

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Lê Hoàng

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC, HOẠT TÍNH
GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA LOÀI HẢI SÂM *Stichopus horrens*
VÀ *Holothuria edulis* Ở VÙNG BIỂN TRUNG BỘ VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ -
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: GS. VS. Châu Văn Minh

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Hoài Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại hội đồng chấm luận án Tiến sĩ cấp Học
viện họp tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Vào hồi: giờ ngày tháng năm 2023

Có thể tìm hiểu Luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học
và Công nghệ Việt Nam

- Thư viện Quốc gia

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Trái đất là hành tinh của các đại dương với trên 70% diện tích bề mặt được bao phủ bởi nước mặn và đại dương cũng chiếm hơn 90% thể tích khu vực sinh sống của trái đất. Vì vậy có thể nói rằng môi trường biển sở hữu sự đa dạng sinh học loài lớn nhất với gần 300.000 loài sinh vật khác nhau. Biển và đại dương là nguồn tài nguyên thiên nhiên vô cùng quý báu, đảm bảo cung cấp nguyên liệu cho nhiều ngành công nghiệp thiết yếu như thực phẩm, mỹ phẩm, hóa dược...

Nước ta được thiên nhiên ưu đãi với hơn 1 triệu km² vùng biển, có khí hậu nhiệt đới gió mùa, mật độ cửa sông dày đặc tạo nên những điều kiện lý tưởng cho hệ sinh vật biển rất đa dạng về thành phần loài và trữ lượng dồi dào. Đã có một số công trình nghiên cứu về các hợp chất thiên nhiên từ sinh vật biển từ những năm 1970. Tuy nhiên, so sánh với tiềm năng sinh vật biển rất lớn ở nước ta thì đến nay những công trình nghiên cứu trong nước vẫn còn quá ít và tản mát, đặc biệt là các nghiên cứu về động vật Da gai. Tính đến hiện tại, đã có khoảng 7.000 loài thuộc ngành Da gai (Echinoderm) đã được ghi nhận. Số lượng loài thuộc ngành này không nhiều nhưng số lượng các cá thể các động vật thuộc ngành Da gai là rất lớn, đặc biệt là ở các vùng nước sạch và nước sâu. Các động vật thuộc ngành này thường mang những đặc điểm sinh học thú vị và luôn nhận được những sự quan tâm nghiên cứu từ các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau như các nghiên cứu về quá trình phát triển, sinh học nguồn gen và đặc biệt là nghiên cứu về các hợp chất có nhiều giá trị dược dụng.

Các động vật thuộc ngành Da gai được chia thành năm lớp: Asteroidea (Sao biển), Ophiuroidea (Đuôi rắn), Crinoidea (Huệ biển), Holothuroidea (Hải sâm, Dưa chuột biển) và Echinoidea (Nhím biển). Trong đó, hải sâm đã được sử dụng lâu đời trong nền y học phương đông như một phương thuốc bồi bổ cơ thể và được mệnh danh là “sâm của biển”. Các loài hải sâm cũng được chế biến thành nhiều món ăn có giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao. Ở Việt Nam, tính đến năm 2022 các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học mới chỉ được tiến hành trên vài loài hải sâm. Như vậy có thể thấy, việc nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài này vẫn còn rất hạn chế. Nhằm tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học từ động vật Da gai góp phần tạo cơ sở tạo ra sản phẩm có tác dụng hỗ trợ tăng cường sức khỏe, luận án: “*Nghiên cứu thành phần hoá học, hoạt tính gây độc tế bào của loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* ở vùng biển Trung bộ Việt Nam*” đã được tiến hành với các nội dung chính sau:

2. Mục tiêu tổng quát của luận án

1. Xác định được thành phần hóa học của hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* sinh sống tại vùng biển Trung bộ Việt Nam.

2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư các hợp chất phân lập được nhằm định hướng cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

3. Các nội dung chính của luận án

1. Phân lập các hợp chất từ hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* sinh sống tại vùng biển Trung bộ Việt Nam.

