến là hai protein trung gian chính của phản ứng viêm. NO được sinh ra bởi NOS (nitric oxide synthases). Có ba dạng

NOS: nNOS (NOS thần kinh ở hệ thần kinh trung ương, cơ xương và tụy), iNOS (NOS cảm ứng ở đại thực bào đã kích hoạt, tim, gan và tế bào cơ trơn), và eNOS (NOS nội mô ở nội mô, não và biểu mô). iNOS là xúc tác chính phản ứng oxi hóa của quá trình khử amin của L-arginine để sinh ra NO. Việc sản sinh quá nhiều NO có thể gây ra các tác động có hại như shock nhiễm khuẩn và kích thích sản sinh các yếu tố trung gian của quá trình viêm. Sự tăng lên của sản phẩm NO trong tế bào bởi iNOS được tìm thấy ở nhiều bệnh tự miễn và viêm mãn tính.

Ngoài iNOS, COX-2 là một enzyme có tác dụng sản sinh ra các prostaglandin, nhân tố quan trọng trong quá trình viêm, từ arachidonic axit. Các chất hay thuốc kháng viêm không đảo ngược được quá trình viêm mà chỉ giới hạn hoặc làm chậm quá trình viêm bằng cách ức chế việc sản xuất các chất trung gian gây viêm. Các thuốc kháng viêm được chia làm hai loại: Loại steroid và loại không steroid. Trên thị trường hiện nay chủ yếu là các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs-Nonsteroidal anti-inflammatory drugs), đa số là các thuốc tổng hợp và có tác dụng hầu hết trên các loại viêm không phân biệt nguyên nhân. Cơ chế hoạt động của các thuốc này là kìm hãm hoạt động của các enzyme cyclooxygenase COX-2, làm giảm tổng hợp các prostaglandin (PG-yếu tố trung gian quan trọng nhất gây nên phản ứng viêm) [52]. Tuy nhiên NSAIDs cũng gây ảnh hưởng đến COX-1 dẫn tới sự thay đổi nội mô mà hậu quả là những tác động có hại đến dạ dày, thận. Do đó, việc tìm kiếm các HCTN có khả năng ức chế đặc hiệu COX-2 hoặc NO để chữa viêm mà vẫn an toàn đang được các nhà khoa học quan tâm.

Các enzyme COX-2 và iNOS được cảm ứng bởi các cytokine tương tự và các nhân tố cảm ứng khác do đó chúng có thể được đồng điều chỉnh [115]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá sự ức chế biểu hiện của hai protein này trên dòng tế bào RAW264.7 dưới tác động của **CM1**.

Tác động của **CM1** lên sự biểu hiện của hai protein COX-2 và iNOS liên quan đến quá trình viêm được đánh giá bằng phương pháp Western Blot như đã trình bày ở mục 2.3.2.2. Tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS và xử lý với **CM1** ở các nồng độ 1, 3 và 10 μ M. Kết quả Western Blot cho thấy, theo sự tăng nồng độ, **CM1** gây giảm biểu hiện của COX-2 và iNOS. Trong khi đó mức độ biểu hiện của tubulin không thay đổi (Hình 3.5).

Như vậy, hợp chất **CM1** ức chế mạnh sự tạo thành NO thông qua kìm hãm sự biểu hiện của COX-2 và iNOS. Do đó, **CM1** là một hợp chất kháng viêm tiềm năng. Đây cũng là lần đầu tiên nghiên cứu về hoạt tính kháng viêm của **CM1** được công bố cho tới hiện nay.

Bên cạnh các nghiên cứu đã công bố về hoạt tính kháng viêm của các hợp chất naphthopyrone từ các loài huệ biển [74], [75], kết quả nghiên cứu của tác giả có thể được dùng làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính kháng viêm của các hợp chất anthraquinone.

Hóa học các HCTN biển đã phát triển trong suốt bảy thập kỷ qua, cho đến nay, đã phát hiện được nhiều hơn 20.000 hợp chất mới từ các sinh vật biển bao gồm vi khuẩn, nấm, vi tảo, rong biển, bọt biển, san hô mềm, động vật thân mềm, động vật hình rêu (bryozoans), da gai và hải tiêu [116]. Nhiều hợp chất trong số này có cấu trúc rất độc đáo và thể hiện HT SH đáng kể. Một số hợp chất bắt nguồn từ biển đã được chọn làm chất dẫn đường cho nghiên cứu nhiều loại thuốc điều trị các bệnh khác nhau. Những nghiên cứu của luận án đóng góp vào kho tàng các HCTN biển và là cơ sở khám phá nguồn dược liệu từ những hợp chất tiềm năng. Trong khuôn khổ của luận án, nhiều hợp chất thu được có hoạt tính tốt nhưng lượng ít do việc thu thập mẫu sinh vật biển rất khó khăn nên chưa thể tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế. Do đó, trong các nghiên cứu về sau này, các hợp chất cần được phân lập đủ lượng để có thể thực hiện sâu hơn các phép thử sinh học.

CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam được tiến hành về thành phần hóa học và HT SH của hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu ở vùng biển Việt Nam.

1. Nghiên cứu thành phần hóa học

Đã phân lập và xác định cấu trúc 31 hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu thập tại vùng biển Việt Nam. Cụ thể:

+ Từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* đã phân lập và xác định cấu trúc 08 hợp chất với **3 hợp chất mới** là capillasterquinone A (**CM1**), capillasterquinone B (**CM2**), capillasterolide (**CM8**).

+ Từ loài huệ biển *Comanthus delicata* đã phân lập và xác định cấu trúc 23 hợp chất với **10 hợp chất mới** là delicapyron A–H (**CD1–CD5** và **CD15–CD17**) và delicaquinon A (**CD18**) và B (**CD19**).

2. Nghiên cứu hoạt tính sinh học

+ Đã đánh giá được hoạt tính gây độc trên 05 dòng TB UT người (KB, SK-Mel-2, HepG2, LNCaP và MCF7) của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả cho thấy: hợp chất **CD2** thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng TB UT da SK-Mel-2 và ung thư vú MCF7 với IC_{50} tương ứng là $11,99 \pm 0,69$ và $14,90 \pm 2,25$ μ M. Các hợp chất **CD4**, **CD6**, **CD7**, **CD8** thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng TB UT da SK-Mel-2 với giá trị IC_{50} tương ứng là $8,51 \pm 0,98$, $12,03 \pm 0,54$, $11,68 \pm 0,88$, $10,49 \pm 1,25$ μ M.

+ Đã xác định được hợp chất **CD7** thể hiện rõ khả năng gây chết tế bào SK-Mel-2 qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3.

+ Đã đánh giá được hoạt tính ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả cho thấy hợp chất **CM1** thể hiện hoạt tính mạnh nhất với IC_{50} là $5,89 \pm 0,11$ μ M.

+ Đã xác định được hợp chất **CM1** ức chế mạnh sự sản sinh NO thông qua ức chế sự biểu hiện của protein COX-2 và iNOS trên dòng tế bào RAW264.7 ở nồng độ 10 μ M.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về thành phần các hợp chất, hoạt tính gây độc TB UT và kháng viêm của các hợp chất từ hai loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* nhận thấy:

Hợp chất **CD7** có tiềm năng trong cho các nghiên cứu theo hướng điều trị ung thư và hợp chất **CM1** có tác dụng kháng viêm tiềm năng do đó cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động của hai hợp chất này ở cấp độ *in vivo*.

Hợp chất **CD2** có hoạt tính ức chế mạnh sự phát triển của dòng TB UT da SK-Mel-2 và ung thư vú MCF7 trong khi các hợp chất **CD4**, **CD6**, **CD8** ức chế chỉ ức chế dòng TB UT da SK-Mel-2. Như vậy, cần nghiên cứu sâu hơn về cơ chế GĐTB trên các dòng TB UT để làm rõ cơ chế tác động của chúng.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Phân lập được 13 hợp chất mới từ 2 loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* và *Comanthus delicata* thu thập ở vùng biển Việt Nam, tiến hành nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của 13 hợp chất mới này.
2. Hợp chất 6-methoxycomaparvin (**CD7**) có hoạt tính gây độc tế bào ung thư thông qua quá trình apoptosis và cảm ứng caspase-3 ở tế bào ung thư SK-Mel-2; Hợp chất capillasterquinone A (**CM1**) có hoạt tính kháng viêm, ức chế sự sản sinh NO thông qua ức chế biểu hiện của các protein iNOS và COX-2 ở đại thực bào RAW264.7.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA LUẬN ÁN

1. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi Thanh Huong, Nguyen Hai Dang, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Do Cong Thung, Phan Van Kiem, and Chau Van Minh. Anthraquinone and butenolide constituents from the crinoid *Capillaster multiradiatus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2018, 66, 1023-1026.
2. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Tran Hong Quang, Do Thi Thao, Do Cong Thung, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Pham Van Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh. Naphthopyrone and anthraquinone derivatives from *Comanthus delicata*. **Phytochemistry Letters**, 2021, 46, 129-135.
3. **Le Thi Vien**, Tran Thi Hong Hanh, Tran Hong Quang, Do Cong Thung, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Pham Van Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh. Sulfated naphthopyrones and anthraquinones from the Vietnamese crinoid *Comanthus delicata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2022, 70(5), 408-412.
4. Châu Văn Minh, Nguyễn Hoài Nam, Phan Văn Kiệt, Nguyễn Xuân Cường, **Lê Thị Viên**, Trần Thị Hồng Hạnh, Phan Thị Thanh Hương, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Văn Thanh, Đỗ Công Thung. Hợp chất anthraquinon có hoạt tính kháng viêm và phương pháp chiết hợp chất này từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*. **Bằng độc quyền sáng chế**, 2021, số 29299.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. M. Mayer, K. B. Glaser, C. Cuevas, R. S. Jacobs, W. Kem, R. D. Little, J. M. McIntosh, D. J. Newman, B. C. Potts, D. E. Shuster. *The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective*. Trends in pharmacological sciences, 2010, 31(6), 255-265.
2. P. T. Son, P. M. Giang. *Hóa học các hợp chất thiên nhiên*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 2016, Vol. 1.
3. A. R. Carroll, B. R. Copp, R. A. Davis, R. A. Keyzers, M. R. Prinsep. *Marine natural products*. Natural Product Reports, 2020, 37(2), 175-223.
4. M. Sarfaraj, F. Sheeba, A. Saba, M. S. Khan. *Marine natural products: A lead for Anti-cancer*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2012, 41, 27-39.
5. D. J. Newman, G. M. Cragg. *Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play"*. Planta medica, 2016, 82(9-10), 775-789.
6. K. H. Altmann. *Drugs from the Oceans: Marine Natural Products as Leads for Drug Discovery*. Chimia, 2017, 71(10), 646-652.
7. F. Pereira. *Have marine natural product drug discovery efforts been productive and how can we improve their efficiency?* Expert opinion on drug discovery, 2019, 14(8), 717-722.
8. X. Thomas. *Chemotherapy of acute leukemia in adults*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2009, 10(2), 221-237.
9. D. J. Newman, G. M. Cragg, C. N. Battershill. *Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year*. Diving and hyperbaric medicine, 2009, 39(4), 216-225.
10. J. G. McGivern. *Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2007, 3(1), 69-85.
11. T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, J. P. Saludes. *Drug development from marine natural products*. Nature reviews. Drug discovery, 2009, 8(1), 69-85.

12. E. M. Gordon, K. K. Sankhala, N. Chawla, S. P. Chawla. *Trabectedin for Soft Tissue Sarcoma: Current Status and Future Perspectives*. *Advances in Therapy*, 2016, 33(7), 1055-1071.
13. M. D'Incalci, C. M. Galmarini. *A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action*. *Molecular cancer therapeutics*, 2010, 9(8), 2157-2163.
14. S. Jain, L. T. Vahdat. *Eribulin Mesylate*. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(21), 6615-6622.
15. A. Losada, M. J. Muñoz-Alonso, C. García, P. A. Sánchez-Murcia, J. F. Martínez-Leal, J. M. Domínguez, M. P. Lillo, F. Gago, C. M. Galmarini. *Translation Elongation Factor eEF1A2 is a Novel Anticancer Target for the Marine Natural Product Plitidepsin*. *Scientific reports*, 2016, 6, 35100.
16. M. Brönstrup, F. Sasse. *Natural products targeting the elongation phase of eukaryotic protein biosynthesis*. *Natural Product Reports*, 2020, 37(6), 752-762.
17. N. W. van de Donk, E. Dhimolea. *Brentuximab vedotin*. *mAbs*, 2012, 4(4), 458-465.
18. N. C. Richardson, Y. L. Kasamon, H. Chen, R. A. de Claro, J. Ye, G. M. Blumenthal, A. T. Farrell, R. Pazdur. *FDA Approval Summary: Brentuximab Vedotin in First-Line Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma*. *Oncologist*, 2019, 24(5), e180-e187.
19. E. D. Deeks. *Polatuzumab Vedotin: First Global Approval*. *Drugs*, 2019, 79(13), 1467-1475.
20. T. K. Burki. *Enfortumab vedotin shows promise in solid tumours*. *The Lancet. Oncology*, 2020, 21(3), e133.
21. E. Gourd. *Lurbinectedin for BRCA-mutated advanced breast cancer*. *The Lancet. Oncology*, 2018, 19(11), e582.
22. R. A. de Mello, N. M. Neves, H. Tadokoro, G. A. Amaral, P. Castelo-Branco, V. A. d. A. Zia. *New Target Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of the Literature and Future Perspectives*. *J Clin Med*, 2020, 9(11), 3543.
23. A. Markham. *Belantamab Mafodotin: First Approval*. *Drugs*, 2020, 80(15), 1607-1613.
24. Đ. h. Y. H. Nội. *Bài giảng ung thư học*. Nhà xuất bản y học, 1999.

25. N. B. Đức, T. V. Thuần, N. T. Mai. *Điều trị nội khoa ung thư*. Nhà xuất bản Y học: Hà Nội, 2010, Vol.
26. D. Hanahan, R. A. Weinberg. *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000, 100(1), 57-70.
27. C. W. Boone, G. J. Kelloff, W. E. Malone. *Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review*. Cancer research, 1990, 50(1), 2-9.
28. V. Herbert. *The antioxidant supplement myth*. The American journal of clinical nutrition, 1994, 60(2), 157-158.
29. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972, 26(4), 239-257.
30. R. S. Y. Wong. *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011, 30(1), 87.
31. S. L. Fink, B. T. Cookson. *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infection and immunity, 2005, 73(4), 1907-1916.
32. G. Rampal, N. Khanna, T. S. Thind, S. Arora, A. Vig. *Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms*. 2022.
33. M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba, N. Sakuragi. *Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer*. BioMed Research International, 2014, 2014, 150845.
34. G. Rampal, 1, N. K. , 2, T. S. T. , S. A. , 1, A. P. , Viga, .
35. Y. Zhou, Y. Hong, H. Huang. *Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- κ B Signaling Pathway*. Kidney & blood pressure research, 2016, 41(6), 901-910.
36. O. Takeuchi, S. Akira. *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010, 140(6), 805-820.
37. O. Chertov, D. Yang, O. M. Howard, J. J. Oppenheim. *Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses*. Immunological reviews, 2000, 177, 68-78.

38. T. Lawrence. *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2009, 1(6), a001651.
39. L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao. *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018, 9(6), 7204-7218.
40. R. W. Schrier, W. Wang. *Acute renal failure and sepsis*. The New England journal of medicine, 2004, 351(2), 159-169.
41. J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John. *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochimica et biophysica acta, 2011, 1813(5), 878-888.
42. M. Jana, K. Pahan. *IL-12 p40 homodimer, but not IL-12 p70, induces the expression of IL-16 in microglia and macrophages*. Molecular immunology, 2009, 46(5), 773-783.
43. M. Jana, S. Dasgupta, U. Pal, K. Pahan. *IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1*. Glia, 2009, 57(14), 1553-1565.
44. G. K. Kolluru, J. H. Siamwala, S. Chatterjee. *eNOS phosphorylation in health and disease*. Biochimie, 2010, 92(9), 1186-1198.
45. J. A. Donald. *Nitric Oxide*. Handbook of Hormones, Elsevier, 2015, 603-e103A-604.
46. U. Förstermann, W. C. Sessa. *Nitric oxide synthases: regulation and function*. European Heart Journal, 2012, 33(7), 829-837.
47. J. R. Lancaster. *Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications*. Future Science OA, 2015, 1(1).
48. A. R. Amin, M. Attur, S. B. Abramson. *Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis*. Current opinion in rheumatology, 1999, 11(3), 202-209.
49. J. N. Sharma, A. Al-Omran, S. S. Parvathy. *Role of nitric oxide in inflammatory diseases*. Inflammopharmacology, 2007, 15(6), 252-259.
50. R. M. Clancy, A. R. Amin, S. B. Abramson. *The role of nitric oxide in inflammation and immunity*. Arthritis and rheumatism, 1998, 41(7), 1141-1151.

51. L. Liu, S. Huq, W. Xu. *Targeting Cyclooxygenase and Nitric Oxide Pathway Cross-Talk: A New Signal Transduction Pathway for Developing More Effective Anti- Inflammatory Drugs*. *Current Signal Transduction Therapy*, 2009, 4(1), 66-75.
52. K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee, P. Isakson. *Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(25), 12013-12017.
53. R. Y. Kang, J. Freire-Moar, E. Sigal, C. Q. Chu. *Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis*. *British journal of rheumatology*, 1996, 35(8), 711-718.
54. J. Clària. *Cyclooxygenase-2 biology*. *Current pharmaceutical design*, 2003, 9(27), 2177-2190.
55. L. T. Sơn. *Giáo trình động vật học*. NXB Đại học Huế, 2006, Vol. 11.
56. M. Sutherland, J. Wells. *Pigments of marine animals. IV. The anthraquinoid pigments of the crinoids, Comatula pectinata L. and C. cratera A. H. Clark*. *Australian Journal of Chemistry*, 1967, 20(3), 515-533.
57. V. Powell, M. Sutherland. *Pigments of marine animals. VI. Anthraquinoid pigments of the crinoids Ptilometra australis Wilton and Tropiometra afra Hartlaub*. *Australian Journal of Chemistry*, 1967, 20(3), 541-553.
58. R. Kent, I. Smith, M. Sutherland. *Pigments of marine animals. X. Substituted naphthopyrones from the crinoid Comantheria perplexa*. *Australian Journal of Chemistry*, 1970, 23(11), 2325-2335.
59. J. A. Rideout, I. R. Smith, M. D. Sutherland. *Pigments of marine animals. XII. The synthesis of certain substituted naphthopyrones related to crinoid pigments*. *Australian Journal of Chemistry*, 1976, 29(5), 1087-1098.
60. J. A. Rideout, N. B. Smith, M. D. Sutherland. *Chemical defense of crinoids by polyketide sulphates*. *Experientia*, 1979, 35(10), 1273-1274.
61. J. A. Rideout, M. D. Sutherland. *Pigments of Marine Animals. XV. Bianthrone and Related Polyketides from Lamprometra palmata gyges and Other Species of Crinoids*. *Australian Journal of Chemistry*, 1985, 38(5), 793-808.

62. D. Takahashi, T. Maoka, M. Tsushima, K. Fujitani, M. Kozuka, T. Matsuno, T. Shingu. *New Quinone Sulfates from the Crinoids Tropiometra afra macrodiscus and Oxycomanthus japonicus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 50(12), 1609-1612.
63. K. Wolkenstein, W. Schoefberger, N. Müller, T. Oji. *Proisocrinins A–F, Brominated Anthraquinone Pigments from the Stalked Crinoid Proisocrinus ruberrimus*. Journal of Natural Products, 2009, 72(11), 2036-2039.
64. A. D. Wright, J. L. Nielson, D. M. Tapiolas, C. A. Motti, S. P. B. Oviden, P. S. Kearns, C. H. Liptrot. *Detailed NMR, Including 1,1-ADEQUATE, and Anticancer Studies of Compounds from the Echinoderm Colobometra perspinosa*. Marine Drugs, 2009, 7(4), 565-575.
65. Y. Y. Lin, S. J. Tsai, M. Y. Chiang, Z. H. Wen, J. H. Su. *Anti-inflammatory anthraquinones from the crinoid Himerometra magnipinna*. Natural product communications, 2015, 10(2), 317-318.
66. S. Khokhar, G. K. Pierens, J. N. A. Hooper, M. G. Ekins, Y. Feng, R. A. Davis. *Rhodocomatulin-Type Anthraquinones from the Australian Marine Invertebrates Clathria hirsuta and Comatula rotalaria*. Journal of Natural Products, 2016, 79(4), 946-953.
67. W. Wätjen, S. S. Ebada, A. Bergermann, Y. Chovolou, F. Totzke, M. H. G. Kubbutat, W. Lin, P. Proksch. *Cytotoxic effects of the anthraquinone derivatives 1'-deoxyrhodoptilometrins and (S)-(-)-rhodoptilometrins isolated from the marine echinoderm Comanthus sp.* Archives of toxicology, 2017, 91(3), 1485-1495.
68. K. Wolkenstein, J. C. Fuentes-Monteverde, N. Nath, T. Oji, C. Griesinger. *Hypalocrinins, Taurine-Conjugated Anthraquinone and Biaryl Pigments from the Deep Sea Crinoid Hypalocrinus naresianus*. Journal of natural products, 2019, 82(1), 163-167.
69. I. Smith, M. Sutherland. *Pigments of marine animals. XI. Angular naphthopyrones from the crinoid Comanthus parvicirrus timorensis*. Australian Journal of Chemistry, 1971, 24(7), 1487-1499.
70. K. Francesconi. *Pigments of some echinoderms collected from Western Australian waters*. Australian Journal of Chemistry, 1980, 33(12), 2781-2784.

71. J. Dai, Y. Liu, H. Jia, Y.-D. Zhou, D. G. Nagle. *Benzochromenones from the Marine Crinoid Comantheria rotula Inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in Cell-Based Reporter Assays and Differentially Suppress the Growth of Certain Tumor Cell Lines*. Journal of Natural Products, 2007, 70(9), 1462-1466.
72. F. Folmer, W. T. Harrison, J. N. Tabudravu, M. Jaspars, W. Aalbersberg, K. Feussner, A. D. Wright, M. Dicato, M. Diederich. *NF-kappaB-inhibiting naphthopyrones from the Fijian echinoderm Comanthus parvicirrus*. J Nat Prod, 2008, 71(1), 106-111.
73. H. R. Bokesch, L. K. Cartner, R. W. Fuller, J. A. Wilson, C. J. Henrich, J. A. Kelley, K. R. Gustafson, J. B. McMahon, T. C. McKee. *Inhibition of ABCG2-mediated drug efflux by naphthopyrones from marine crinoids*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2010, 20(13), 3848-3850.
74. L. C. Chen, Y. Y. Lin, Y. H. Jean, Y. Lu, W. F. Chen, S. N. Yang, H. M. Wang, I. Y. Jang, I. M. Chen, J. H. Su, P. J. Sung, J. H. Sheu, Z. H. Wen. *Anti-inflammatory and analgesic effects of the marine-derived compound comaparvin isolated from the crinoid Comanthus bennetti*. Molecules (Basel, Switzerland), 2014, 19(9), 14667-14686.
75. Z.-Y. Ke, J.-W. Chen, B.-Y. Wu, Y.-Y. Jhan, Z.-H. Wen, T.-A. Kung, P.-J. Sung, J.-J. Chen, K.-H. Lai, H.-M. Chung. *A new angular naphthopyrone from feather star Comanthus parvicirrus (Müller, 1841)*. Journal of Molecular Structure, 2022, 1253, 132261.
76. N. Shao, G. Yao, L. C. Chang. *Bioactive Constituents from the Marine Crinoid Himerometra magnipinna*. Journal of Natural Products, 2007, 70(5), 869-871.
77. F. De Riccardis, M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, B. Richer de Forges, C. Debitus. *The gymnochromes: novel marine brominated phenanthroperylenequinone pigments from the stalked crinoid Gymnocrinus richeri*. The Journal of Organic Chemistry, 1991, 56(24), 6781-6787.
78. M. Laille, F. Gerald, C. Debitus. *In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural product*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 1998, 54, 167-170.
79. H. V. Kemami Wangun, A. Wood, C. Fiorilla, J. K. Reed, P. J. McCarthy, A. E. Wright. *Gymnochromes E and F, Cytotoxic Phenanthroperylenequinones from*

- a Deep-Water Crinoid, Holopus rangii*. Journal of Natural Products, 2010, 73(4), 712-715.
80. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox. *Gaussian 16 Rev. C.01*. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2016.
81. N. M. O'Boyle, T. Vandermeersch, C. J. Flynn, A. R. Maguire, G. R. Hutchison. *Confab-Systematic generation of diverse low-energy conformers*. Journal of Cheminformatics, 2011, 3(1), 1-9.
82. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd. *Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines*. J. Natl. Cancer Inst., 1991, 83(11), 757-766.
83. C. Chu, J. Xu, D. Cheng, X. Li, S. Tong, J. Yan, Q. Li. *Anti-Proliferative and Apoptosis-Inducing Effects of Camptothecin-20(s)-O-(2-pyrazolyl-1)acetic Ester in Human Breast Tumor MCF-7 Cells*. Molecules, 2014, 19(4), 4941.
84. Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos. *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 1992, 13(8), 795-808.

85. K.-H. Altmann, J. Gertsch. *Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents*. Natural Product Reports, 2007, 24(2), 327-357.
86. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(9), 4350-4354.
87. H. D. Nguyen, Y. Y. Choo, T. D. Nguyen, H. N. Nguyen, V. M. Chau, J. H. Lee. *7-Methoxy-(9H- β -carbolin-1-yl)-(E)-1-propenoic acid, a β -carboline alkaloid from *Eurycoma longifolia*, exhibits anti-inflammatory effects by activating the Nrf2/Heme oxygenase-1 pathway*. Journal of cellular biochemistry, 2016, 117(3), 659-670.
88. A. D. Wright, J. L. Nielson, D. M. Tapiolas, C. A. Motti, S. P. Oviden, P. S. Kearns, C. H. Liptrot. *Detailed NMR, including 1,1-ADEQUATE, and anticancer studies of compounds from the echinoderm *Colobometra perspinosa**. Mar Drugs, 2009, 7(4), 565-575.
89. J. Lee, W. Wang, J. Hong, C. O. Lee, S. Shin, K. S. Im, J. H. Jung. *A new 2,3-dimethyl butenolide from the brittle star *Ophiomastix mixta**. Chem Pharm Bull, 2007, 55(3), 459-461.
90. G. L. Bartolini, T. R. Erdman, P. J. Scheuer. *Anthraquinone pigments from the crinoid *Comanthus bennetti**. Tetrahedron, 1973, 29(22), 3699-3702.
91. N. K. Utkina, O. B. Maksimov. *Anthraquinone pigments of the starfish *Echinaster echinophorus*. IV*. Chem Nat Comp, 1977, 13(5), 528-531.
92. M. Iorizzi, F. de Riccardis, L. Minale, R. Riccio. *Starfish saponins, 52. Chemical constituents from the starfish *Echinaster brasiliensis**. J Nat Prod, 1993, 56(12), 2149-2162.
93. J. Banville, P. Brassard. *Reactions of keten acetals. Part VI. Total syntheses of the anthraquinones (+/-)-nalgiovensin, (+/-)-isorhodoptilometrin, and (+/-)-rhodoptilometrin*. J Chem Soc, Perkin Trans 1, 1976, (6), 613-619.
94. Y. Feng, S. Khokhar, R. A. Davis. *Crinoids: ancient organisms, modern chemistry*. Nat. Prod. Rep., 2017, 34(6), 571-584.

95. J. Dai, Y. Liu, H. Jia, Y. D. Zhou, D. G. Nagle. *Benzochromenones from the marine crinoid Comantheria rotula inhibit hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in cell-based reporter assays and differentially suppress the growth of certain tumor cell lines.* Journal of natural products, 2007, 70(9), 1462-1466.
96. Y. Chovolou, S. S. Ebada, W. Wätjen, P. Proksch. *Identification of angular naphthopyrones from the Philippine echinoderm Comanthus species as inhibitors of the NF- κ B signaling pathway.* Eur. J. Pharmacol., 2011, 657(1), 26-34.
97. F. Folmer, W. T. Harrison, J. N. Tabudravu, M. Jaspars, W. Aalbersberg, K. Feussner, A. D. Wright, M. Dicato, M. Diederich. *NF- κ B-inhibiting naphthopyrones from the Fijian echinoderm Comanthus parvicirrus.* J Nat Prod, 2008, 71(1), 106-111.
98. Y. Kashiwada, G. Nonaka, I. Nishioka. *Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). V. Isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives.* Chem Pharm Bull, 1984, 32(9), 3493-3500.
99. Y. Chovolou, S. S. Ebada, W. Wätjen, P. Proksch. *Identification of angular naphthopyrones from the Philippine echinoderm Comanthus species as inhibitors of the NF- κ B signaling pathway.* European Journal of Pharmacology, 2011, 657(1), 26-34.
100. T.-C. Lin, Y.-Y. Lin, Y.-J. Wu, Z.-H. Wen, J.-H. Su. *A novel naphthopyrone-derived metabolite from the marine crinoid Comanthus bennetti.* Chem. Nat. Compd., 2021, 57(1), 91-93.
101. D. Takahashi, T. Maoka, M. Tsushima, K. Fujitani, M. Kozuka, T. Matsuno, T. Shingu. *New quinone sulfates from the crinoids Tropiometra afra macrodiscus and Oxycomanthus japonicus.* Chem. Pharm. Bull., 2002, 50(12), 1609-1612.
102. Y. Sakuma, J. Tanaka, T. Higa. *New naphthopyrone pigments from the Crinoid Comanthus parvicirrus.* Australian Journal of Chemistry, 1987, 40(9), 1613-1616.
103. K. Wolkenstein, W. Schoefberger, N. Müller, T. Oji. *Proisocrinins A-F, brominated anthraquinone pigments from the stalked crinoid Proisocrinus ruberrimus.* J Nat Prod, 2009, 72(11), 2036-2039.

104. W. Wätjen, S. S. Ebada, A. Bergermann, Y. Chovolou, F. Totzke, M. H. G. Kubbutat, W. Lin, P. Proksch. *Cytotoxic effects of the anthraquinone derivatives 1'-deoxyrhodoptilometrins and (S)-(-)-rhodoptilometrins isolated from the marine echinoderm Comanthus sp.* Arch. Toxicol., 2017, 91(3), 1485-1495.
105. L. T. Vien, T. T. H. Hanh, P. T. T. Huong, N. H. Dang, N. V. Thanh, N. X. Cuong, N. H. Nam, D. C. Thung, P. V. Kiem, C. V. Minh. *Anthraquinone and butenolide constituents from the crinoid Capillaster multiradiatus.* Chem. Pharm. Bull., 2018, 66(11), 1023-1026.
106. K. Wolkenstein, J. C. Fuentes-Monteverde, N. Nath, T. Oji, C. Griesinger. *Hypalocrinins, taurine-conjugated anthraquinone and biaryl pigments from the deep sea crinoid Hypalocrinus naresianus.* J. Nat. Prod., 2019, 82(1), 163-167.
107. Y. Sakuma, J. Tanaka, T. Higa. *New naphthopyrone pigments from the crinoid Comanthus parvicirrus.* Aust. J. Chem., 1987, 40(9), 1613-1616.
108. S. Ebada, V. Wray, R. Edrada, P. Proksch. *Anthraquinones and naphthopyrones from the marine echinoderm Comanthus sp.* Planta Med, 2009, 75(09), PE11.
109. I. Smith, M. Sutherland. *Pigments of marine animals. XI. Angular naphthopyrones from the crinoid Comanthus parvicirrus timorensis.* Aust. J. Chem., 1971, 24(7), 1487-1499.
110. N. S. Ghaly, F. R. Melek, T. Mabry. *Angular naphthopyrones with DPPH scavenging activity from the crinoid Oligometra serripinna.* Revista Latinoamericana de Quimica, 2009, 37(3), 252-261.
111. N. K. Lee, Y. H. Kim. *New cytotoxic anthraquinones from the crinoid Ptilometra : 1'-Deoxyrhodoptilometrins-6-O-sulfate and rhodoptilometrins-6-O-sulfate.* Bulletin of the Korean Chemical Society, 1995, 16(11), 1011-1013.
112. K. Y. Lum, A. R. Carroll, M. G. Ekins, S. Read, Z. Haq, I. Tietjen, J. St John, R. A. Davis. *Capillasterin A, a novel pyrano[2,3-f]chromene from the Australian crinoid Capillaster multiradiatus.* Marine drugs, 2019, 17(1), 26.
113. E. Devarajan, A. A. Sahin, J. S. Chen, R. R. Krishnamurthy, N. Aggarwal, A.-M. Brun, A. Sapino, F. Zhang, D. Sharma, X.-H. Yang, A. D. Tora, K.

- Mehta. *Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance*. *Oncogene*, 2002, 21(57), 8843-8851.
114. Y.-Y. Lin, S.-J. Tsai, M. Y.-N. Chiang, Z.-H. Wen, J. H. Su. *Anti-inflammatory Anthraquinones from the Crinoid Himerometra magnipinna*. *Natural Product Communications*, 2015, 10.
115. J. R. Vane, J. A. Mitchell, I. Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, D. A. Willoughby. *Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(6), 2046-2050.
116. G.-P. Hu, J. Yuan, L. Sun, Z.-G. She, J.-H. Wu, X.-J. Lan, X. Zhu, Y.-C. Lin, S.-P. Chen. *Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008*. *Marine Drugs*, 2011, 9(4).

PHỤ LỤC

Phụ lục 1.	Phiếu giám định mẫu <i>Capillaster multiradiatus</i> (Linnaeus, 1758).....	PL-1
Phụ lục 2.	Phiếu giám định mẫu <i>Comanthus delicata</i> (Linnaeus, 1758).....	PL-2
Phụ lục 3.	Các phổ của CM1.....	PL-3
Phụ lục 4.	Các phổ của CM2.....	PL-6
Phụ lục 5.	Các phổ của CM3.....	PL-9
Phụ lục 6.	Các phổ của CM4.....	PL-11
Phụ lục 7.	Các phổ của CM5.....	PL-13
Phụ lục 8.	Các phổ của CM6.....	PL-15
Phụ lục 9.	Các phổ của CM7.....	PL-17
Phụ lục 10.	Các phổ của CM8.....	PL-19
Phụ lục 11.	Các phổ của CD1.....	PL-22
Phụ lục 12.	Các phổ của CD2.....	PL-25
Phụ lục 13.	Các phổ của CD3.....	PL-28
Phụ lục 14.	Các phổ của CD4.....	PL-31
Phụ lục 15.	Các phổ của CD5.....	PL-34
Phụ lục 16.	Các phổ của CD6.....	PL-37
Phụ lục 17.	Các phổ của CD7.....	PL-39
Phụ lục 18.	Các phổ của CD8.....	PL-41
Phụ lục 19.	Các phổ của CD9.....	PL-43
Phụ lục 20.	Các phổ của CD10.....	PL-45
Phụ lục 21.	Các phổ của CD11.....	PL-47
Phụ lục 22.	Các phổ của CD12.....	PL-48
Phụ lục 23.	Các phổ của CD13.....	PL-49
Phụ lục 24.	Các phổ của CD14.....	PL-50
Phụ lục 25.	Các phổ của CD15.....	PL-51
Phụ lục 26.	Các phổ của CD16.....	PL-54
Phụ lục 27.	Các phổ của CD17.....	PL-57
Phụ lục 28.	Các phổ của CD18.....	PL-60

Phụ lục 29.	Các phổ của CD19.....	PL-63
Phụ lục 30.	Các phổ của CD20.....	PL-66
Phụ lục 31.	Các phổ của CD21.....	PL-68
Phụ lục 32.	Các phổ của CD22.....	PL-70
Phụ lục 33.	Các phổ của CD23.....	PL-72

Phụ lục 1. Phiếu giám định mẫu *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

1. Hồ sơ mẫu

Ký hiệu mẫu: ST-HB-03

Tọa độ thu mẫu: 16°12'59.32" Bắc - 108°11'56.95" Đông

Thời gian thu mẫu: Tháng 8 năm 2016

Địa điểm thu mẫu: Bán đảo Sơn Trà, TP Đà Nẵng

Địa điểm lưu mẫu: Viện Hóa Sinh biển, Viện Tài nguyên và Môi trường biển

2. Kết quả giám định

Ngành Echinodermata

Lớp Crinoidea

Lớp phụ Articulata

Bộ Comatulida

Họ Comatulidae

Giống *Capillaster*

Loài *Capillaster multiradiatus* (Linnaeus, 1758)

Tên Việt Nam: Huệ biển

Hải Phòng, ngày 16 tháng 9 năm 2016

Người giám định

GS. TS. Đỗ Công Thung

Phụ lục 2. Phiếu giám định mẫu *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

1. Hồ sơ mẫu

Ký hiệu mẫu: DLB-2020-DG07

Tọa độ thu mẫu: 12⁰35'06" Bắc- 109⁰24'44" Đông

Thời gian thu mẫu: Tháng 7 năm 2020

Địa điểm thu mẫu: Vịnh Vân Phong, tỉnh Khánh Hòa

Địa điểm lưu mẫu: Viện Hóa Sinh biển, Viện Tài nguyên và Môi trường biển

2. Kết quả giám định

Ngành Echinodermata

Lớp Crinoidea

Lớp phụ Articulata

Bộ Comatulida

Họ Comatulidae

Giống *Comanthus*

Loài *Comanthus delicata* (AH Clark, 1909)