2. Xác định cấu trúc các hợp chất đã phân lập từ hai loài hải sâm trên.

3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư các hợp chất phân lập được.

4. Bố cục của luận án

Mở đầu (02 trang): giới thiệu chung về luận án. Chương 1: Tổng quan (25 trang): phân tích đánh giá về tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước, các vấn đề có liên quan đến đối tượng nghiên cứu, các vấn đề còn tồn tại và nội dung cần giải quyết. Chương 2: Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu (07 trang): trình bày các phương pháp chủ yếu sử dụng trong thực nghiệm, phương pháp phân tích đánh giá kết quả bằng các kỹ thuật. Chương 3: Thực nghiệm và Kết quả (11 trang): trình bày mô hình thí nghiệm và kết quả đạt được. Chương 4: Thảo luận và Kết quả: xử lý và phân tích số liệu đưa ra nhận xét và đánh giá về kết quả thông qua số liệu thực nghiệm (90 trang). Kết luận và Kiến nghị (02 trang). Những đóng góp mới của luận án (01 trang). Danh mục công trình công bố của tác giả liên quan đến luận án (01 trang). Tài liệu tham khảo (139 tài liệu, 11 trang) và Phụ lục các phở (55 trang).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Trình bày những tổng quan nghiên cứu trên thế giới và trong nước về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài hải sâm liên quan đến đối tượng nghiên cứu của luận án.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* được thu thập tại Hải Vân - Sơn Trà, tỉnh Thừa Thiên - Huế và khu vực Cù Lao Chàm, tỉnh Quảng Nam từ tháng 05-8/2016 và được GS. TS. Đỗ Công Thung (Viện Tài nguyên và Môi trường biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) xác định tên khoa học, tiêu bản lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hải sâm - *Stichopus horrens*
Selenka, 1867



Hải sâm - *Holothuria*
(*Halodeima*) *edulis* Lesson, 1830

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

Các mẫu hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* được rửa sạch nhiều lần bằng nước cất để loại muối và tạp bản. Để ráo nước ở nhiệt độ phòng, sau đó được xay nhỏ, chiết siêu âm hoặc chiết nóng ở nhiệt độ 45-60°C với methanol. Dịch chiết gom lại và loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết MeOH. Cặn chiết này được hoà với nước rồi chiết lỏng-lỏng với CH_2Cl_2 thu được cặn chiết CH_2Cl_2 và phần dịch nước.

2.2.2. Phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất

Việc ngâm chiết, phân lập, tinh chế các phần cặn chiết của hai loài hải sâm *S. horrens* và *H. edulis* được thực hiện bằng các phương pháp: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) silica gel với các cỡ hạt khác nhau, sắc ký cột pha đảo RP-18 và Sephadex LH-20...

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

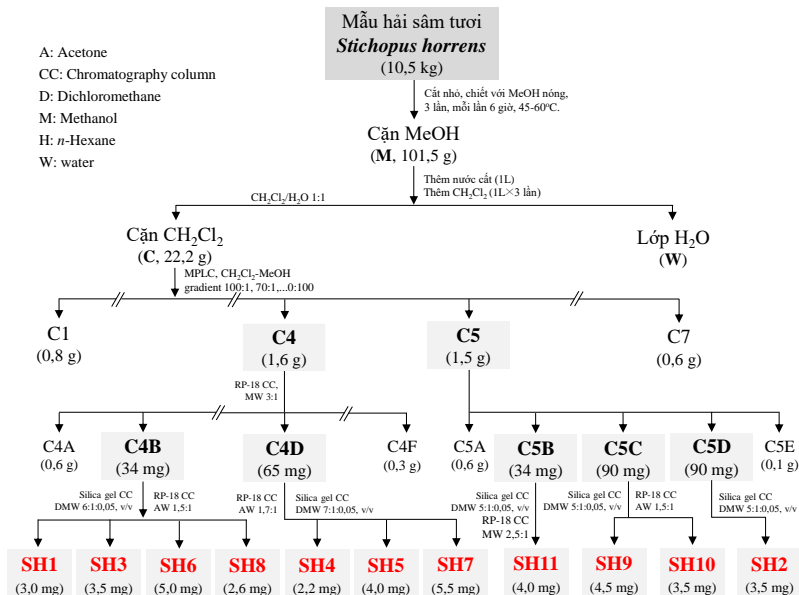
Cấu trúc của hợp chất được xác định bằng sự kết hợp giữa các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại: điểm nóng chảy (Mp), góc quay cực ($[\alpha]_D$), phổ hồng ngoại (IR), phổ khối phun mù điện tử (ESI-MS), phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân: phổ một chiều (1D ^1H , ^{13}C NMR và DEPT) và phổ hai chiều (2D COSY, HSQC, HMBC, NOESY/ROESY và TOCSY)...