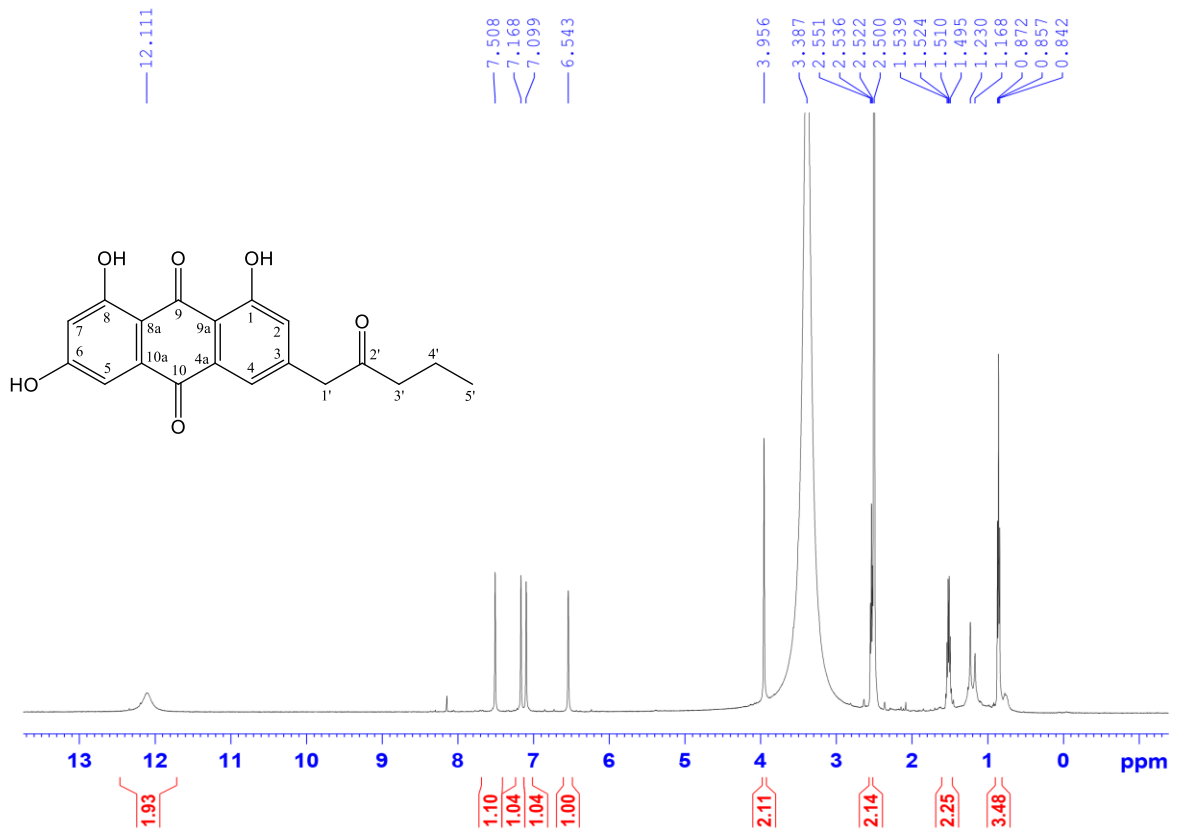
Tên Việt Nam: Huệ biển

Hải Phòng, ngày...21...tháng...8...năm 2020

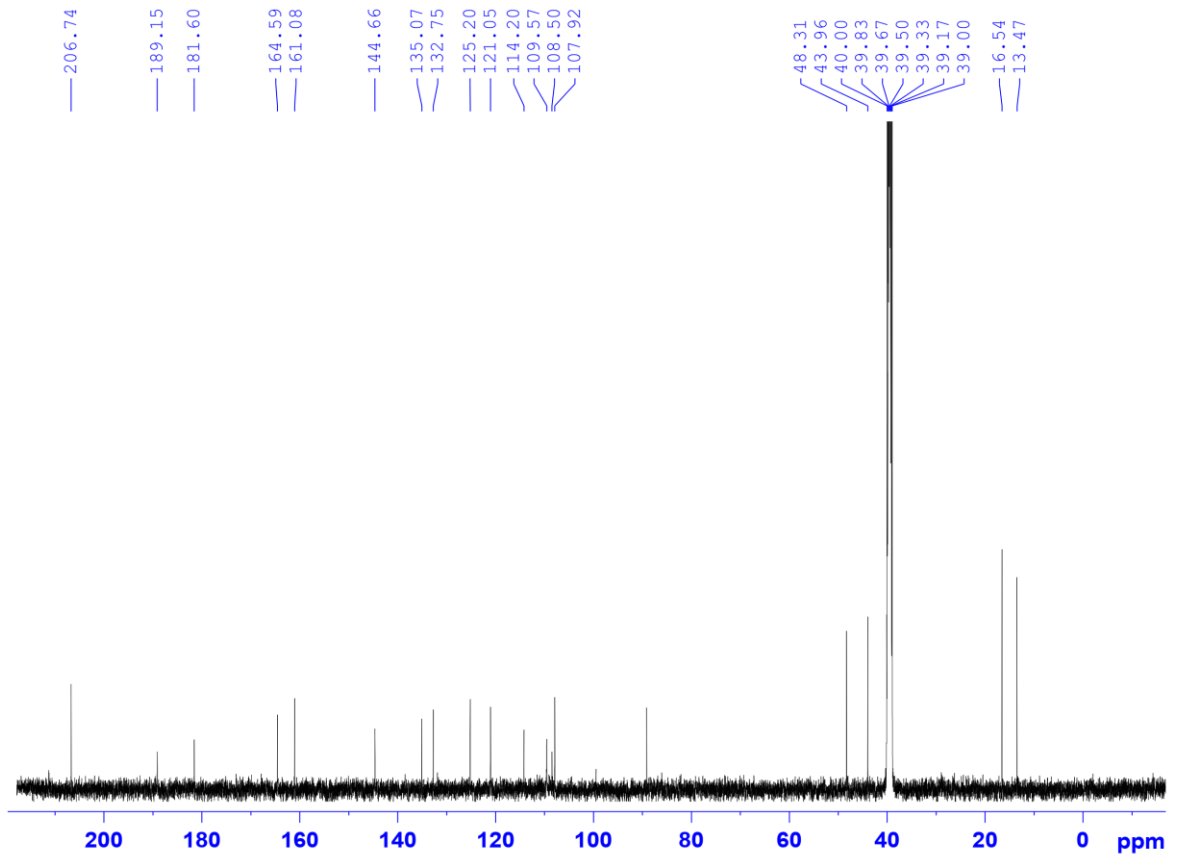
Người giám định

GS. TS. Đỗ Công Thung

Phụ lục 3. Các phổ của CM1

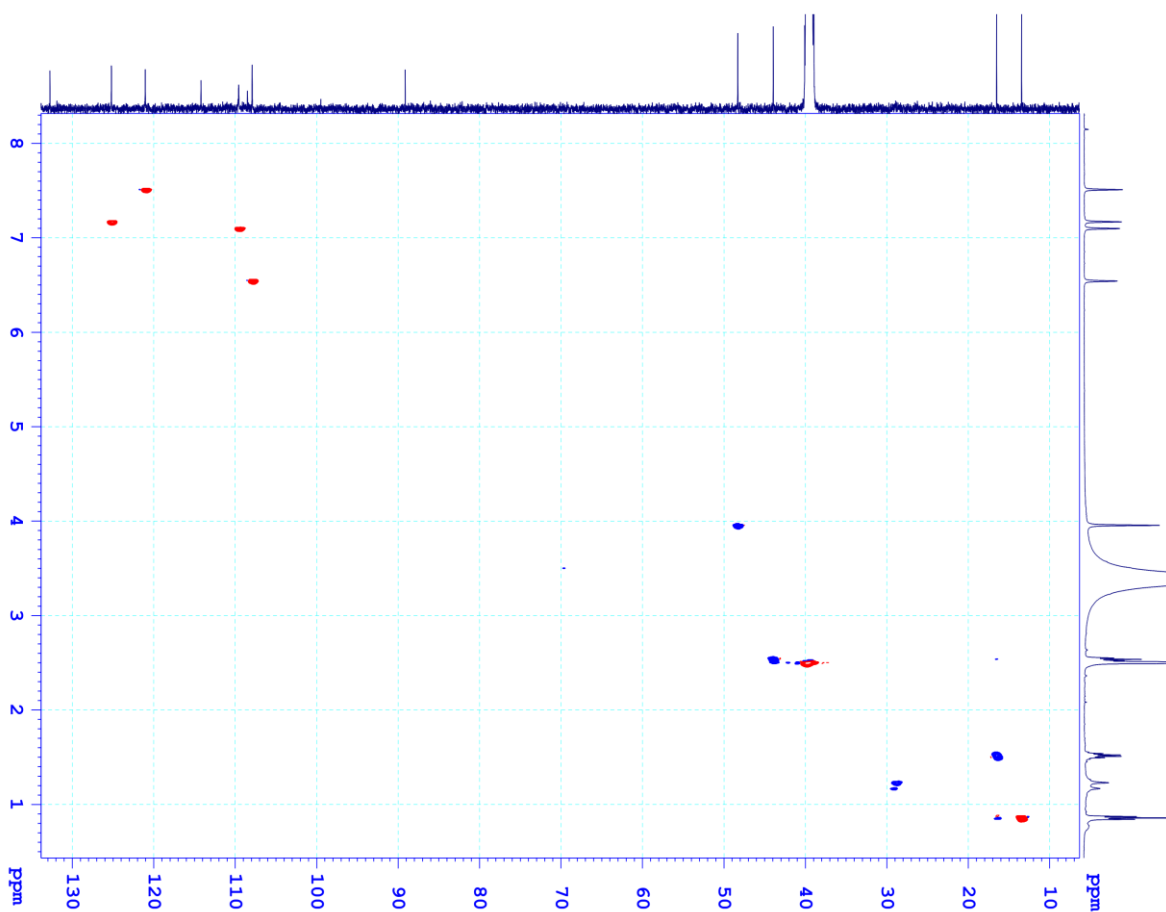


Phổ ¹H-NMR của CM1

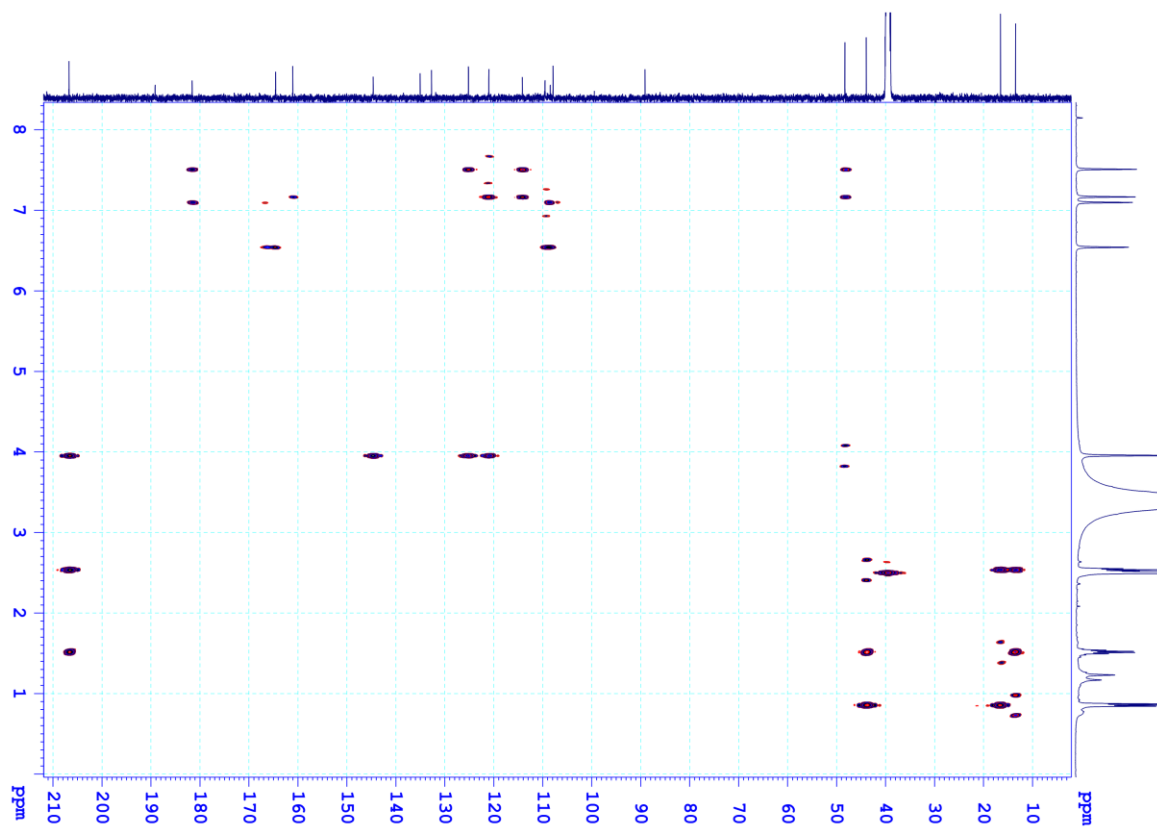


Phổ ¹³C-NMR của CM1

PL-4

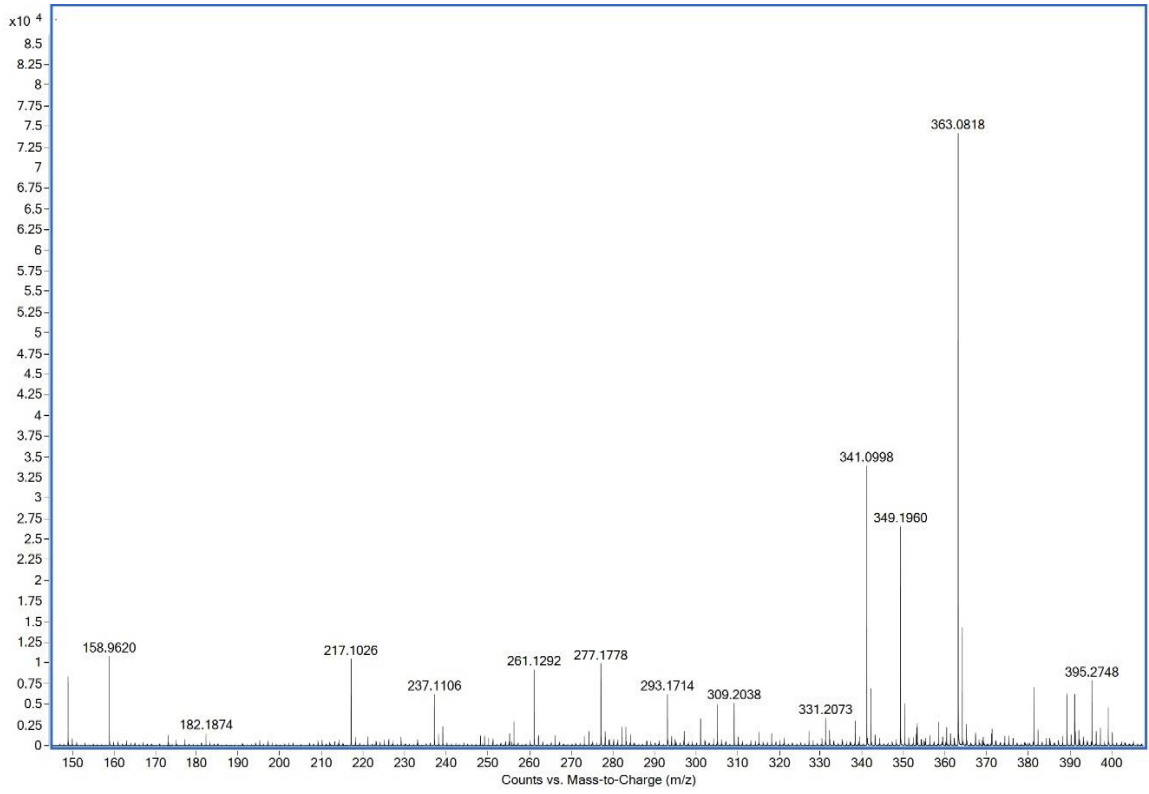


Phổ HSQC của CM1



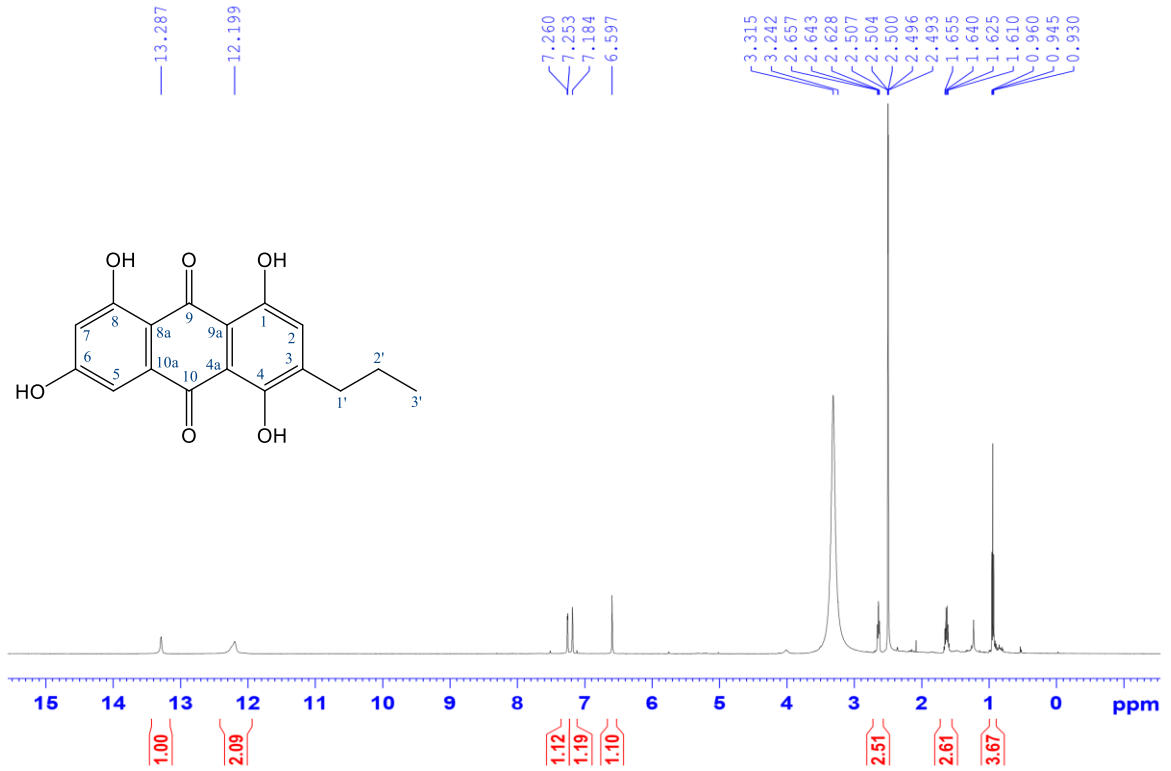
Phổ HMBC của CM1

PL-5

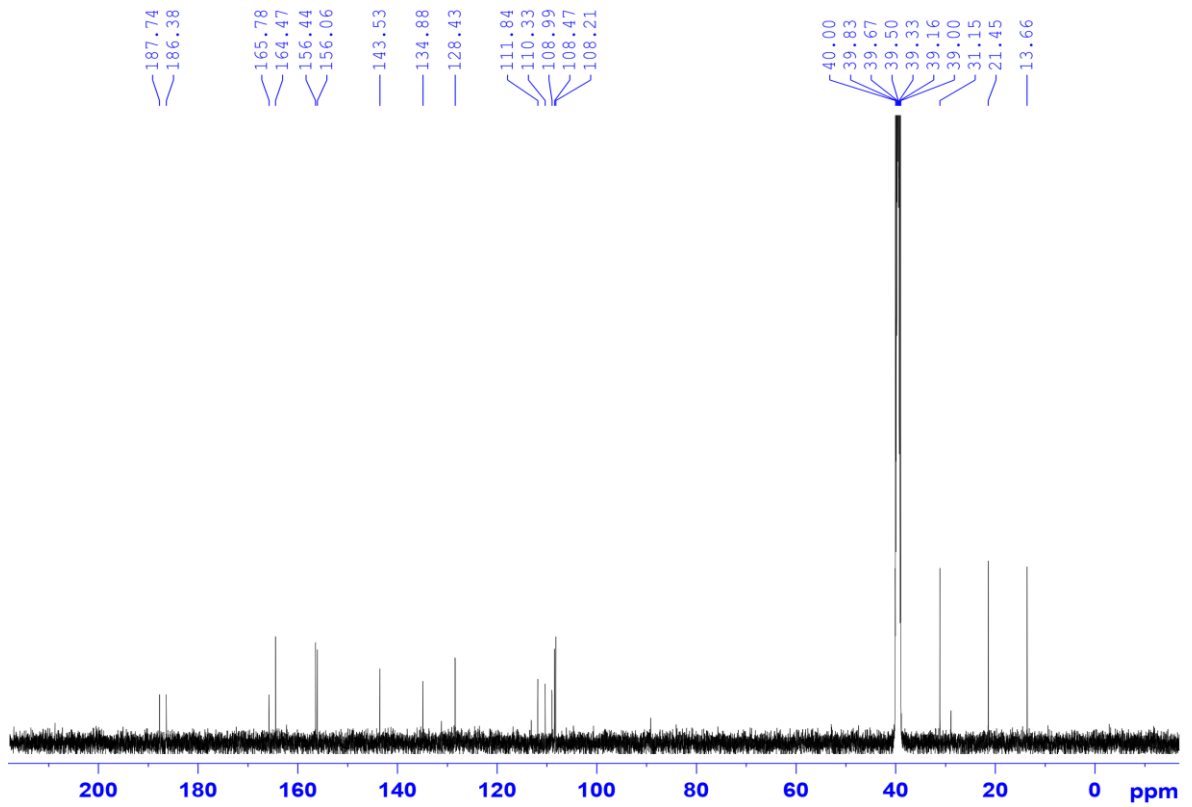


Phổ HR-QTOF-MS của **CM1**

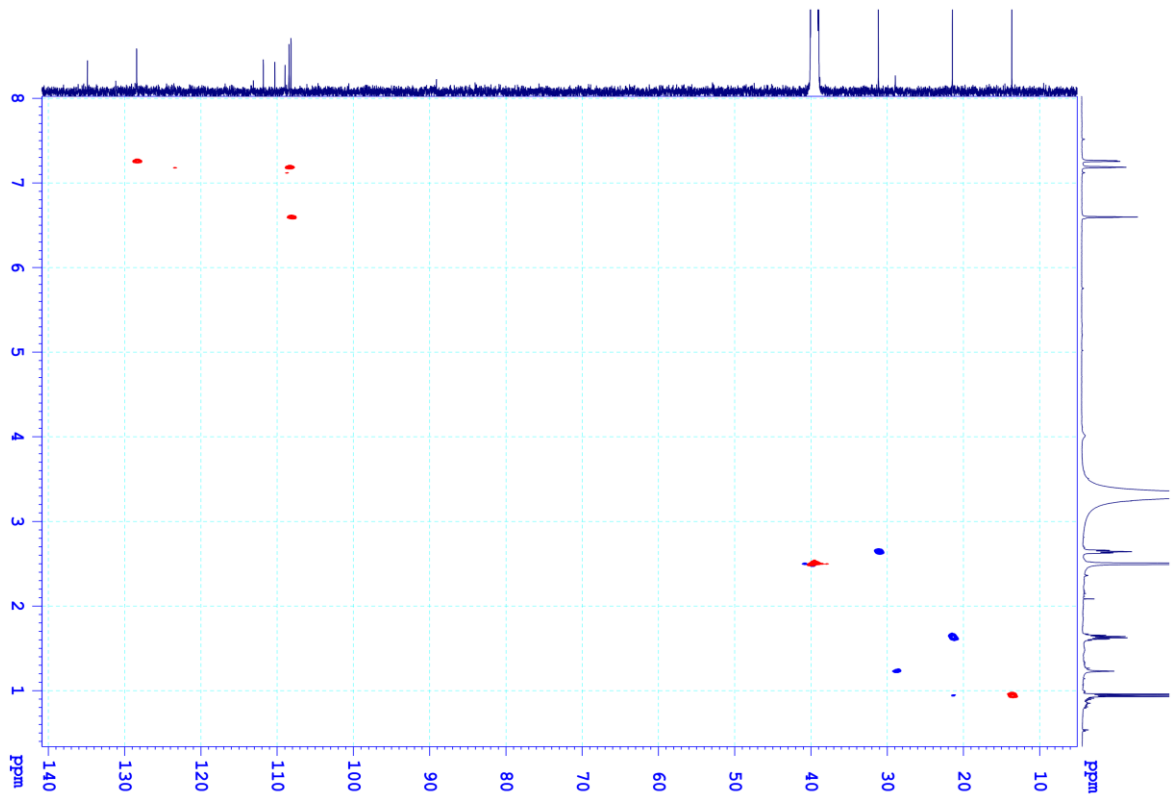
Phụ lục 4. Các phổ của CM2



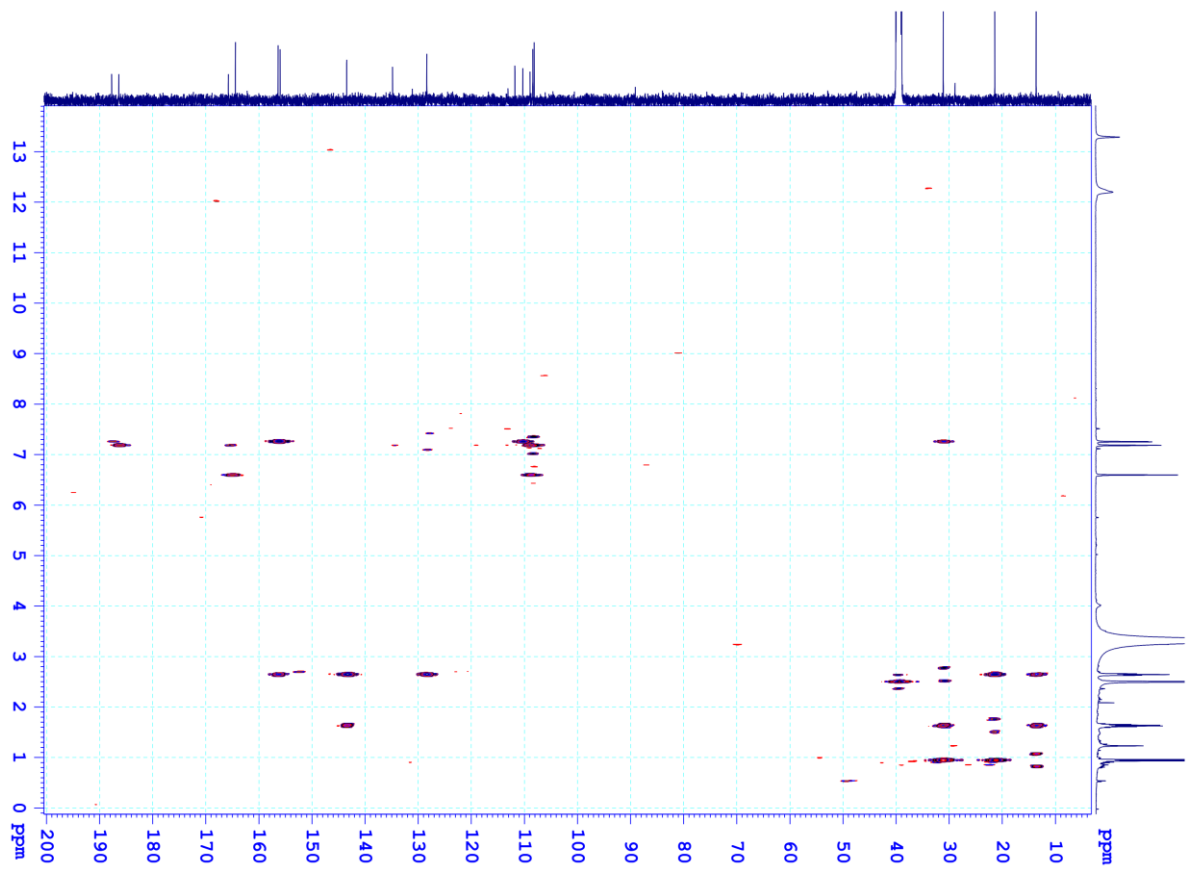
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CM2



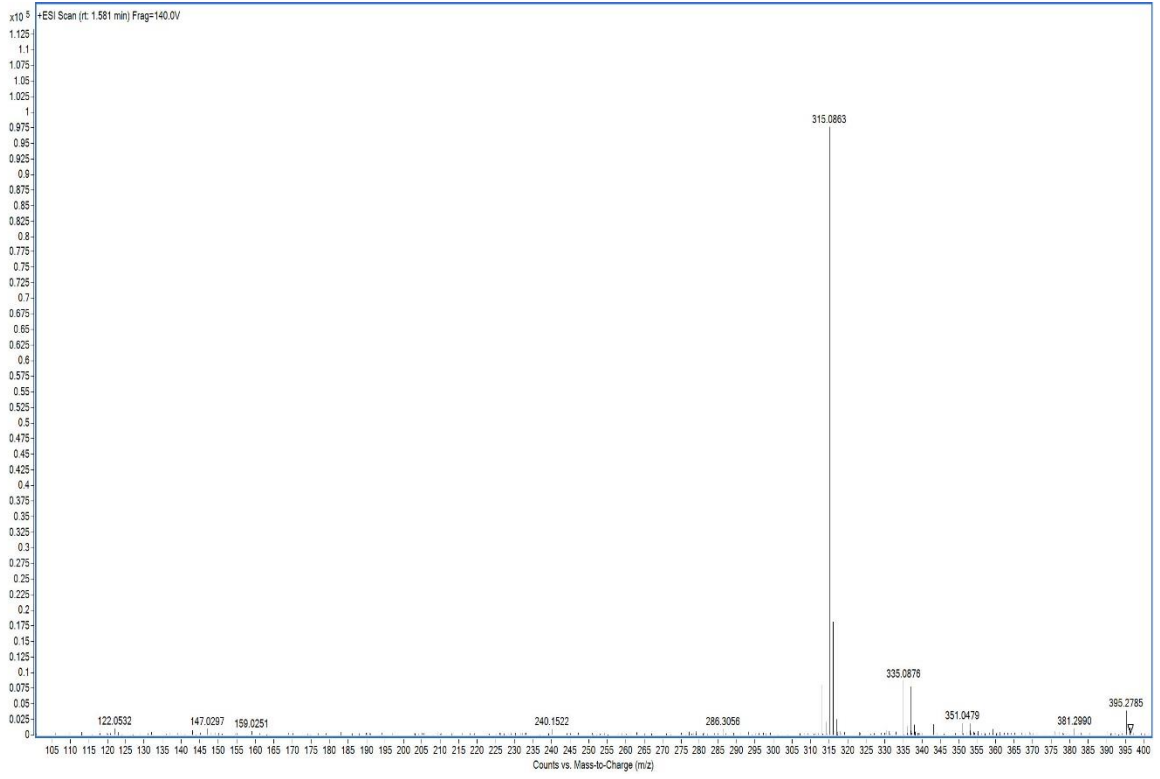
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của CM2



Phổ HSQC của **CM2**

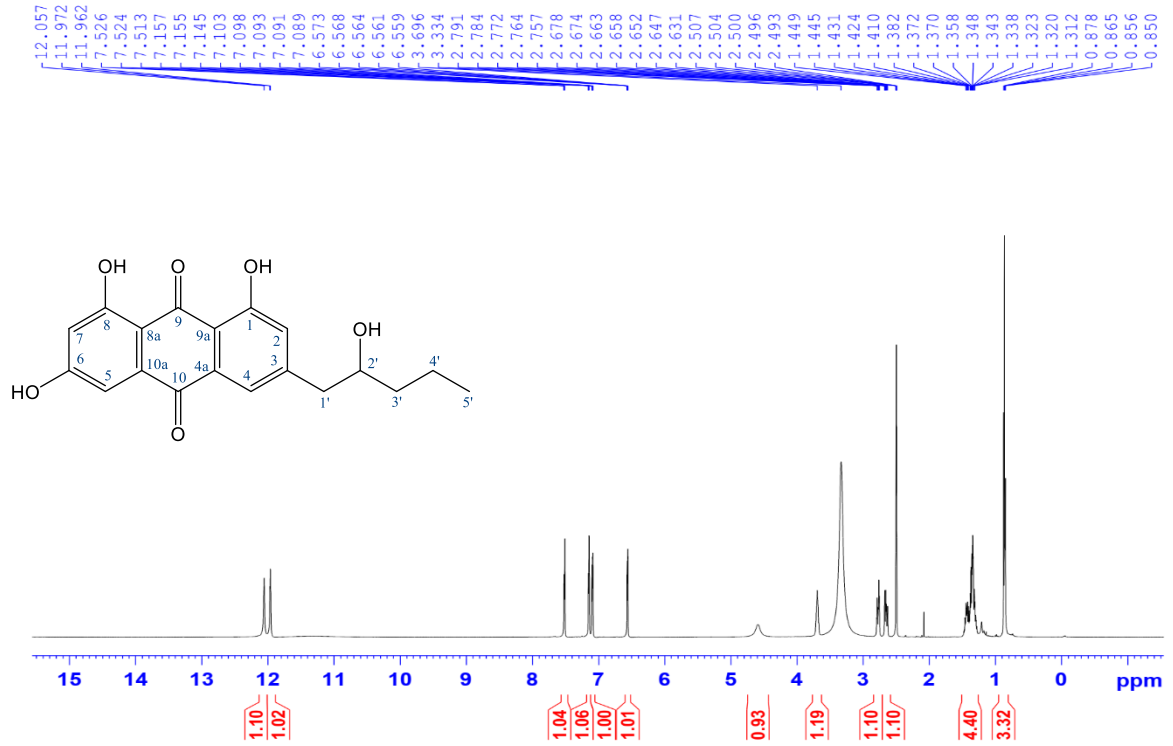


Phổ HMBC của **CM2**

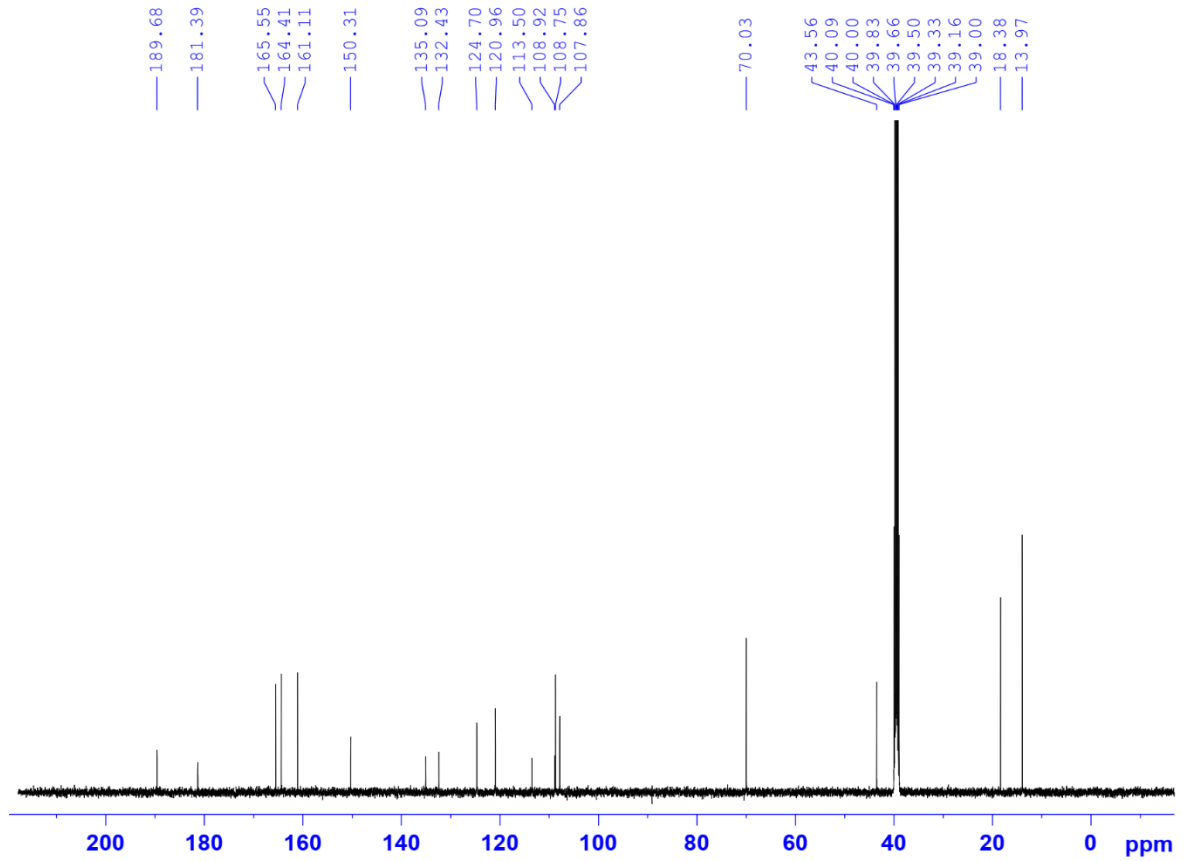


Phổ HR-QTOF-MS của CM2

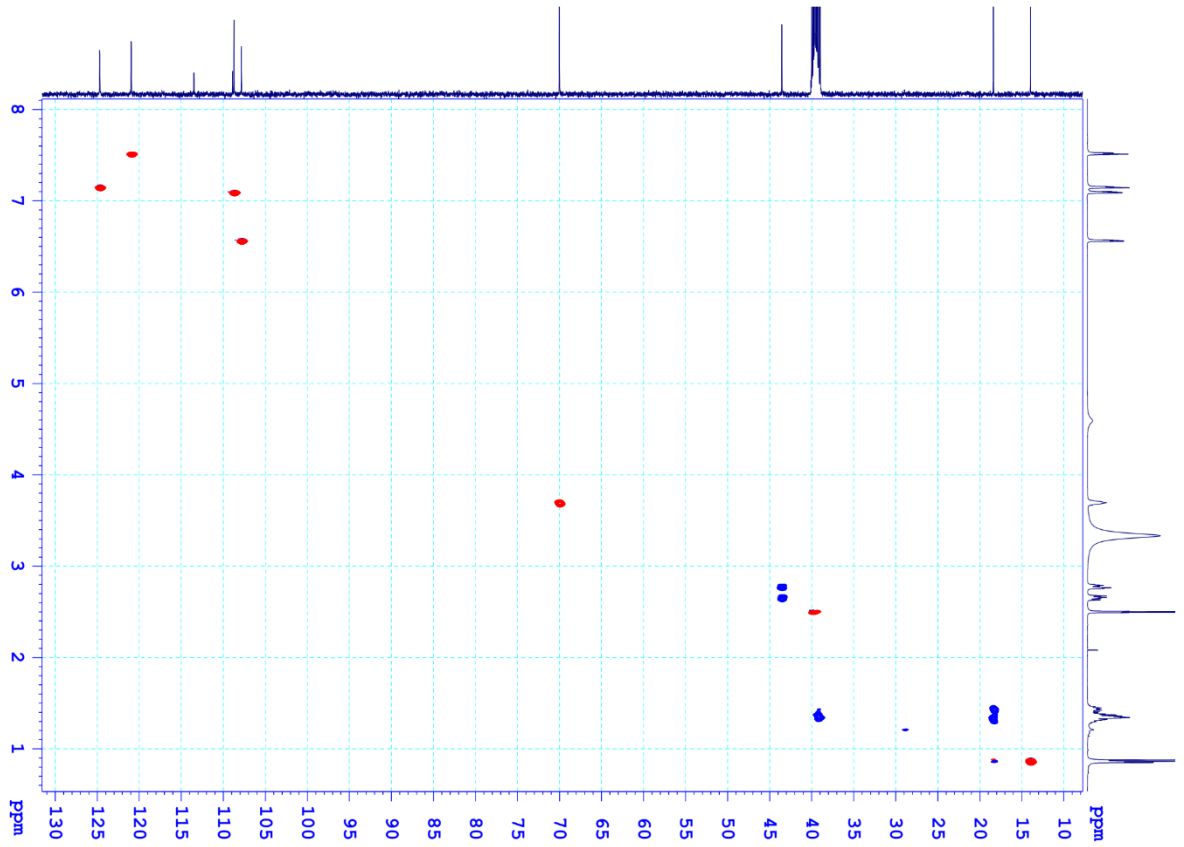
Phụ lục 5. Các phổ của CM3



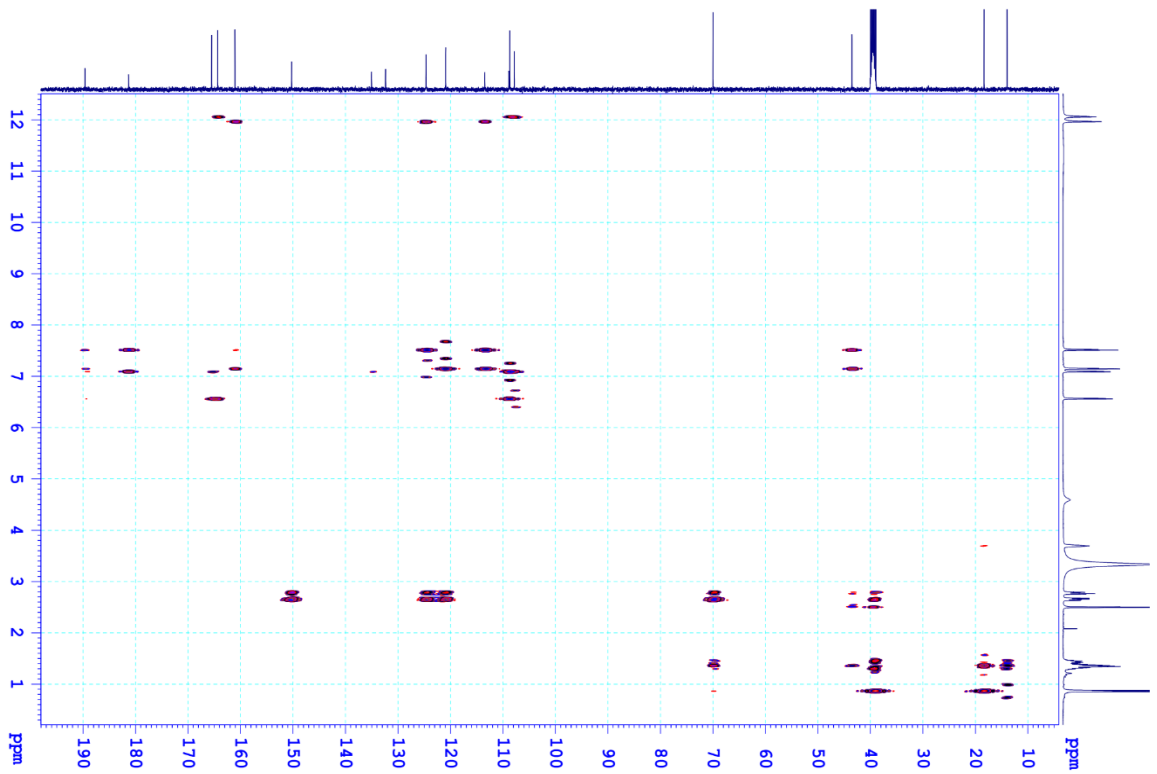
Phổ ¹H-NMR của CM3



Phổ ¹³C-NMR của CM3



Phổ HSQC của CM3



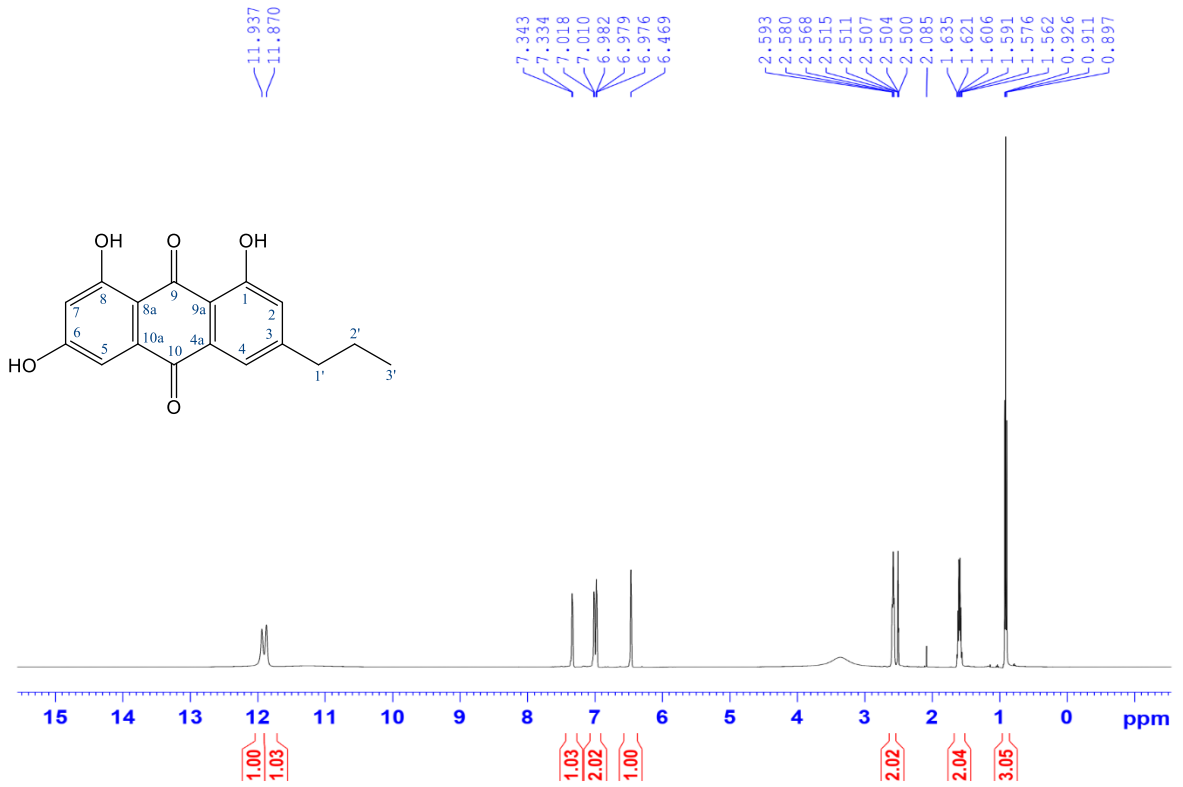
Phổ HMBC của CM3

Bảng giá trị phổ NMR của **CM3**

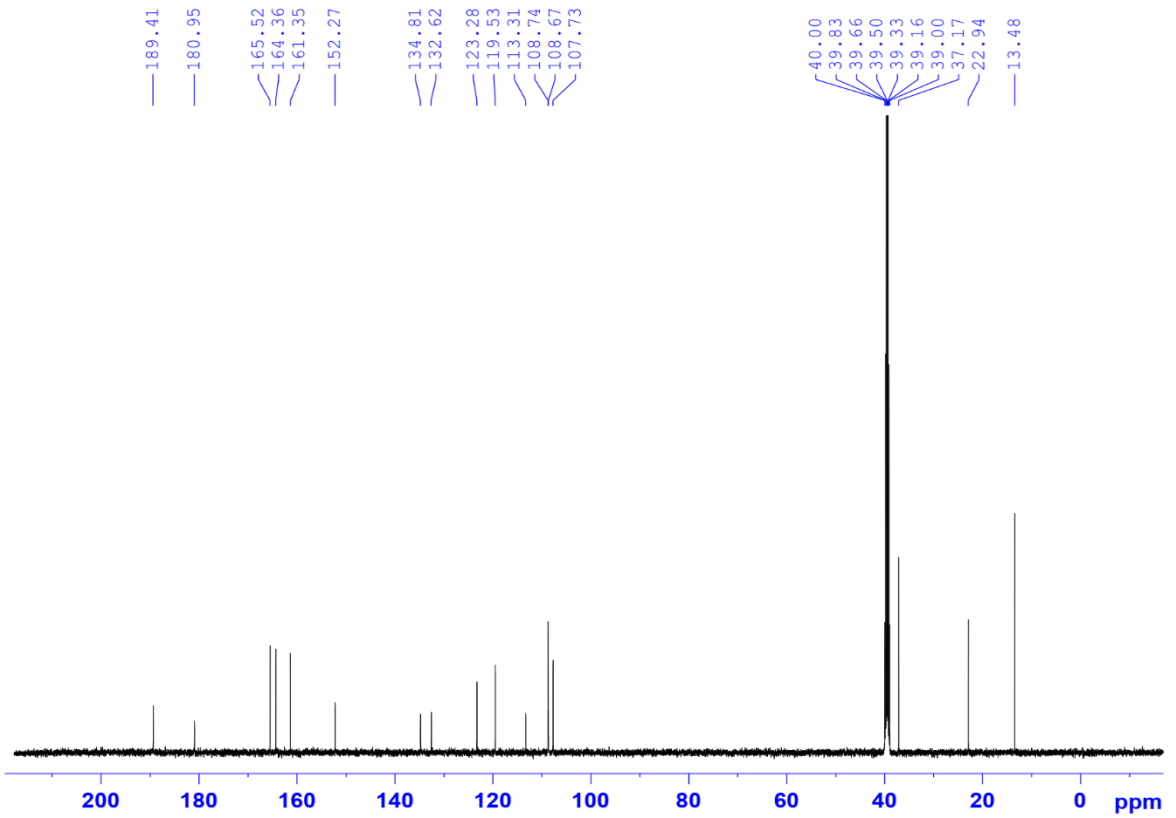
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,11	-	
2	124,70	7,15 dd (1,0, 5,0)	1, 4, 9a, 1'
3	150,31	-	
4	120,96	7,52 dd (1,0, 5,0)	
4a	132,43	-	
5	108,75	7,09 dd (1,0, 2,5)	6, 7, 9, 10
6	165,55	-	
7	107,86	6,56 dd (1,0, 2,5)	5, 6, 8, 8a
8	164,41	-	
8a	108,92	-	
9	189,68	-	
9a	113,50	-	
10	181,39	-	
10a	135,09	-	
1'	43,56	2,65 m/2,77 m	2, 3, 4, 2'
2'	70,03	3,70 m	
3'	39,16	1,35 m	2'
4'	18,38	1,33 m/1,45 m	2'
5'	13,97	0,86 t (7,0)	3', 4'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

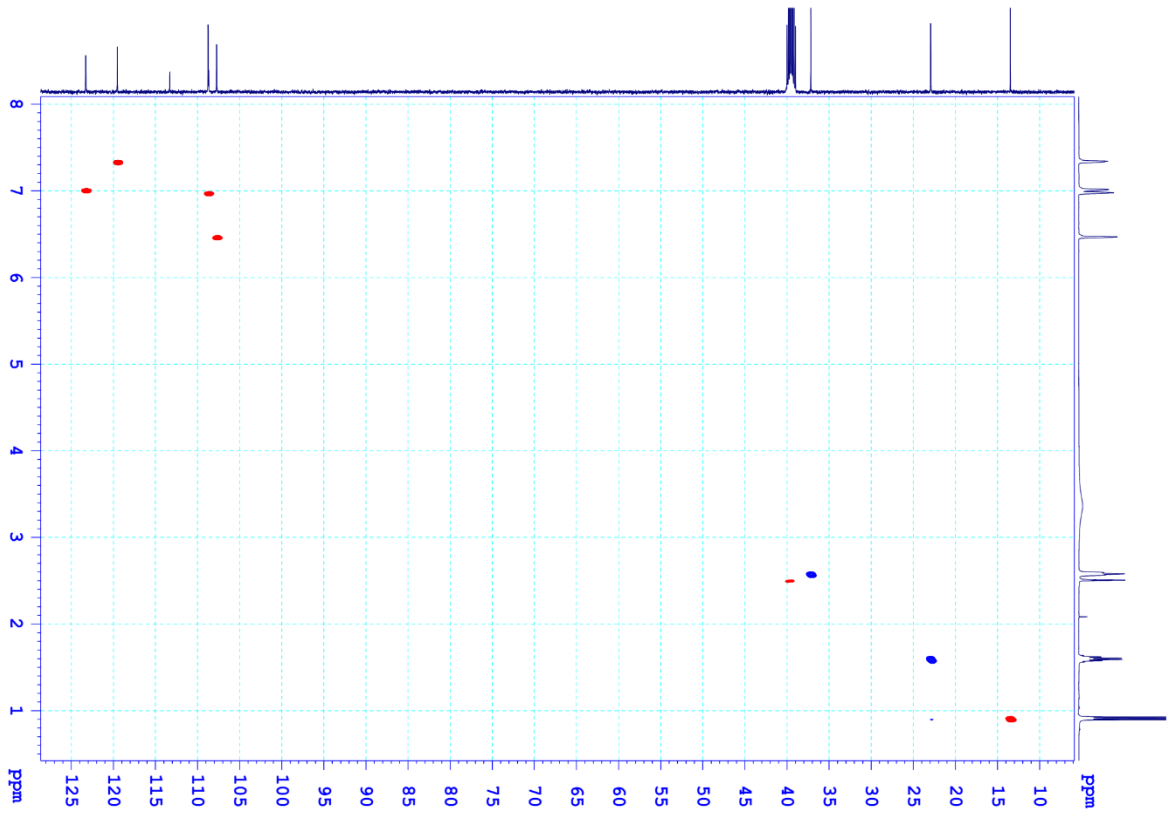
Phụ lục 6. Các phổ của CM4



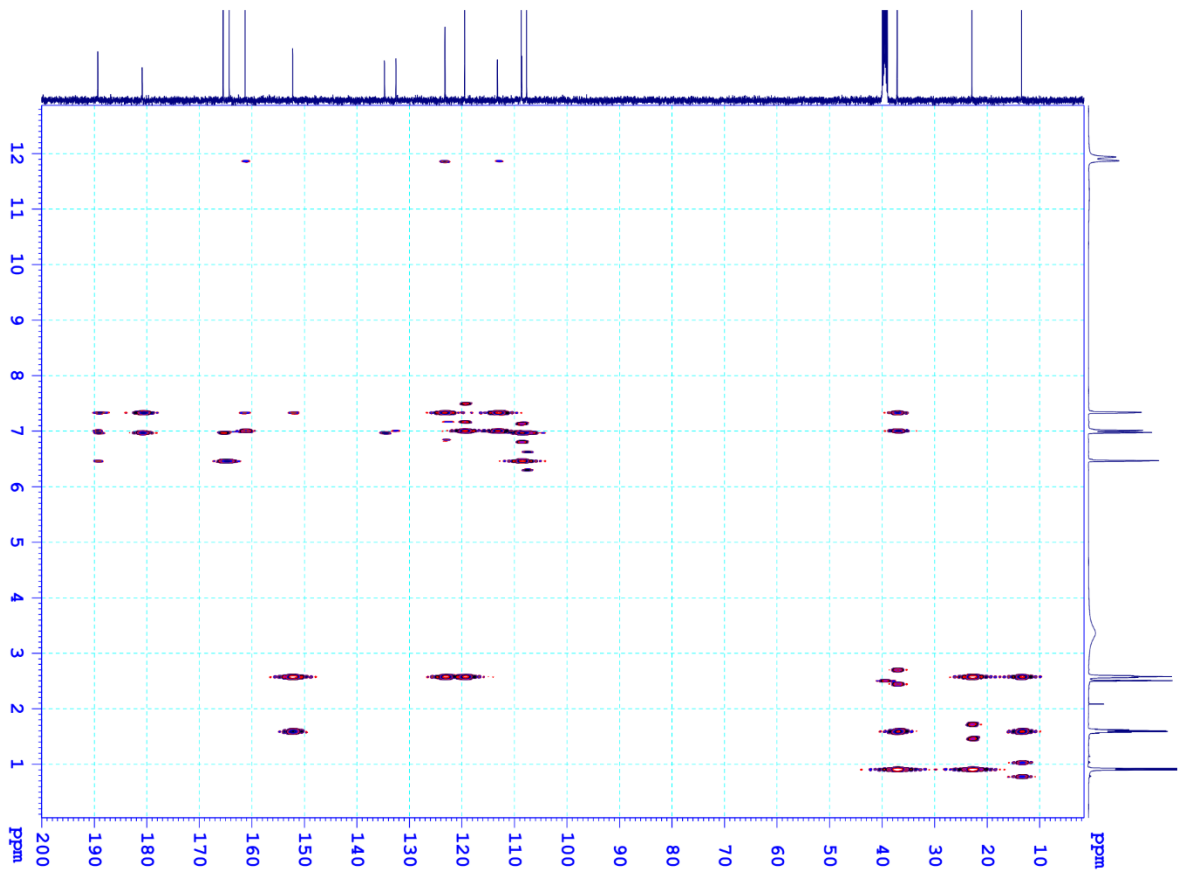
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CM4



Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của CM4



Phổ HSQC của CM4



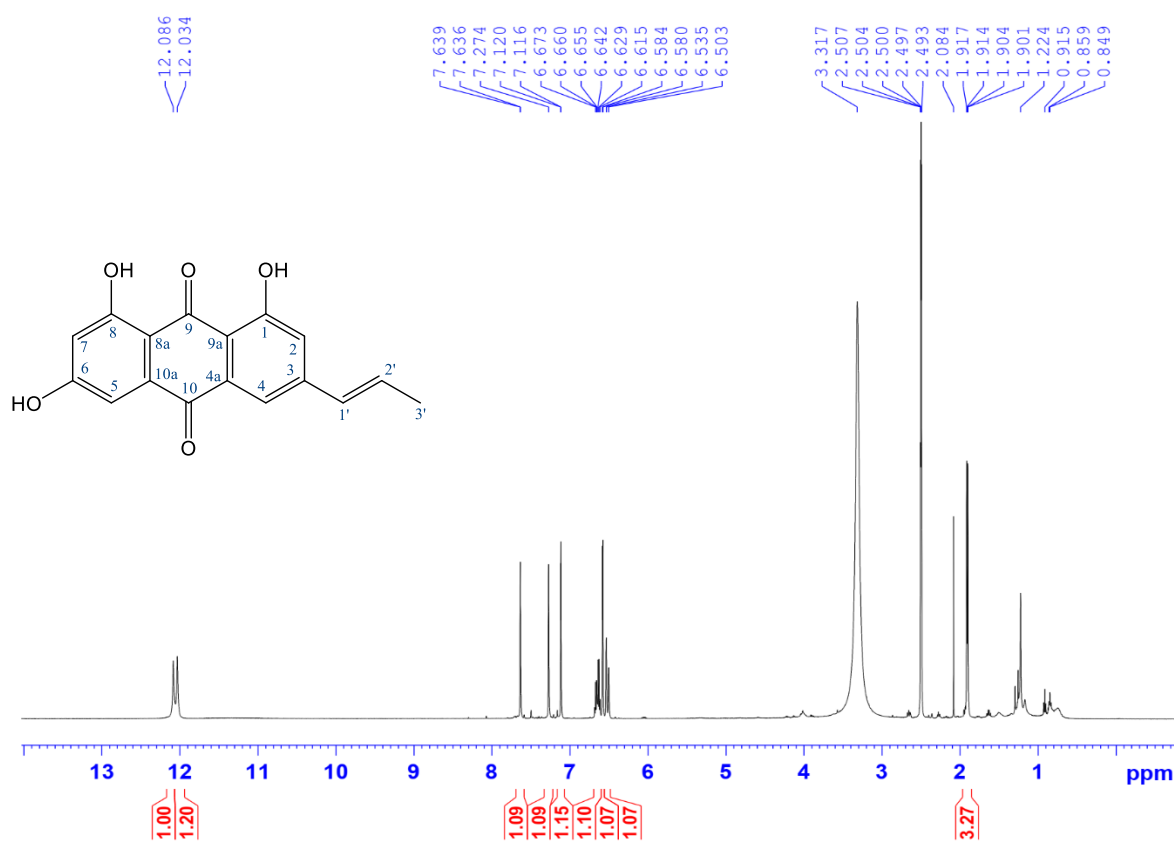
Phổ HMBC của CM4

Bảng giá trị phổ NMR của **CM4**

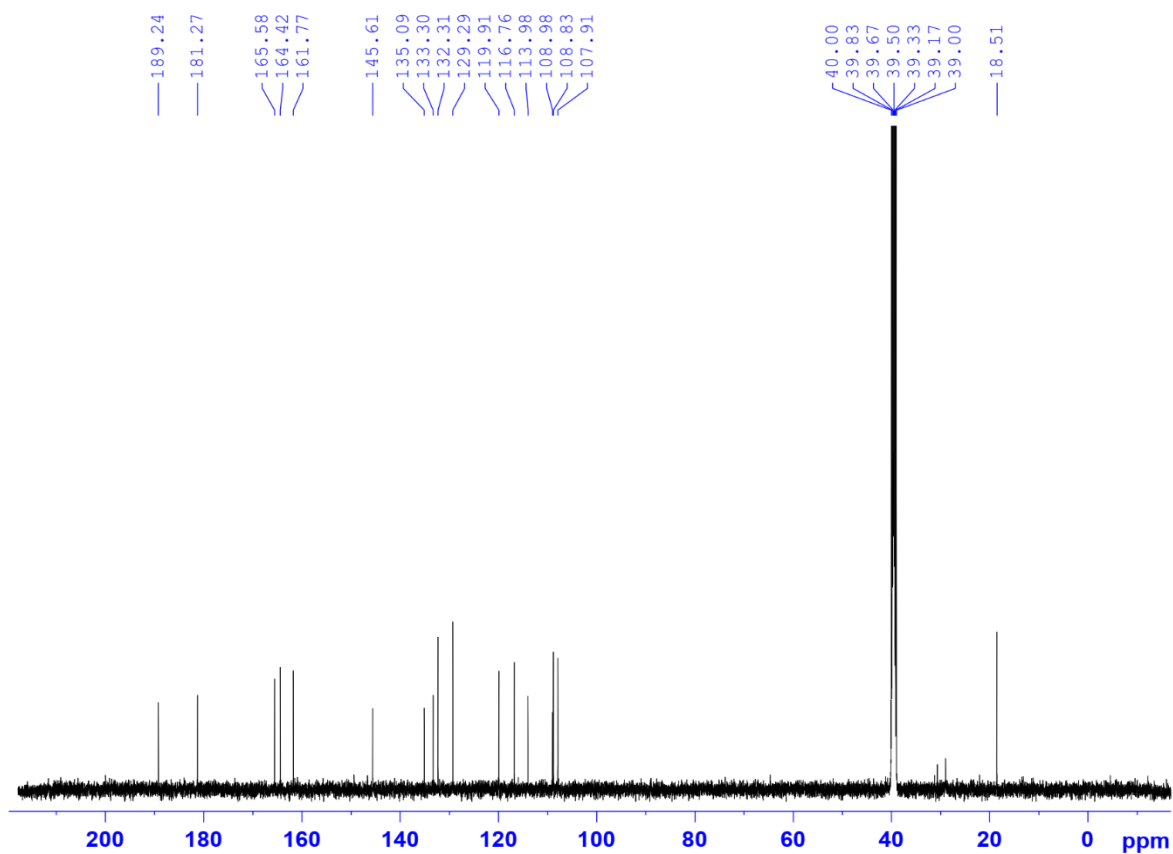
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,35	-	
2	123,28	7,01 d (4,0)	1, 4, 9, 9a, 1'
3	152,27	-	
4	119,53	7,33 d (4,5)	2, 3, 9, 9a, 10, 1'
4a	132,62	-	
5	108,74	6,98 t (1,5)	6, 7, 9, 10, 10a
6	165,52	-	
7	107,73	6,47 br s	5, 6, 8, 8a, 9
8	164,36	-	
8a	108,67	-	
9	189,41	-	
9a	113,31	-	
10	180,95	-	
10a	134,81	-	
1'	37,17	2,58 br t (7,5)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	22,94	1,60 m	3, 1', 3'
3'	13,48	0,91 t (7,5)	1', 2'
1-OH		11,78 s	1, 2, 9a
8-OH		11,94 s	

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

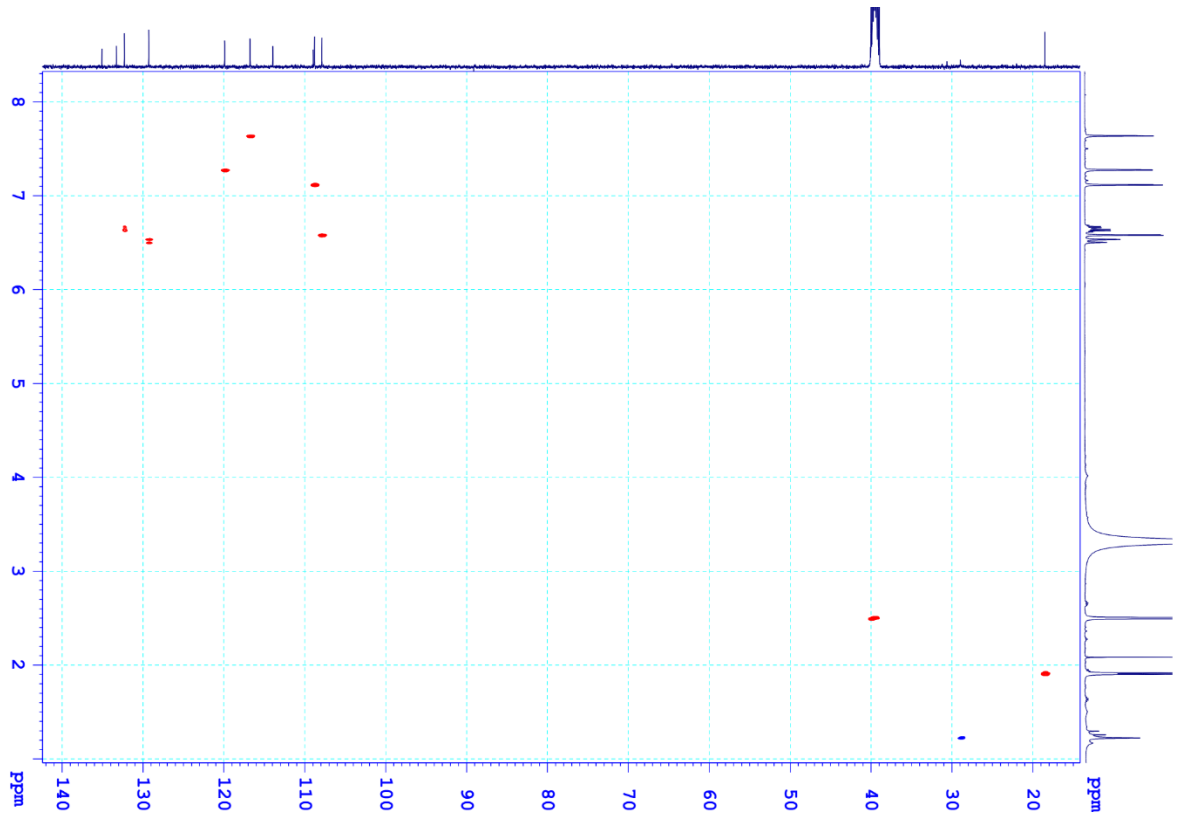
Phụ lục 7. Các phổ của CM5



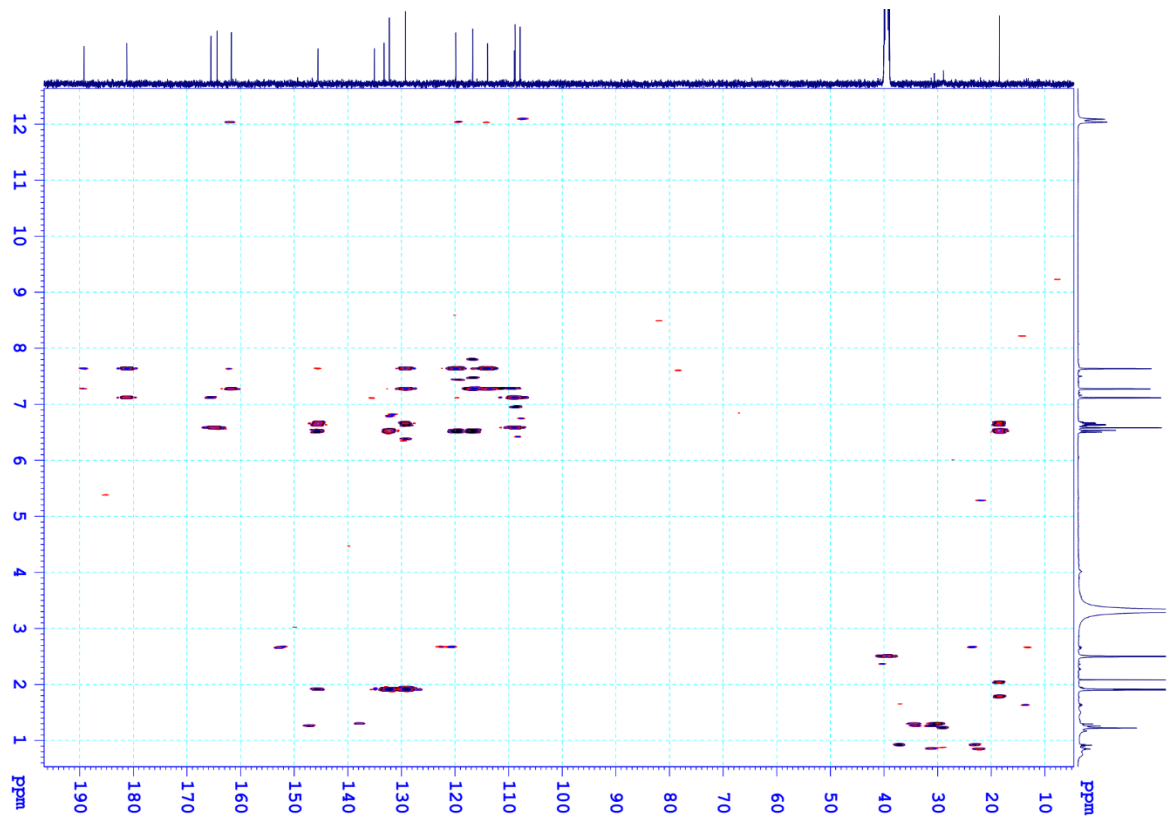
Phổ ¹H-NMR của CM5



Phổ ¹³C-NMR của CM5



Phổ HSQC của CM5



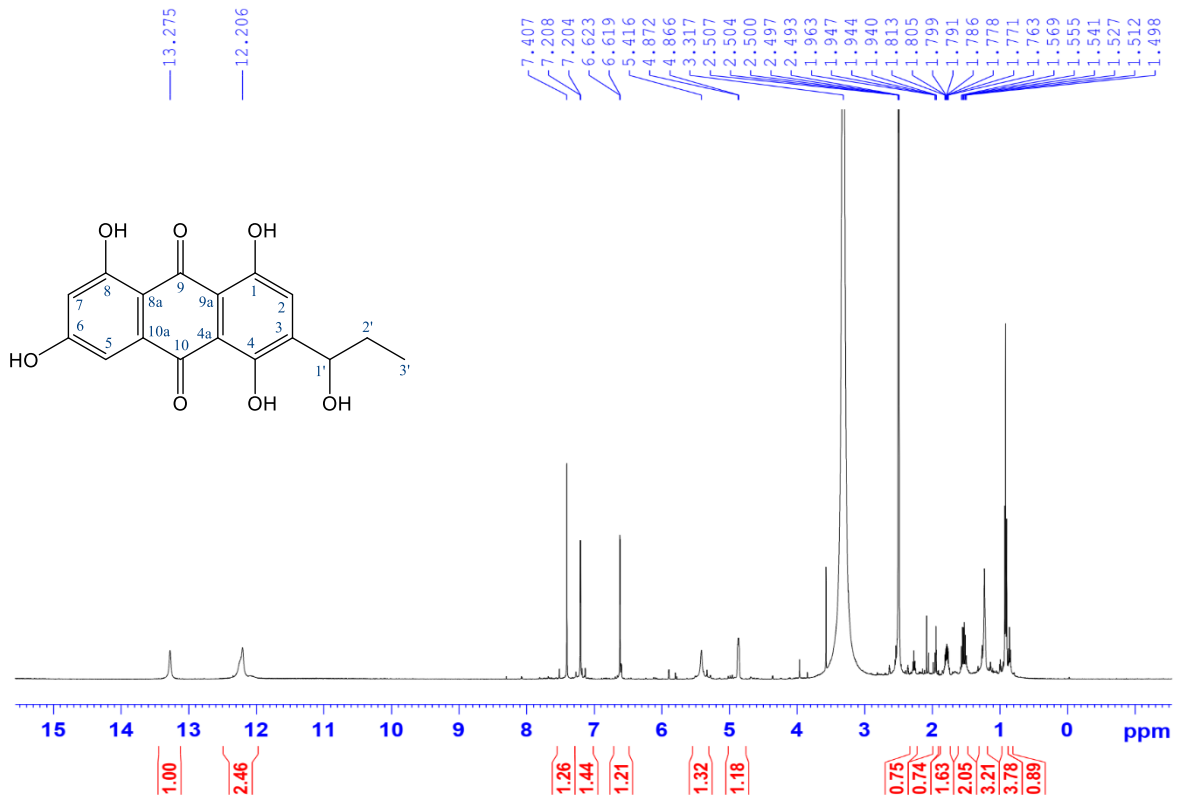
Phổ HMBC của CM5

Bảng giá trị phổ NMR của **CM5**

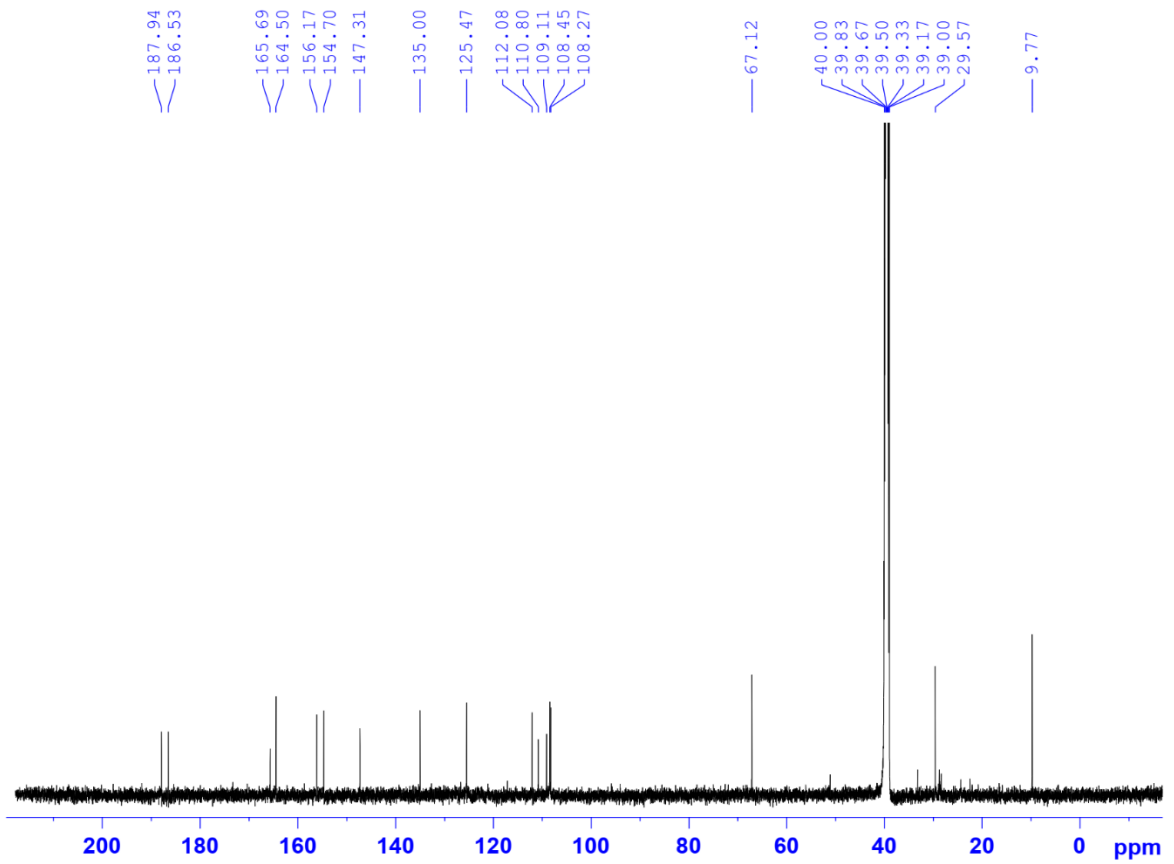
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,77	-	
2	119,91	7,27 br s	1, 4, 9, 9a, 1'
3	145,61	-	
4	116,76	7,63 d (1,5)	2, 3, 9, 9a, 10, 1'
4a	133,30	-	
5	108,83	7,12 d (2,0)	6, 7, 9, 10, 10a
6	165,58	-	
7	107,91	6,58 d (2,0)	5, 6, 8, 8a, 9
8	164,42	-	
8a	108,98	-	
9	189,24	-	
9a	113,98	-	
10	181,27	-	
10a	135,09	-	
1'	129,29	6,52 br d (16,0)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	132,31	6,65 m	3, 1', 3'
3'	18,51	1,91 dd (1,5, 6,5)	1', 2'
1-OH		12,03 s	1, 2, 9a
8-OH		12,08 s	

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

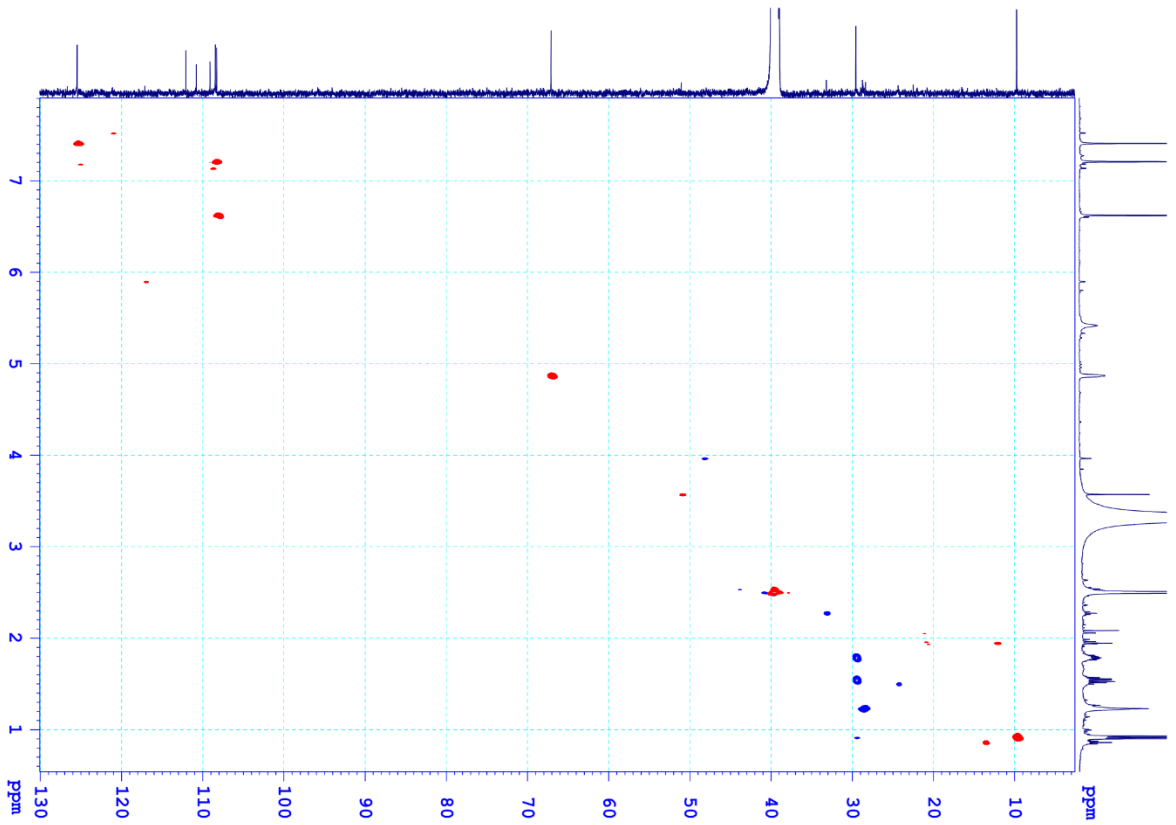
Phụ lục 8. Các phổ của CM6



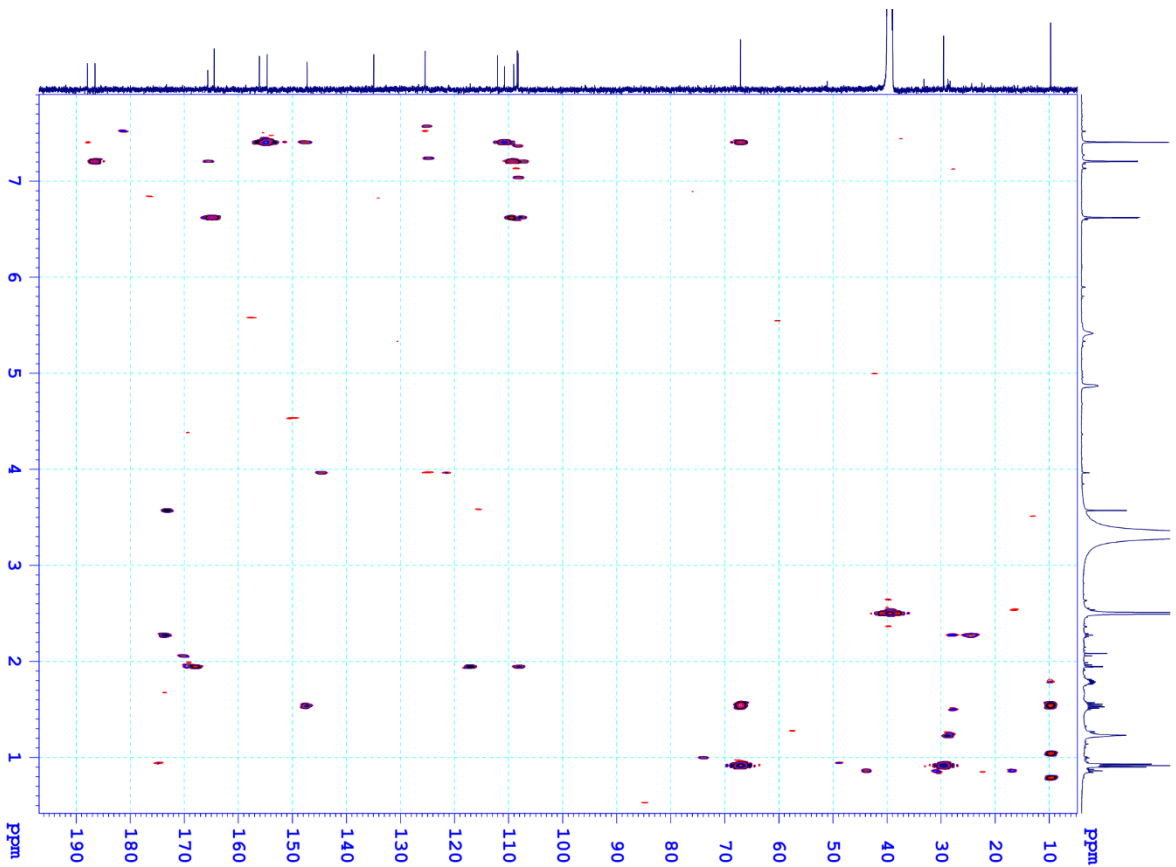
Phổ ¹H-NMR của CM6



Phổ ¹³C-NMR của CM6



Phổ HSQC của CM6



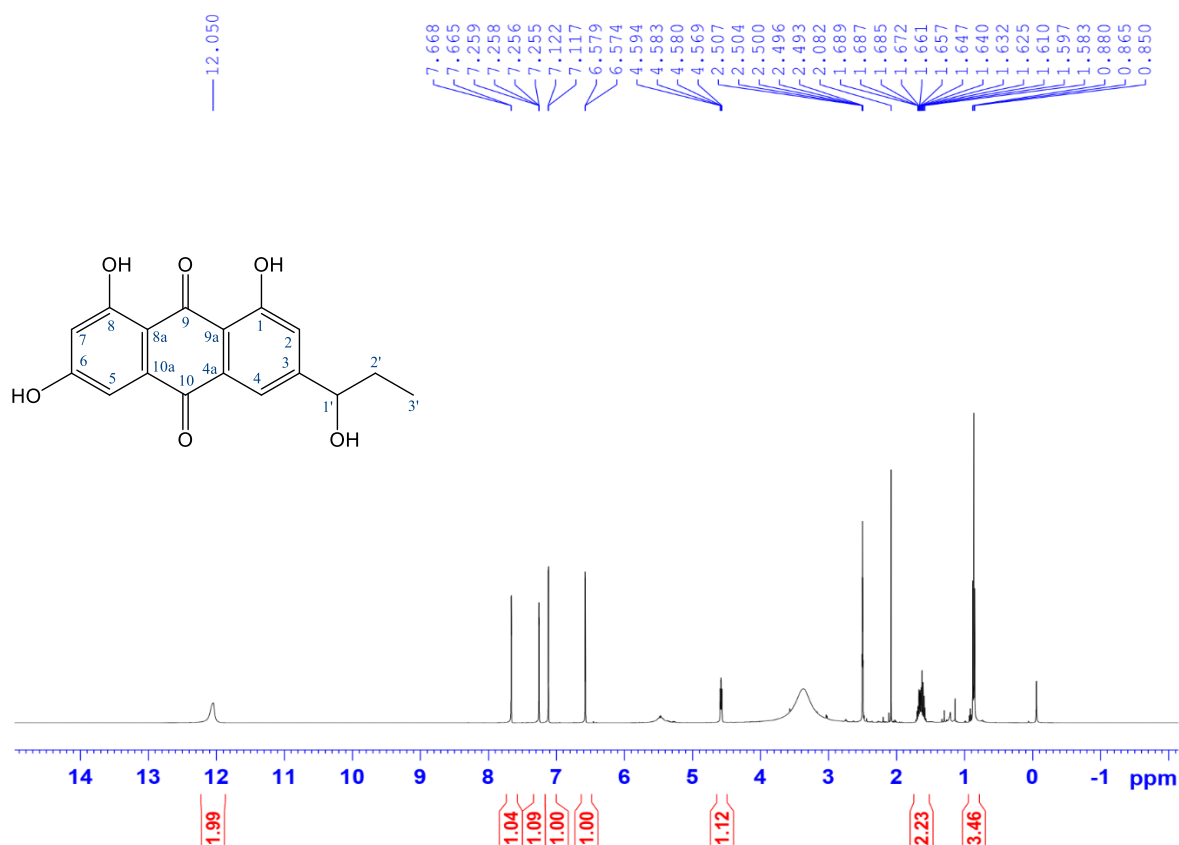
Phổ HMBC của CM6

Bảng giá trị phổ NMR của **CM6**

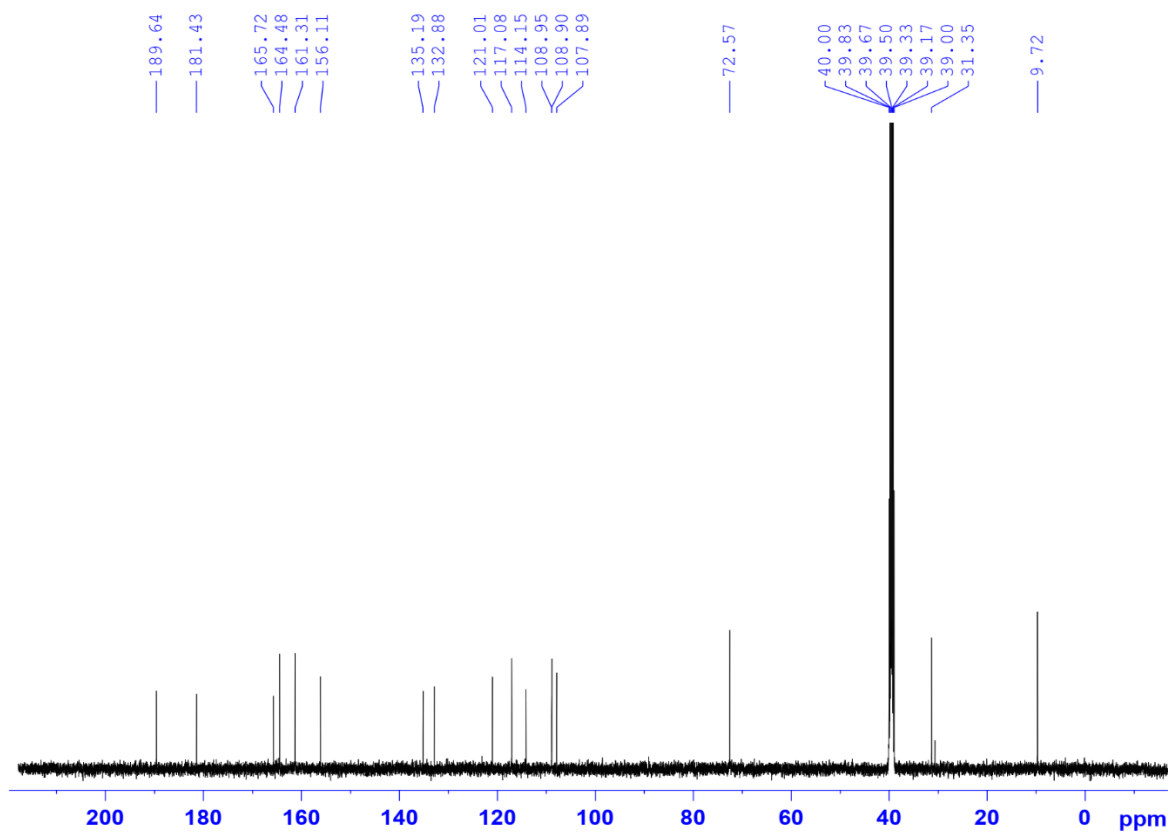
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	156,17	-	
2	125,47	7,41 s	1, 4, 9a, 1'
3	147,31	-	
4	154,70	-	
4a	112,08	-	
5	108,45	7,20 d (2,0)	6, 7, 9, 10
6	165,69	-	
7	108,27	6,62 d (2,0)	5, 6, 8, 8a
8	164,50	-	
8a	109,11	-	
9	187,94	-	
9a	110,80	-	
10	186,53	-	
10a	135,00	-	
1'	67,12	4,87 m	
2'	29,57	1,53 m/1,78 m	3, 1', 3'
3'	9,77	0,91 t (7,5)	1', 2'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

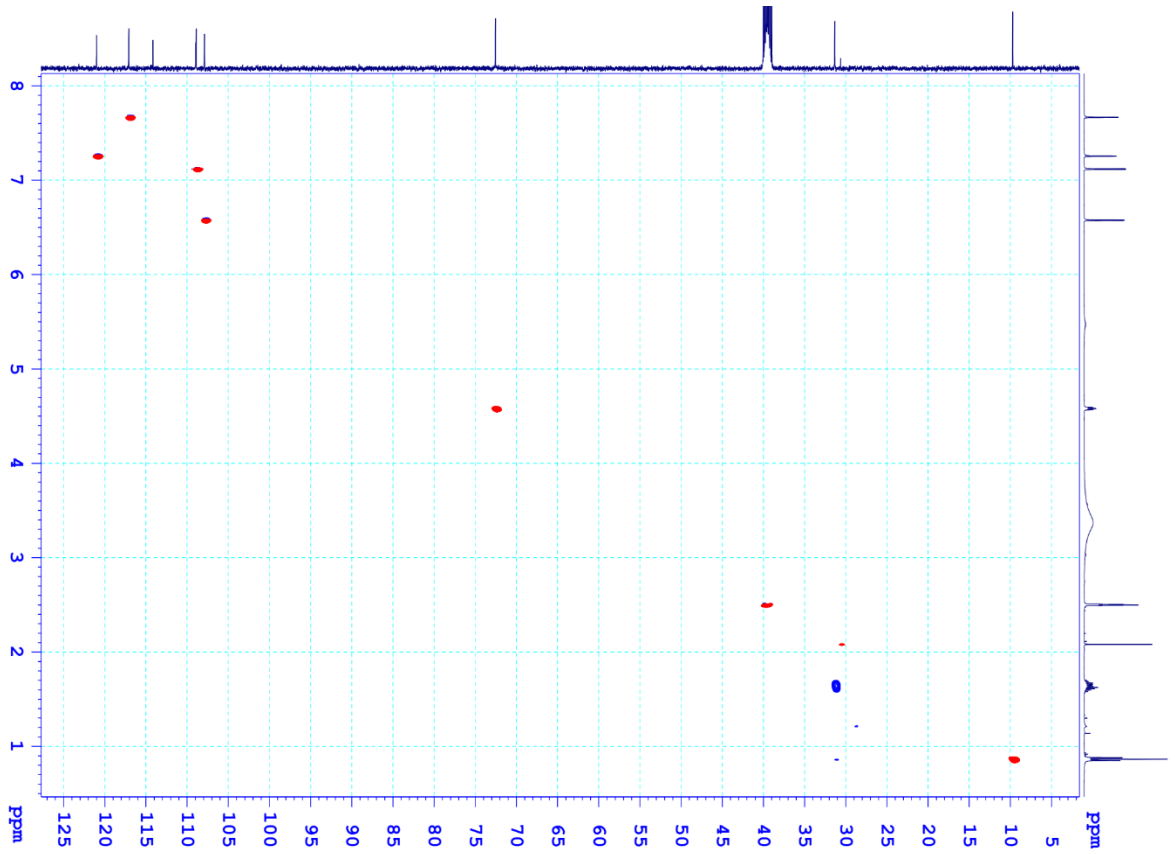
Phụ lục 9. Các phổ của CM7



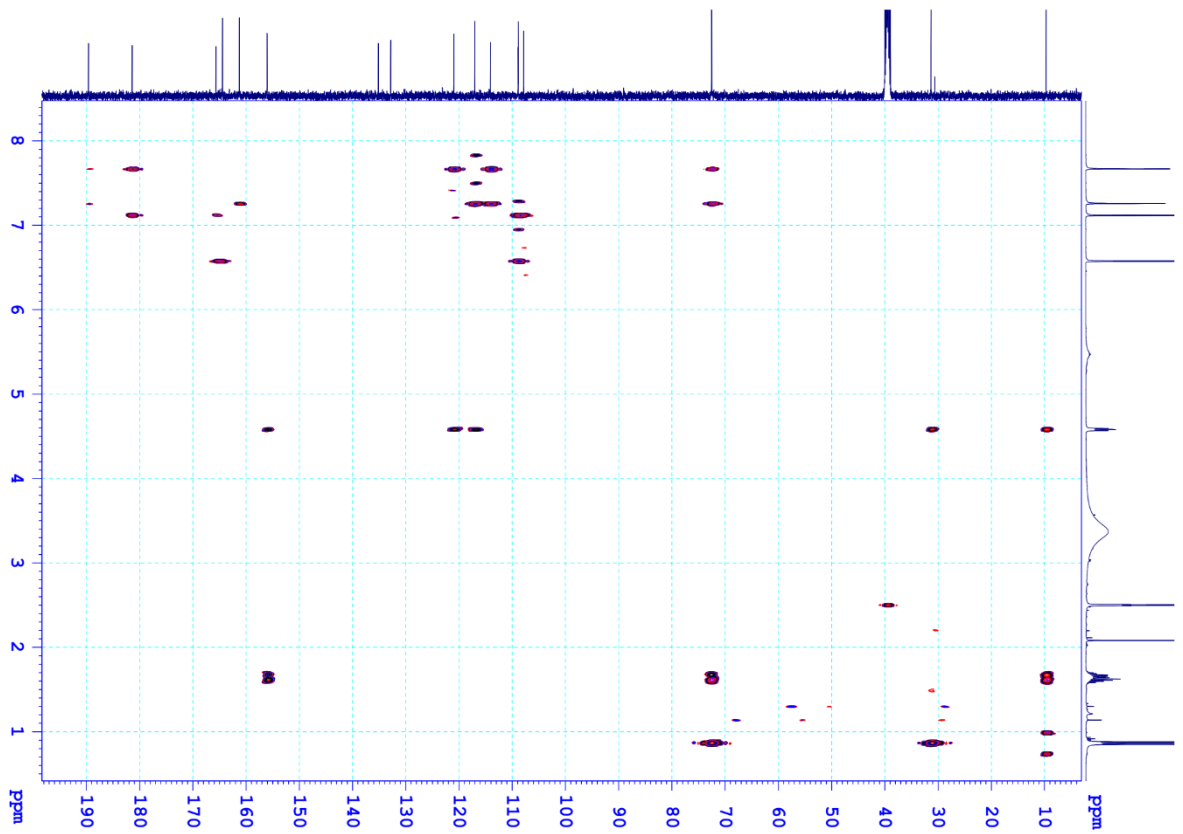
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CM7



Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của CM7



Phổ HSQC của CM7



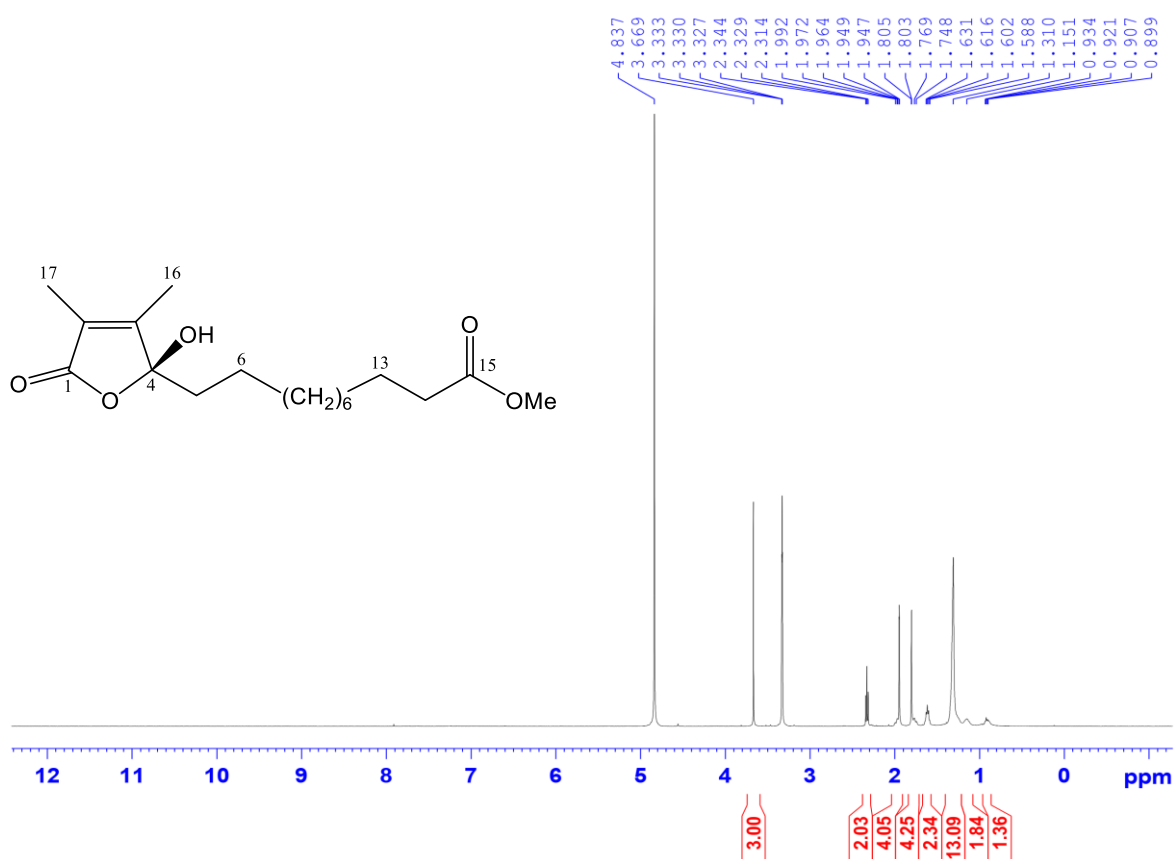
Phổ HMBC của CM7

Bảng giá trị phổ NMR của **CM7**

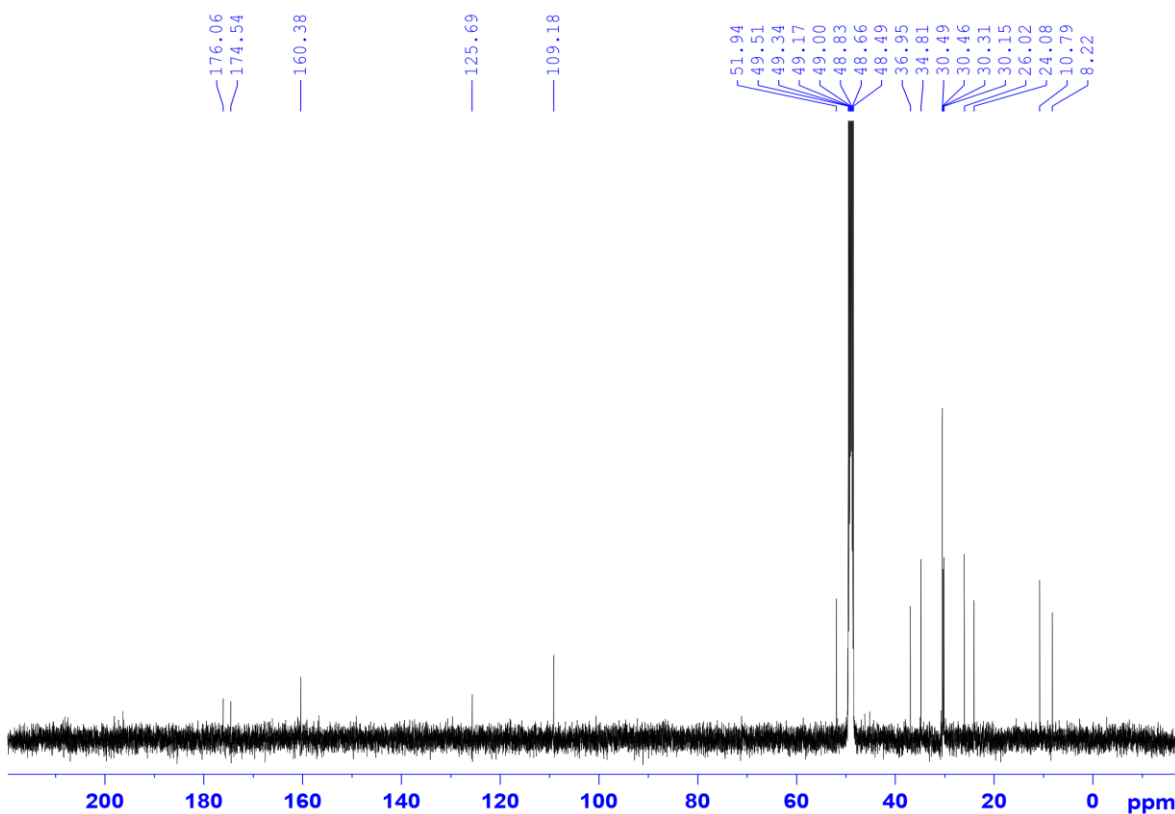
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,31	-	
2	121,01	7,26 dd (0,5, 1,5)	1, 4, 9a, 1'
3	156,11	-	
4	117,08	7,66 d (1,5)	
4a	132,88	-	
5	108,90	7,12 d (2,5)	6, 7, 9, 10
6	165,72	-	
7	107,89	6,57 d (2,5)	5, 6, 8, 8a
8	164,48	-	
8a	108,95	-	
9	189,64	-	
9a	114,15	-	
10	181,43	-	
10a	135,19	-	
1'	72,57	4,58 dd (5,5, 7,0)	
2'	31,35	1,65 m	3, 1', 3'
3'	9,72	0,86 t (7,5)	1', 2'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phụ lục 10. Các phổ của CM8