2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

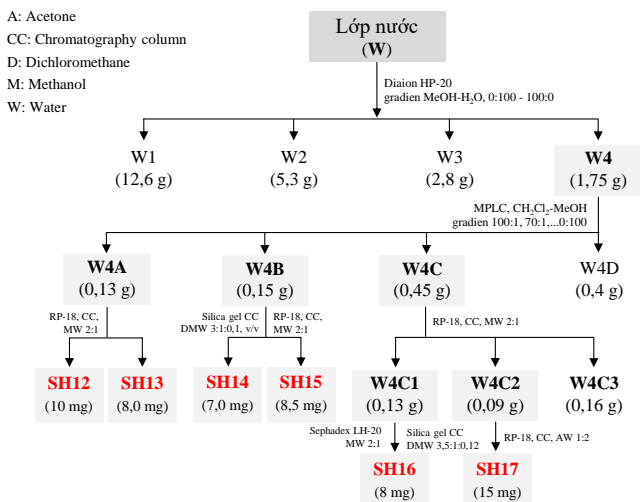
Các hợp chất phân lập được đánh giá hoạt tính gây độc trên năm dòng tế bào ung thư người: tiền liệt tuyến (LNCaP), ung thư vú (MCF7), biểu mô (KB), gan (HepG2) và sắc tố da (SK-Mel-2), sử dụng phương pháp Sulforhodamine B (SRB) của Monks và cộng sự. Các dòng tế bào ung thư do GS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Hawaii và GS. J. Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp. Thực nghiệm được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

3.1. Phân lập các hợp chất từ loài hải sâm *Stichopus horrens*



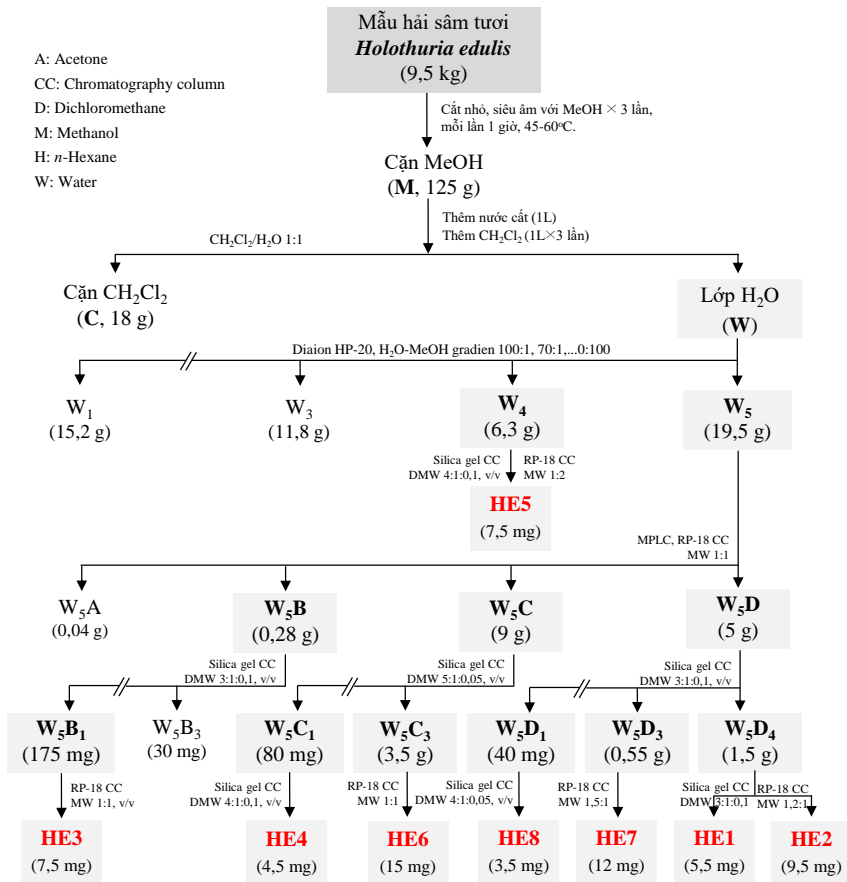
Hình 5. Sơ đồ chiết mẫu và phân lập các chất từ cặn CH₂Cl₂ của *S. horrens*.