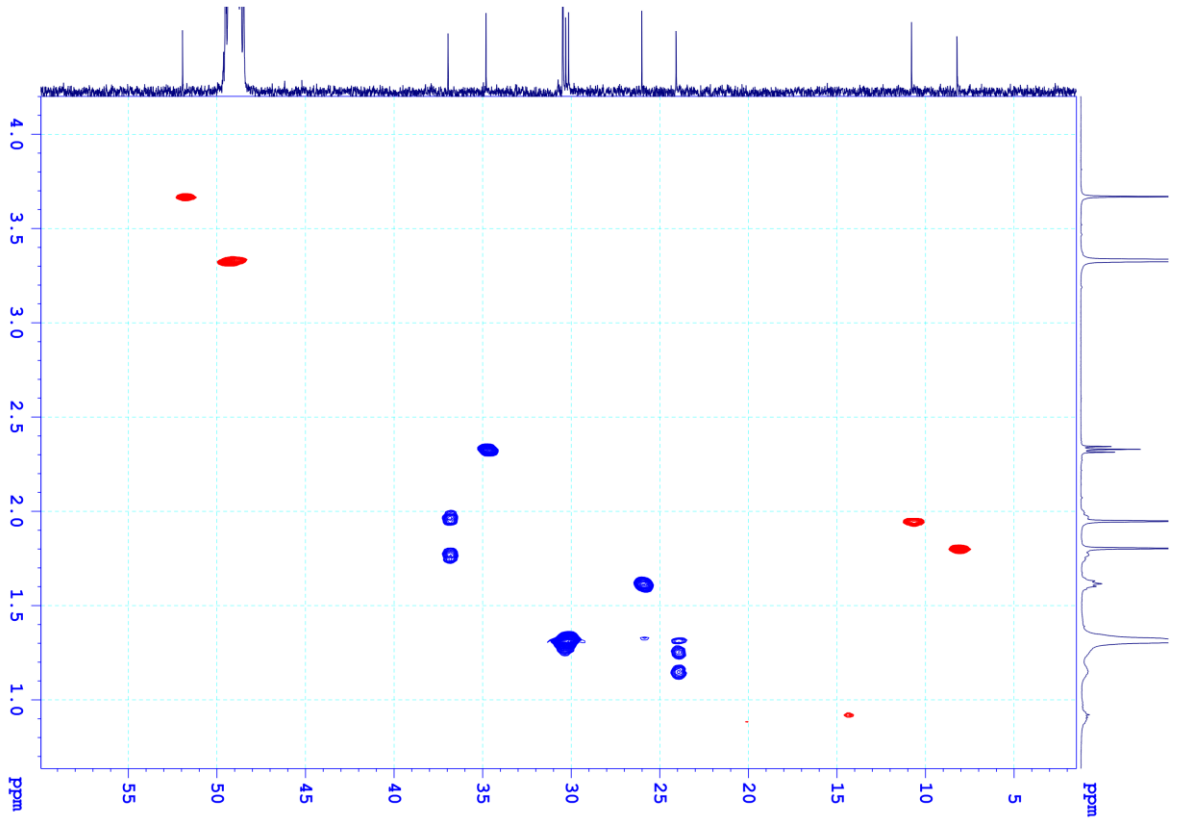


Phổ ¹H-NMR của CM8

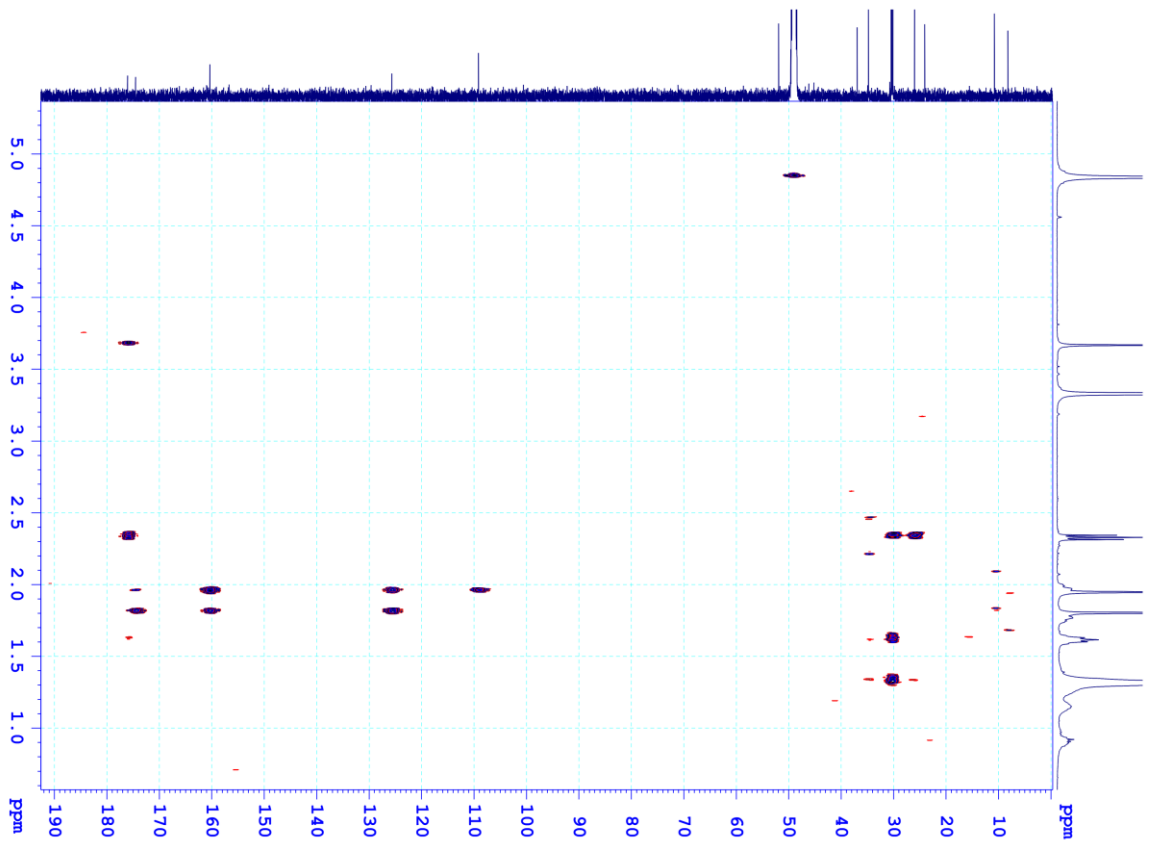


Phổ ¹³C-NMR của CM8

PL-25

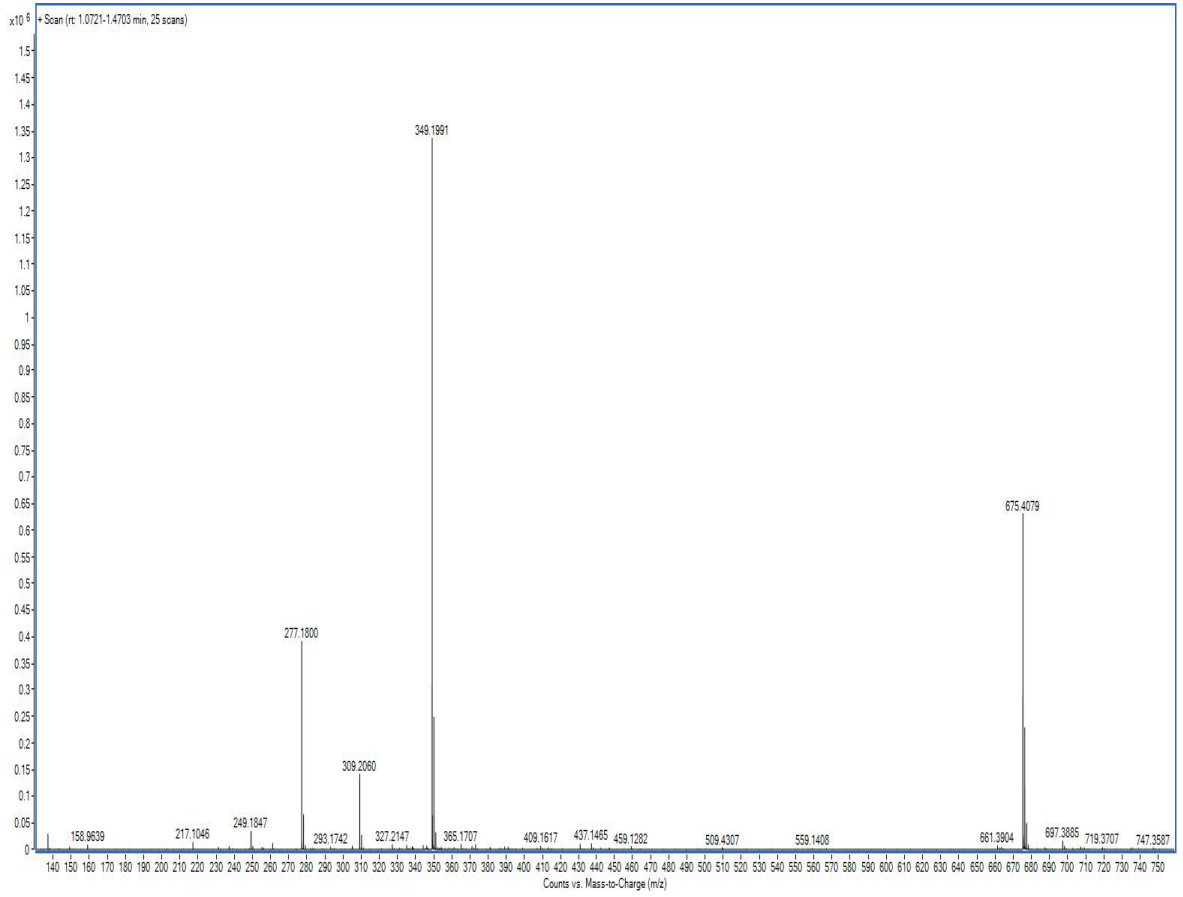


Phổ HSQC của CM8



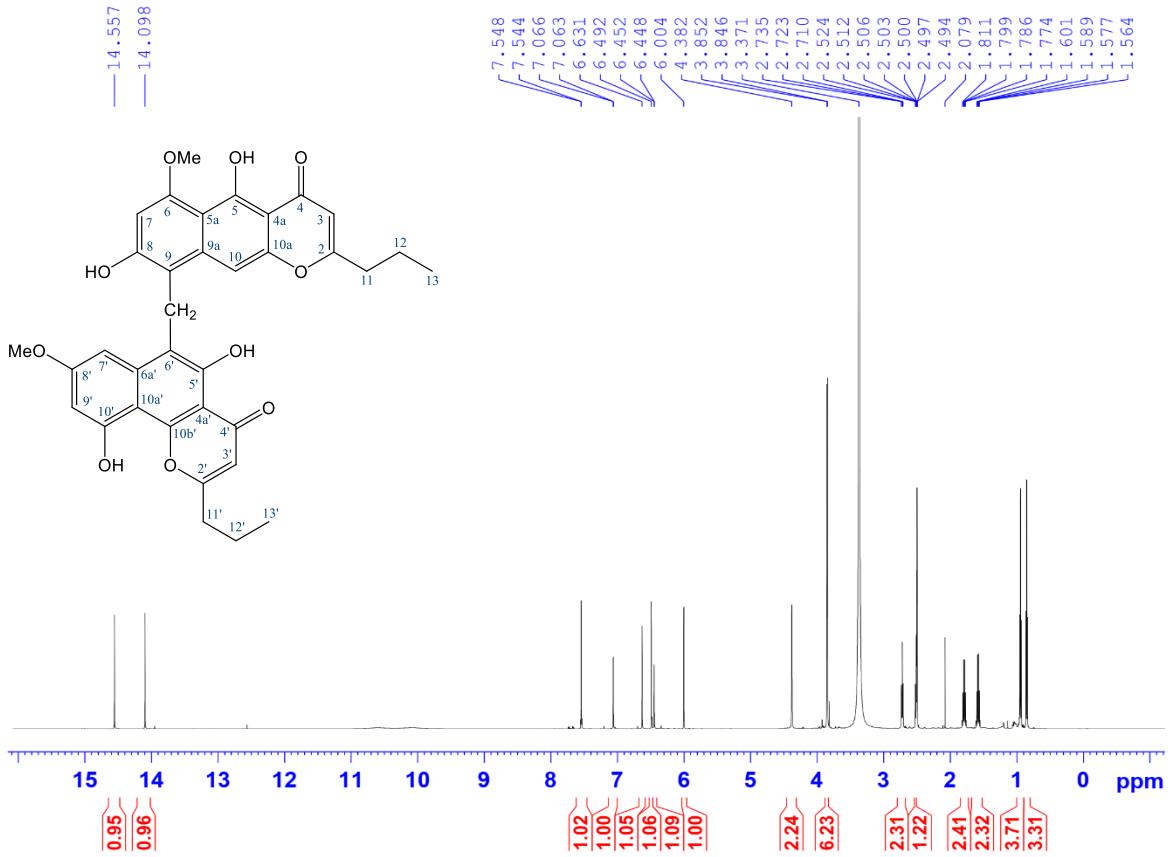
Phổ HMBC của CM8

PL-26

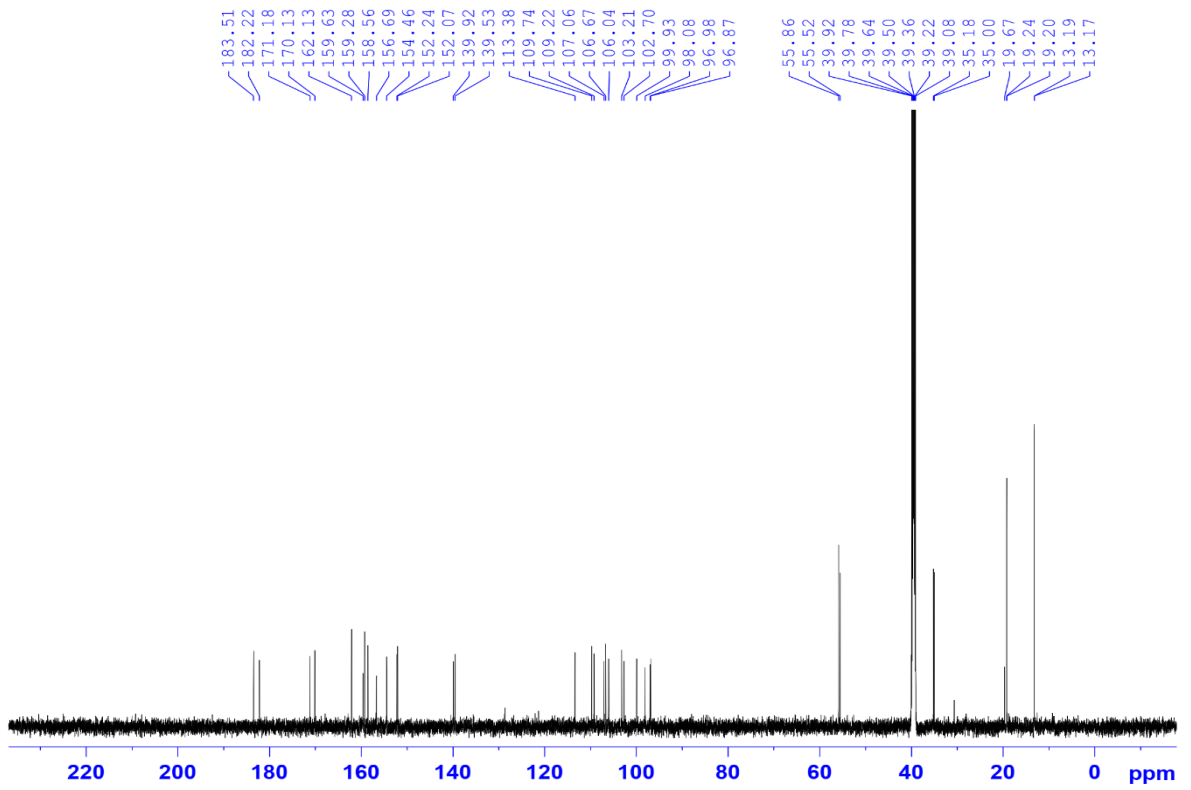


Phổ HR-QTOF-MS của **CM8**

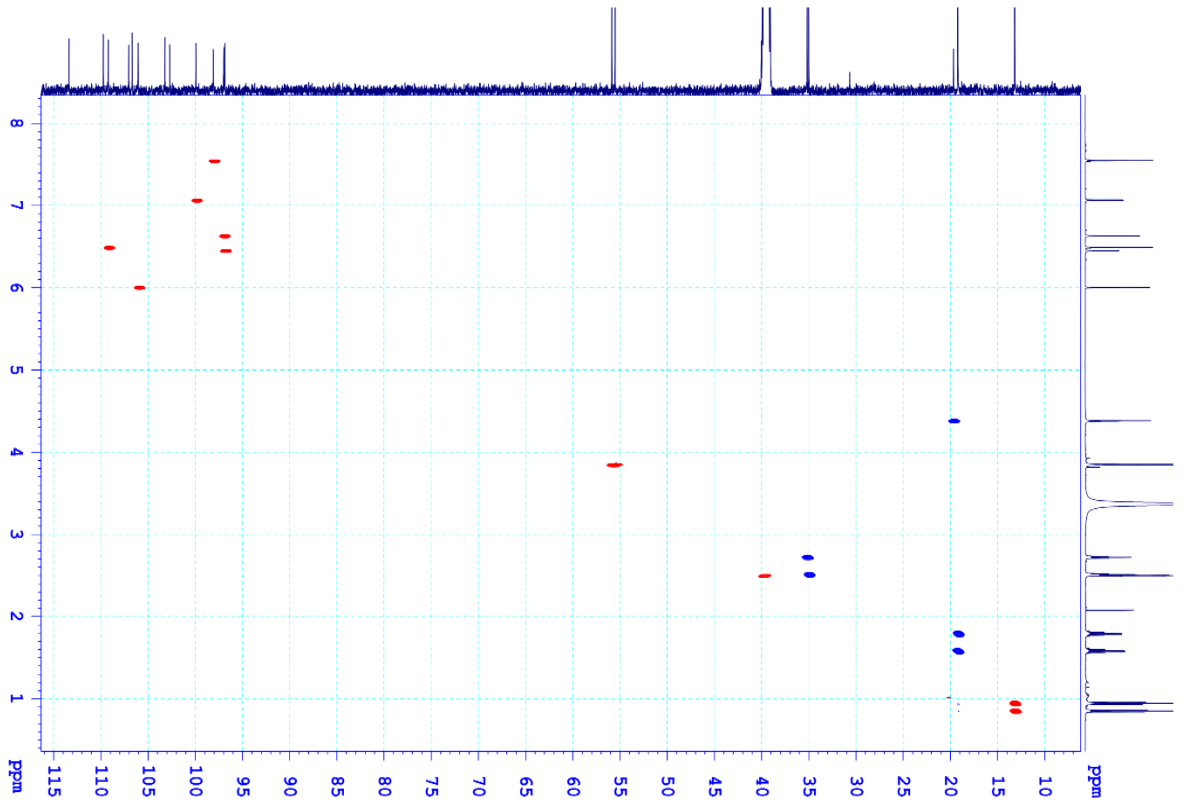
Phụ lục 11. Các phổ của CD1



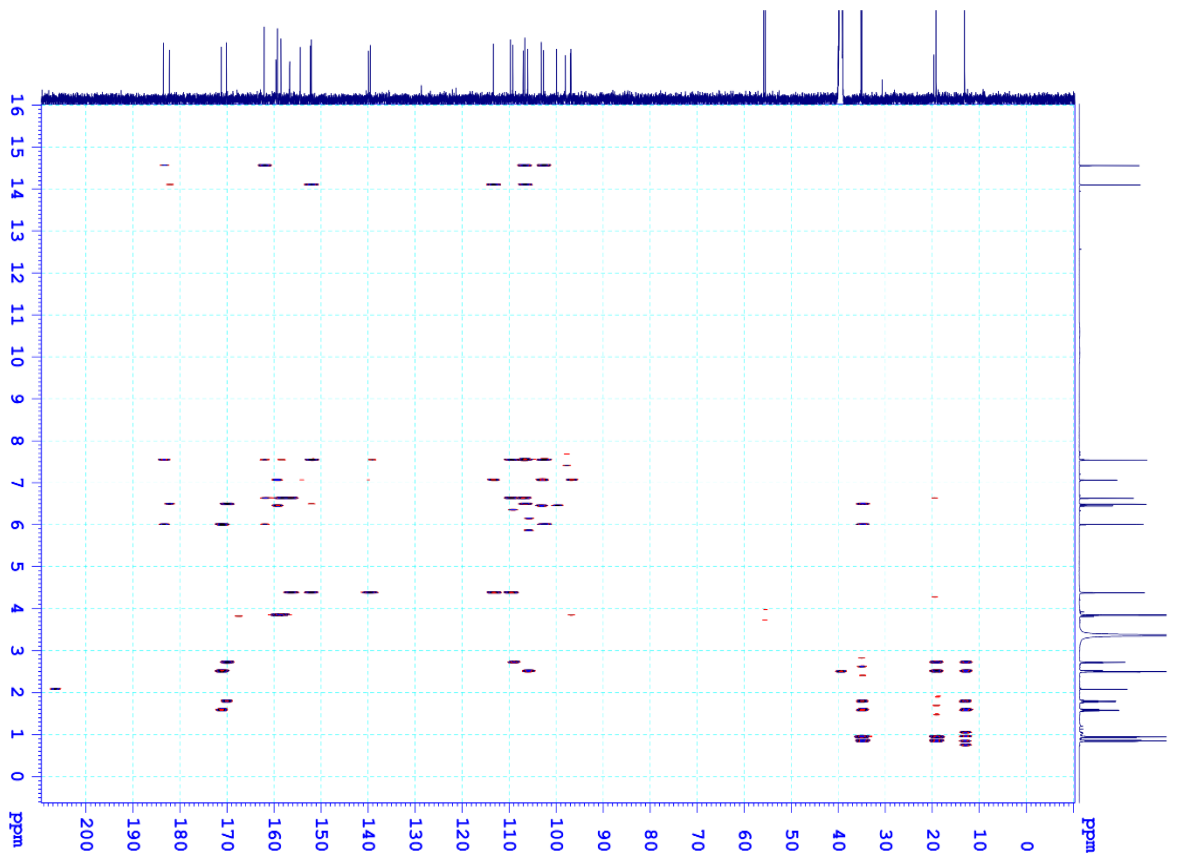
Phổ ¹H-NMR của CD1



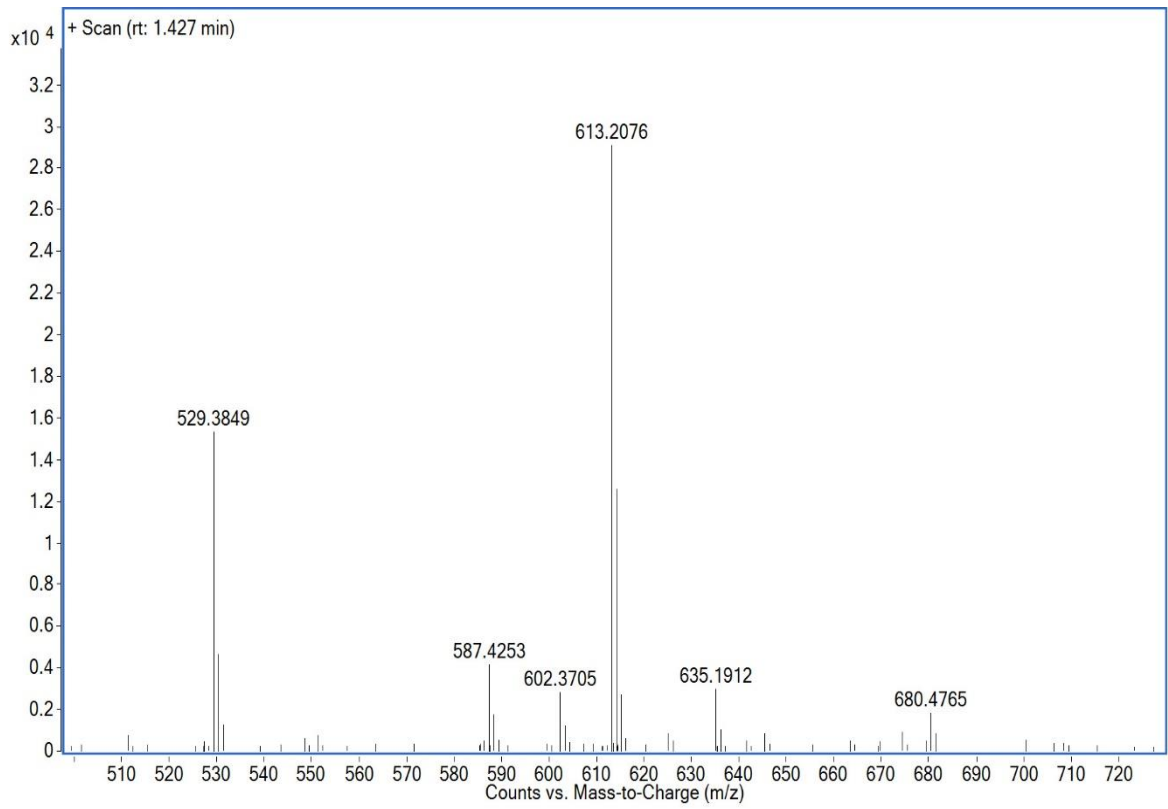
Phổ ¹³C-NMR của CD1



Phổ HSQC của **CD1**

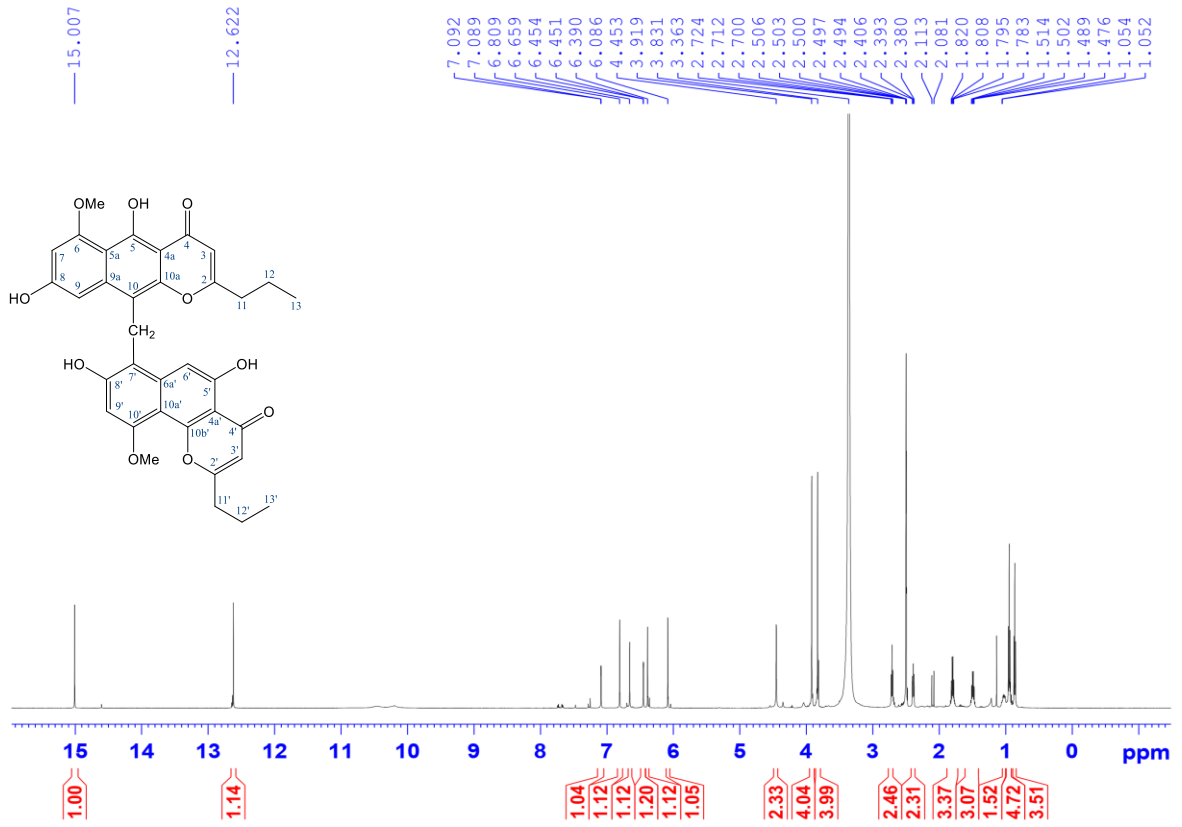


Phổ HMBC của **CD1**

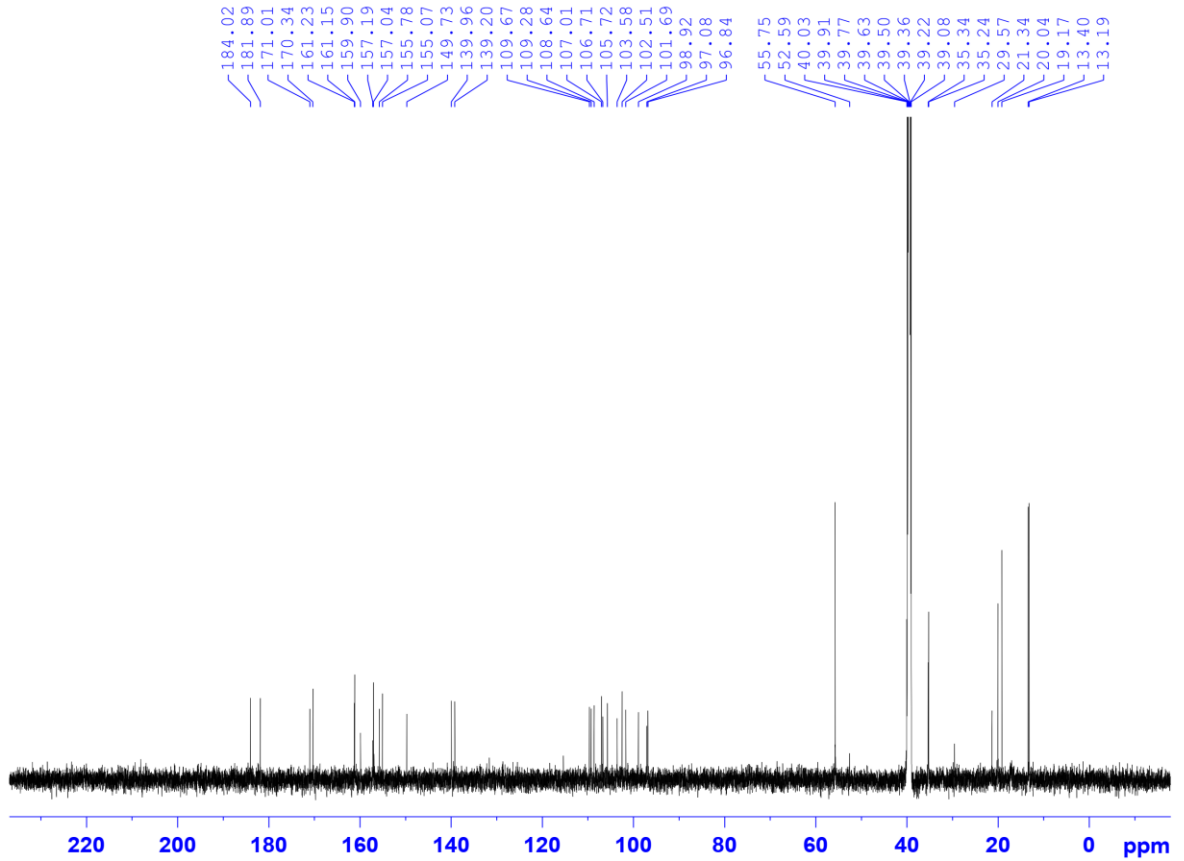


Phổ HR-QTOF-MS của **CD1**

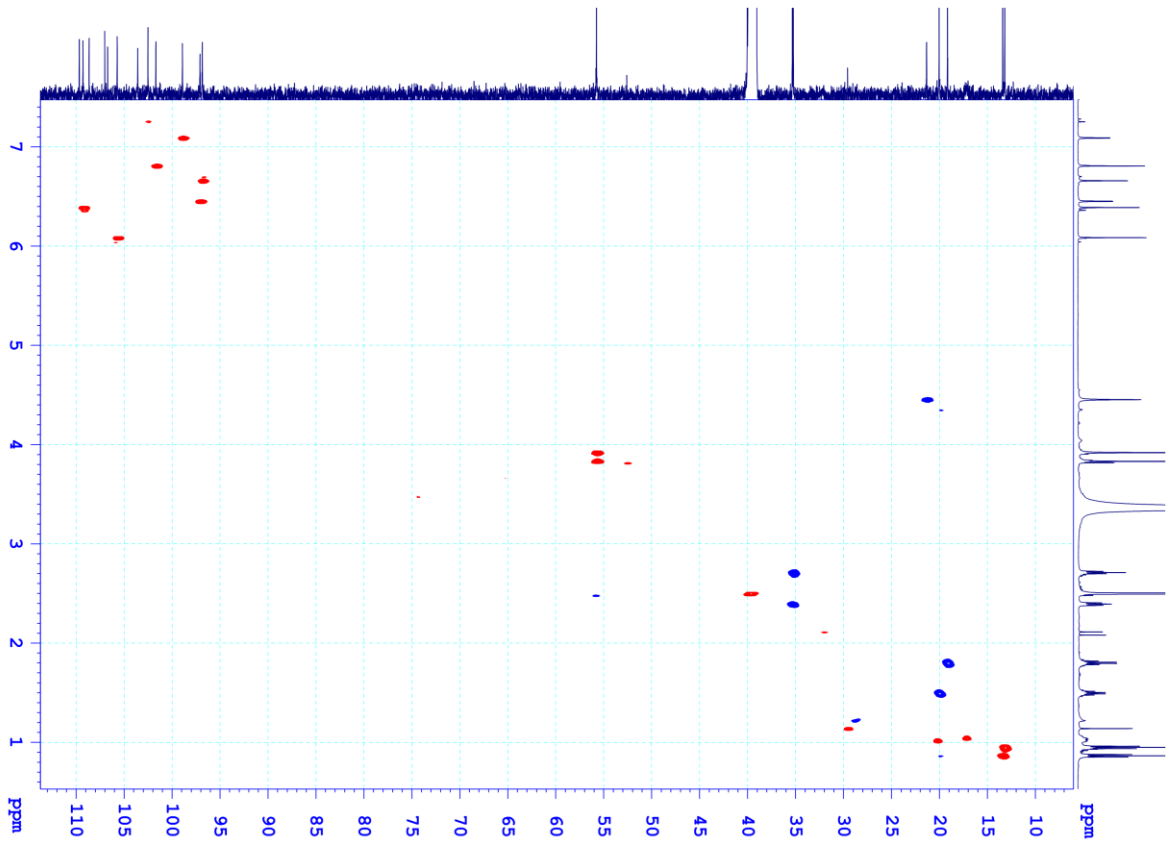
Phụ lục 12. Các phổ của CD2



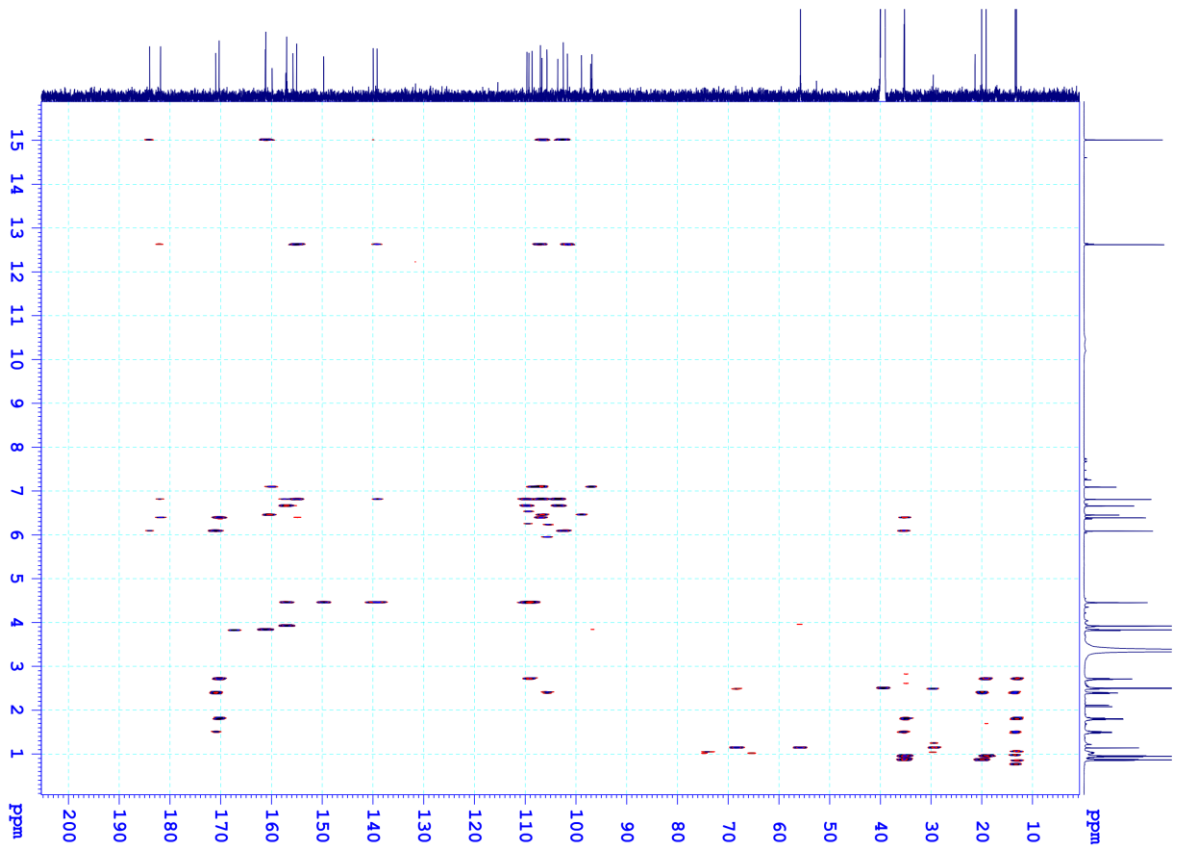
Phổ ¹H-NMR của CD2



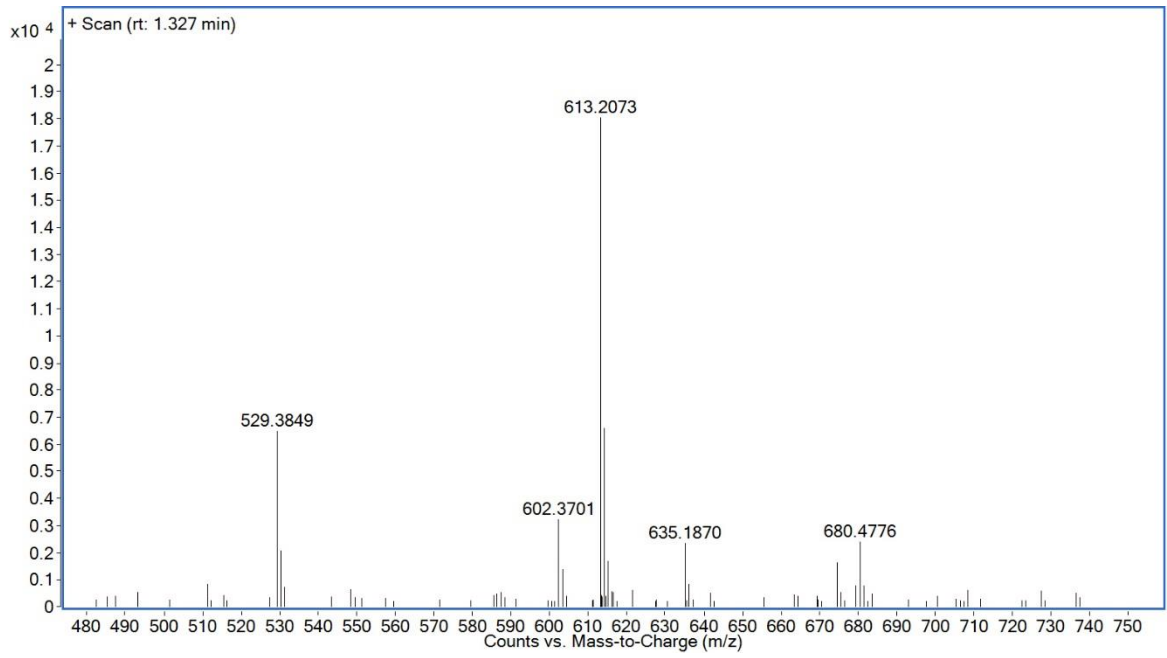
Phổ ¹³C-NMR của CD2



Phổ HSQC của CD2

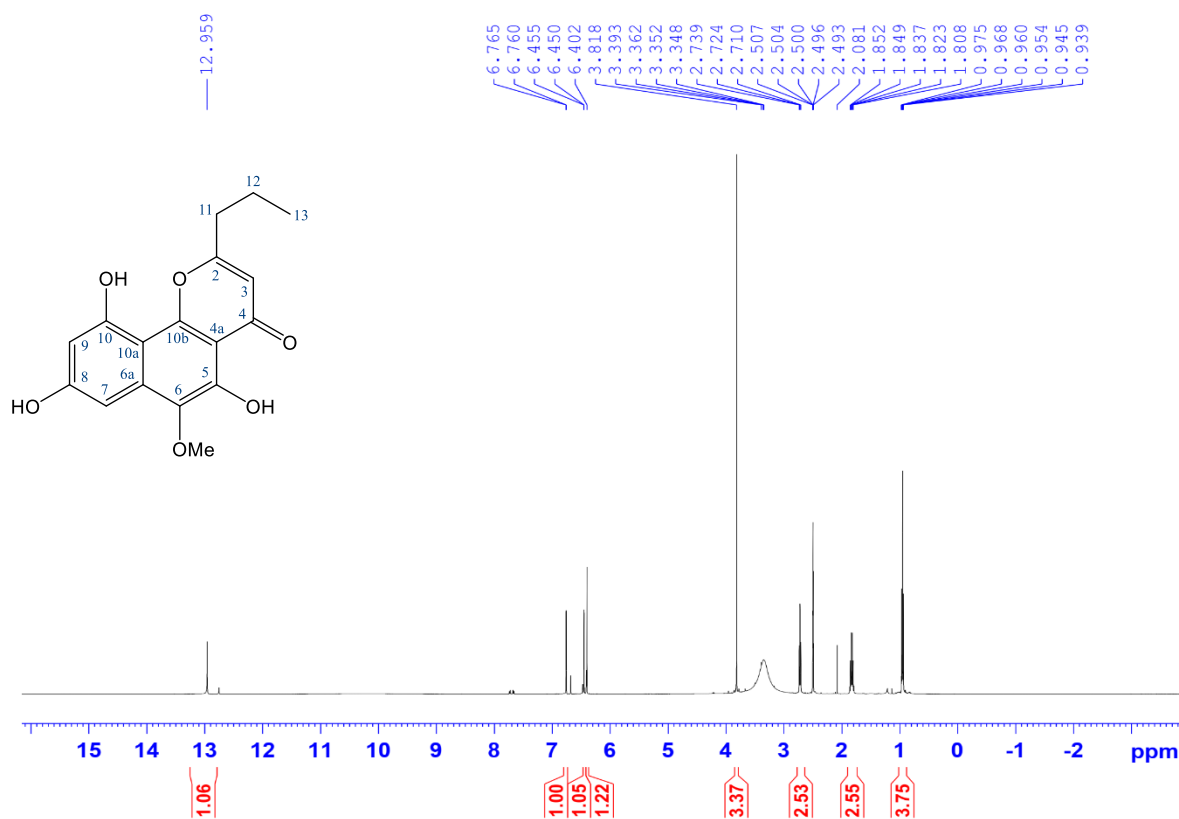


Phổ HMBC của CD2

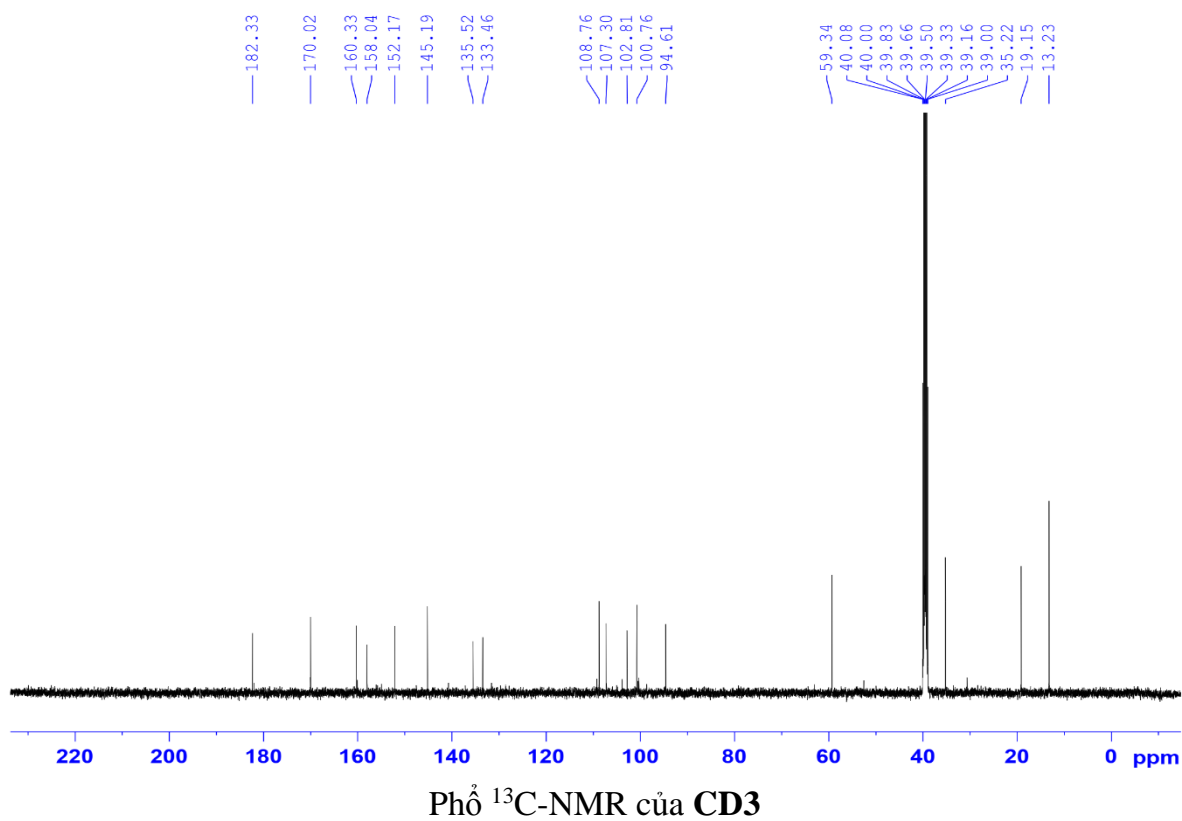


Phổ HR-QTOF-MS của CD2

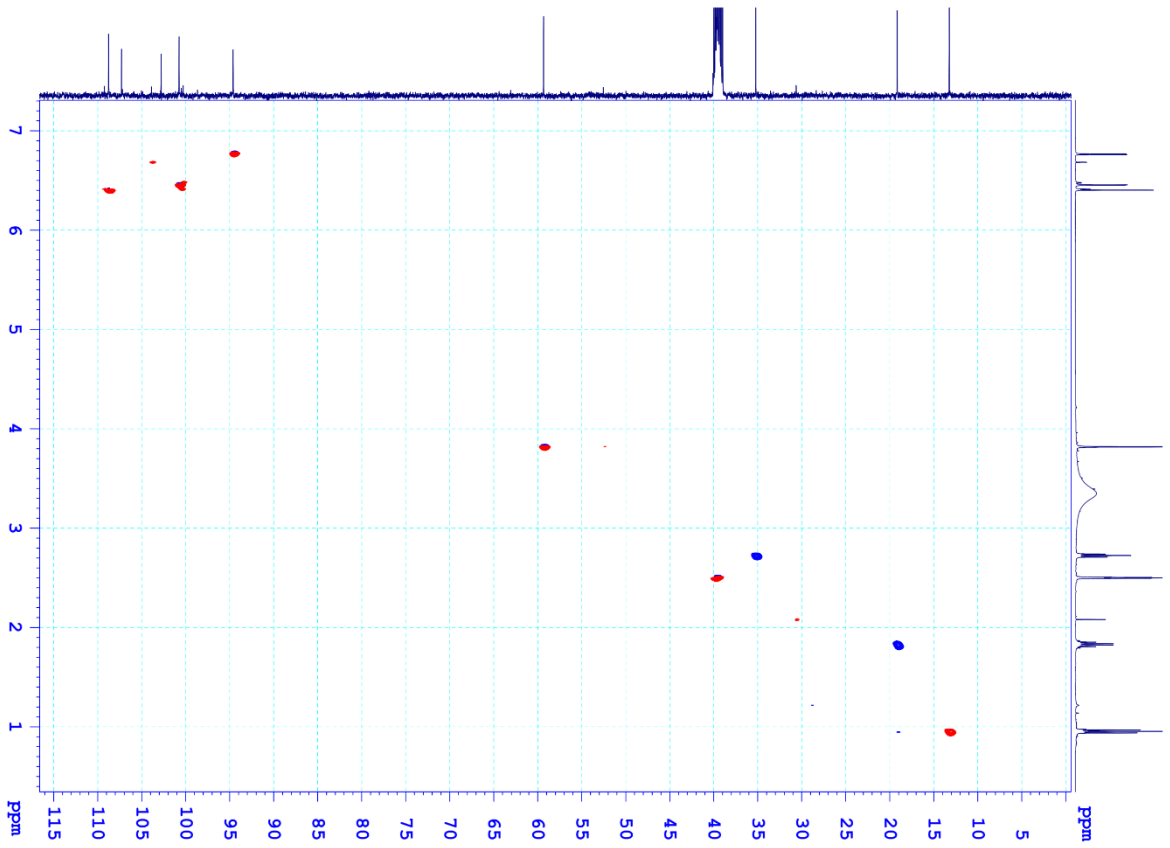
Phụ lục 13. Các phổ của CD3



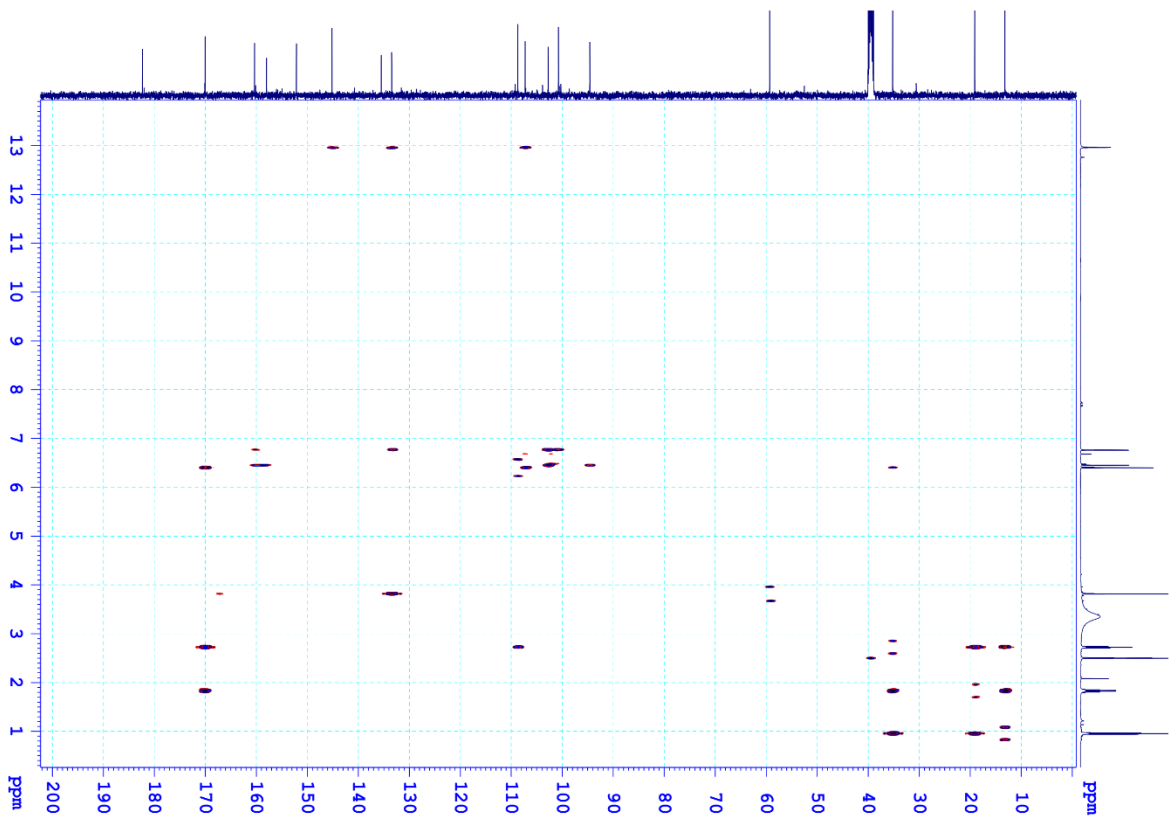
Phổ ¹H-NMR của CD3



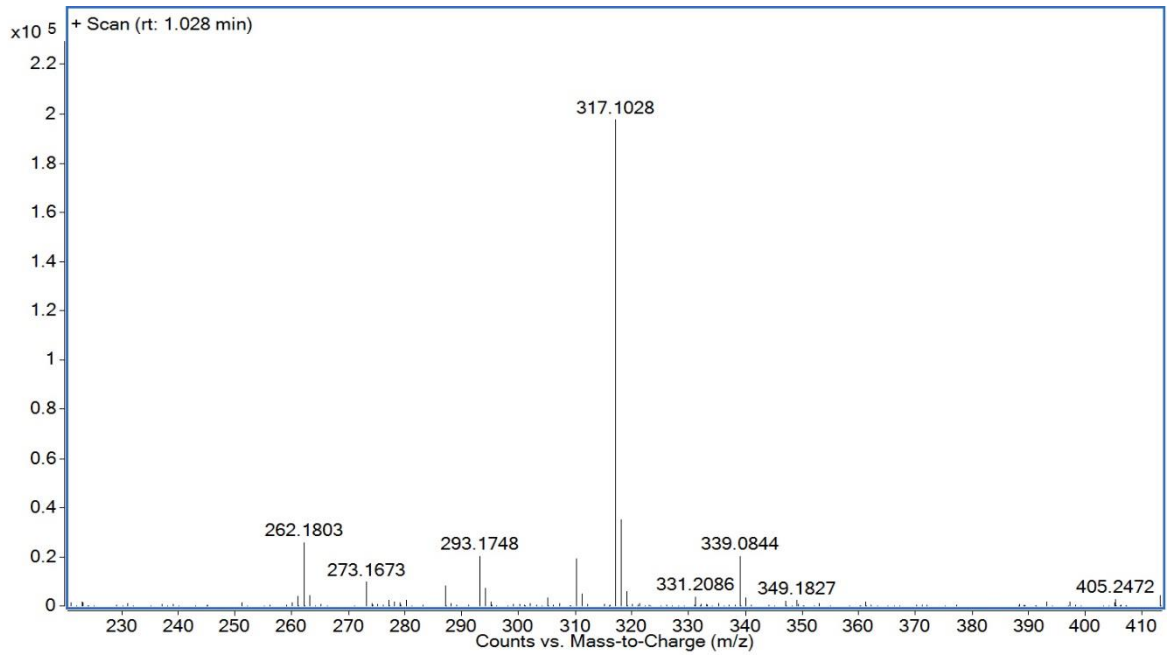
Phổ ¹³C-NMR của CD3



Phổ HSQC của CD3

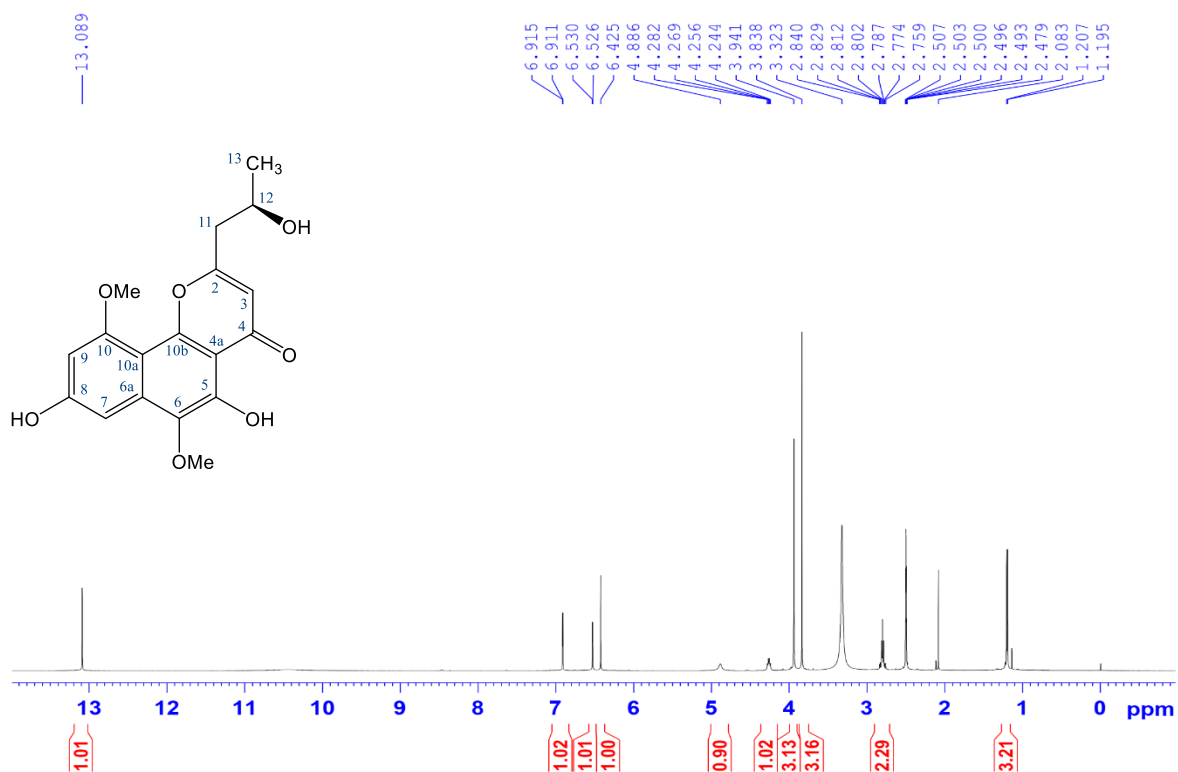


Phổ HMBC của CD3

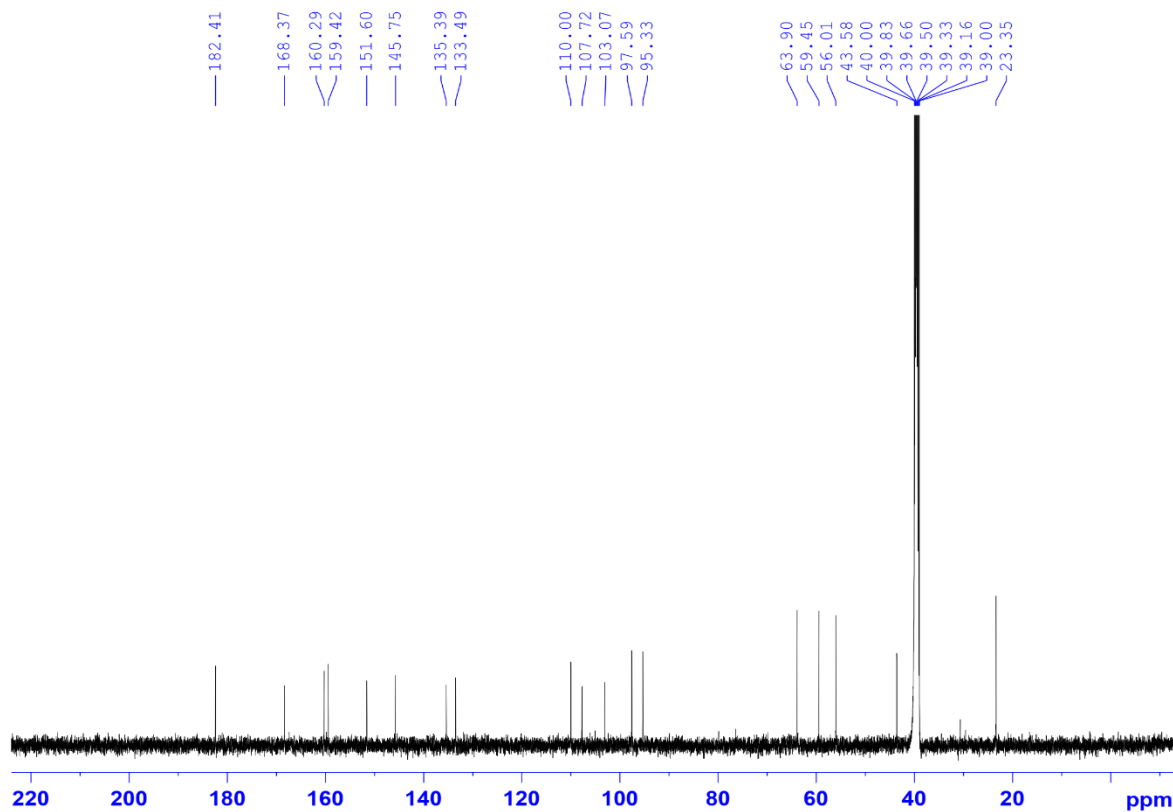


Phổ HR-QTOF-MS của CD3

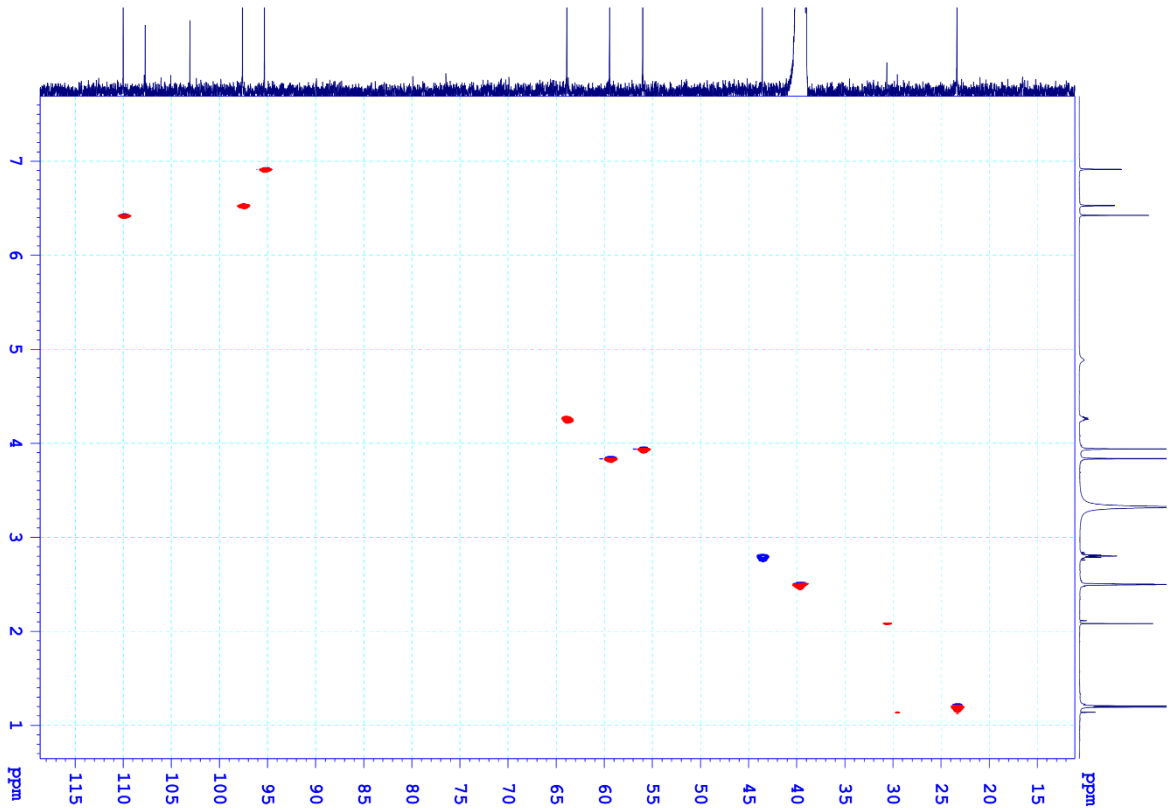
Phụ lục 14. Các phổ của CD4



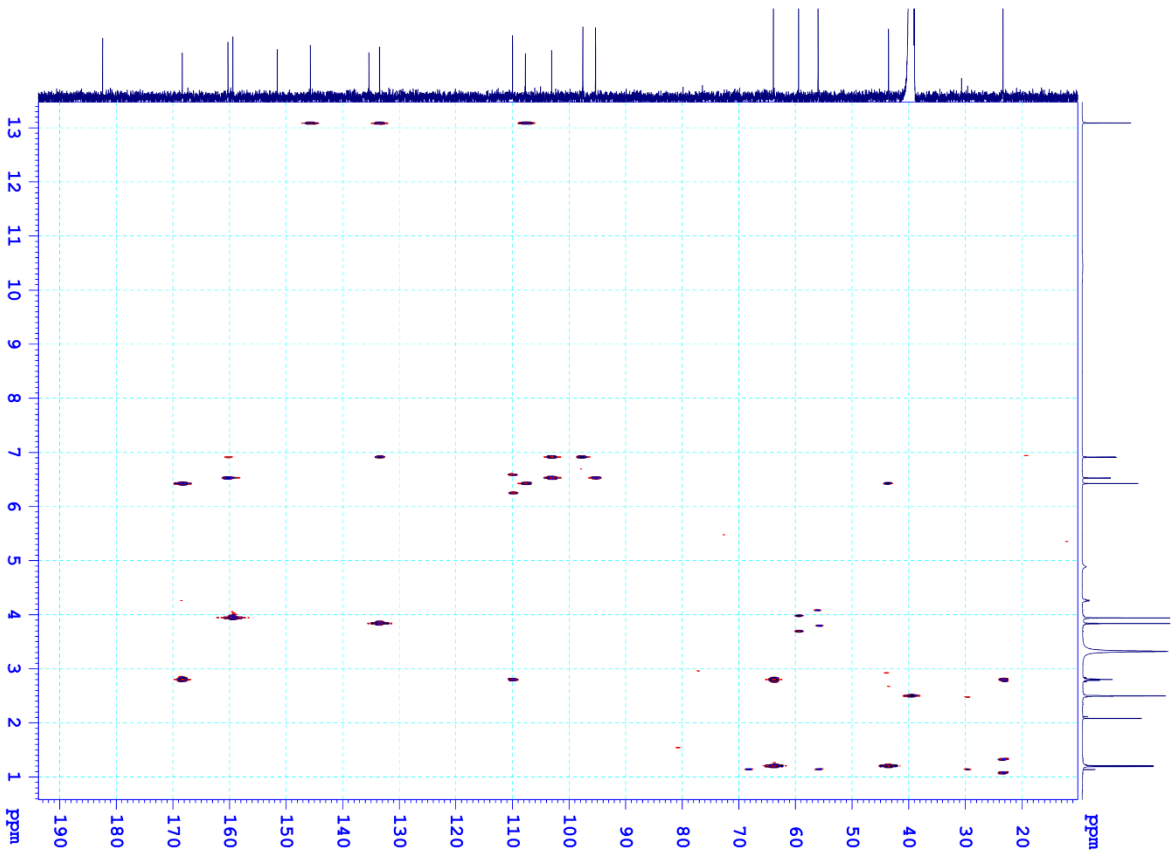
Phổ ¹H-NMR của CD4



Phổ ¹³C-NMR của CD4

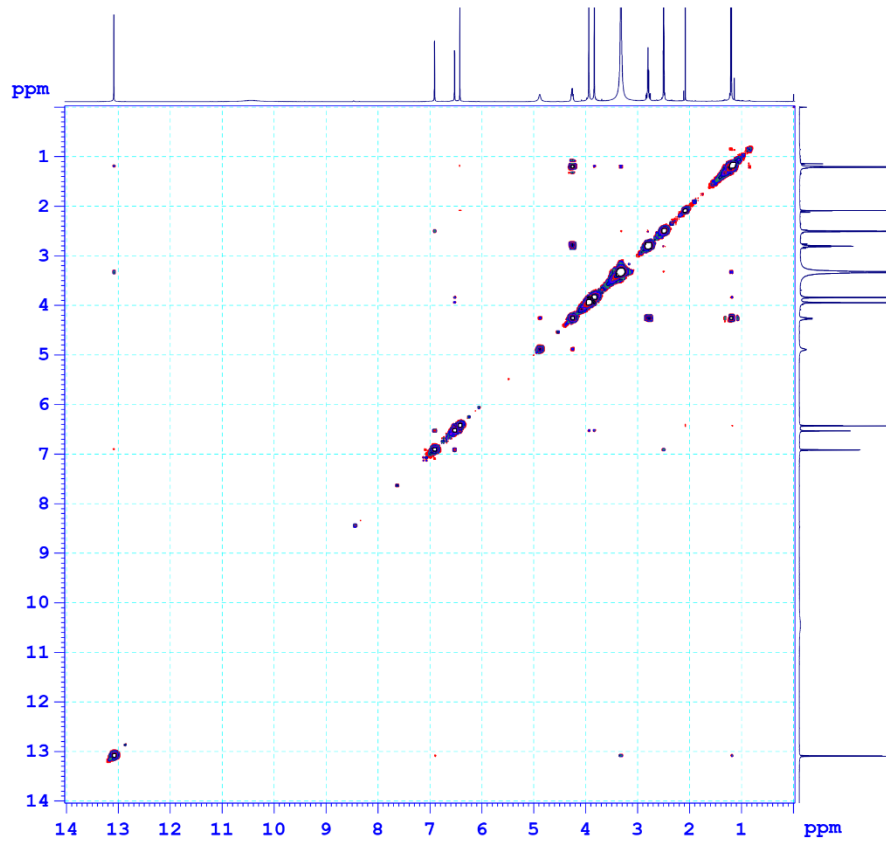


Phổ HSQC của CD4

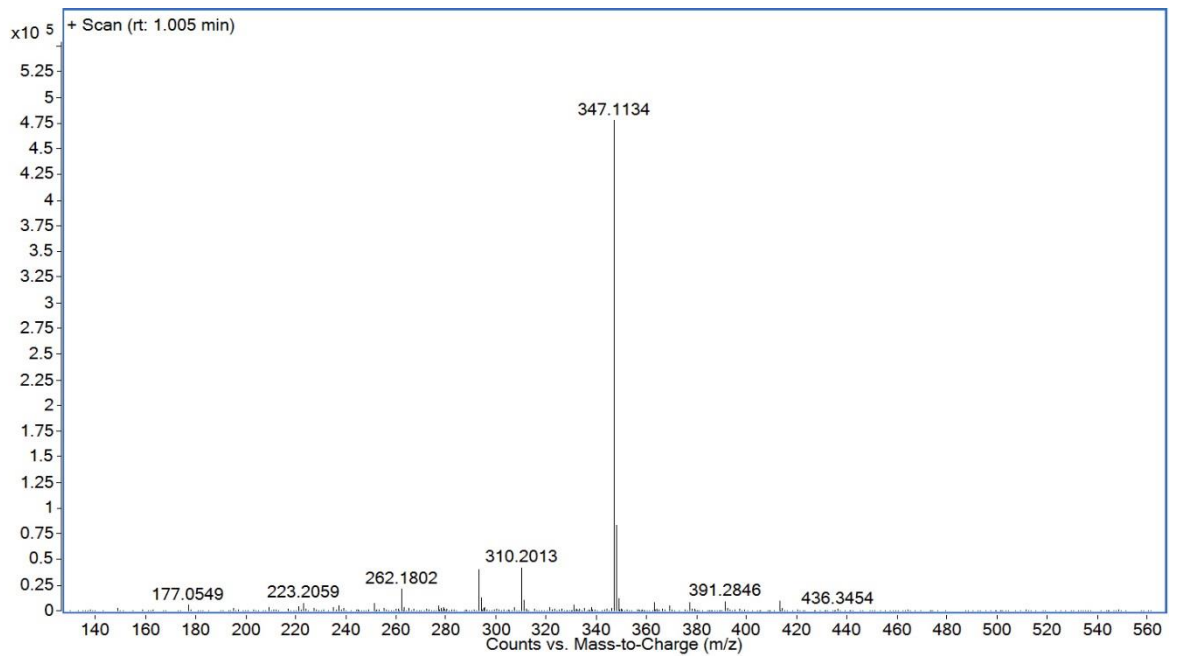


Phổ HMBC của CD4

PL-38

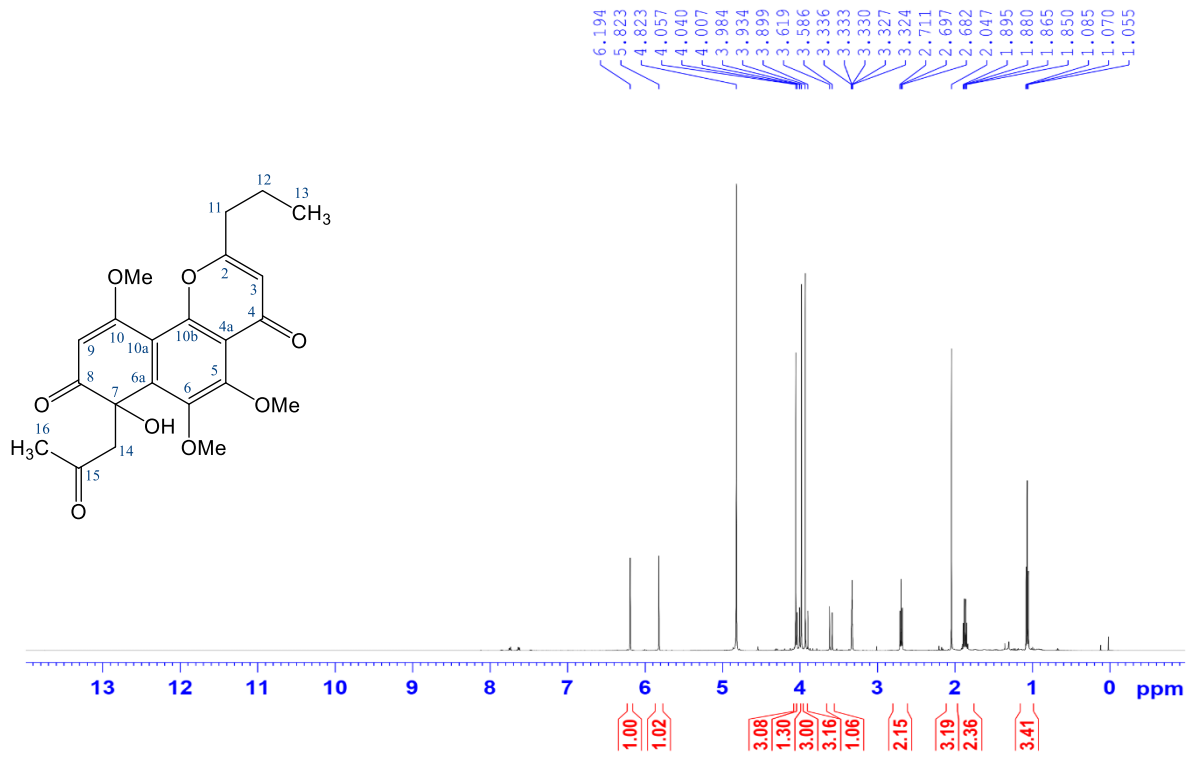


Phổ COSY của CD4

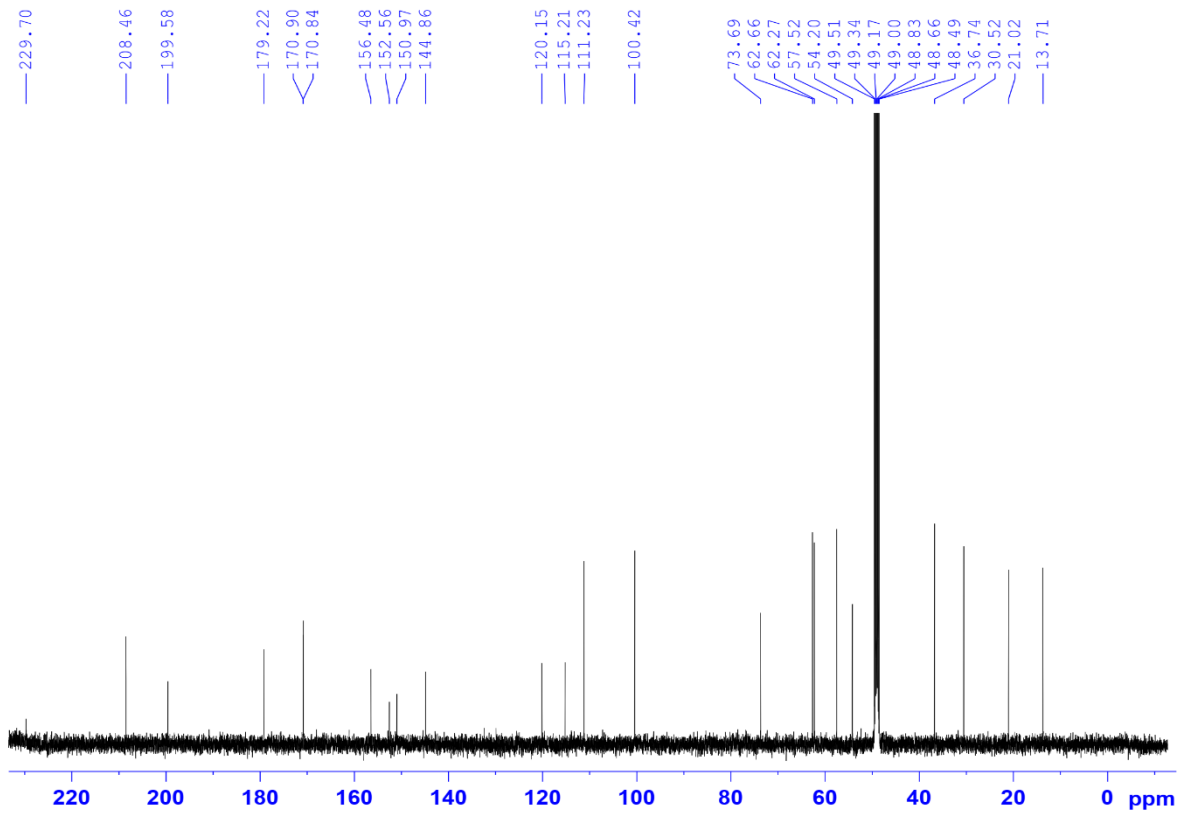


Phổ HR-QTOF-MS của CD4

Phụ lục 15. Các phổ của CD5

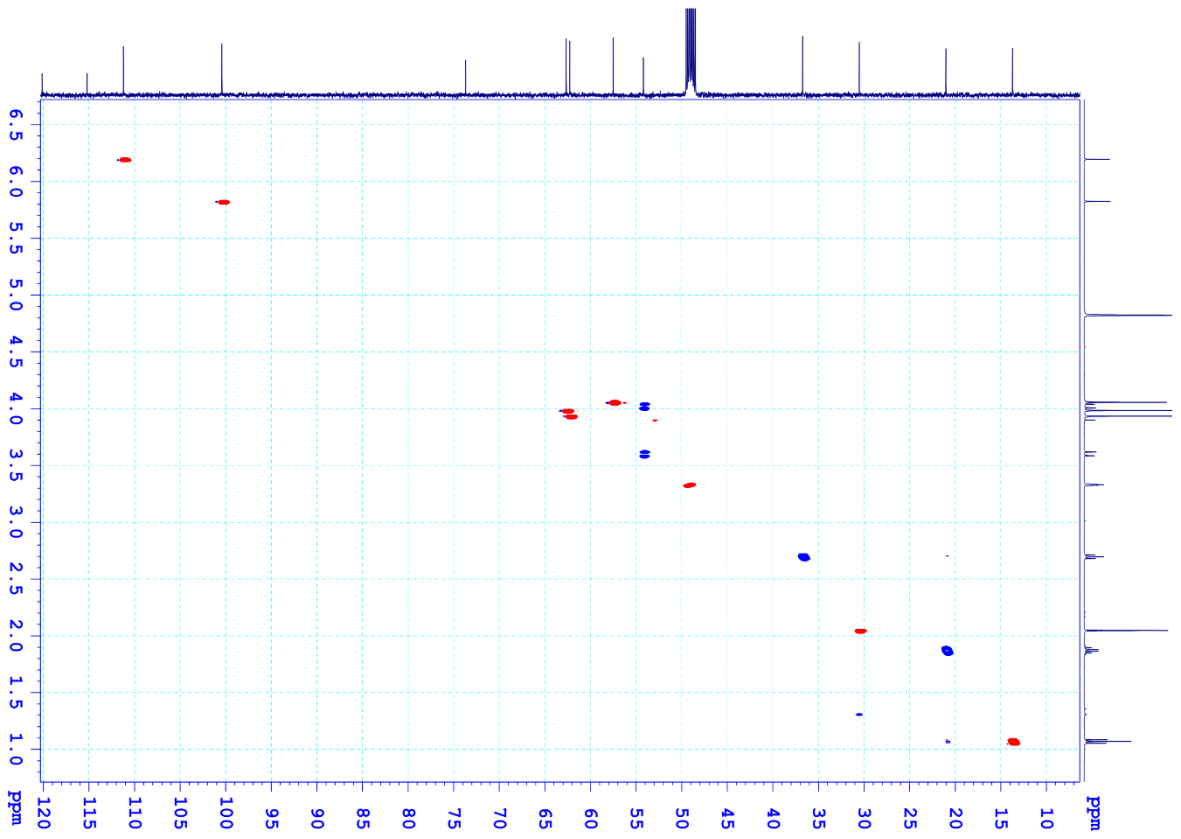


Phổ ¹H-NMR của CD5

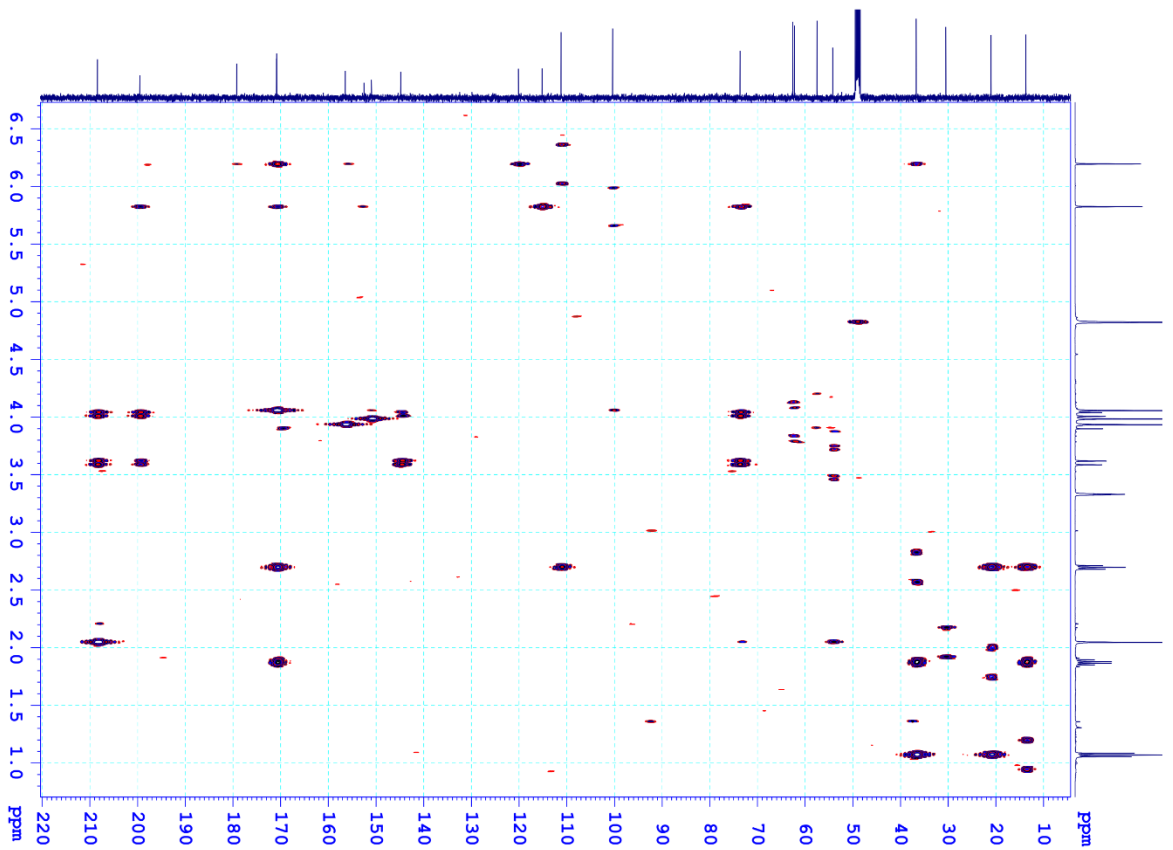


Phổ ¹³C-NMR của CD5

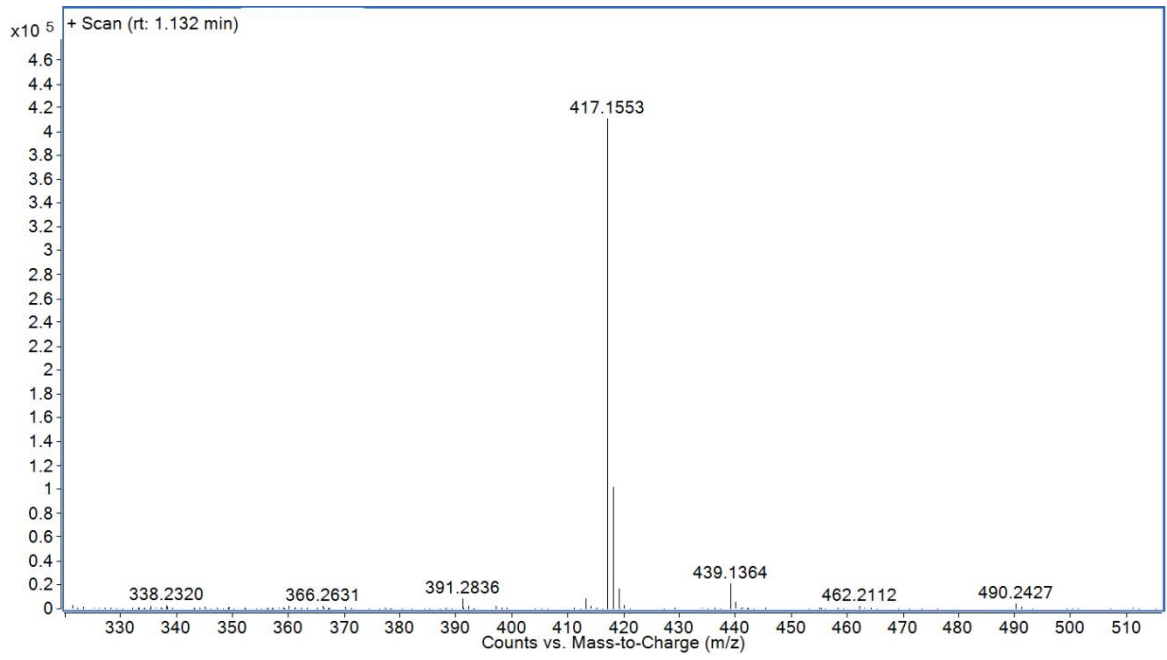
PL-40



Phổ HSQC của CD5

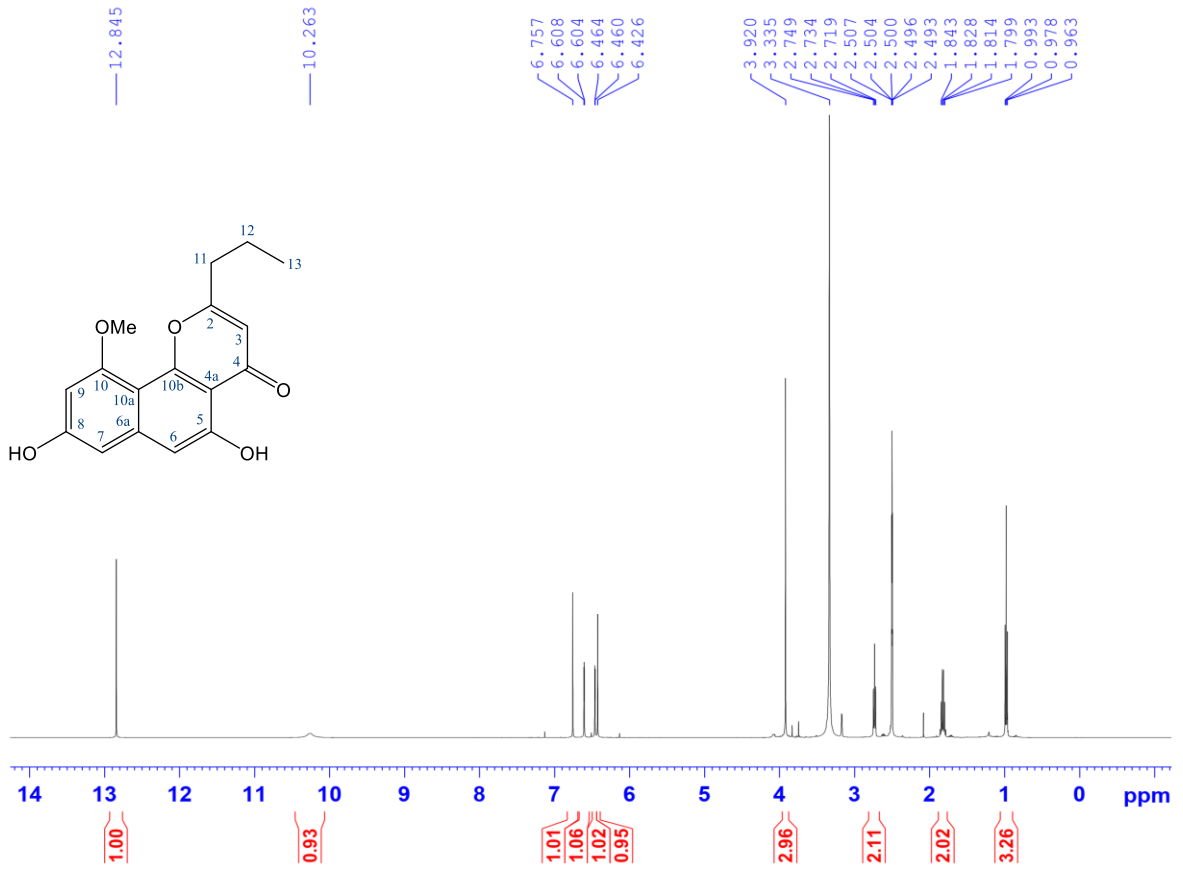


Phổ HMBC của CD5

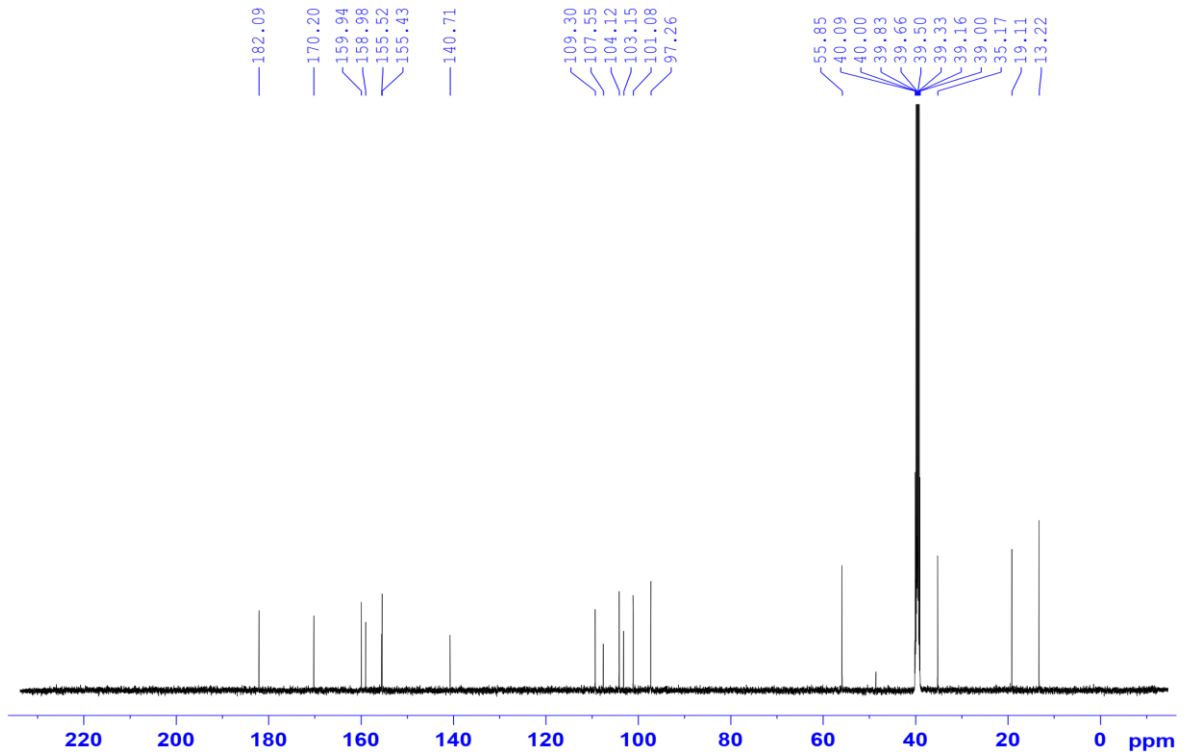


Phổ HR-QTOF-MS của **CD5**

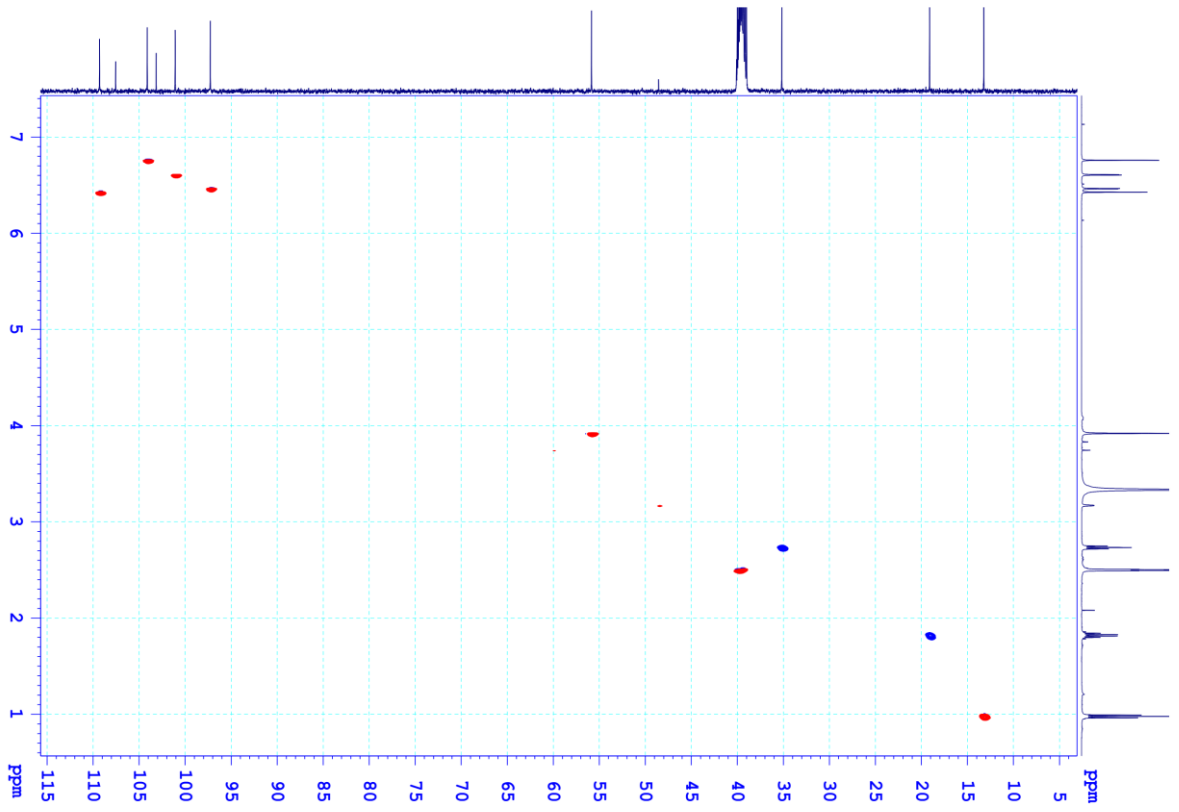
Phụ lục 16. Các phổ của CD6



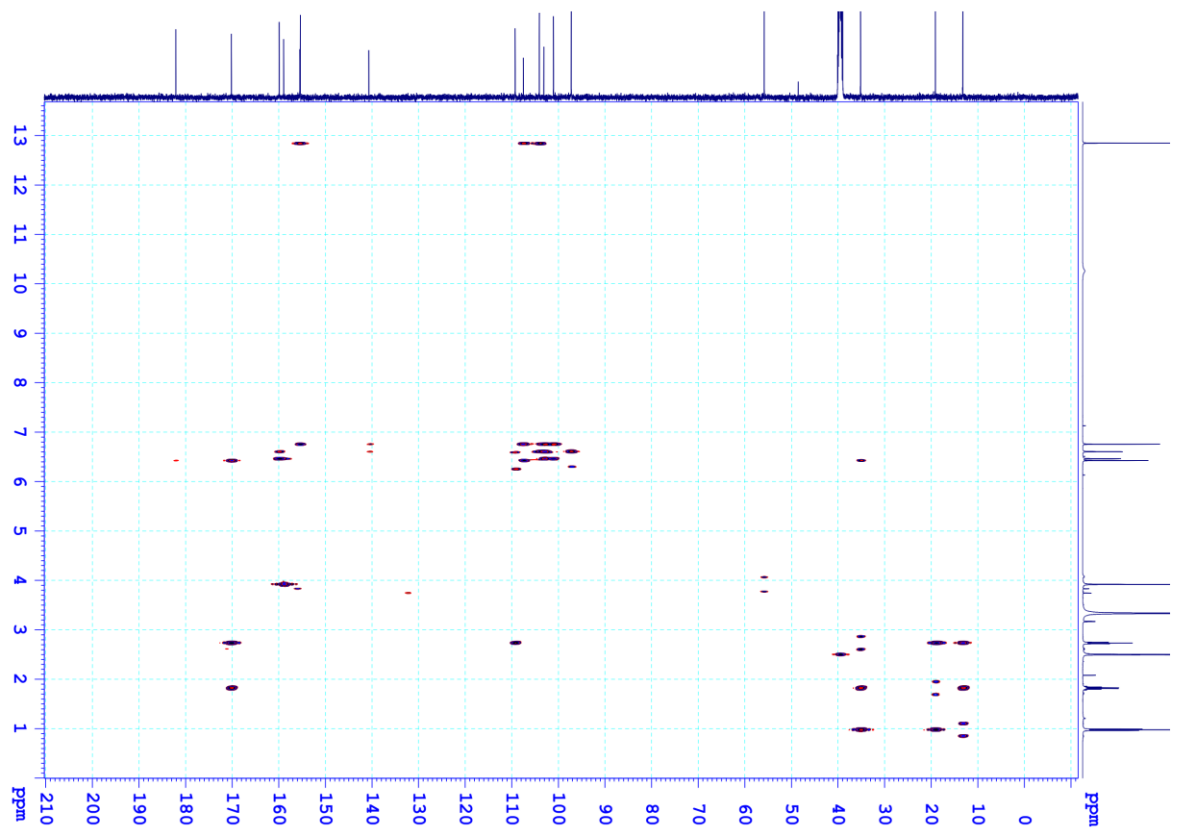
Phổ ¹H-NMR của CD6



Phổ ¹³C-NMR của CD6