Hình 6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lớp nước của *S. horrens*.

Phần này trình bày quá trình, kỹ thuật phân tách và tinh chế 17 hợp chất từ các phân đoạn cận chiết của loài hải sâm *Stichopus horrens* (Hình 5-6).

3.2. Phân lập các hợp chất từ loài hải sâm *Holothuria edulis*



Hình 7. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài *Holothuria edulis*.

Phần này trình bày quá trình, kỹ thuật phân tách và làm sạch 08 hợp chất từ các phân đoạn cận chiết của loài hải sâm *Holothuria edulis* (Hình 7).

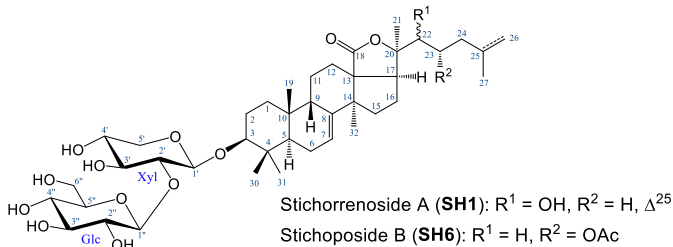
3.3. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất

Phần này trình bày các thông số vật lý và các dữ kiện phổ của 25 hợp chất phân lập từ hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis*.

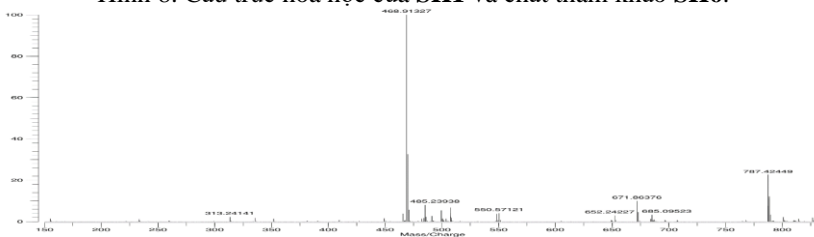
CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

4.1. Thảo luận xác định cấu trúc hóa học từ loài hải sâm *Stichopus horrens*

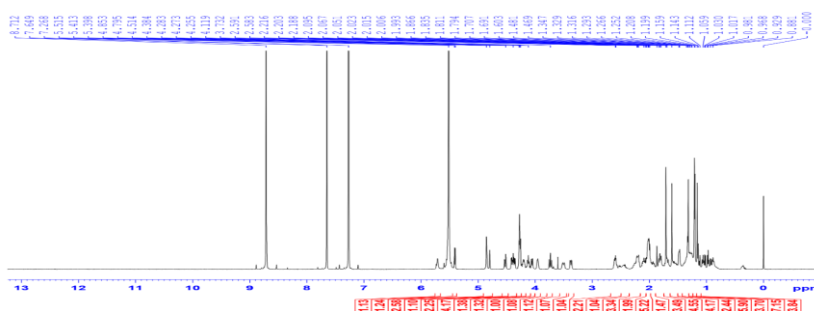
4.1.1. Hợp chất SH1: Stichorrenoside A (hợp chất mới)



Hình 8. Cấu trúc hóa học của **SH1** và chất tham khảo **SH6**.