Phổ HSQC của CD6



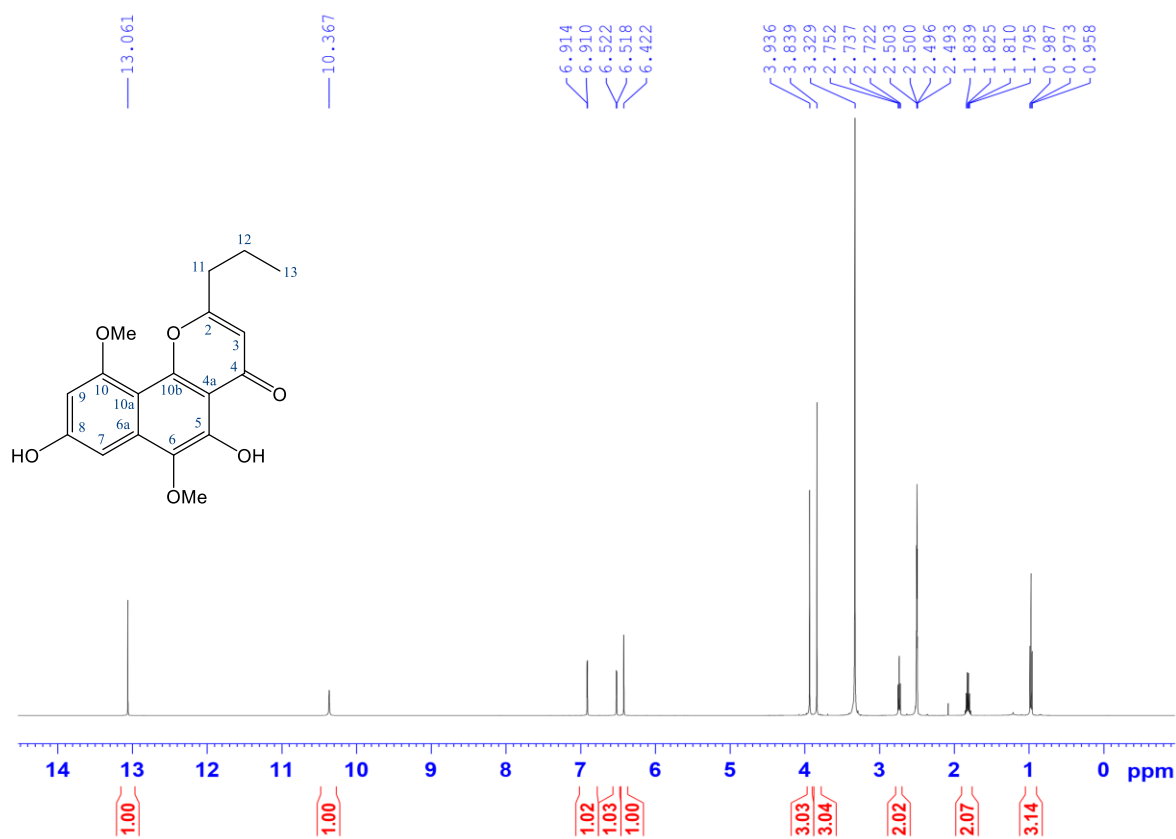
Phổ HMBC của CD6

Bảng giá trị phổ NMR của **CD6**

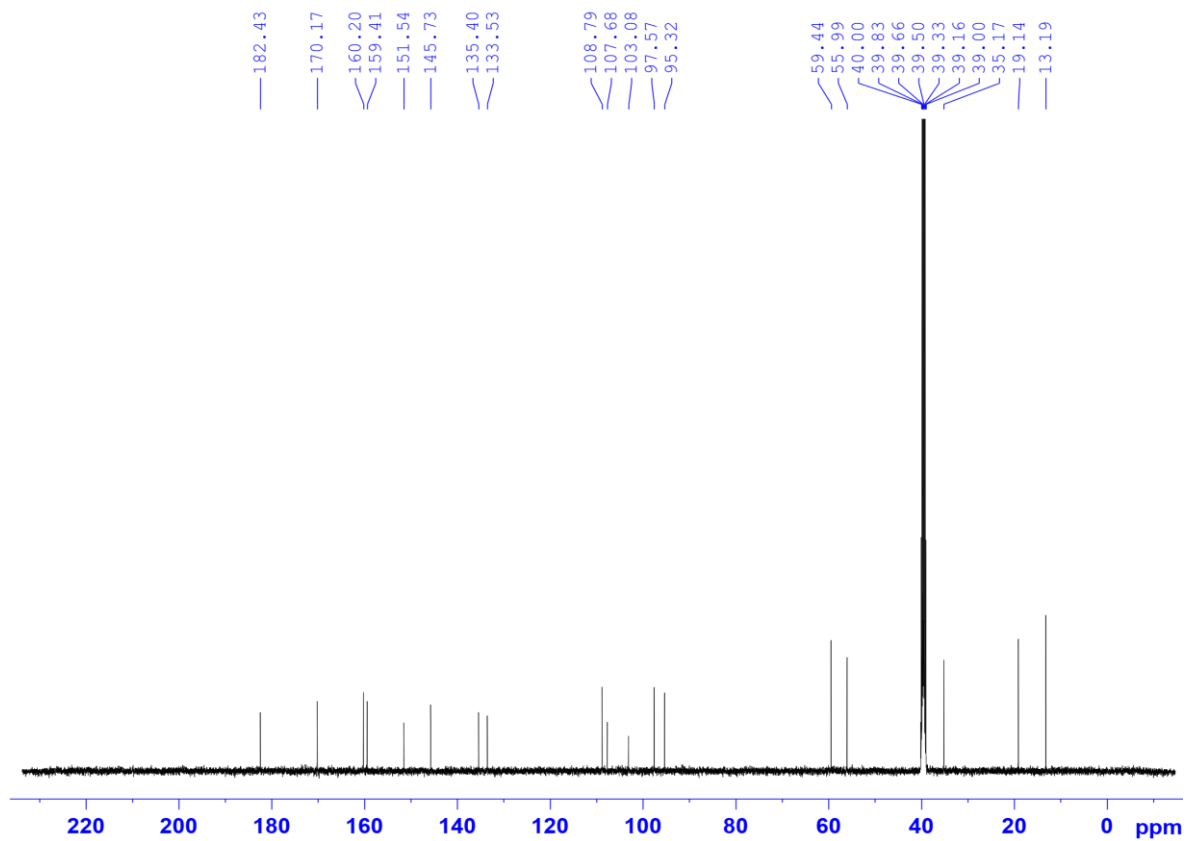
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,20	-	
3	109,30	6,42 s	2, 4, 4a, 11
4	182,09	-	
4a	107,55	-	
5	155,52	-	
6	104,12	6,76 s	4a, 5, 7, 10a
6a	140,71	-	
7	101,08	6,61 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	159,94	-	
9	97,26	6,46 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	158,98	-	
10a	103,15	-	
10b	155,43	-	
11	35,17	2,73 t (7,5)	2, 3, 12, 13
12	19,11	1,82 m	2, 11, 13
13	13,22	0,97 t (7,5)	11, 12
5-OH	-	12,84 s	4a, 5, 6
10-OMe	55,85	3,92 s	10

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

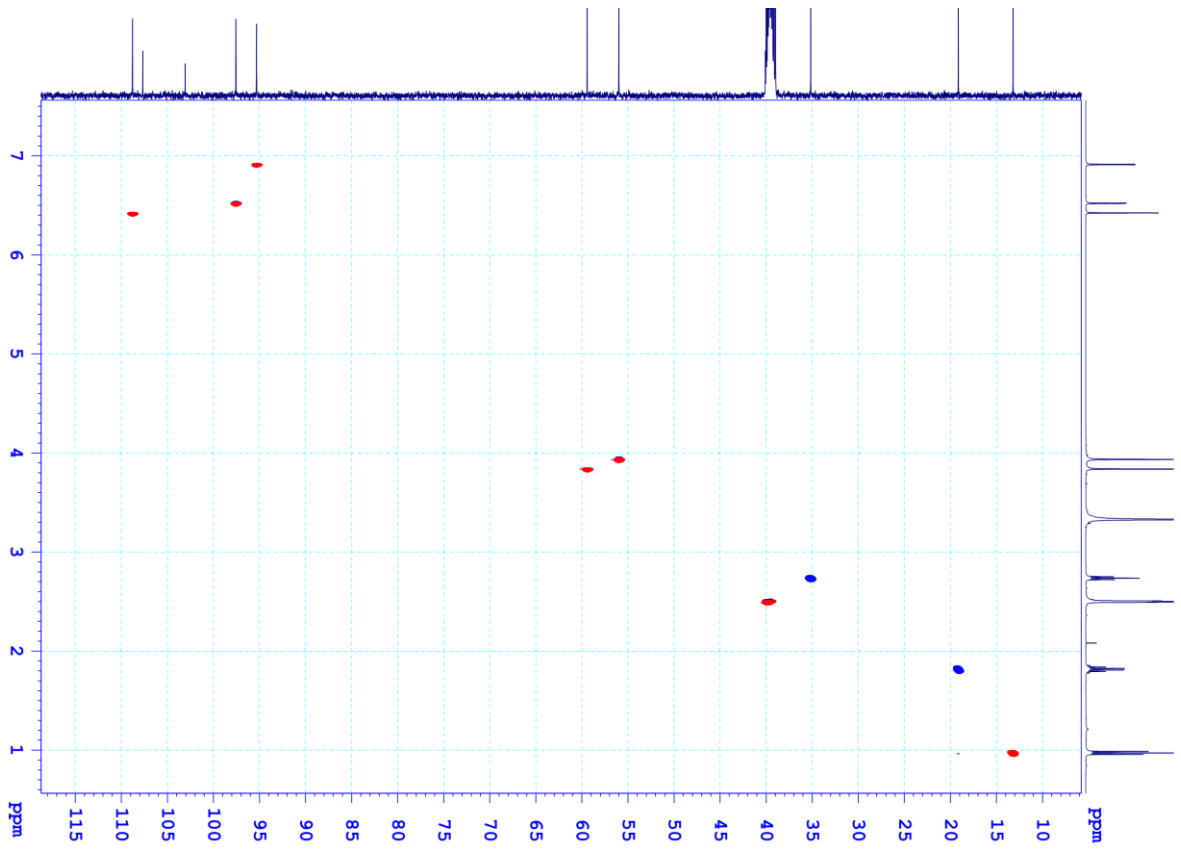
Phụ lục 17. Các phổ của CD7



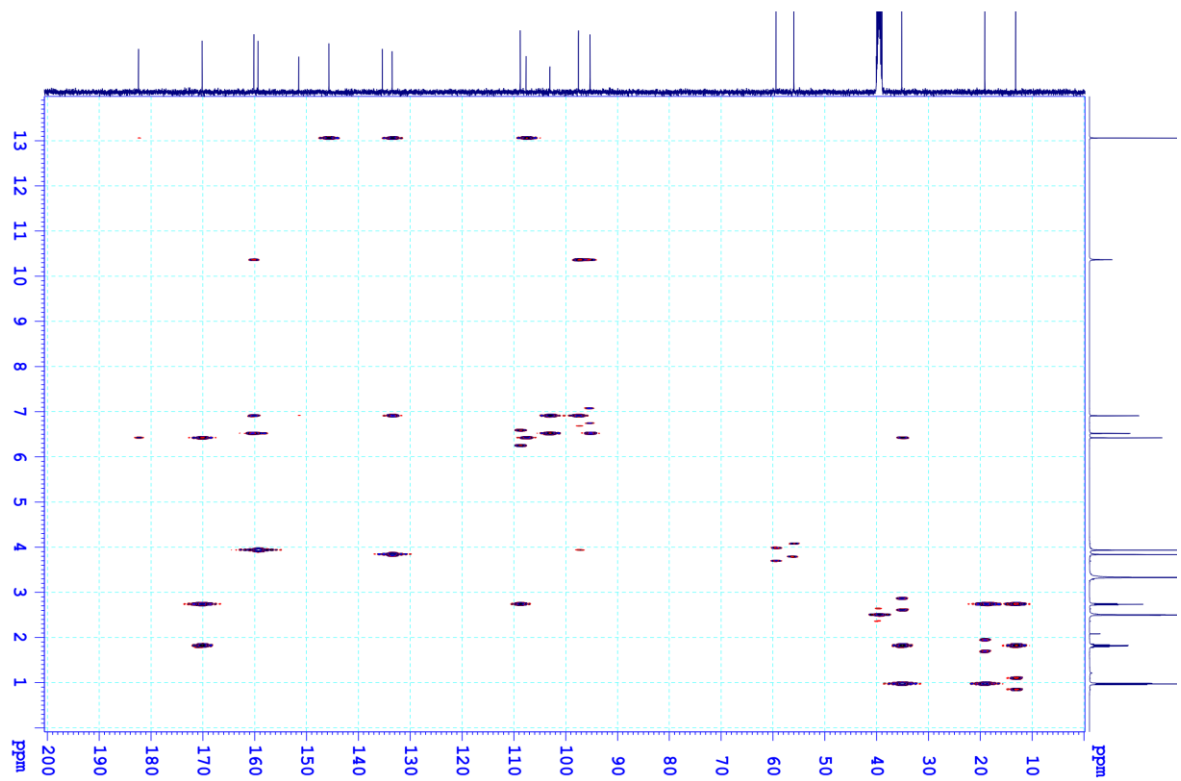
Phổ ¹H-NMR của CD7



Phổ ¹³C-NMR của CD7



Phổ HSQC của CD7



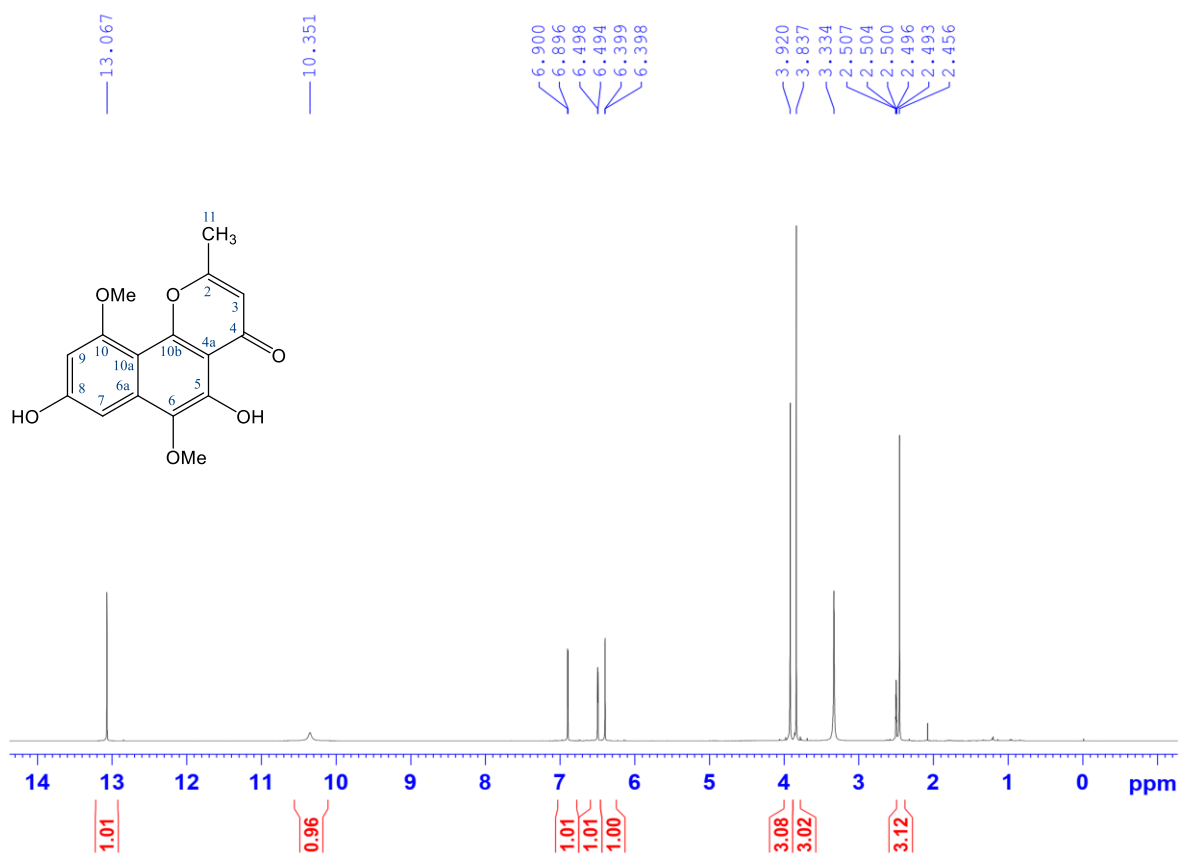
Phổ HMBC của CD7

Bảng giá trị phổ NMR của **CD7**

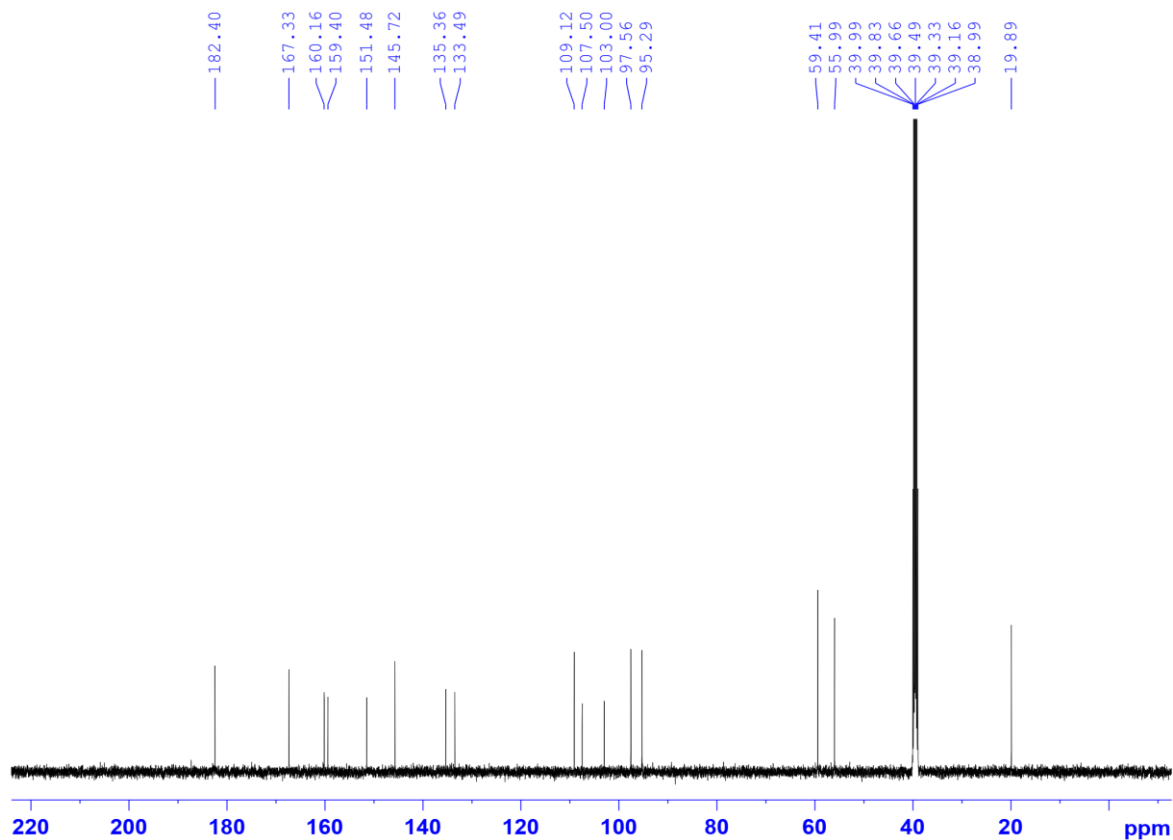
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,17	-	
3	108,79	6,42 s	2, 4, 4a, 11
4	182,43	-	
4a	107,68	-	
5	145,73	-	
6	133,53	-	
6a	135,40	-	
7	95,32	6,91 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	160,20	-	
9	97,57	6,52 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	159,41	-	
10a	103,08	-	
10b	151,54	-	
11	35,17	2,74 t (7,5)	2, 3, 12, 13
12	19,14	1,81 m	2, 11, 13
13	13,19	0,97 t (7,5)	11, 12
5-OH	-	13,06 s	4a, 5, 6
6-OMe	59,44	3,84 s	6
8-OH	-	10,37 s	7, 8, 9
10-OMe	55,99	3,94 s	10

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

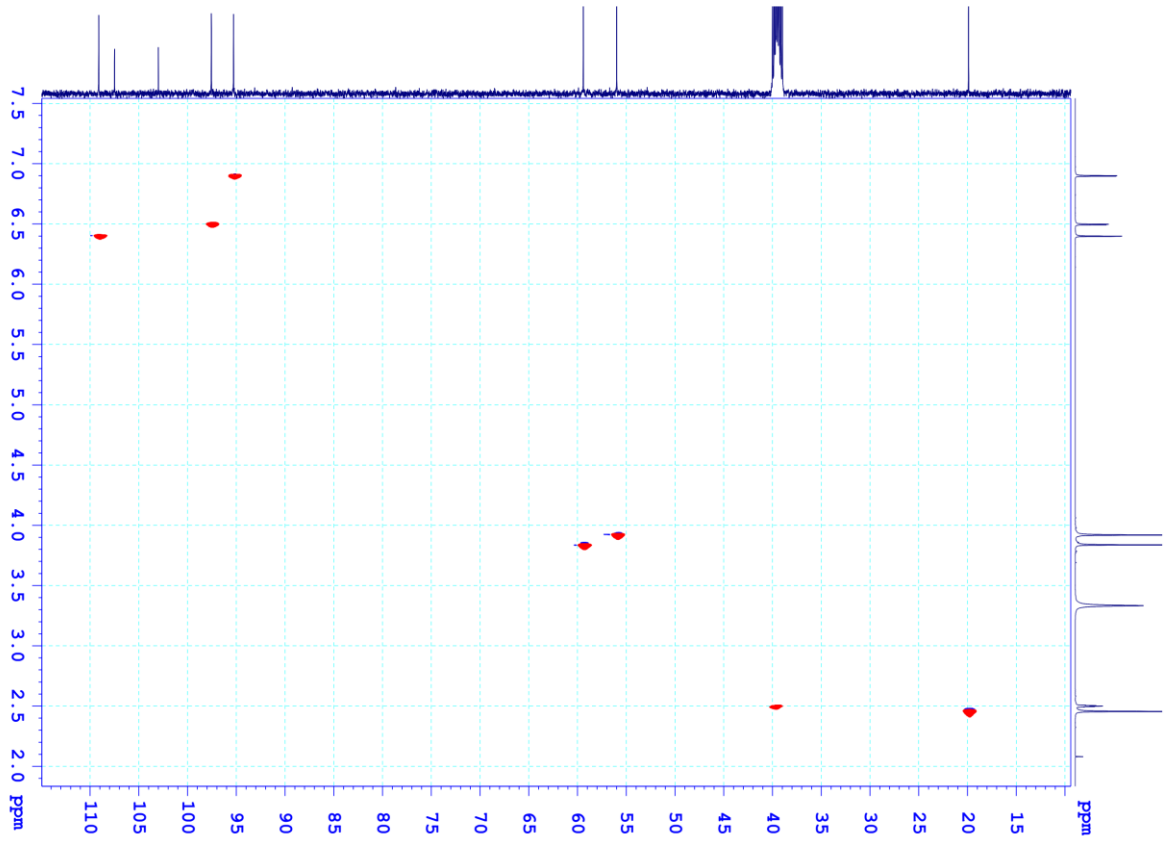
Phụ lục 18. Các phổ của CD8



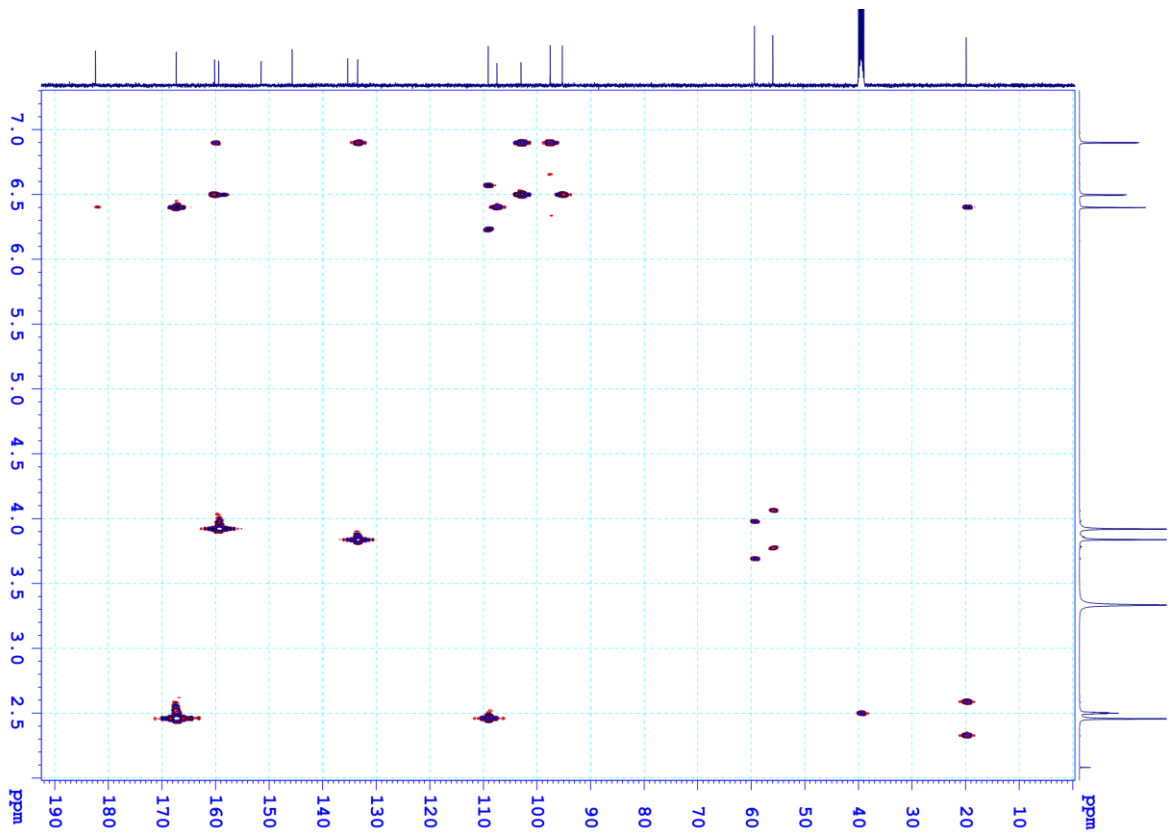
Phổ ¹H-NMR của CD8



Phổ ¹³C-NMR của CD8



Phổ HSQC của **CD8**



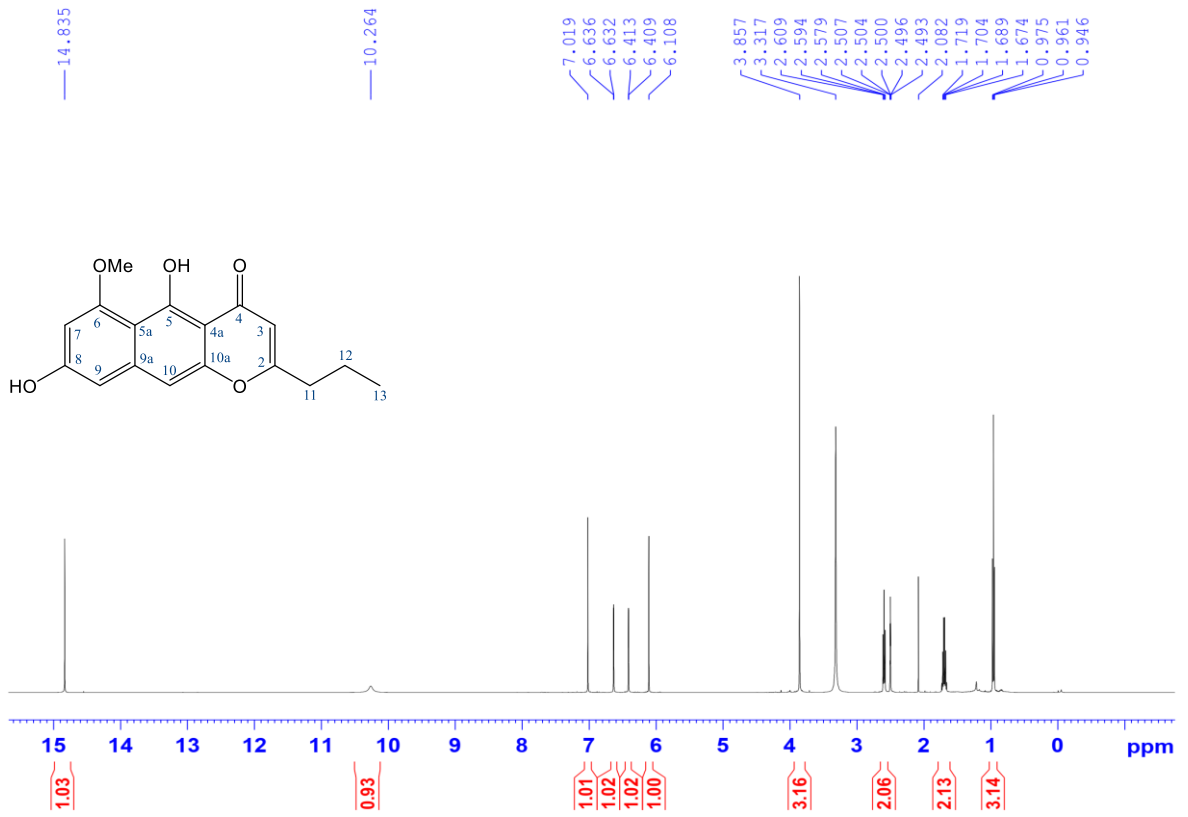
Phổ HMBC của **CD8**

Bảng giá trị phổ NMR của **CD8**

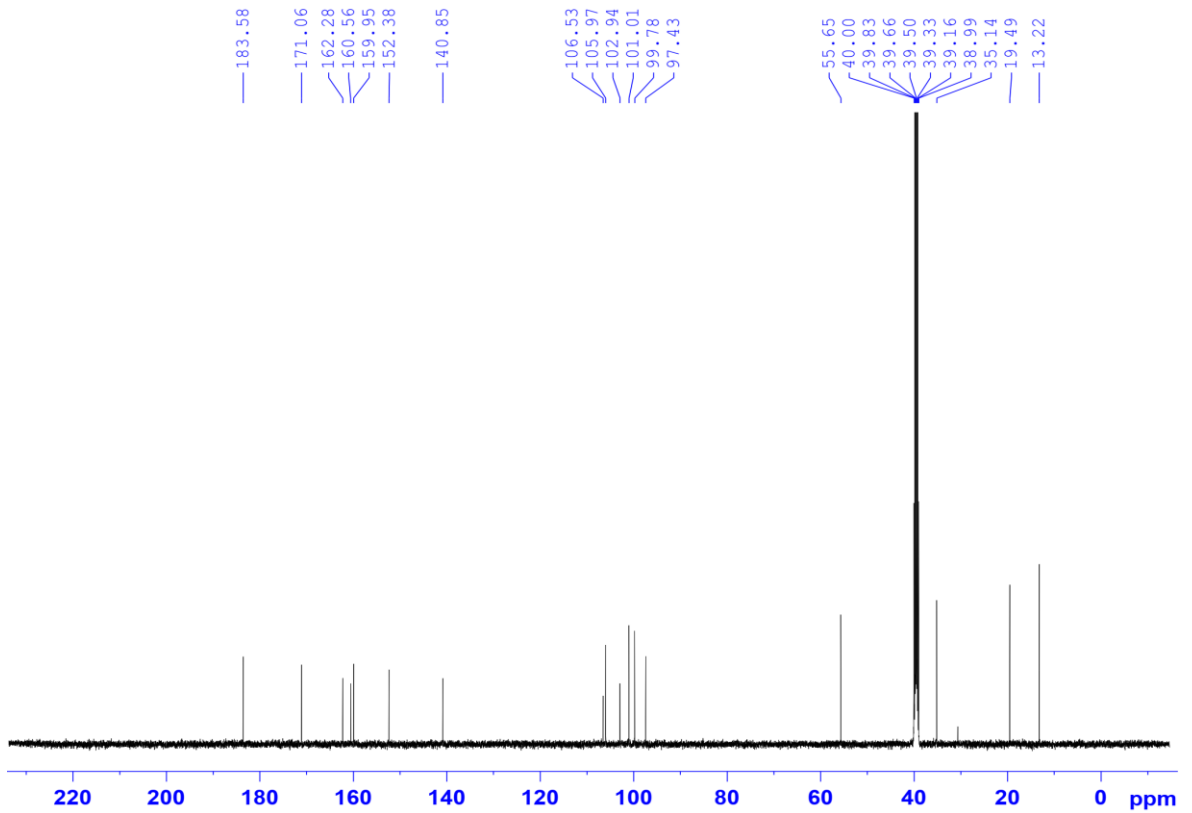
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	167,33	-	
3	109,12	6,40 d (0,5)	2, 4, 4a, 11
4	182,40	-	
4a	107,50	-	
5	145,72	-	
6	133,49	-	
6a	135,36	-	
7	95,29	6,90 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	160,16	-	
9	97,56	6,50 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	159,40	-	
10a	103,00	-	
10b	151,48	-	
11	19,89	2,45 s	2, 3
6-OMe	59,41	3,84 s	6
10-OMe	55,99	3,92 s	10