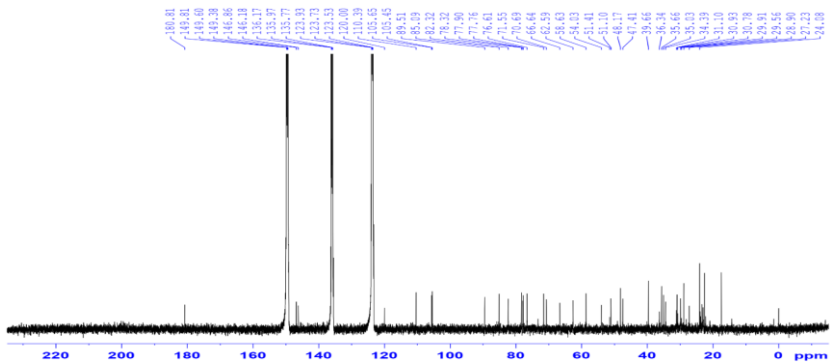


Hình 9. Phổ HR-ESI-MS của **SH1**.

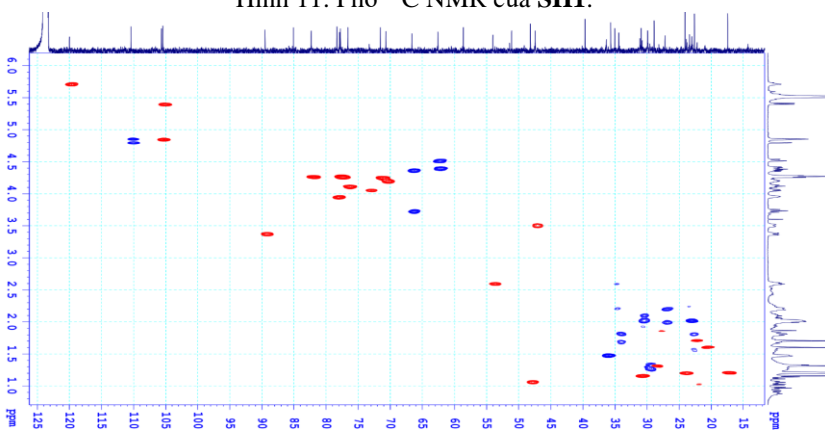


Hình 10. Phổ ^1H NMR của **SH1**.

Hợp chất **SH1** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (Hình 9) xuất hiện peak ion giả phân tử tại m/z 787,42449 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $[\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{NaO}_{13}]^+$, 787,42392) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất này là $\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$. Các phổ NMR của **SH1** đặc trưng cho một hợp chất triterpene diglycoside với sự xuất hiện các tín hiệu của hai carbon anome tại δ_{C} 105,6 (C-1') và 105,4 (C-1), có tương tác HSQC với các proton anome tương ứng

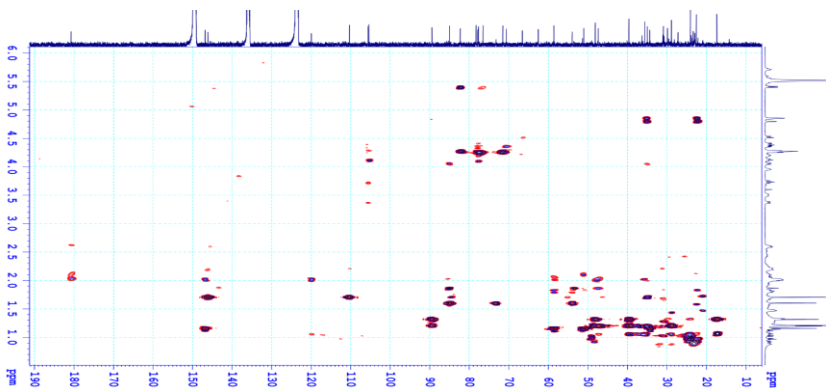


Hình 11. Phổ ^{13}C NMR của SH1.