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

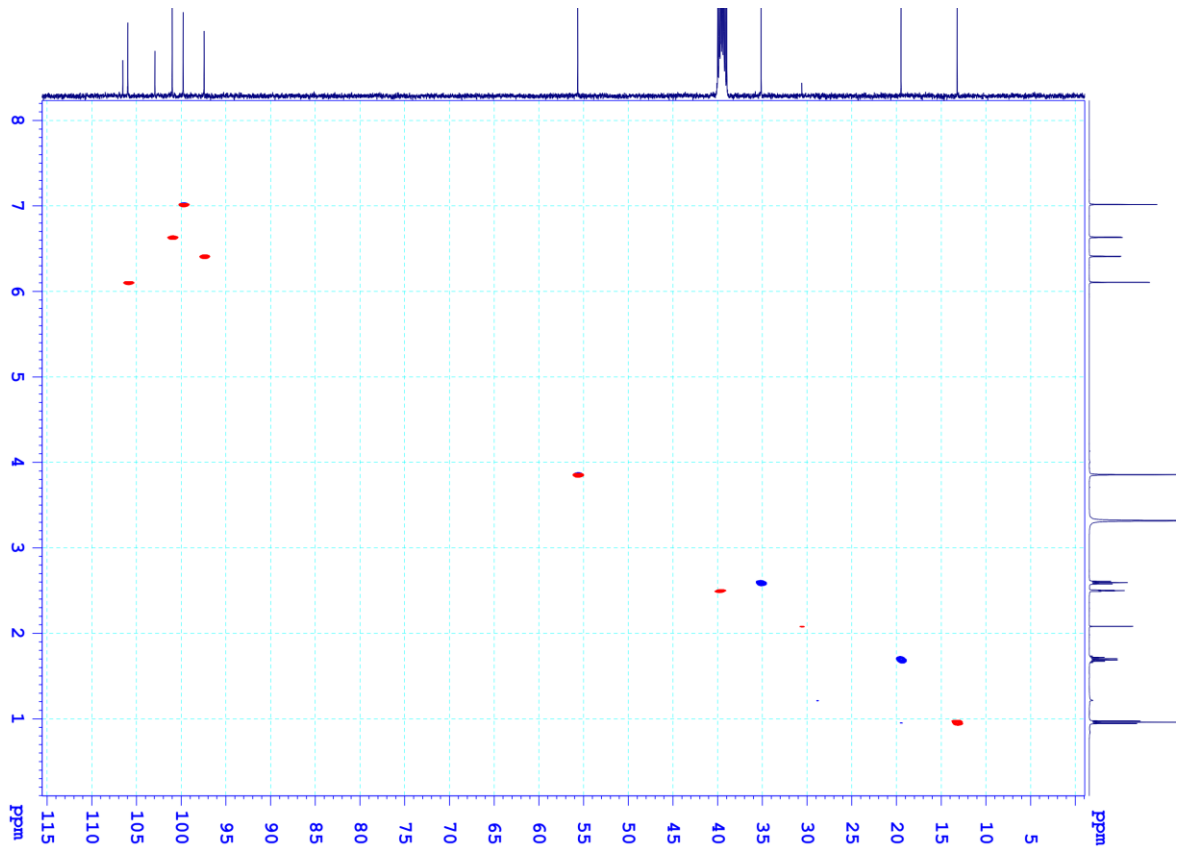
Phụ lục 19. Các phổ của CD9



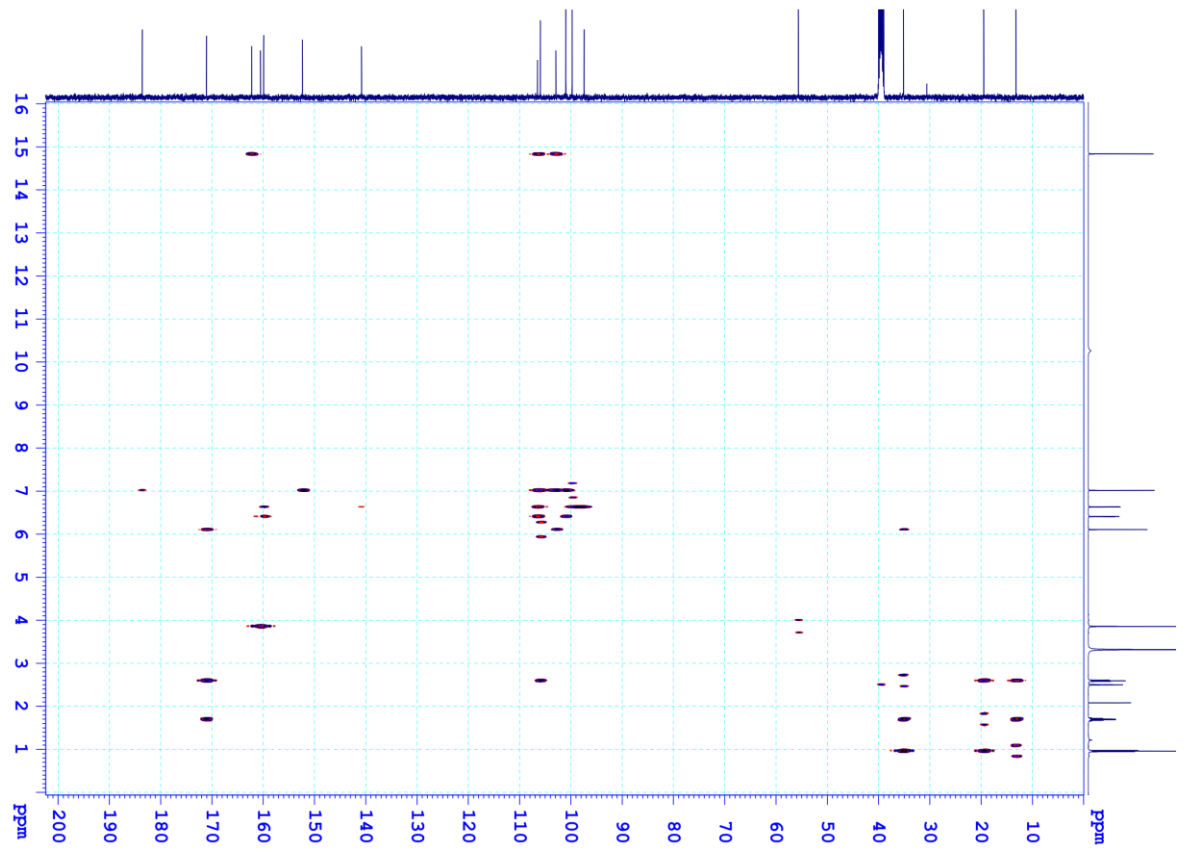
Phổ ¹H-NMR của CD9



Phổ ¹³C-NMR của CD9



Phổ HSQC của CD9



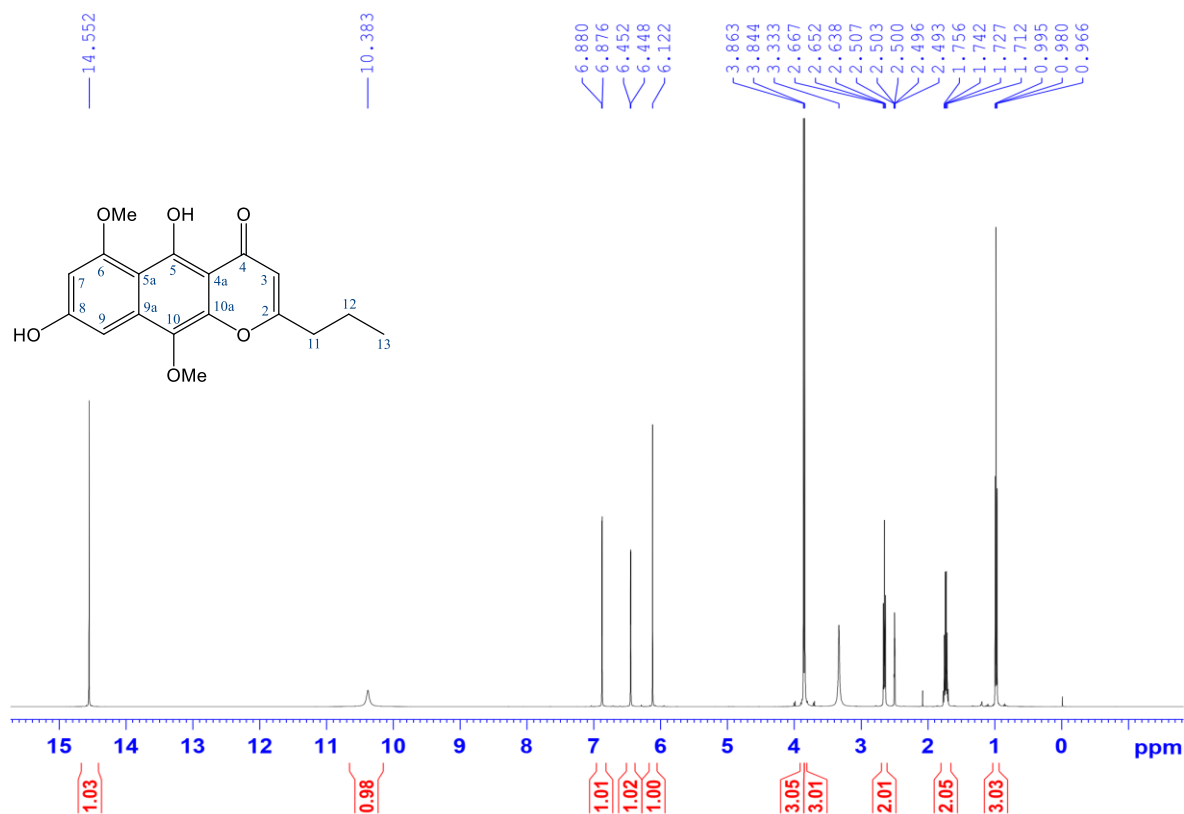
Phổ HMBC của CD9

Bảng giá trị phổ NMR của **CD9**

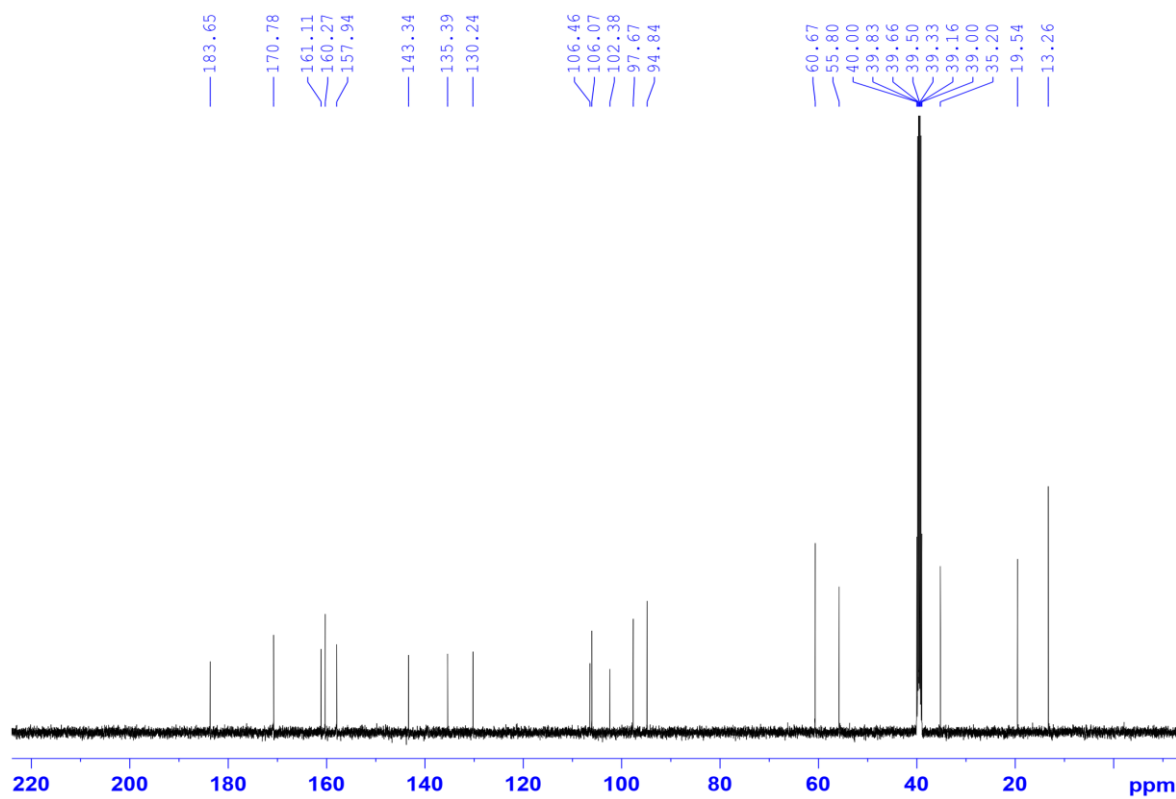
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	171,06	-	
3	105,97	6,11 s	2, 4
4	183,58	-	
4a	102,94	-	
5	162,28	-	
5a	106,53	-	
6	160,56	-	
7	97,43	6,41 d (2,0)	
8	159,95	-	
9	101,01	6,63 d (2,0)	
9a	140,85	-	
10	99,78	7,02 s	
10a	152,38	-	
11	35,14	2,59 t (7,5)	2, 3
12	19,49	1,69 m	
13	13,22	0,96 t (7,0)	12, 11
5-OH	-	14,83 s	
6-OMe	55,65	3,86 s	6

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

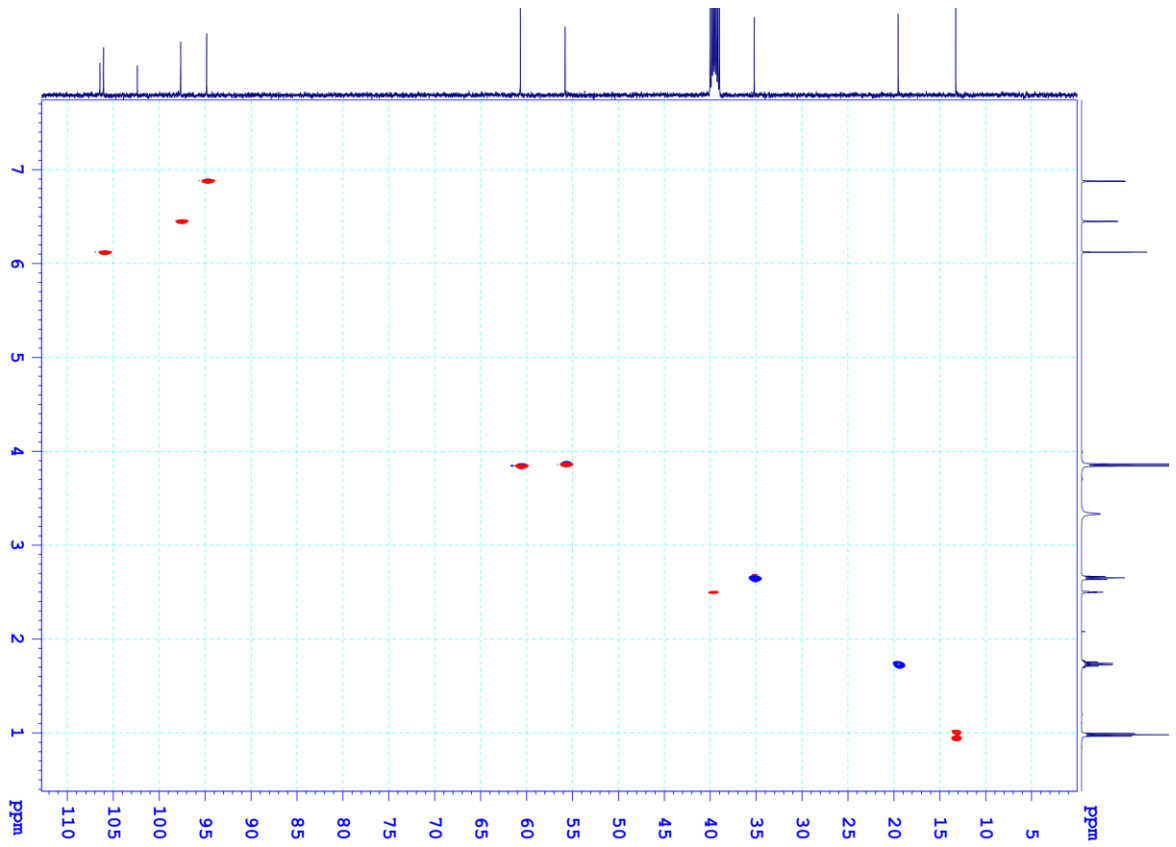
Phụ lục 20. Các phổ của CD10



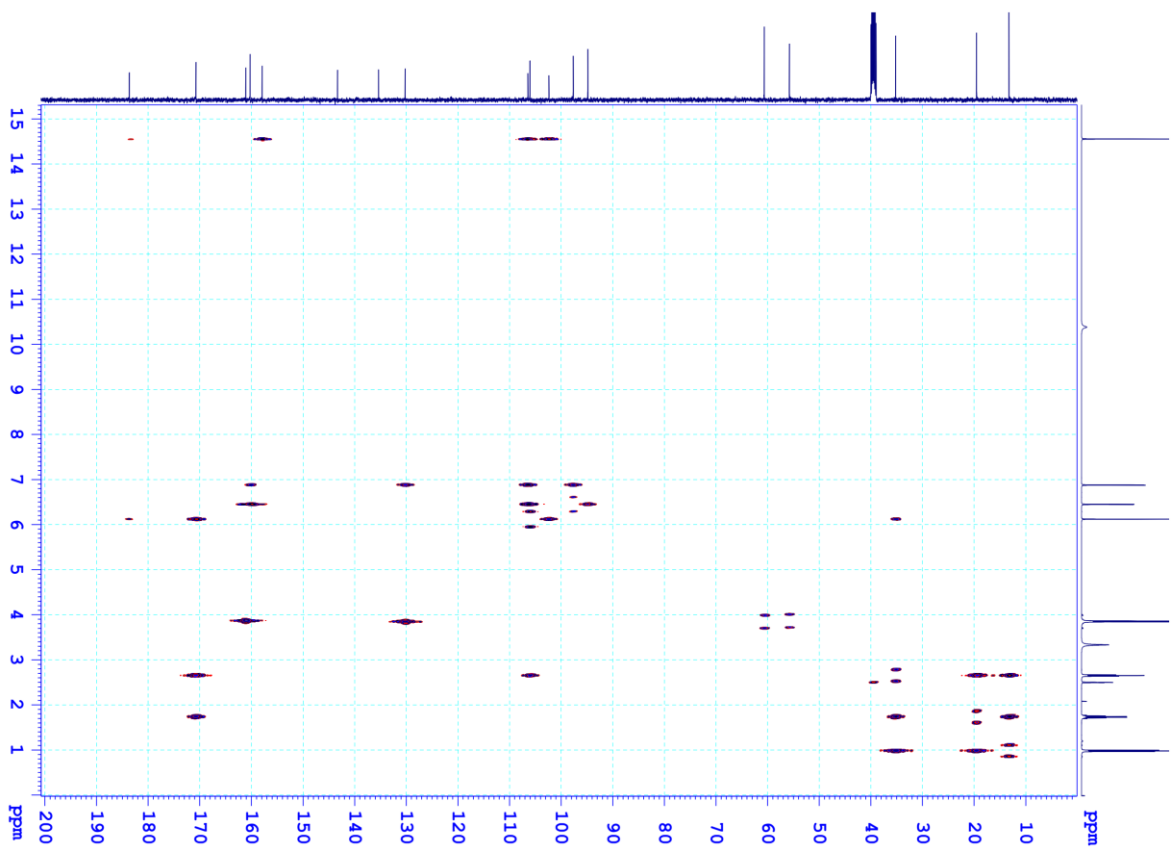
Phổ ¹H-NMR của CD10



Phổ ¹³C-NMR của CD10



Phổ HSQC của CD10



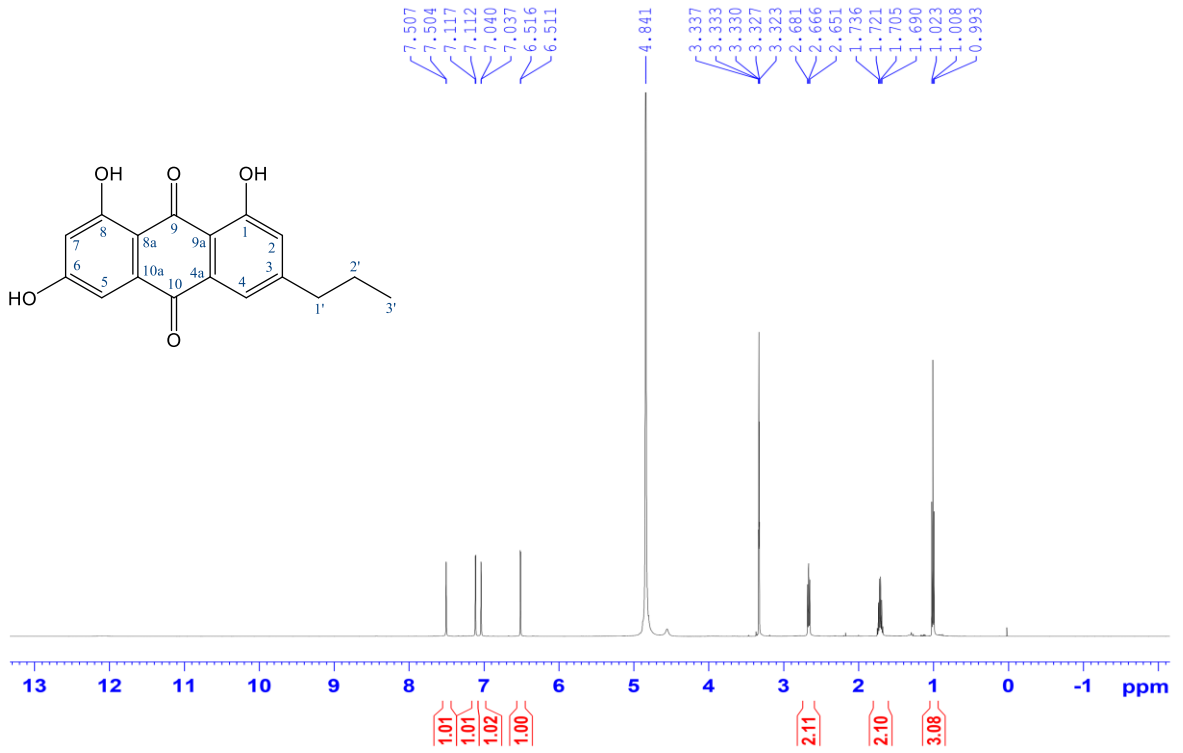
Phổ HMBC của CD10

Bảng giá trị phổ NMR của **CD10**

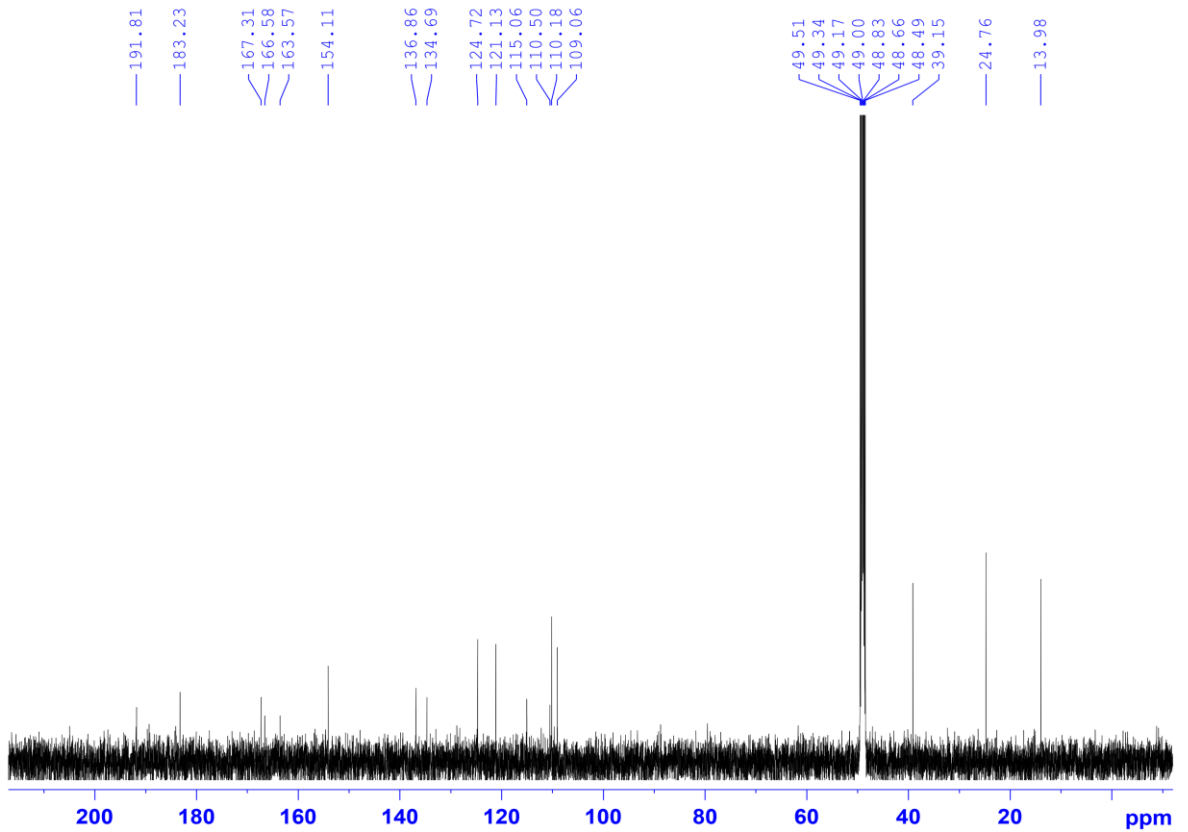
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,78	-	
3	106,07	6,12 s	2, 4a, 11
4	183,65	-	
4a	102,38	-	
5	157,94	-	
5a	106,46	-	
6	161,11	-	
7	97,67	6,45 d (2,0)	5a, 9
8	160,27	-	
9	94,84	6,88 d (2,0)	5a, 7, 8, 10
9a	135,39	-	
10	130,24	-	
10a	143,34	-	
11	35,20	2,65 t (7,5)	2, 3, 12, 13
12	19,54	1,73 m	2, 11, 13
13	13,26	0,98 t (7,5)	11, 12
5-OH		14,55 s	4a, 5, 5a
8-OH		10,38 s	
6-OMe	55,80	3,86 s	6
10-OMe	60,67	3,84 s	10

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phụ lục 21. Các phổ của CD11