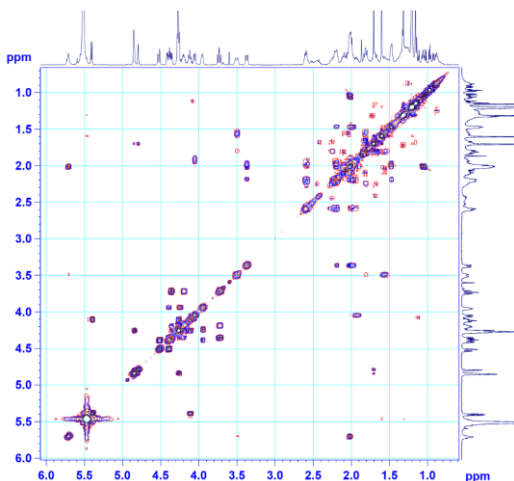


Hình 12. Phổ HSQC của SH1.

tại δ_{H} 4,85 (1H, H-1') và 5,41 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1"). Phân tích phổ ^{13}C NMR và phổ HSQC cho thấy tổng số 41 carbon, trong đó 30 carbon thuộc phần triterpene aglycone bao gồm tín hiệu của hai liên kết olefinic [$\delta_{\text{H/C}}$ 5,71 (1H, br s, H-7)/120,0 (C-7), 146,8 (C-8) và 4,85 (1H, br s, H-26a)/4,79 (1H, br s, H-26b)/110,4 (C-26)], một γ -lactone carbonyl [δ_{C} 180,8 (C-18)], sáu nhóm methyl [δ_{H} 1,20 (3H, s, H-19)/ δ_{C} 24,0 (C-19), 1,60 (3H, s, H-21)/21,0 (C-21), 1,71 (3H, s, H-27)/22,6 (C-27), 1,21 (3H, s, H-30)/17,4 (C-30), 1,33 (3H, s, H-31)/28,9 (C-31) và 1,16 (3H, s, H-32)/30,9 (C-32)], hai nhóm oxymethine [$\delta_{\text{H/C}}$ 3,37 (1H, dd, $J = 3,0, 11,5$ Hz, H-3)/89,5 (C-3) và 4,06 (1H, br d, $J = 9,5$ Hz, H-22)/73,2 (C-22)] và các tín hiệu carbon khác. Những quan sát trên phổ 1D NMR một lần nữa được xác nhận dựa vào các tương tác trên các phổ thực nghiệm 2D HMBC và ^1H - ^1H COSY (Hình 13-14) cho phép gán toàn bộ số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR cho cả hai gốc đường của SH1 (Bảng 7).

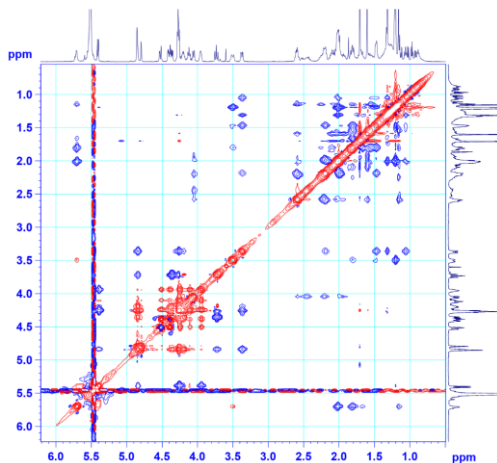


Hình 13. Phổ HMBC của **SH1**.



Hình 14. Phổ COSY của **SH1**.