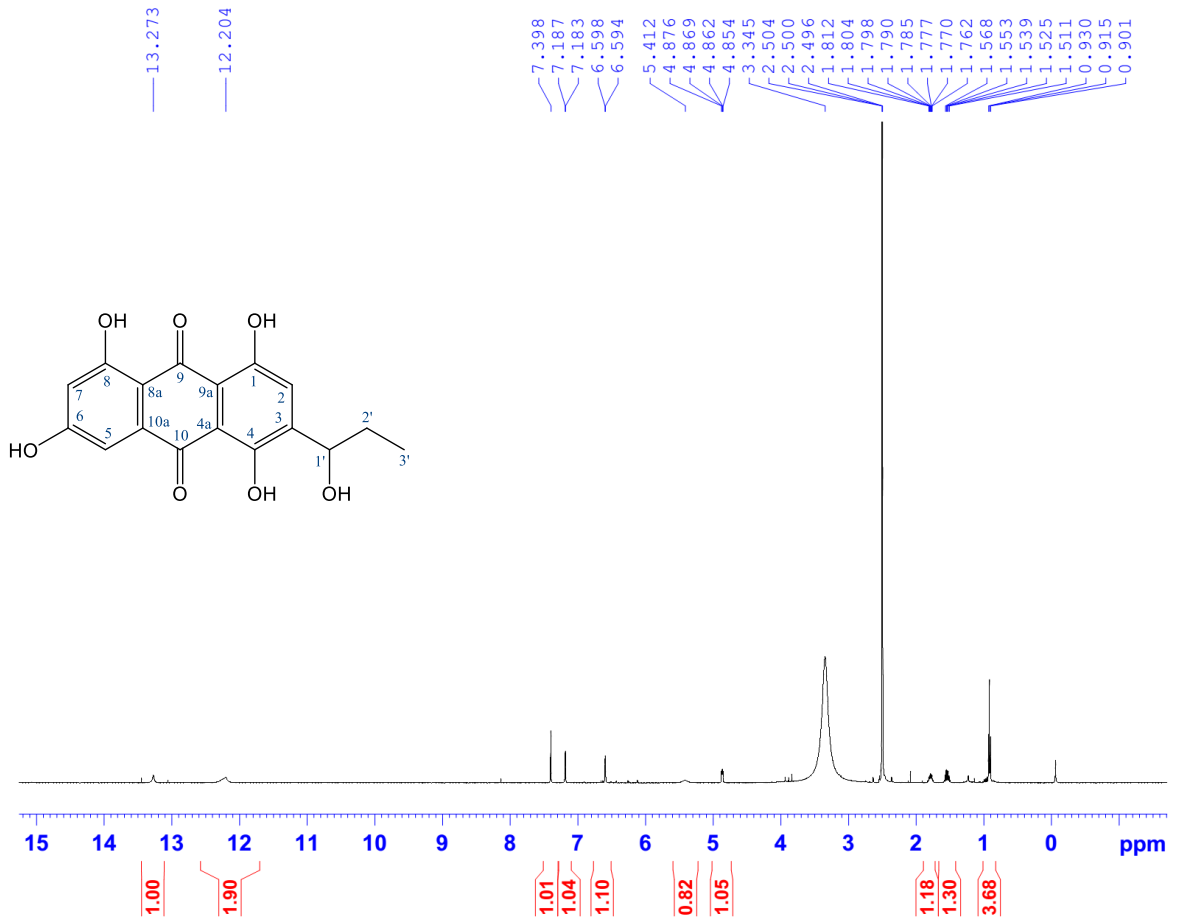


Phổ ¹H-NMR của CD11



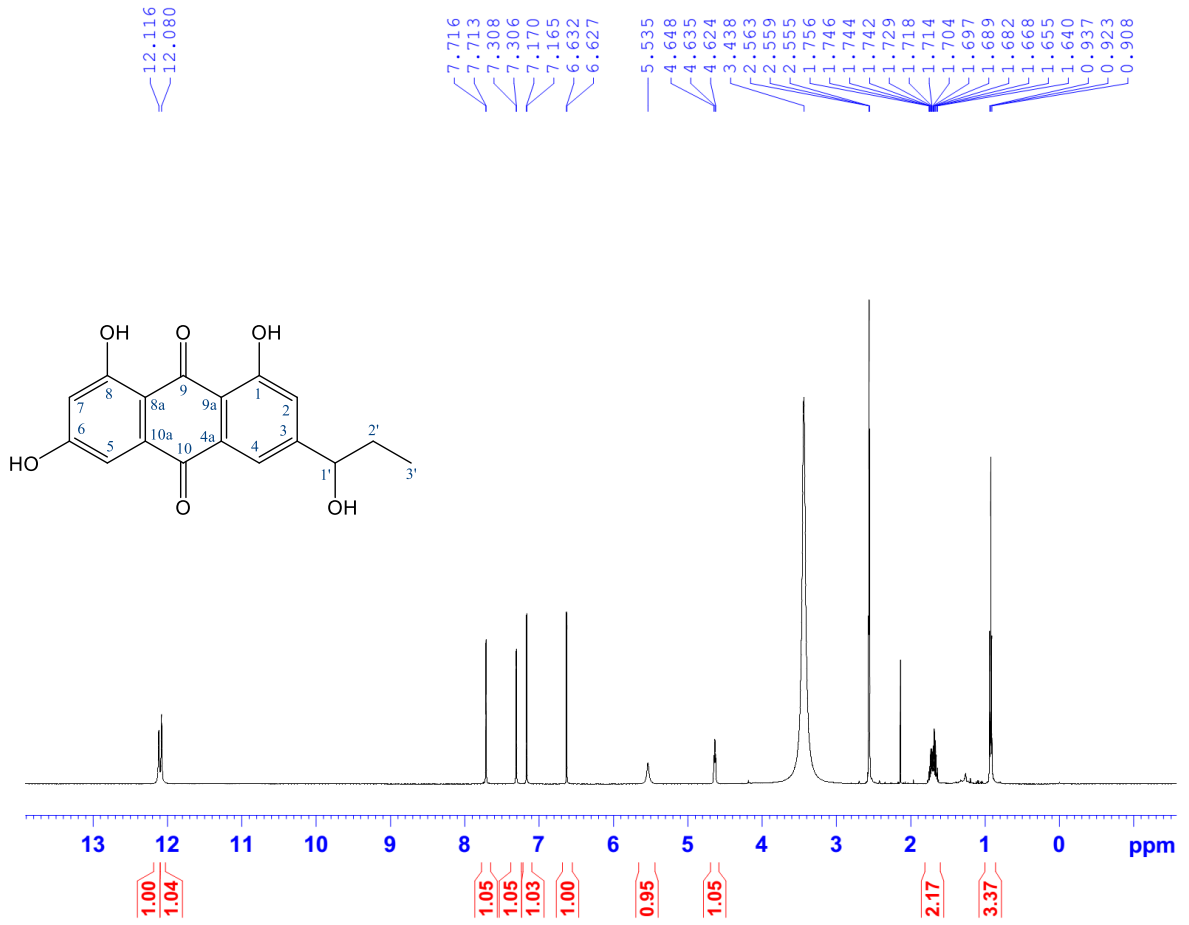
Phổ ¹³C-NMR của CD11

Phụ lục 22. Các phổ của CD12



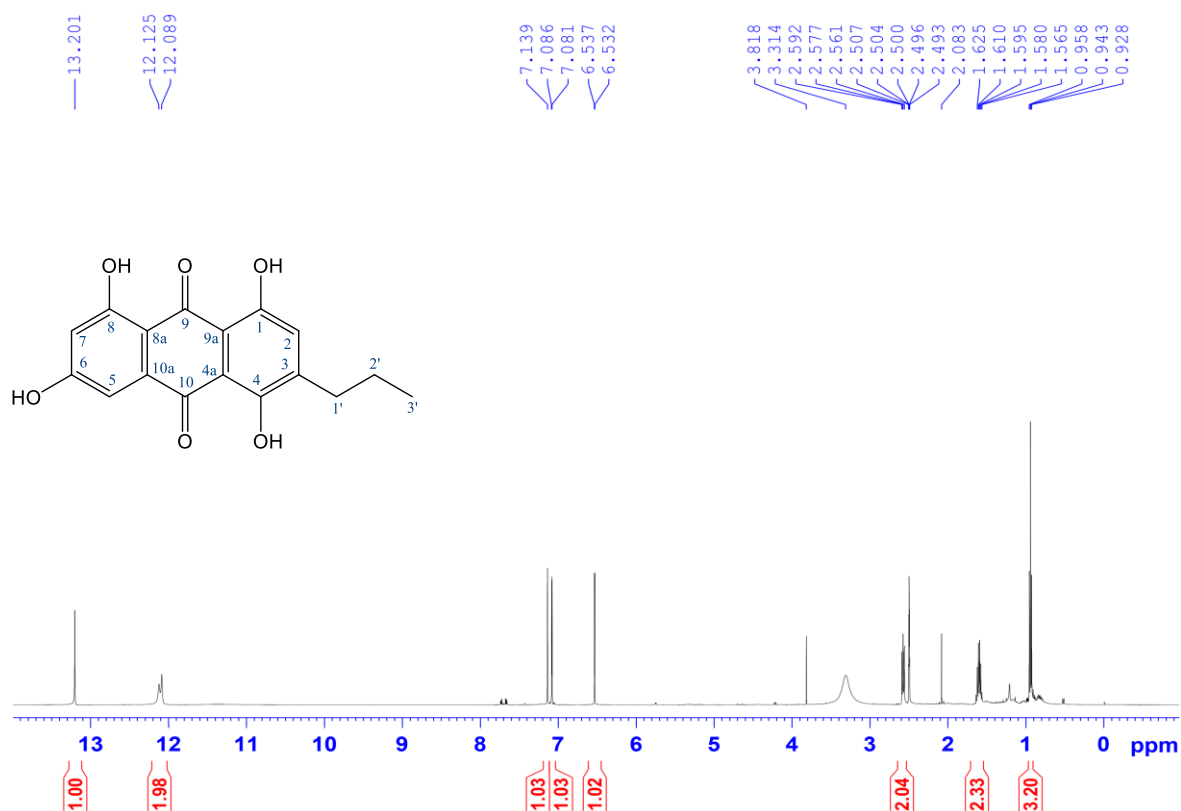
Phổ ¹H-NMR của CD12

Phụ lục 23. Các phổ của CD13

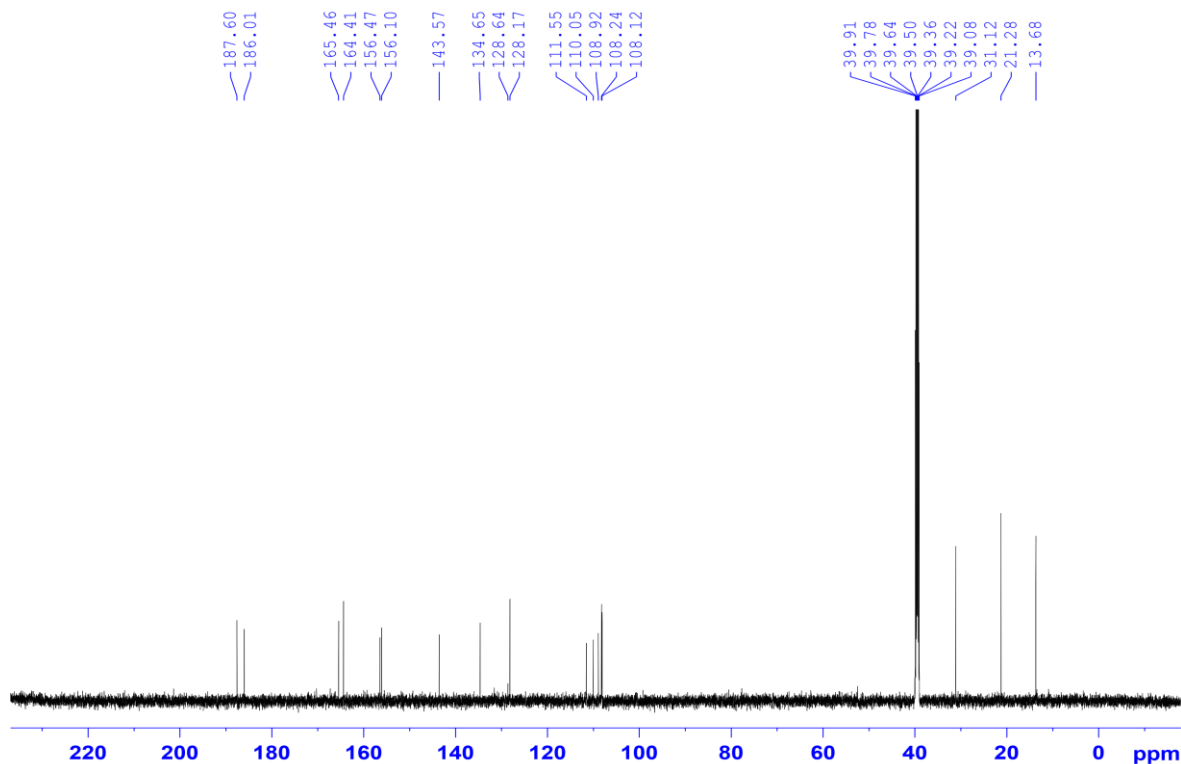


Phổ ¹H-NMR của CD13

Phụ lục 24. Các phổ của CD14

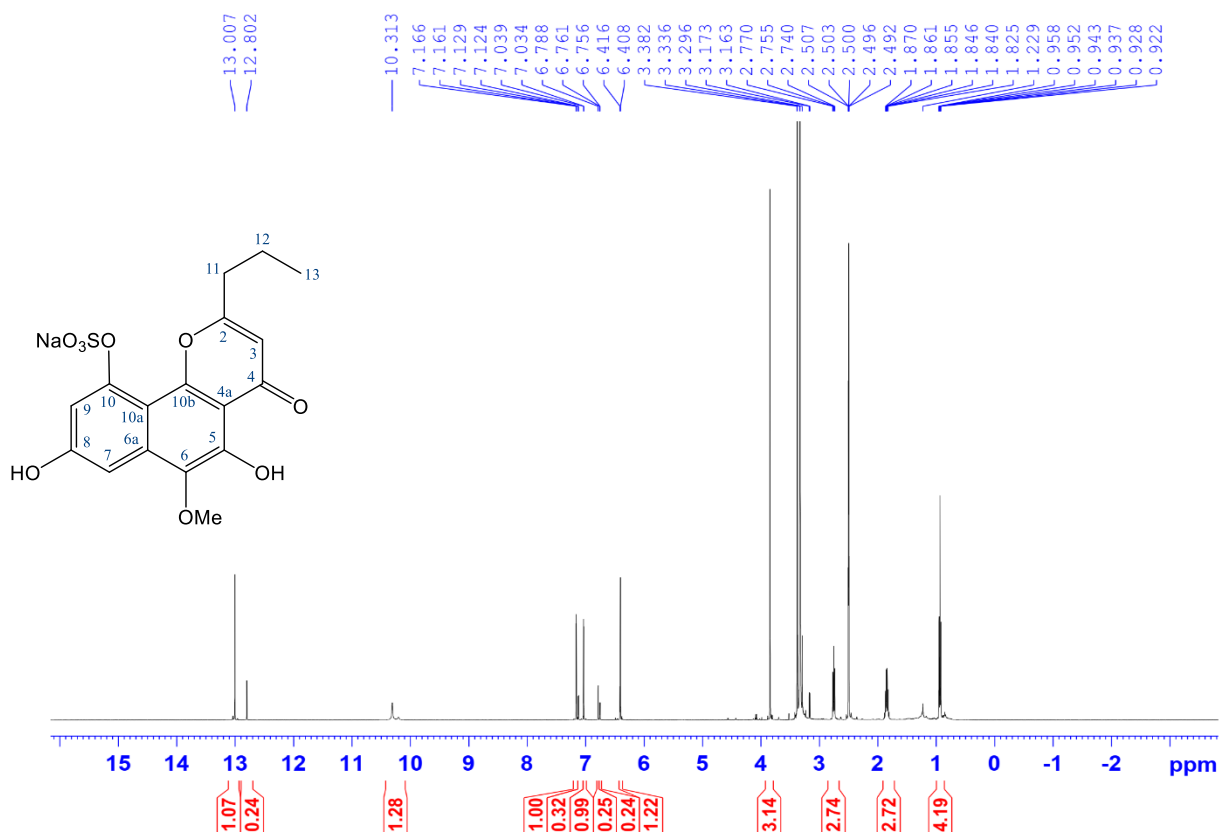


Phổ ¹H-NMR của CD14

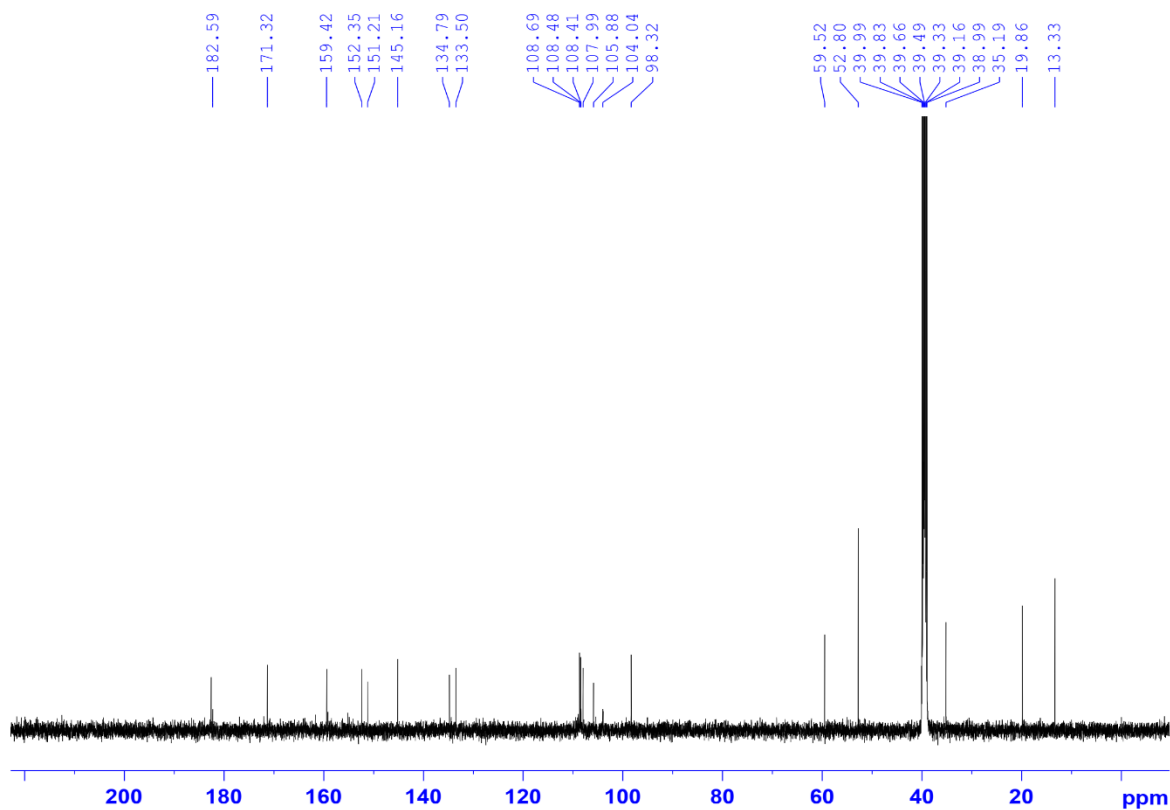


Phổ ¹³C-NMR của CD14

Phụ lục 25. Các phổ của CD15

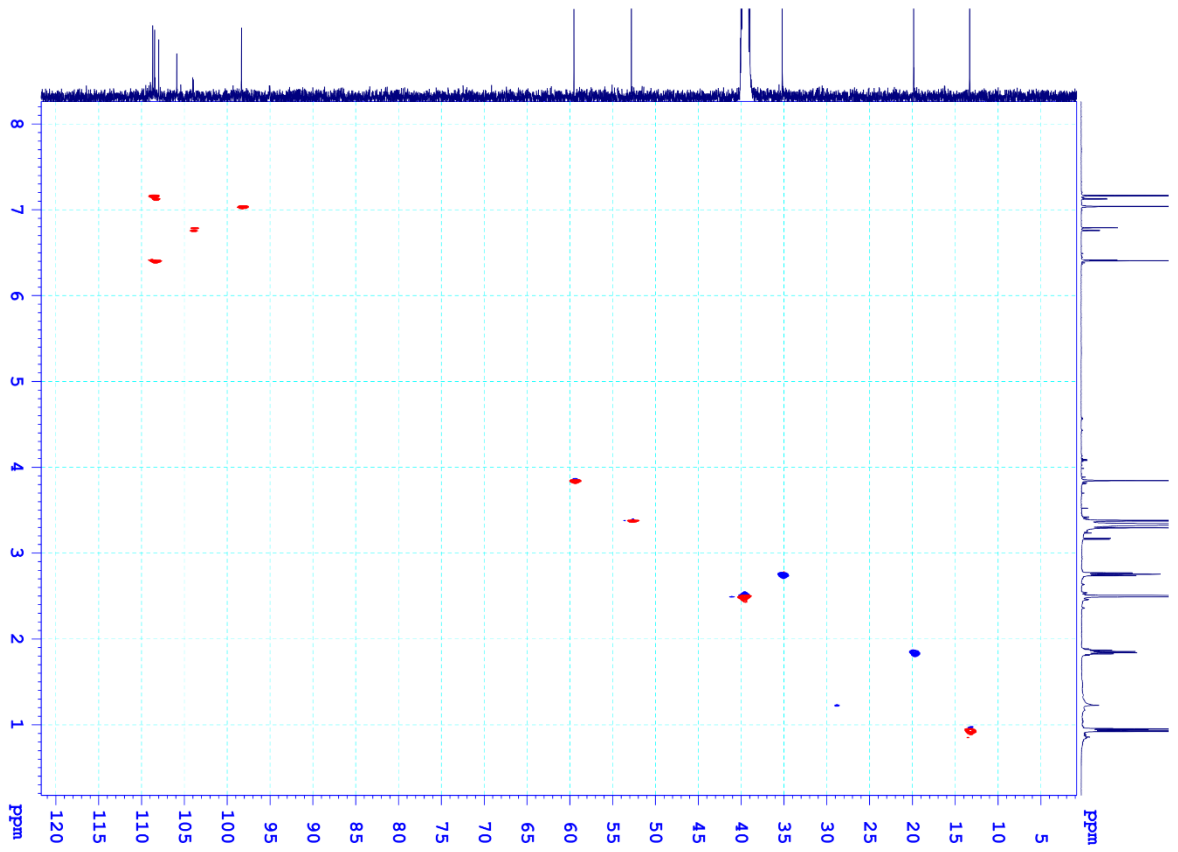


Phổ ¹H-NMR của CD15

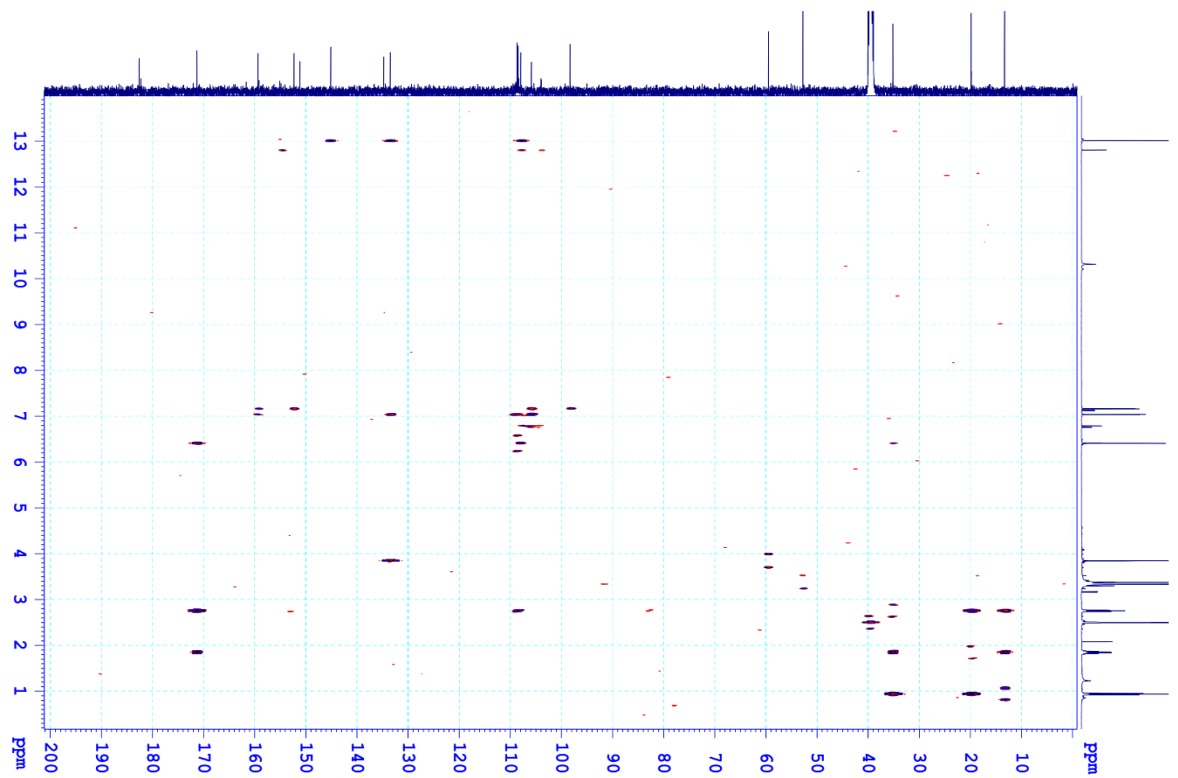


Phổ ¹³C-NMR của CD15

PL-62

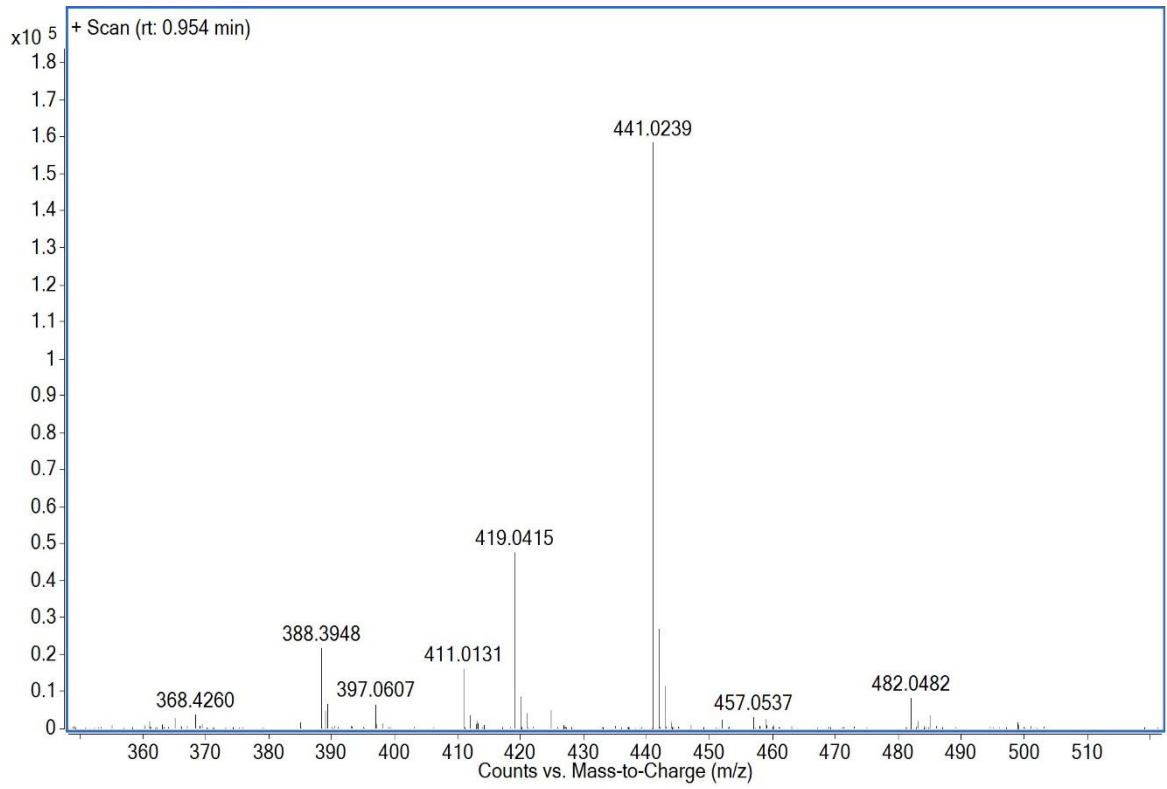


Phổ HSQC của CD15



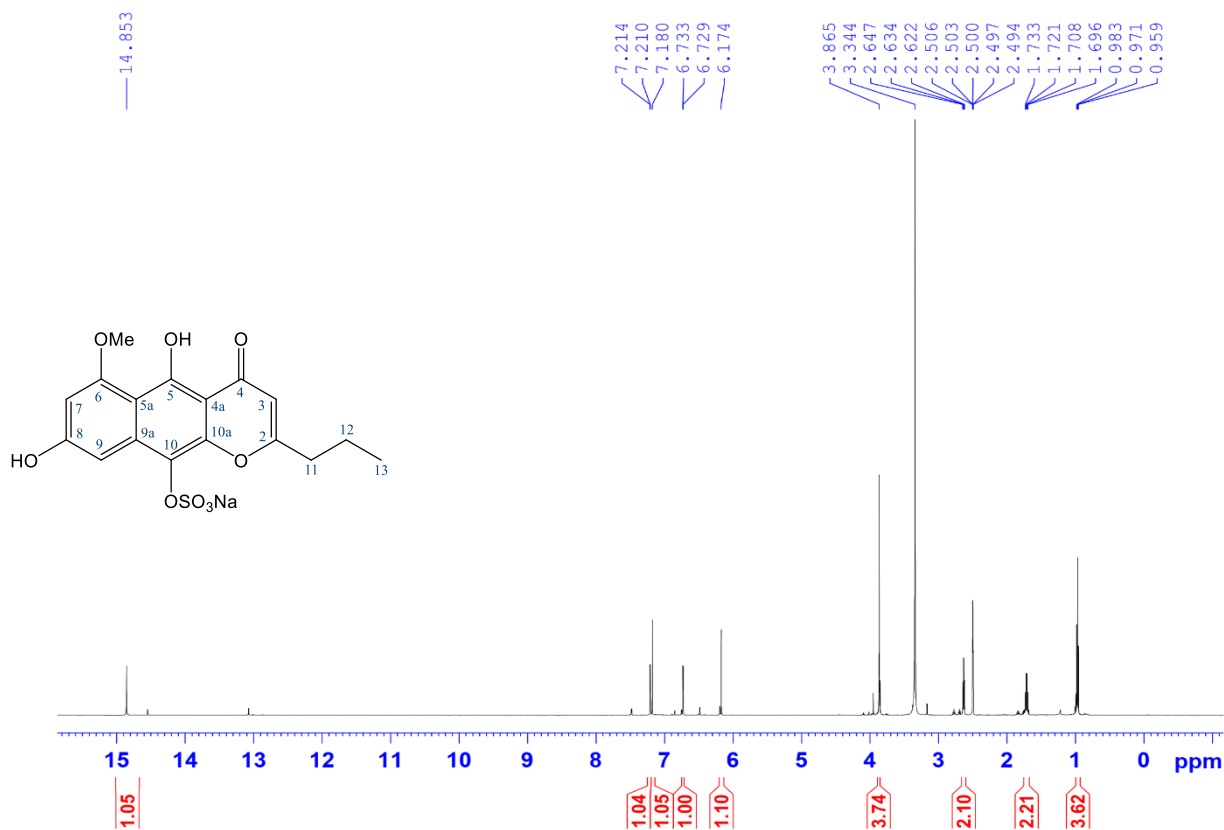
Phổ HMBC của CD15

PL-63

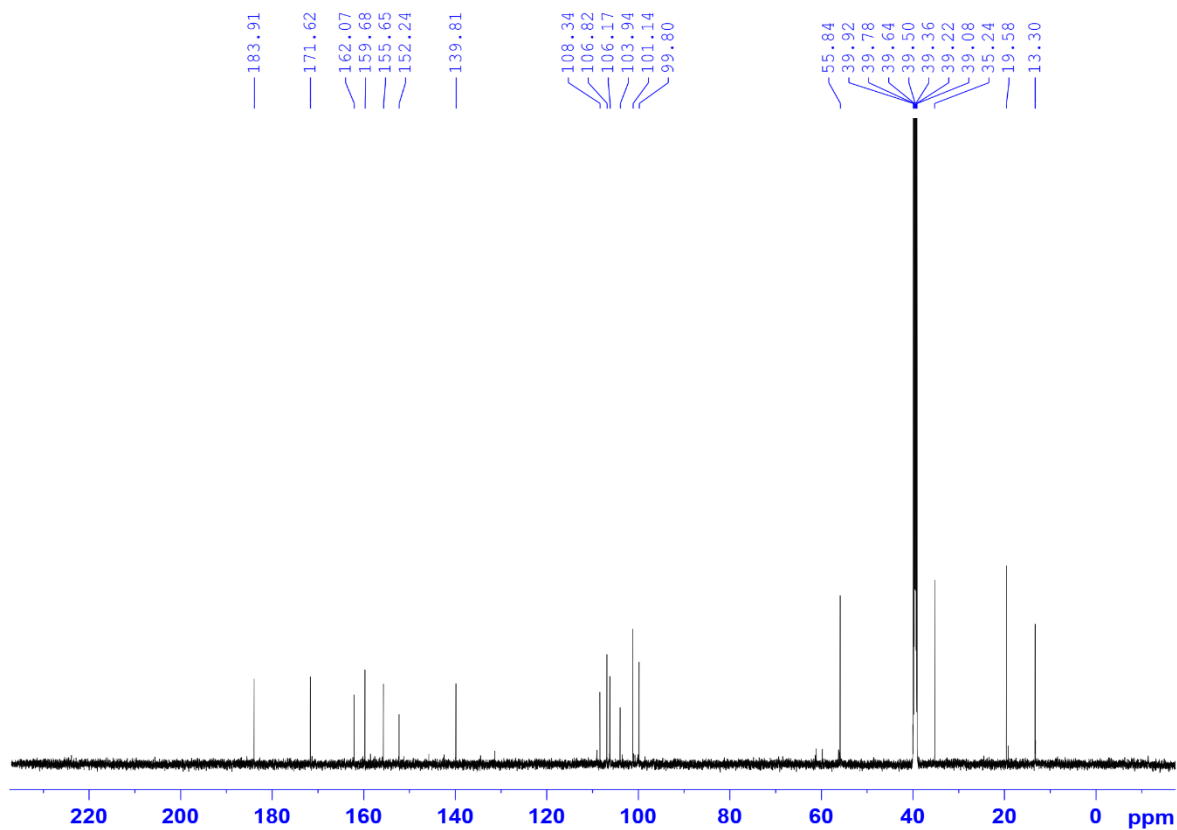


Phổ HR-QTOF-MS của **CD15**

Phụ lục 26. Các phổ của CD16

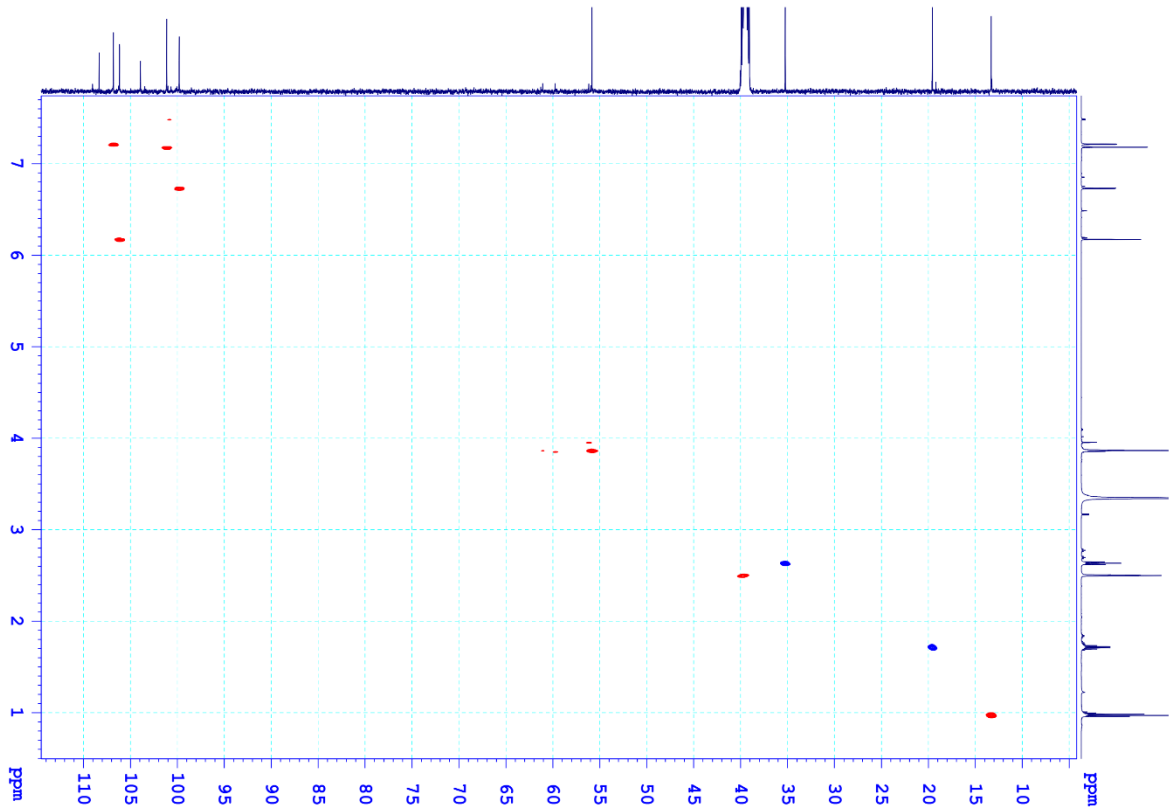


Phổ ¹H-NMR của CD16

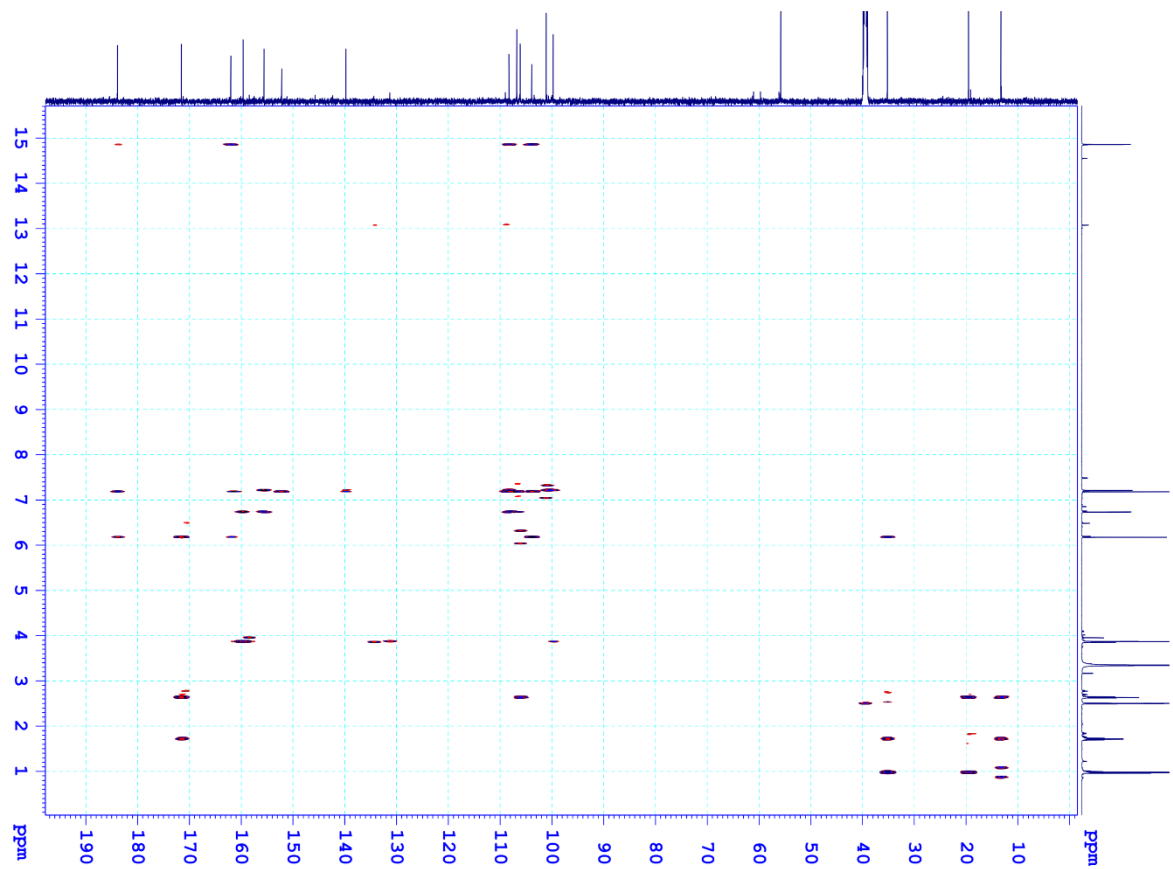


Phổ ¹³C-NMR của CD16

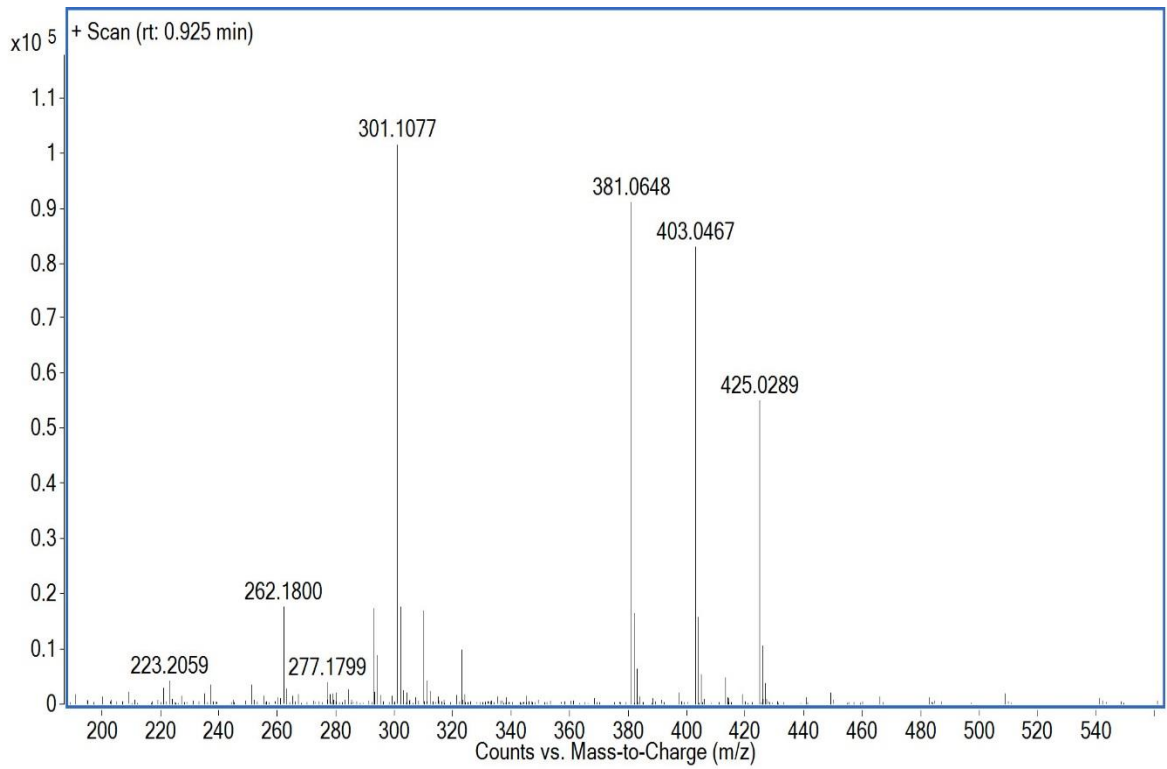
PL-65



Phổ HSQC của CD16

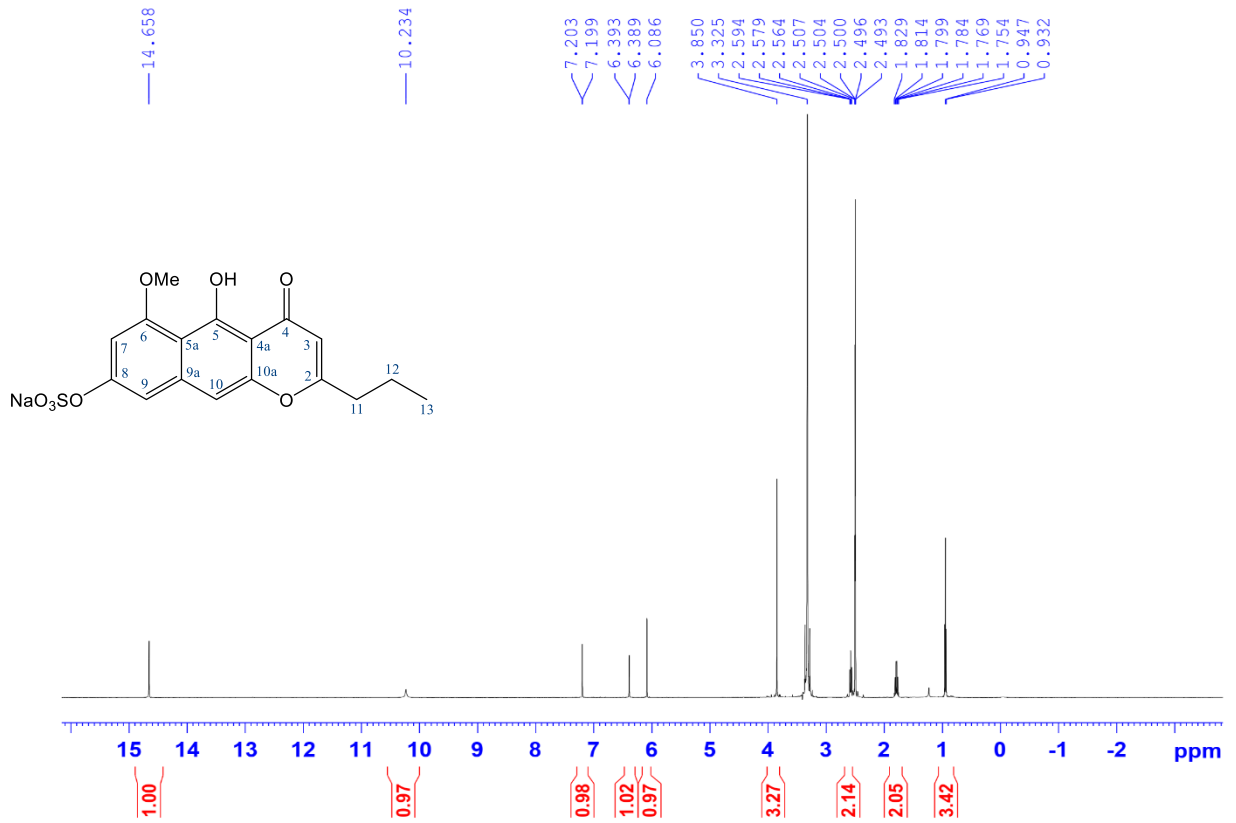


Phổ HMBC của CD16

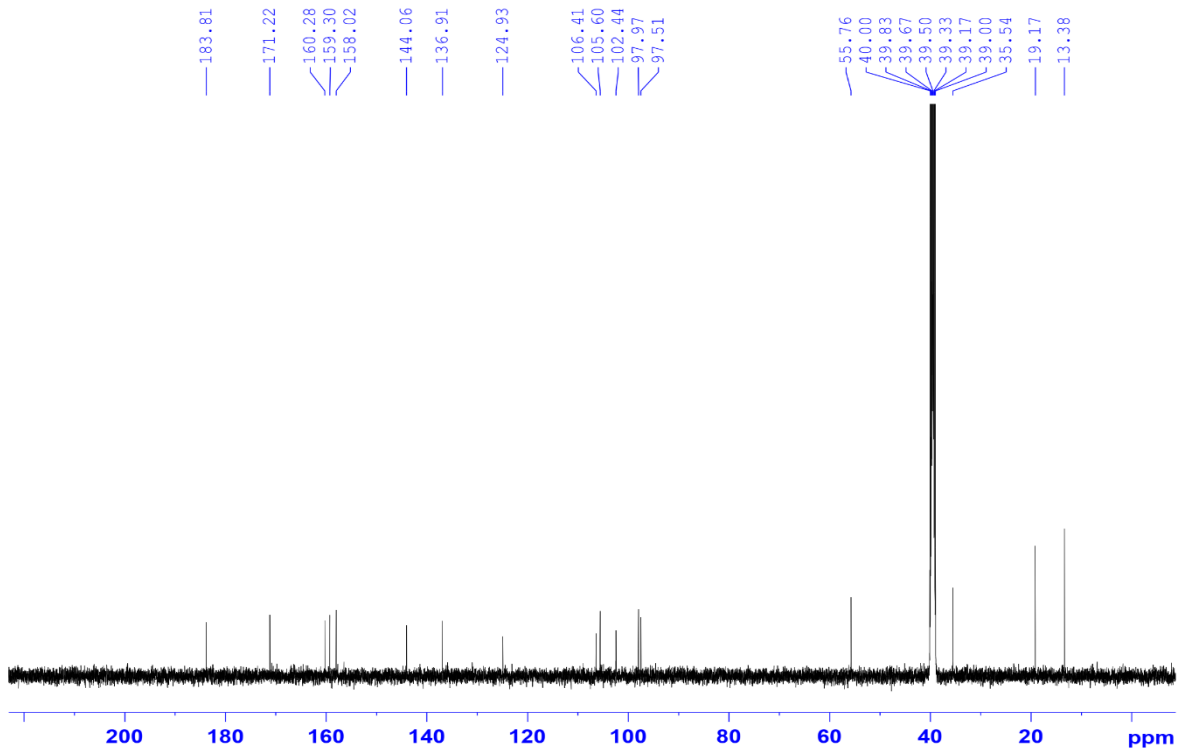


Phổ HR-QTOF-MS của **CD16**

Phụ lục 27. Các phổ của CD17

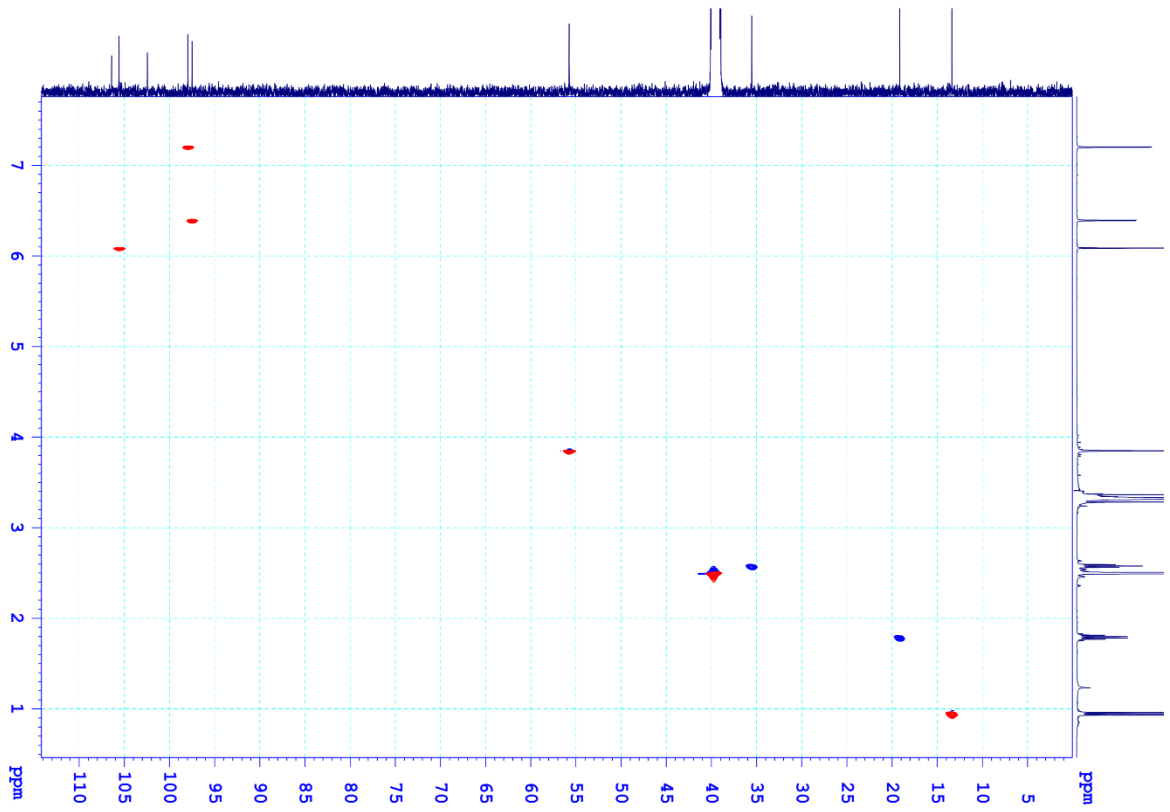


Phổ ¹H-NMR của CD17

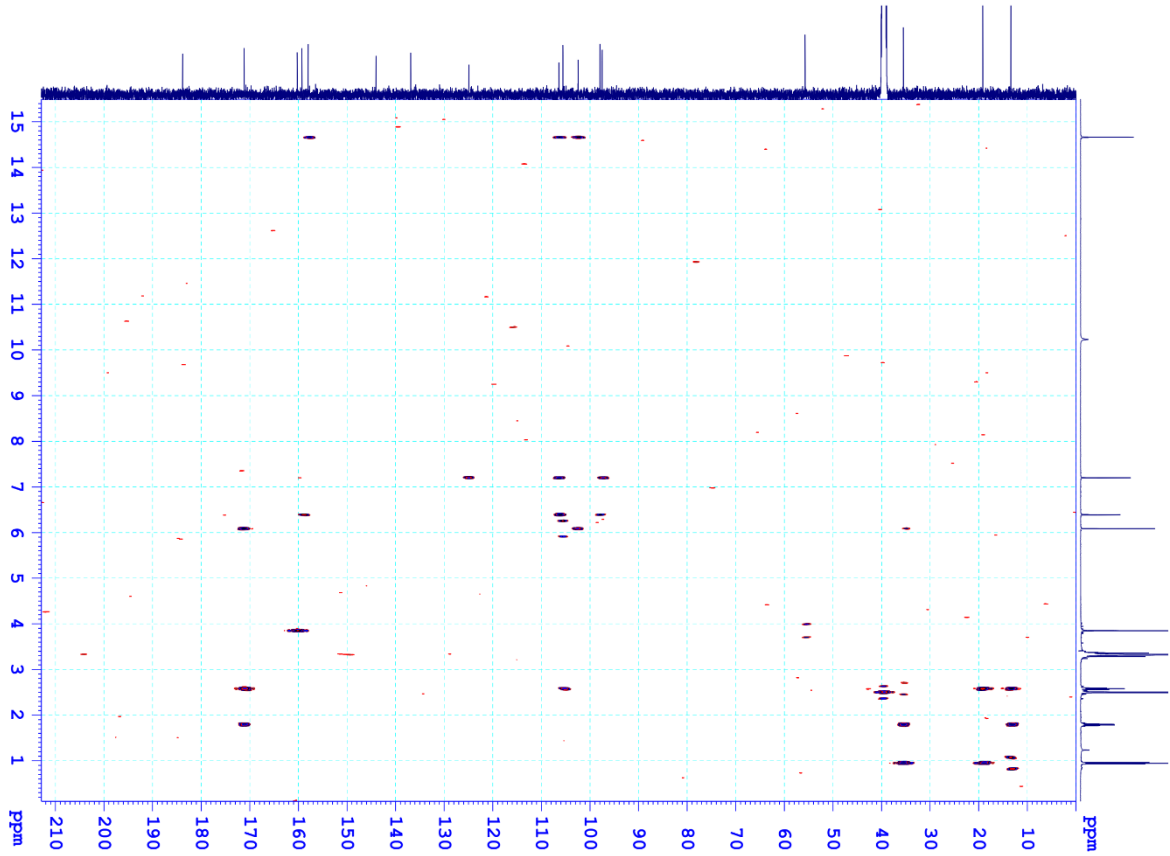


Phổ ¹³C-NMR của CD17

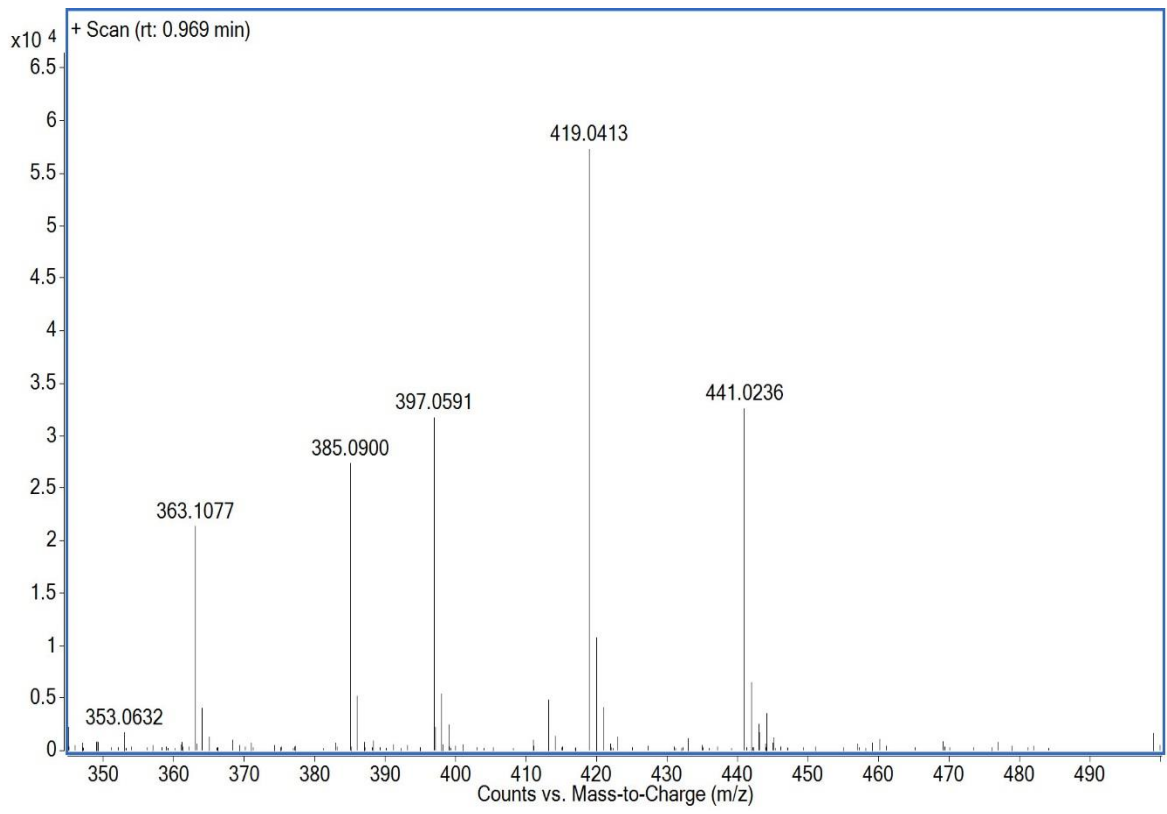
PL-68



Phổ HSQC của CD17

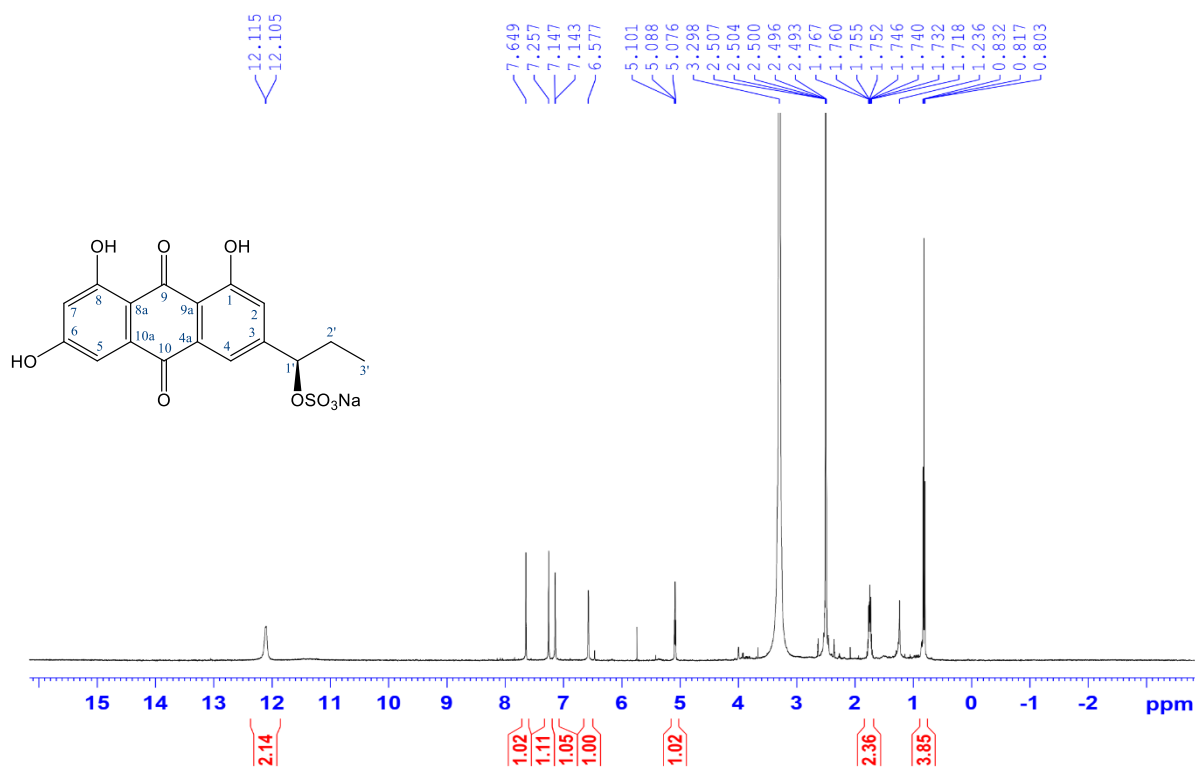


Phổ HMBC của CD17

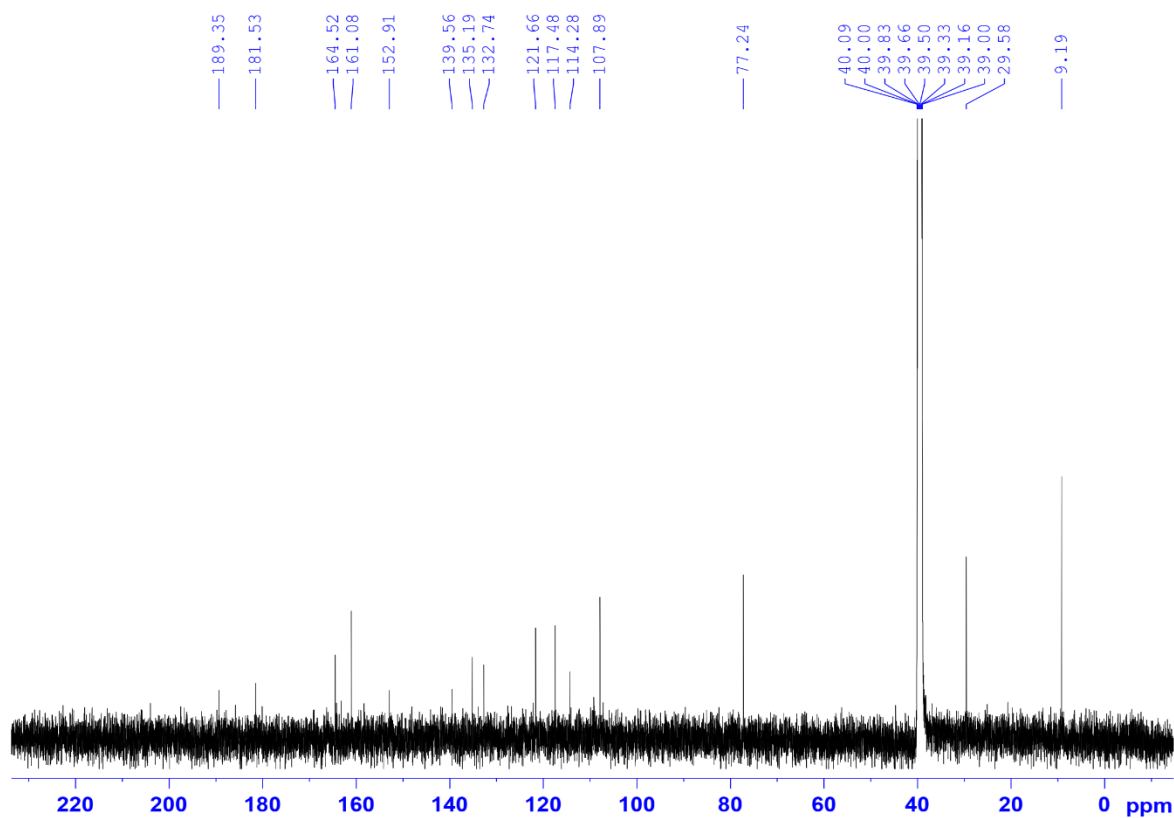


Phổ HR-QTOF-MS của CD17

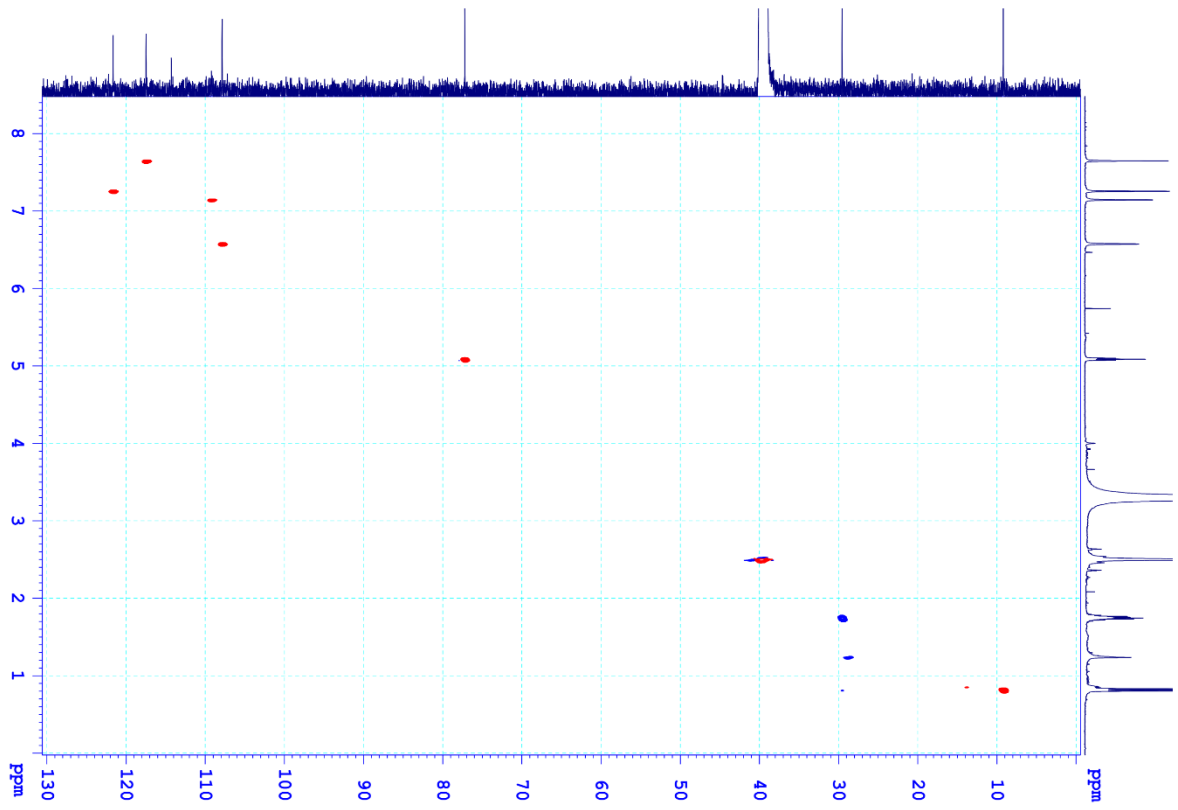
Phụ lục 28. Các phổ của CD18



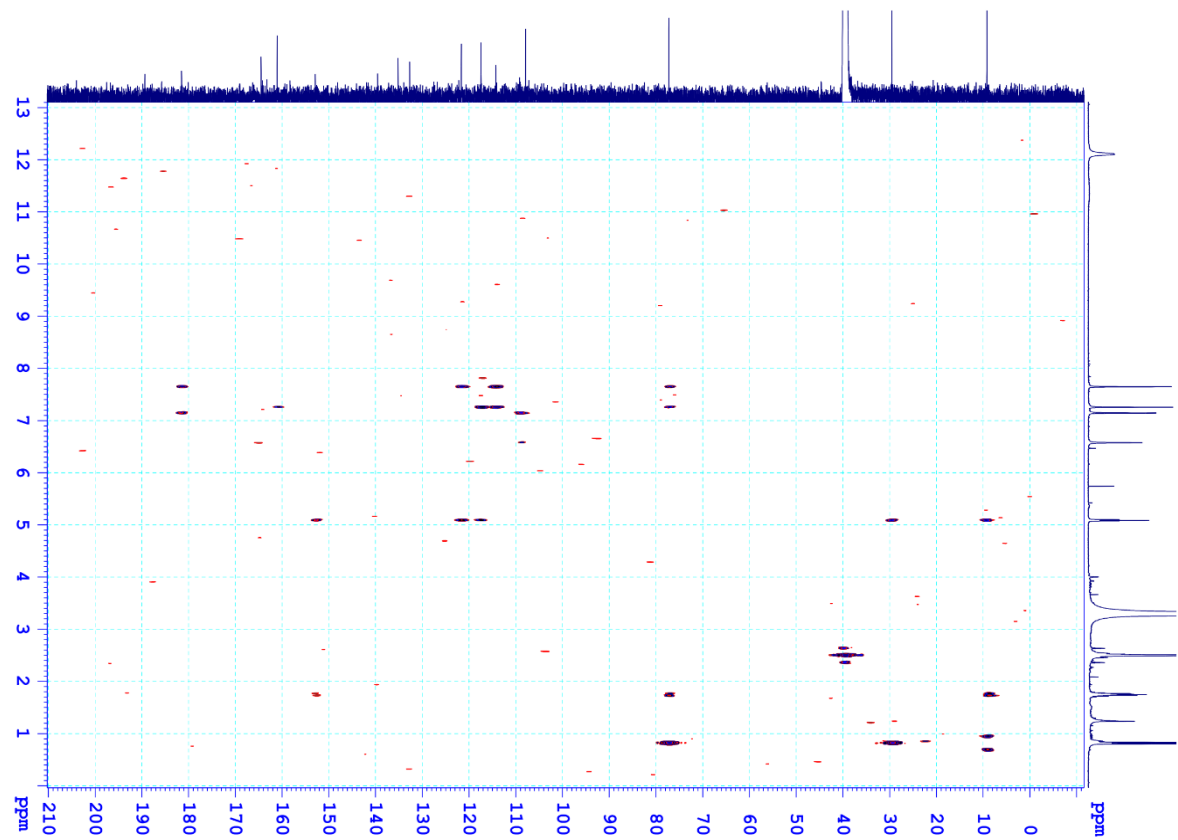
Phổ ¹H-NMR của CD18



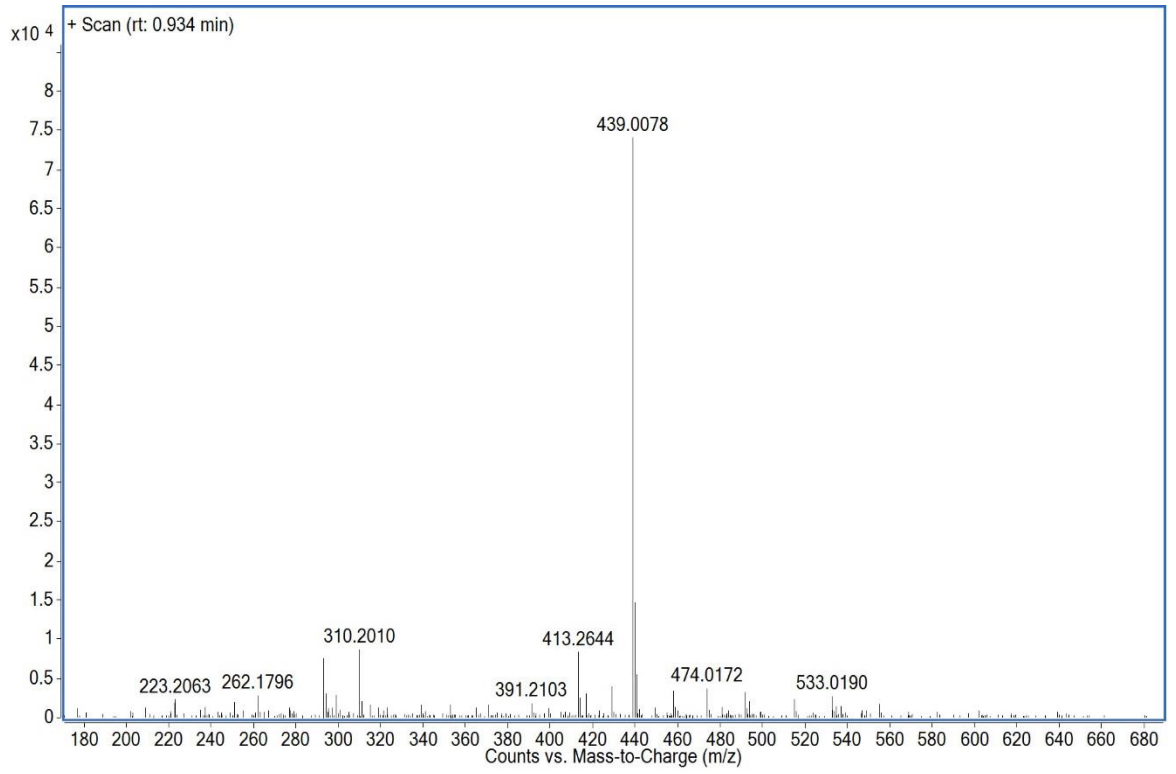
Phổ ¹³C-NMR của CD18



Phổ HSQC của CD18

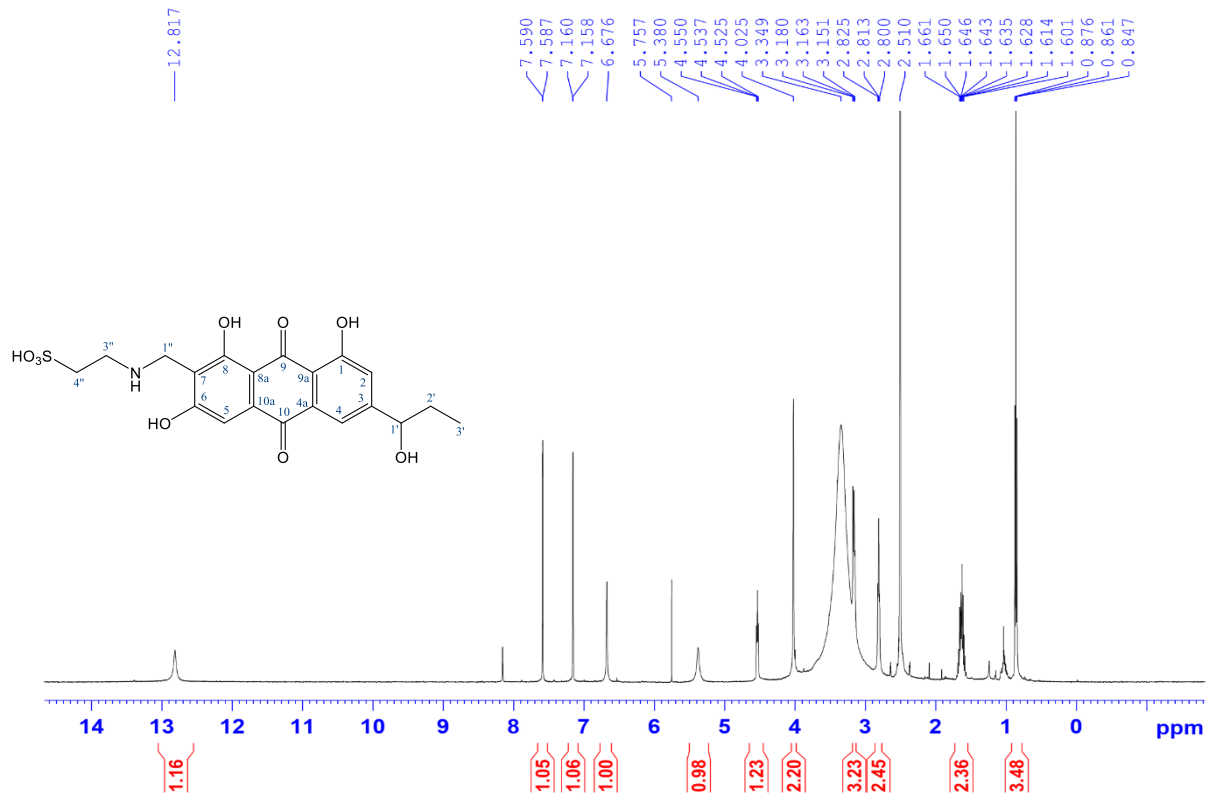


Phổ HMBC của CD18

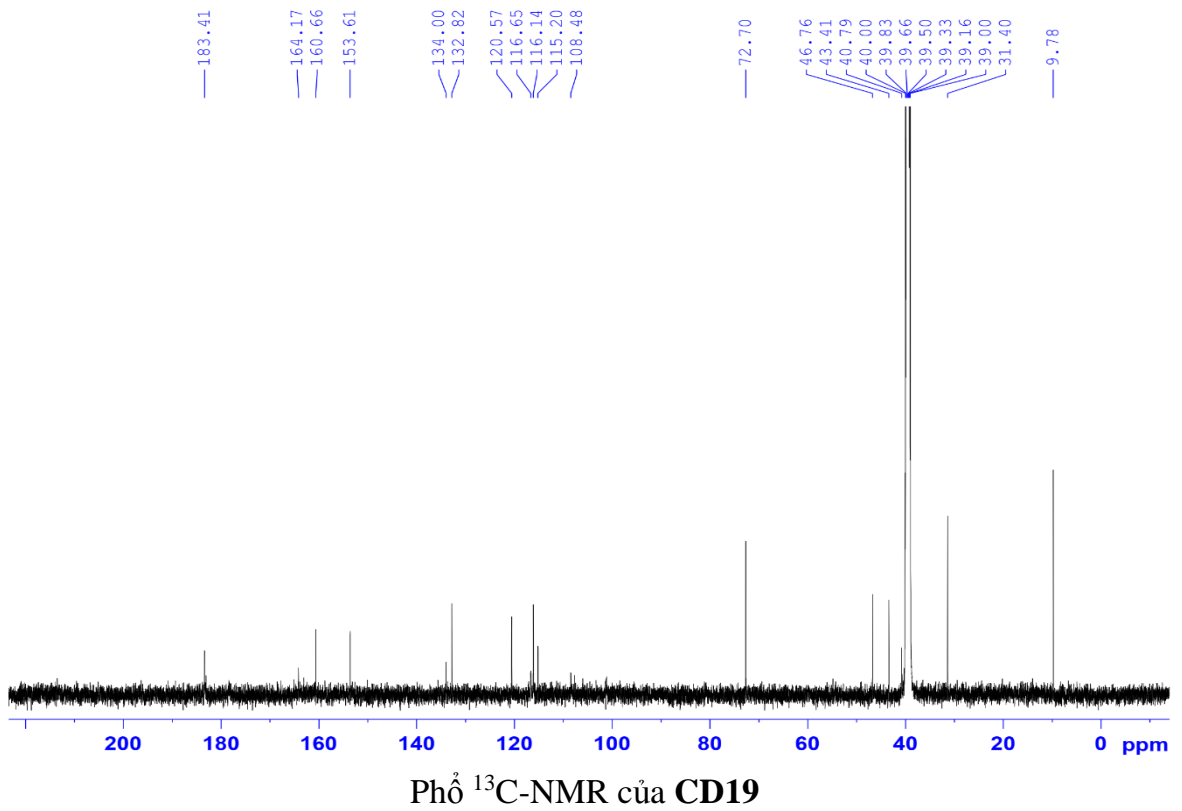


Phổ HR-QTOF-MS của CD18

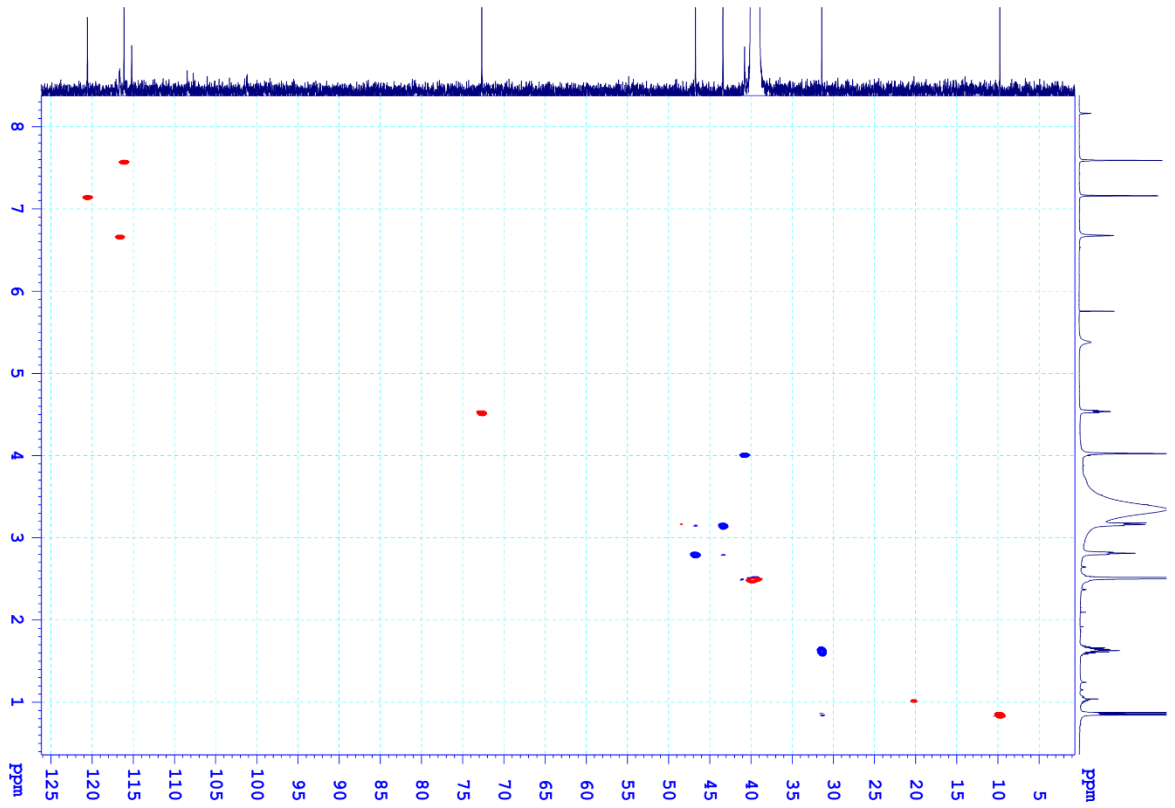
Phụ lục 29. Các phổ của CD19



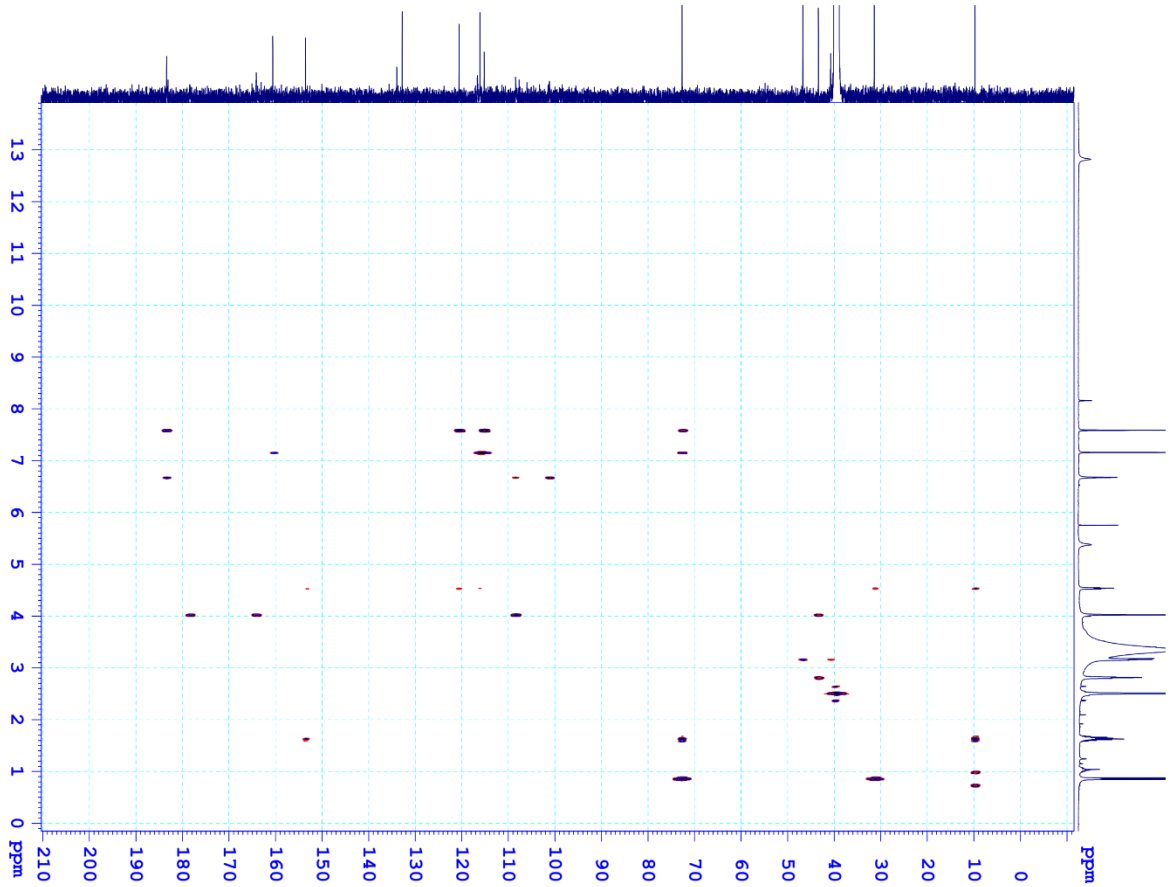
Phổ ¹H-NMR của CD19



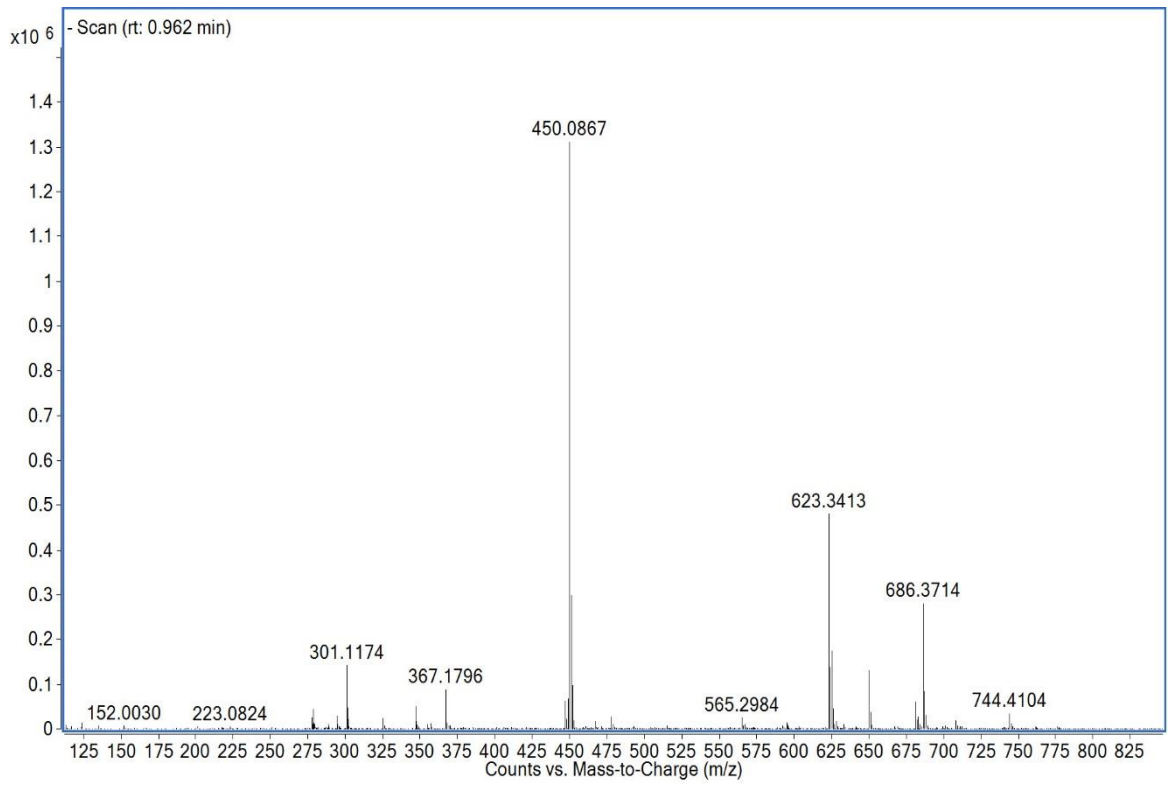
Phổ ¹³C-NMR của CD19



Phổ HSQC của CD19

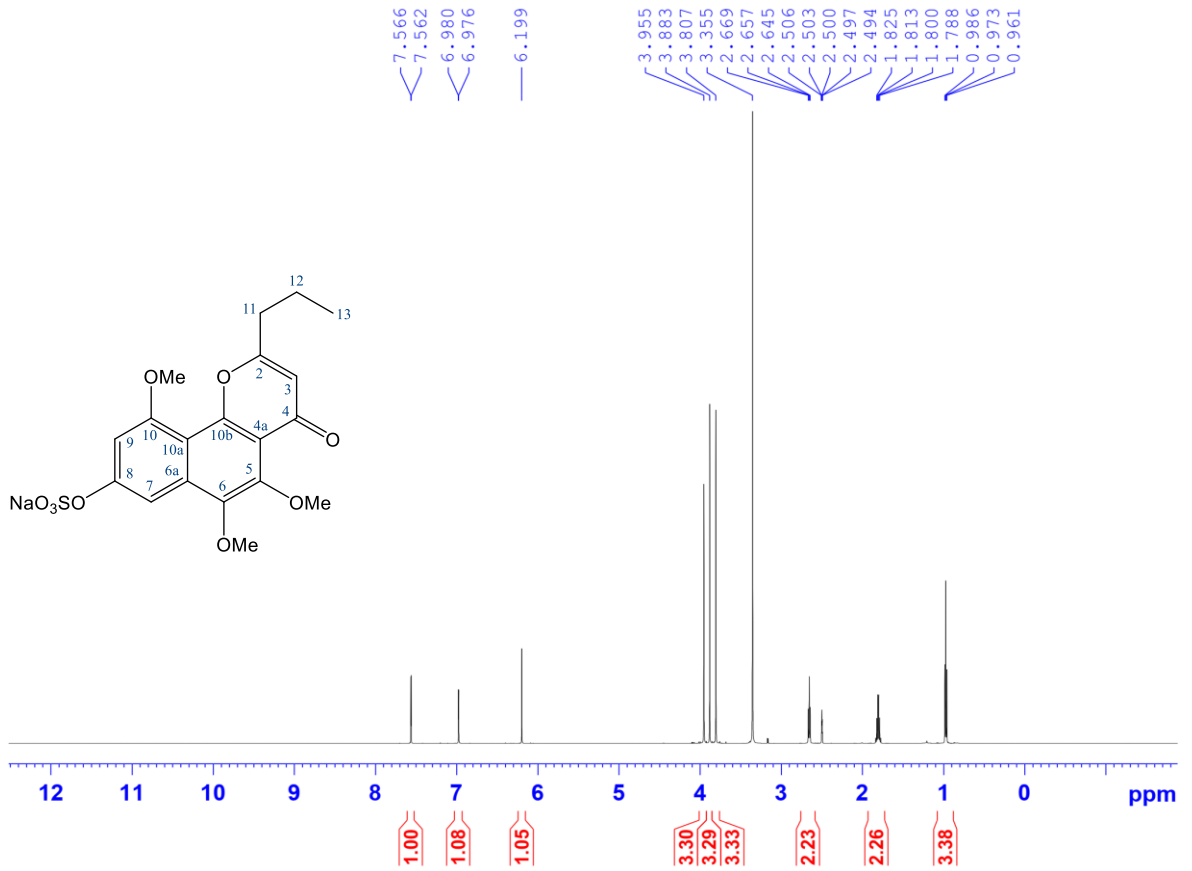


Phổ HMBC của CD19

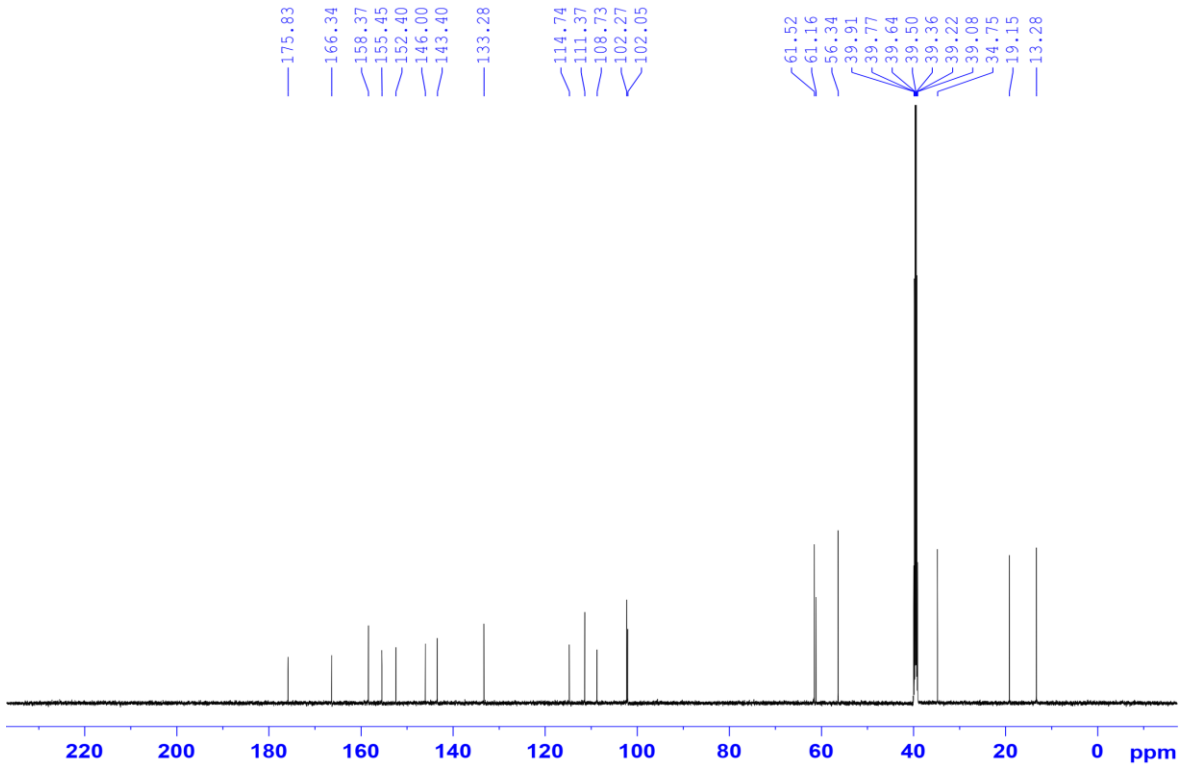


Phổ HR-QTOF-MS của **CD19**

Phụ lục 30. Các phổ của CD20

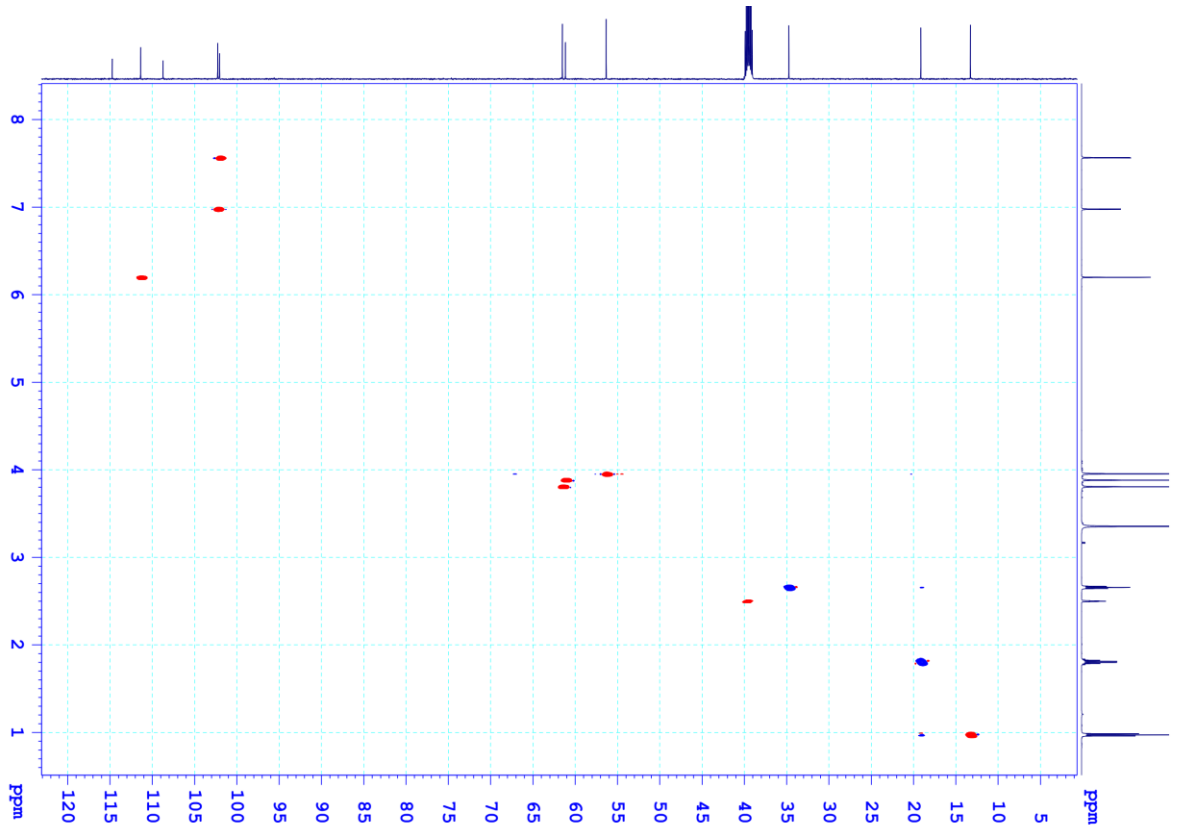


Phổ ¹H-NMR của CD20

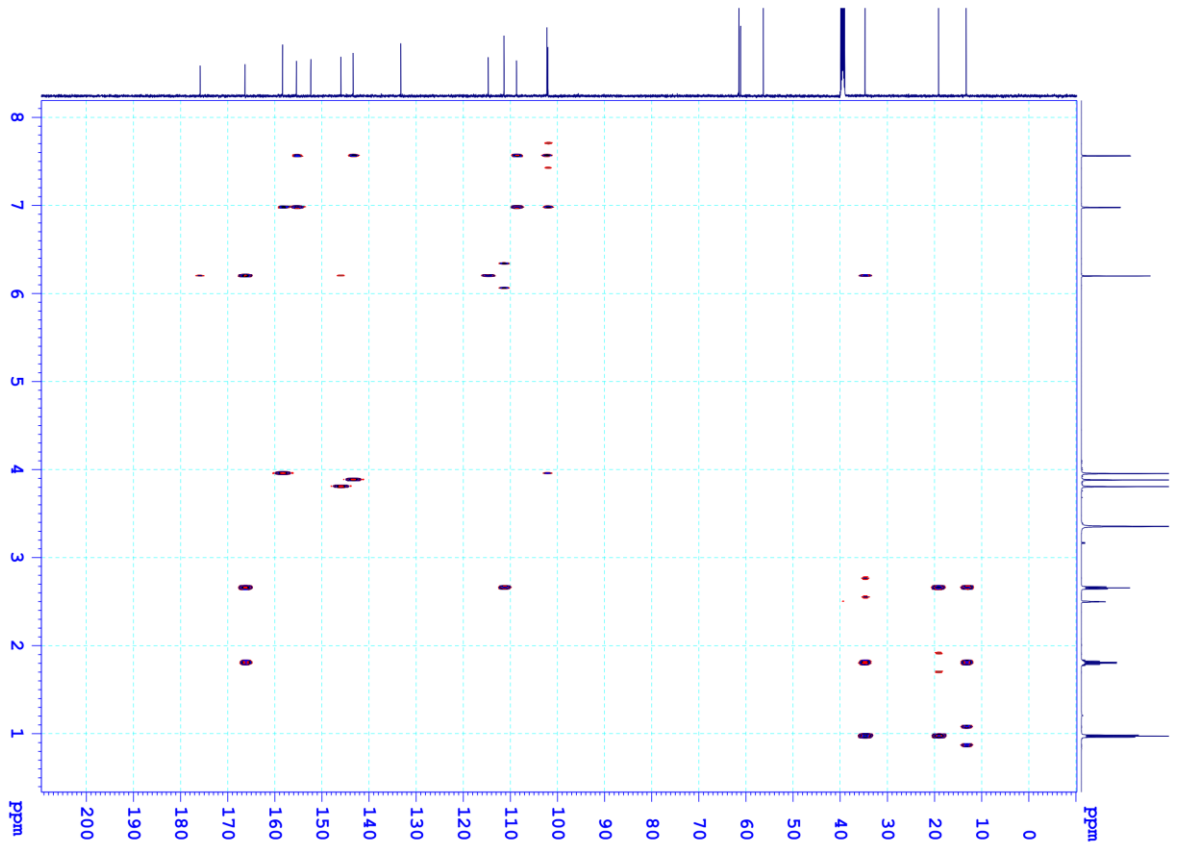


Phổ ¹³C-NMR của CD20

PL-77



Phổ HSQC của CD20



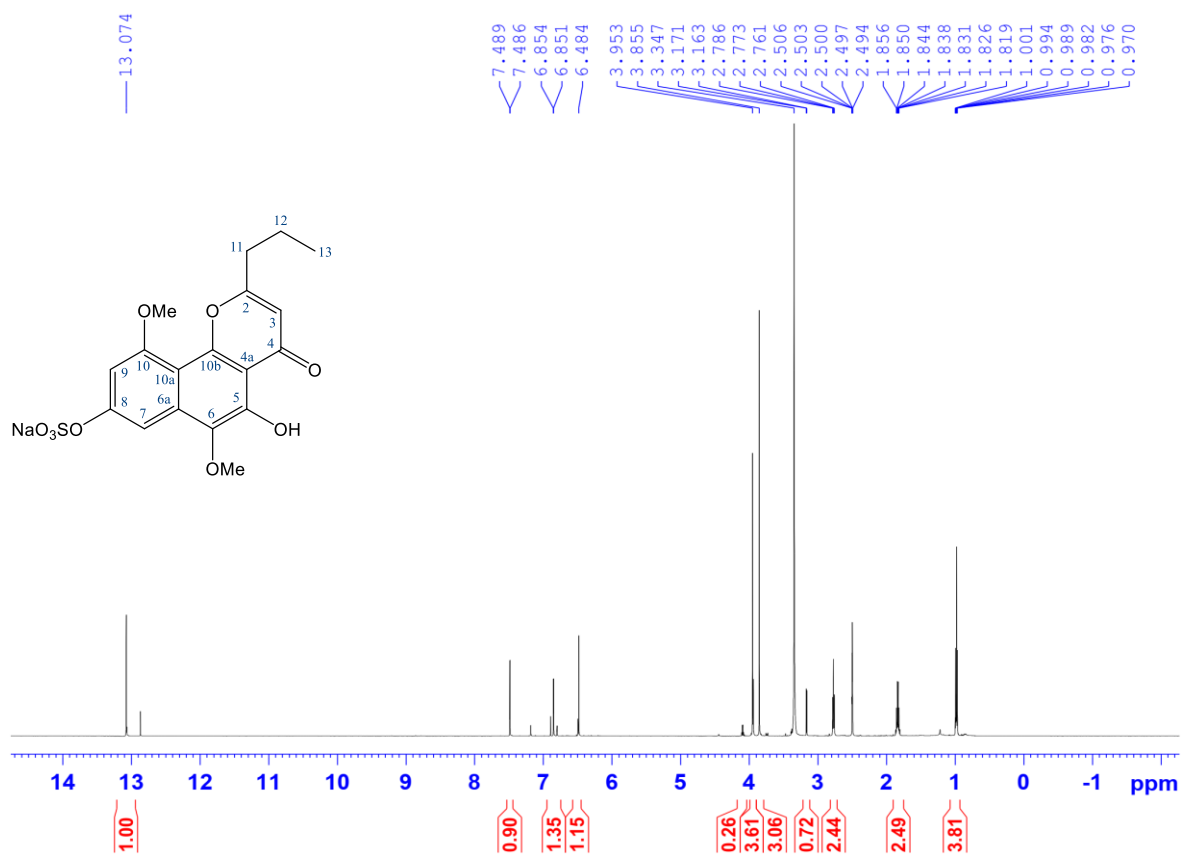
Phổ HMBC của CD20

Bảng giá trị phổ NMR của **CD20**

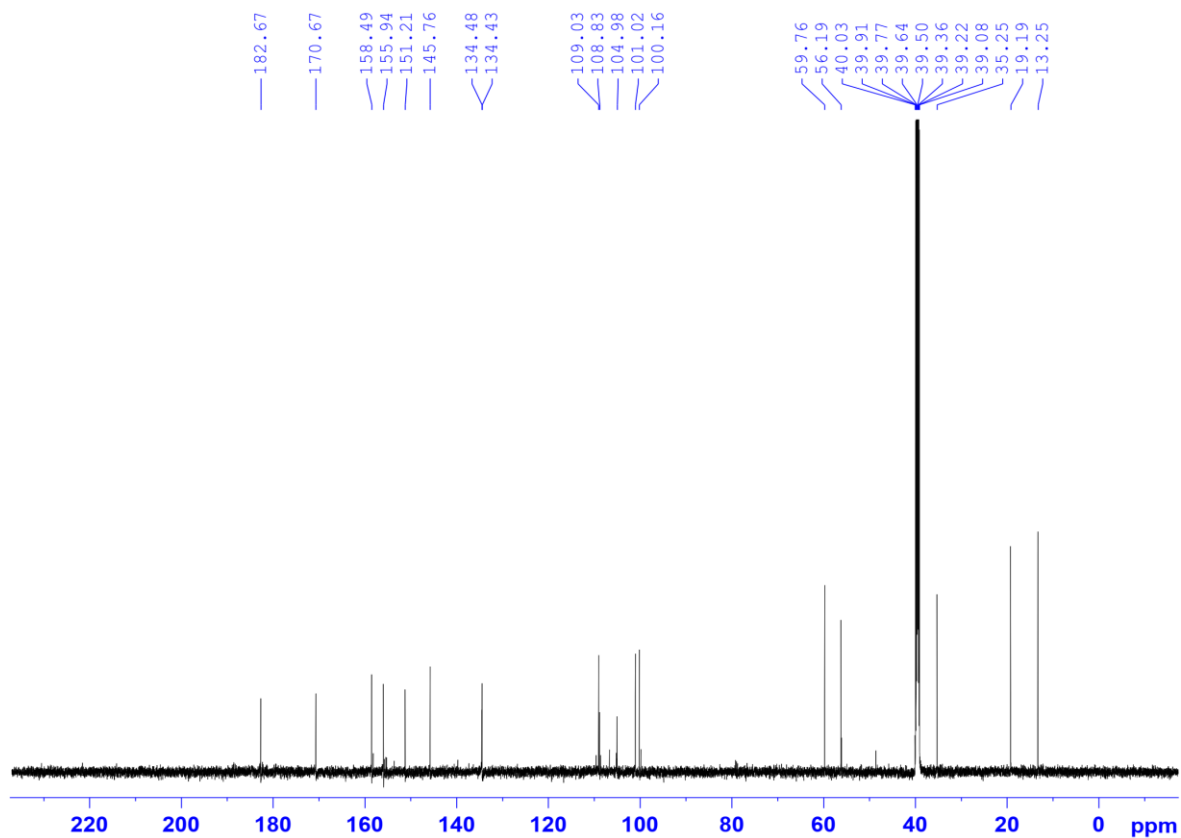
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	166,34	-	
3	111,37	6,20 s	2, 4, 4a, 11
4	175,83	-	
4a	114,74	-	
5	146,00	-	
6	143,40	-	
6a	133,28	-	
7	102,05	7,56 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	155,45	-	