Phân tích các số liệu NMR này cho thấy sự tương đồng như các số liệu NMR của hợp chất stichoposide B cho phép xác định chuỗi đường là β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside. Vị trí liên kết của đường glucose tại C-2' của đường xylose được chứng minh bằng tương tác HMBC của δ_{H} 5,41 (H-1'') với δ_{C} 82,3 (C-2'). Ngoài ra, các số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR phần aglycone của **SH1** cũng tương tự như các số liệu phổ tương ứng của stichoposide B ngoại trừ sự sai khác ở các tín hiệu liên quan đến phần mạch nhánh. Phần mạch nhánh của **SH1** có các tín hiệu của một nhóm oxymethine [$\delta_{\text{H/C}}$ 4,06 (1H, br d, $J = 9,5$ Hz, H-22)/73,2 (C-22)], hai nhóm methylene [δ_{C} 31,1 (C-23) và 35,0 (C-24)/ δ_{H} 1,92 (H-23a), 2,02 (H-23b),



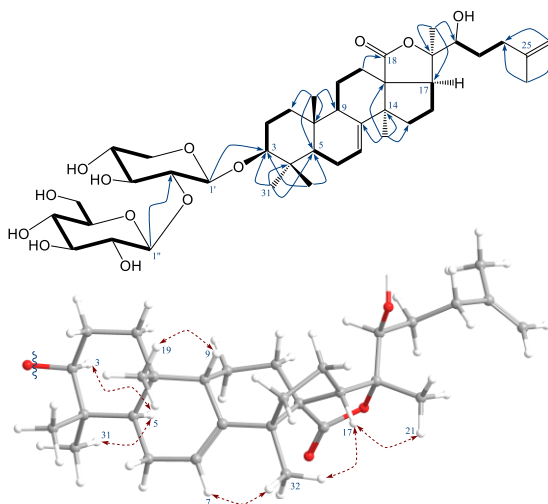
Hình 15. Phổ ROESY của **SH1**.

2,21 (H-24a) và 2,59 (H-24b), mỗi tín hiệu 1H, m), một liên kết đôi bị thế hai vị trí nằm ở đầu mạch [δ_C 146,2 (C, C-25) và 110,4 (CH₂, C-26)/ δ_H 4,79 (H-26a) và 4,85 (H-26b), mỗi tín hiệu 1H, br s) và một nhóm *tert*-methyl [$\delta_{H/C}$ 1,71 (3H, s, H-27)/22,6 (C-27)]. Các tương tác HMBC của H-21 với C-17, C-20 và C-22; H-26 với C-24 và C-27 và H-27 với C-24, C-25 và C-26 cùng với các tương tác trên phổ ¹H-¹H COSY của H-22/H-23/H-24, chứng minh vị trí của một nhóm oxymethine tại C-22, liên kết đôi tại vị trí C-25/C-26 và nhóm *tert*-methyl tại C-27. Các tương tác trên phổ 2D COSY giữa H-1/H-2/H-3, H-5/H-6/H-7, H-9/H-11/H-12, H-15/H-16/H-17 và H-22/H-23/H-24, cùng với các tương tác thuộc phần diglycoside như H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5' và H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6'' cho phép ghép các mảnh cấu trúc của **SH1** (Hình 14). Phân tích các tương tác COSY và HMBC khác (Hình 16) cho phép khẳng định được cấu trúc phẳng của **SH1**. Hóa lập thể phần khung triterpene aglycone của **SH1** được khẳng định bằng phổ ROESY. Tương tác ROESY của H-5 với H-3 và H₃-31 chứng minh cho lập thể α thường gặp của H-3. Proton H-17 có tương tác với cả hai proton H₃-21 và H₃-32 chứng minh cho lập thể α của H-17. Ngoài ra, lập thể của H-9 cũng được xác định dựa trên tín hiệu tương tác ROESY nhận được giữa H-9 với H₃-19 (Hình 15). Tuy nhiên, chưa thể xác định cấu hình của 22-OH bằng phổ NMR do sự khác biệt về chuyển dịch hóa học cho các tín hiệu tương ứng giữa các chất tương tự với lập thể 22(*R*)- và 22(*S*)-hydroxyl không thật sự rõ ràng. Từ tất cả các phân tích đã nêu, cấu trúc hóa học của **SH1** được chứng minh là 3 β -O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-22 ξ -hydroxyholost-7,25-diene. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside A.

Bảng 7. Số liệu phổ NMR của **SH1** và hợp chất tham khảo.