9	102,27	6,98 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	158,37	-	
10a	108,73	-	
10b	152,40	-	
11	34,75	2,66 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	19,15	1,81 m	2, 11, 13
13	13,28	0,97 t (7,0)	11, 12
5-OMe	61,52	3,81 s	5
6-OMe	61,16	3,88 s	6
10-OMe	56,34	3,95 s	10

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phụ lục 31. Các phổ của CD21

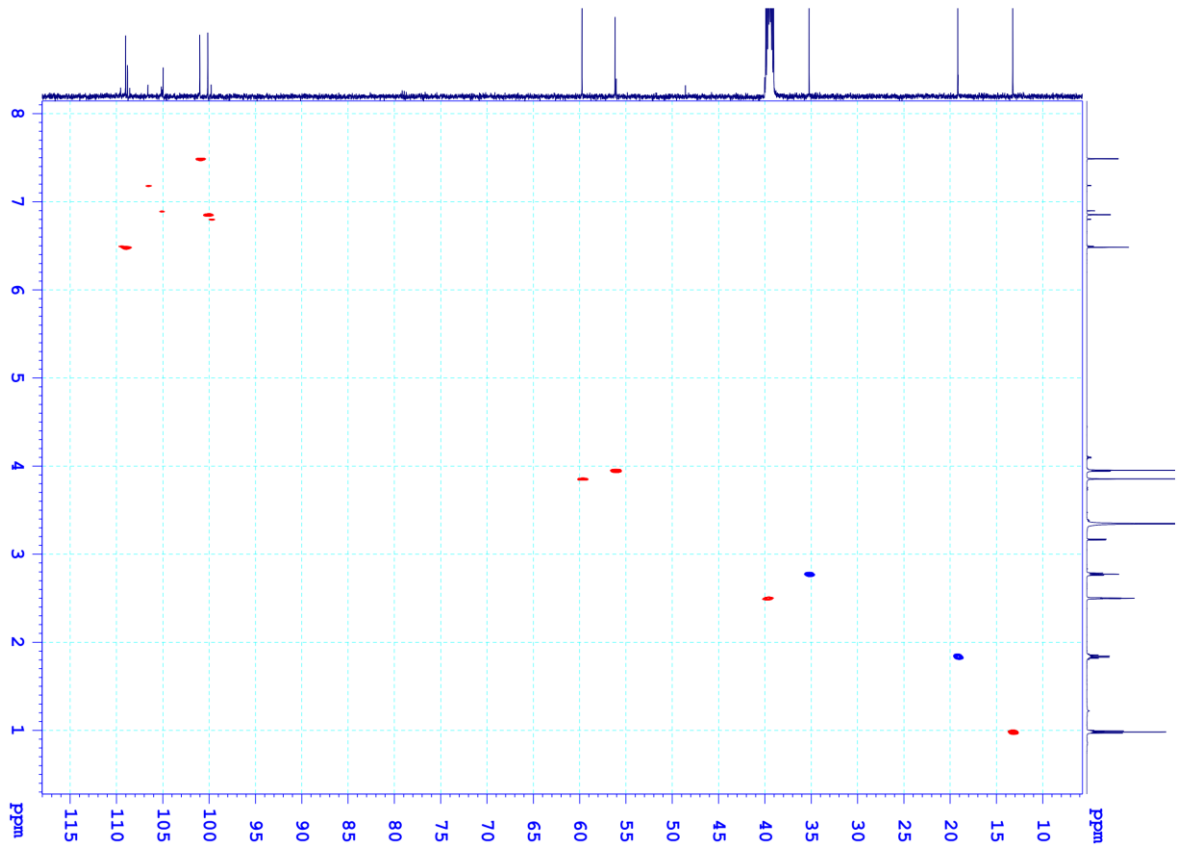


Phổ ¹H-NMR của CD21

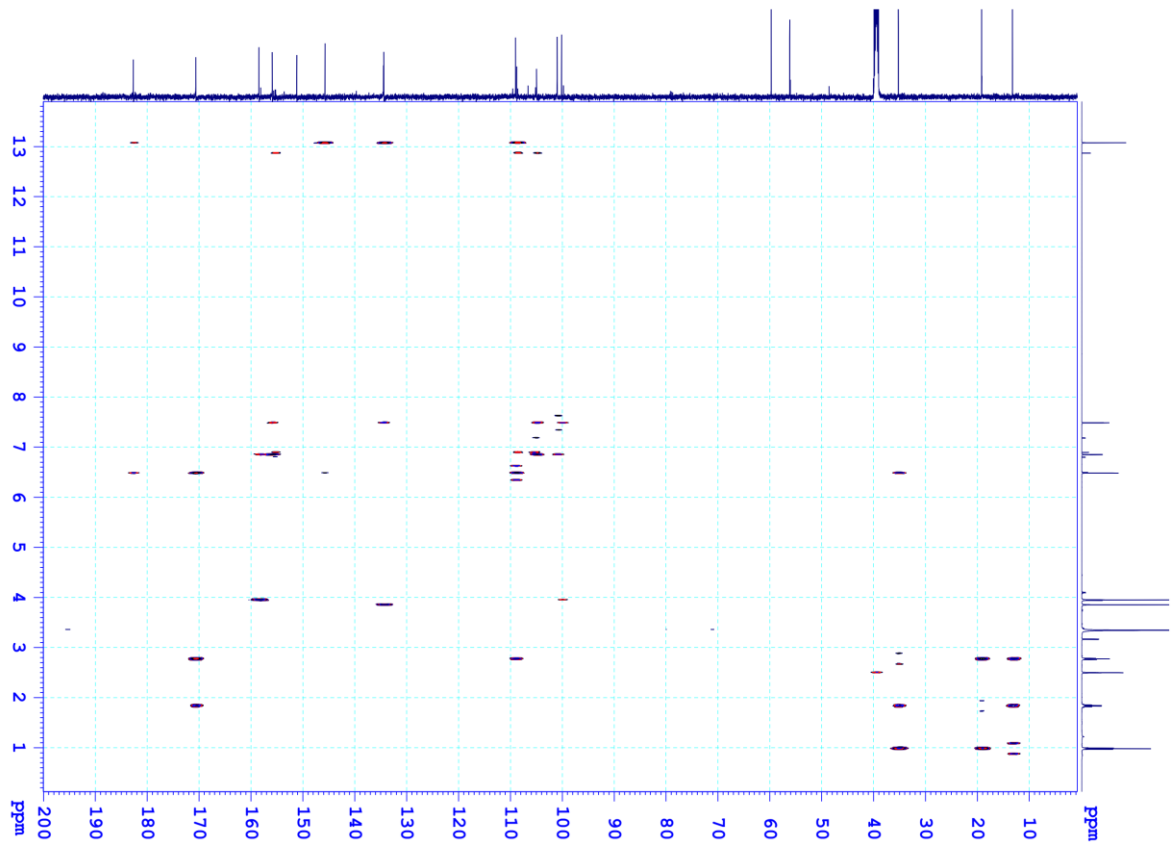


Phổ ¹³C-NMR của CD21

PL-80



Phổ HSQC của CD21

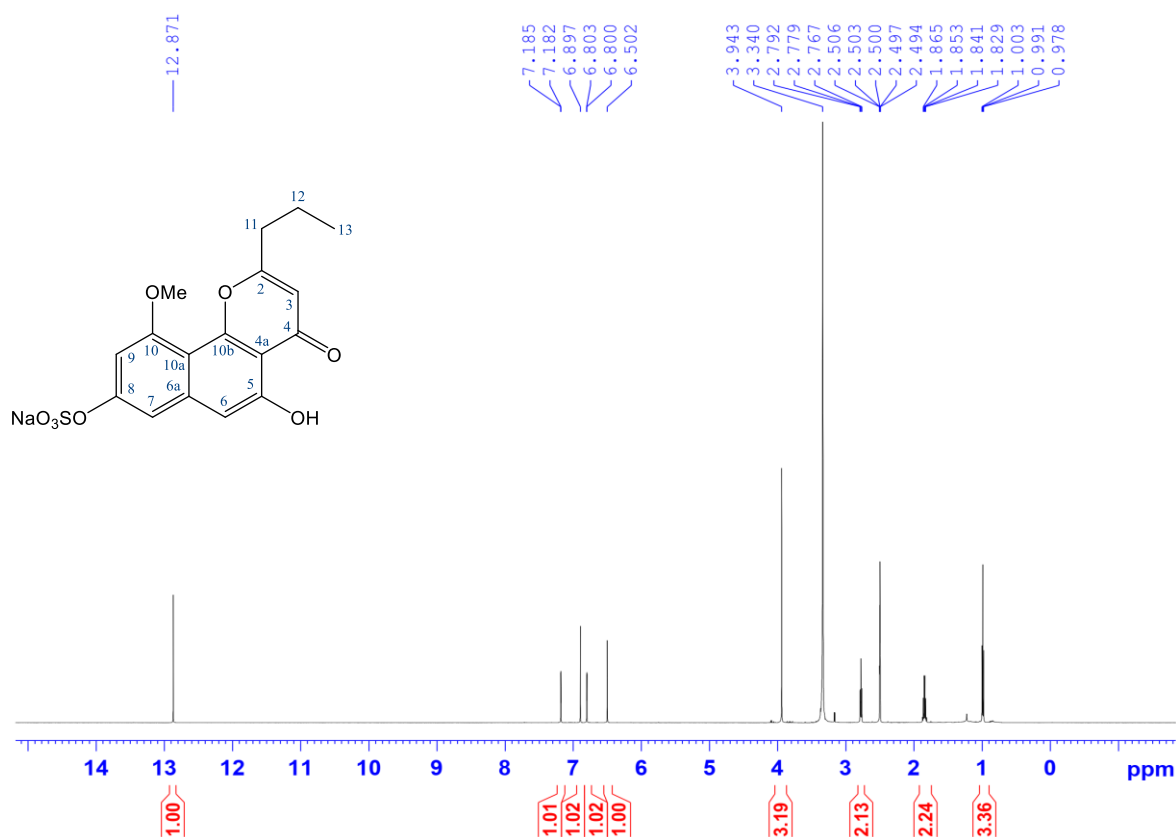


Phổ HMBC của CD21

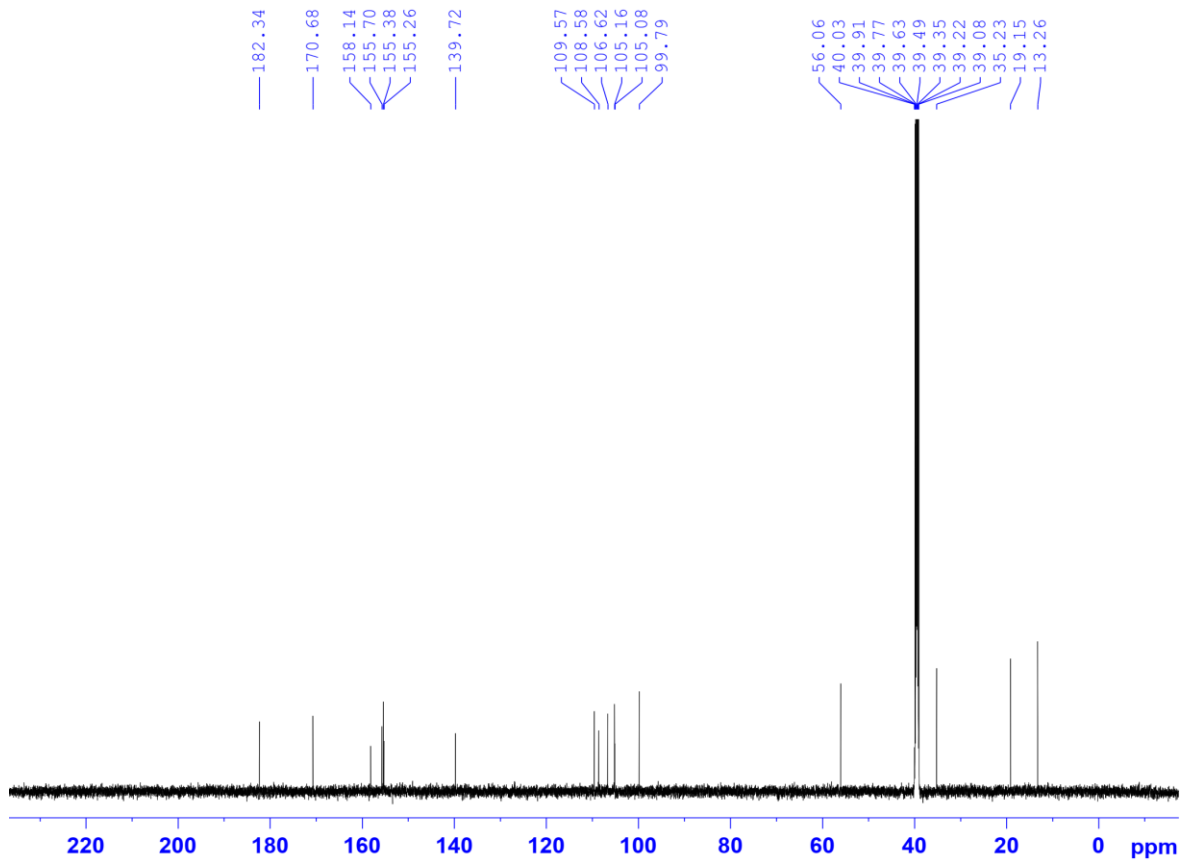
Bảng giá trị phổ NMR của **CD21**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,67	-	
3	109,03	6,48 s	2, 4, 4a, 11
4	182,67	-	
4a	108,83	-	
5	145,76	-	
6	134,43	-	
6a	134,48	-	
7	101,02	7,48 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	155,94	-	
9	100,16	6,85 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	158,49	-	
10a	104,98	-	
10b	151,21	-	
11	35,25	2,77 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	19,19	1,83 m	2, 11, 13
13	13,25	0,98 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	13,07 s	
6-OMe	59,76	3,85 s	6
10-OMe	56,19	3,95 s	10

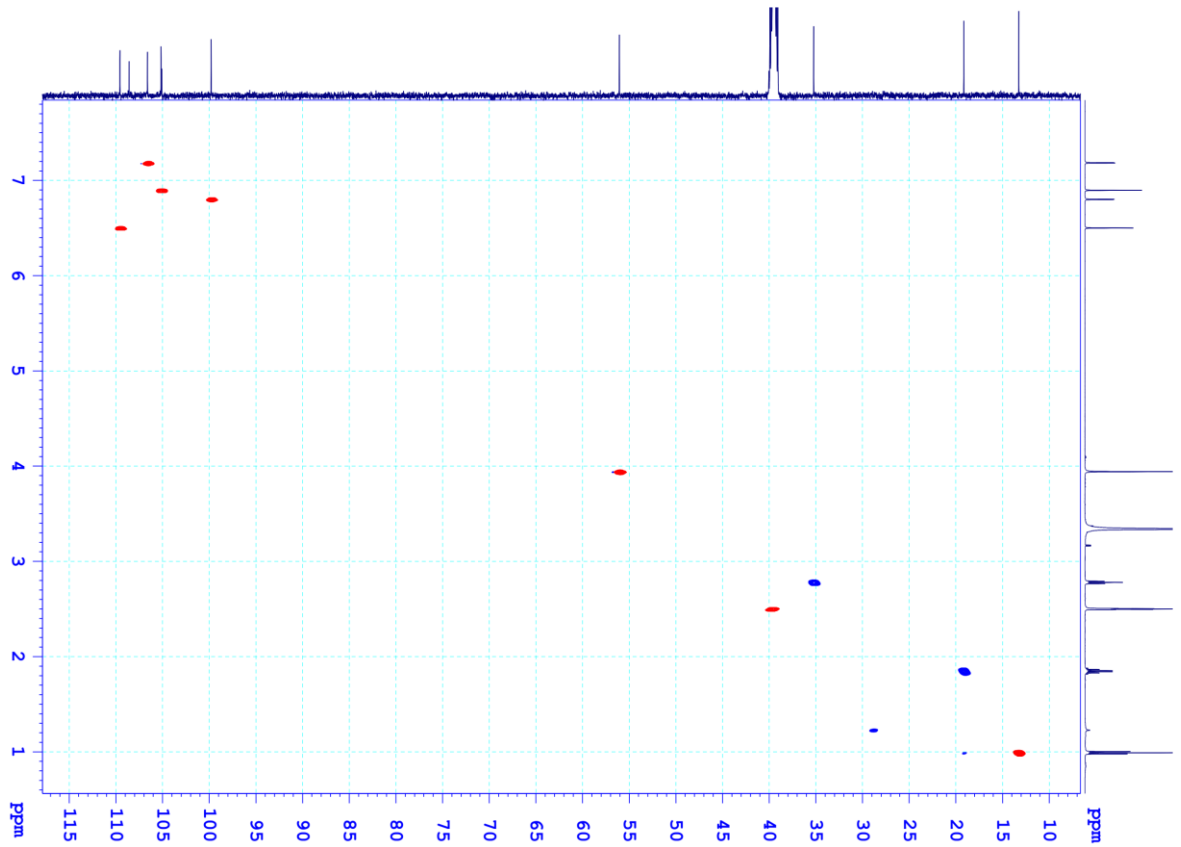
^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phụ lục 32. Các phổ của **CD22**

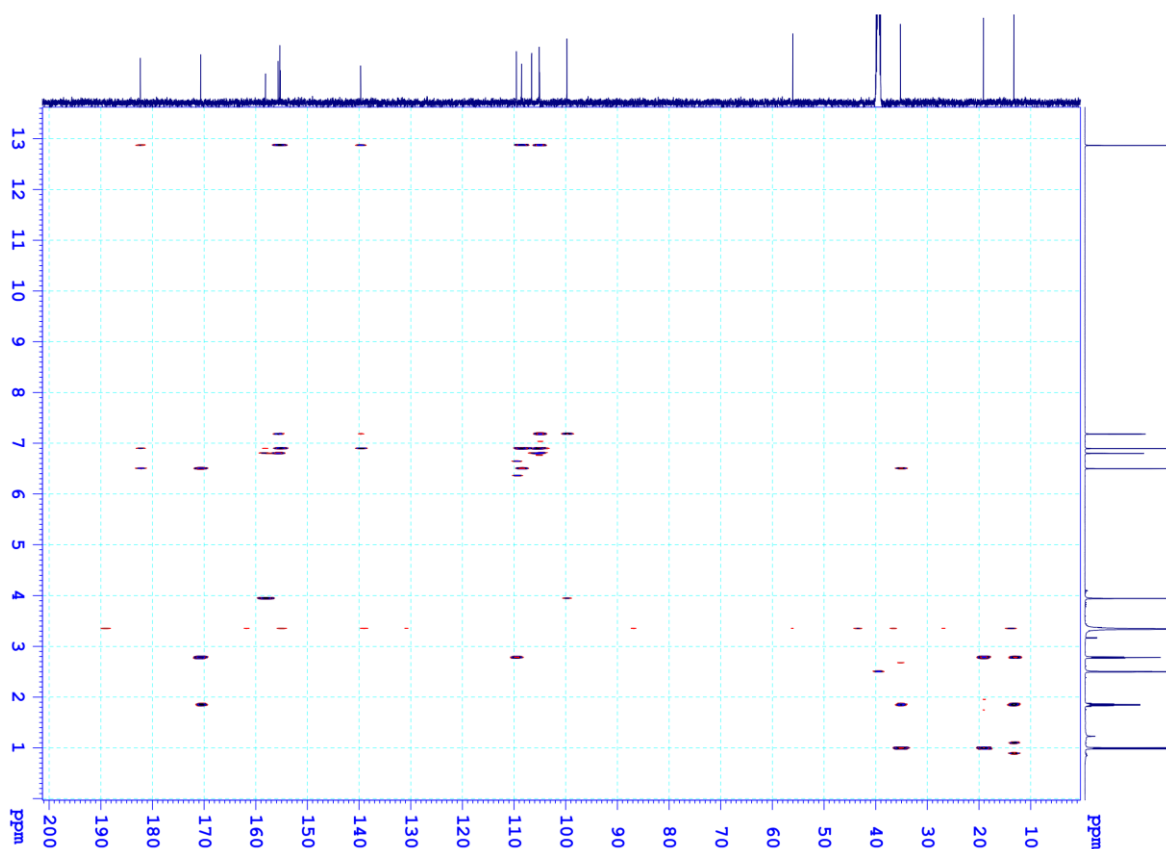
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CD22



Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của CD22



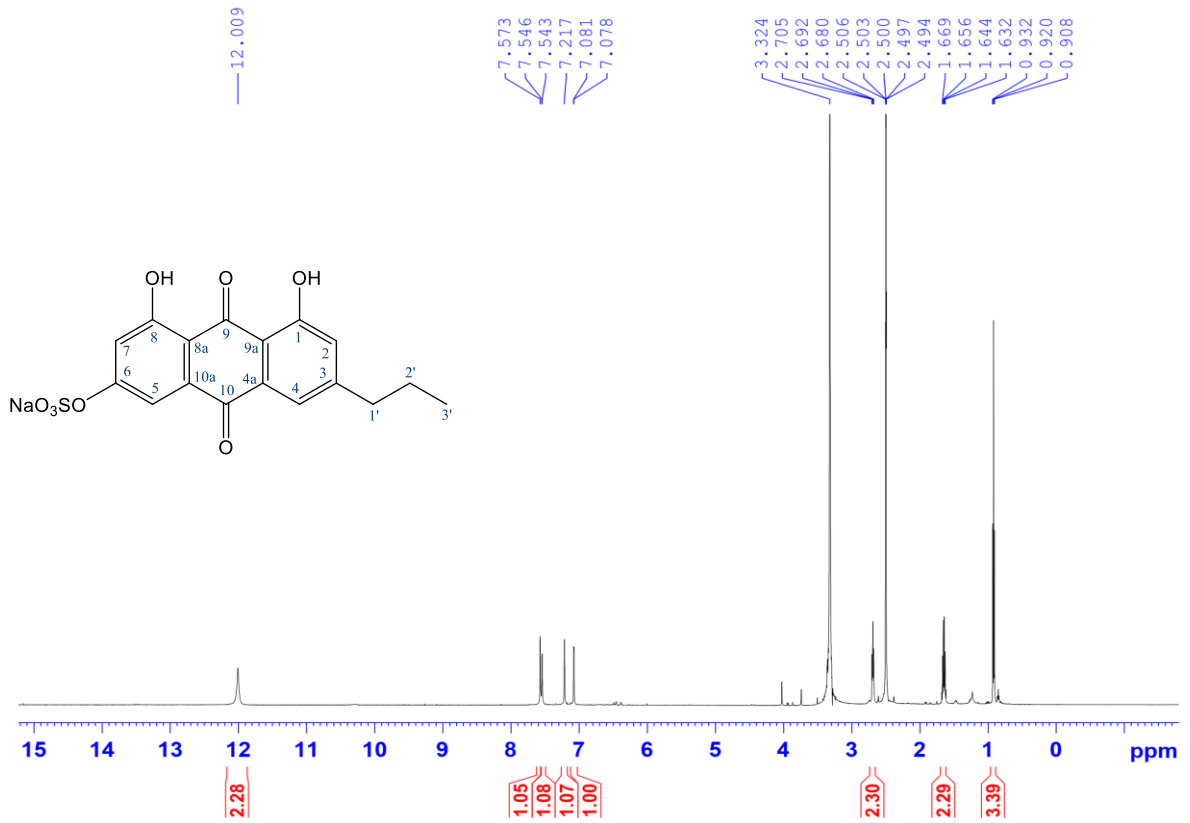
Phổ HSQC của CD22

Phổ HMBC của **CD22**Bảng giá trị phổ NMR của **CD22**

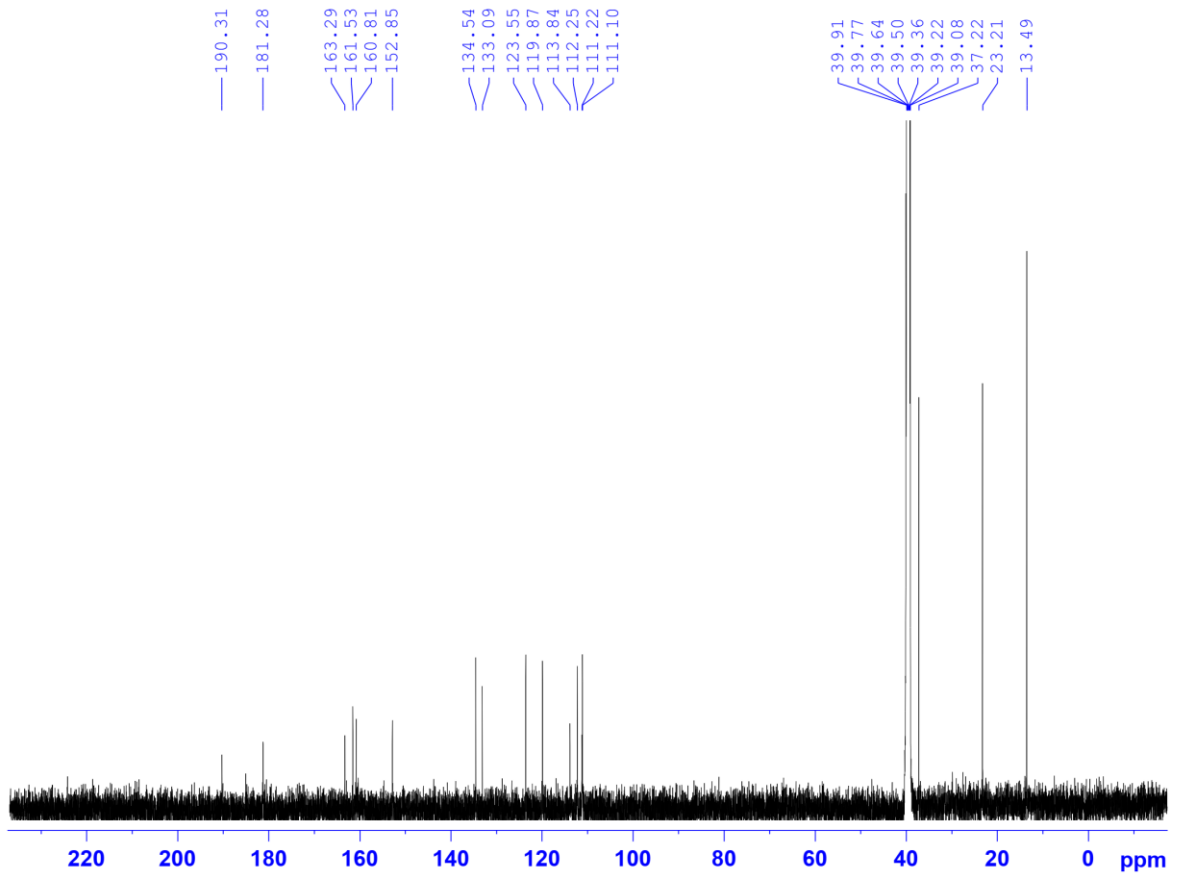
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
2	170,68	-	
3	109,57	6,50 s	2, 4, 4a, 11
4	182,34	-	
4a	108,58	-	
5	155,38	-	
6	105,16	6,90 s	
6a	139,72	-	
7	106,62	7,18 d (2,0)	6, 8, 9, 10a
8	155,70	-	
9	99,79	6,80 d (2,0)	7, 8, 10, 10a
10	158,14	-	
10a	105,08	-	
10b	155,26	-	
11	35,23	2,78 t (7,0)	2, 3, 12, 13
12	19,15	1,85 m	2, 11, 13
13	13,26	0,99 t (7,0)	11, 12
5-OH	-	12,87 s	
6-OMe	56,06	3,94 s	6

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

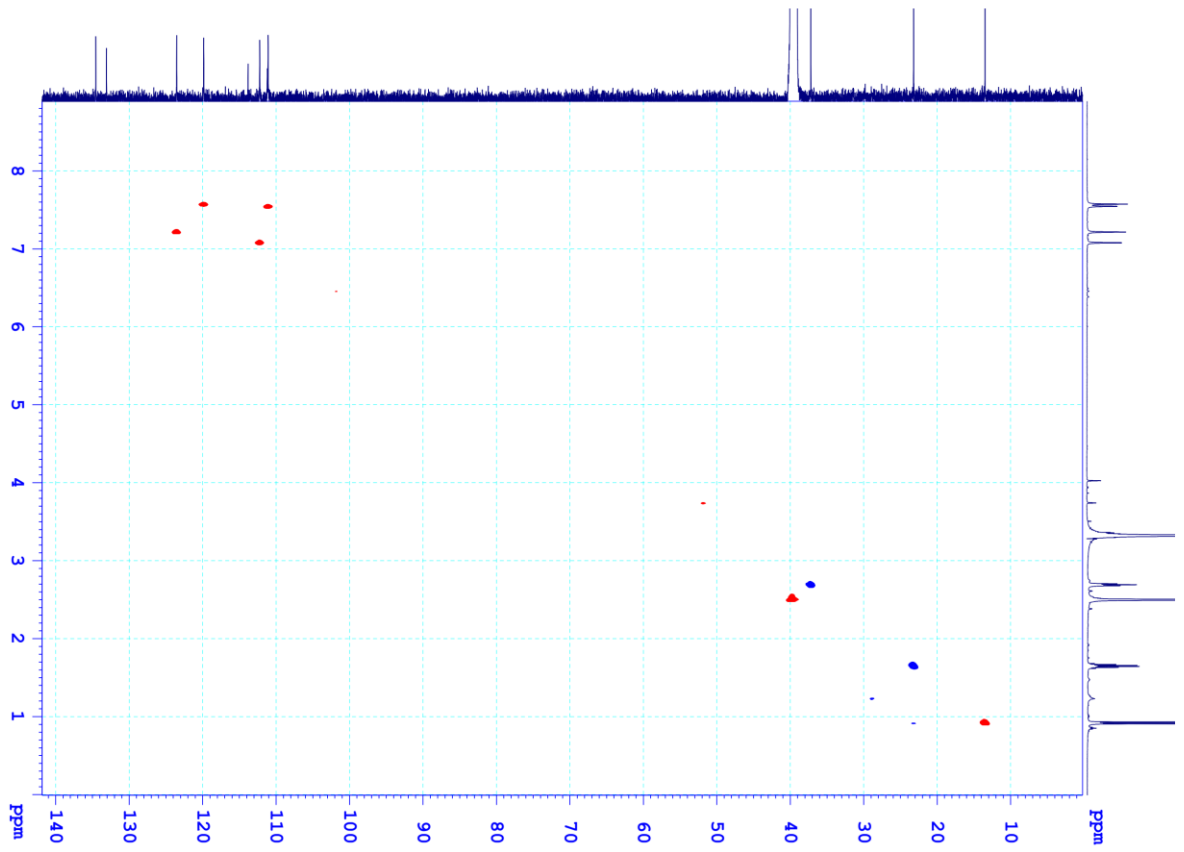
Phụ lục 33. Các phổ của CD23



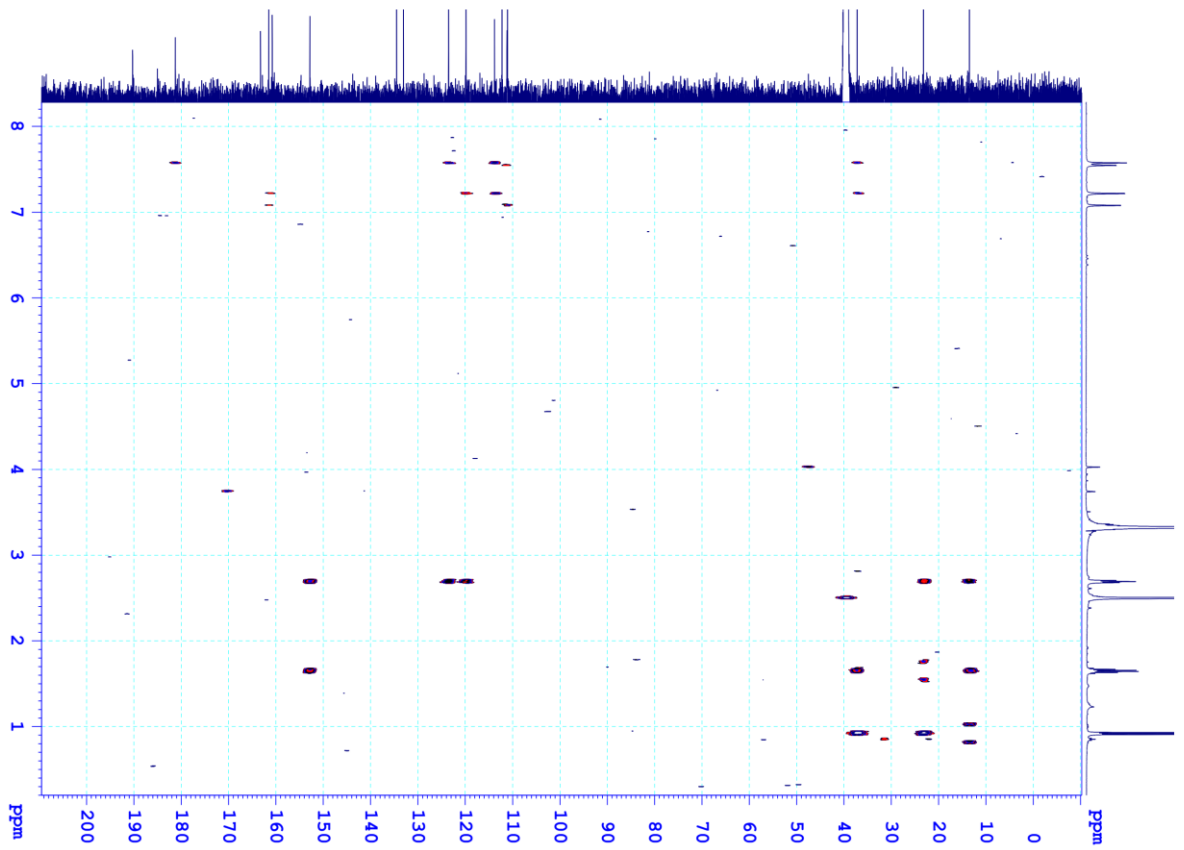
Phổ ¹H-NMR của CD23



Phổ ¹³C-NMR của CD23



Phổ HSQC của CD23



Phổ HMBC của CD23

Bảng giá trị phổ NMR của **CD23**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H \rightarrow C)
1	161,53	-	
2	123,55	7,22 br s	1, 9a, 1'
3	152,85	-	
4	119,87	7,57 br s	
4a	133,09	-	
5	111,10	7,54 d (2,0)	
6	160,81	-	
7	112,25	7,08 d (2,0)	5, 8
8	163,29	-	
8a	111,22	-	
9	190,31	-	
9a	113,84	-	
10	181,28	-	
10a	134,54	-	
1'	37,22	2,69 t (7,0)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	23,21	1,65 m	3, 1', 3'
3'	13,49	0,92 t (7,0)	1', 2'

^ađo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz.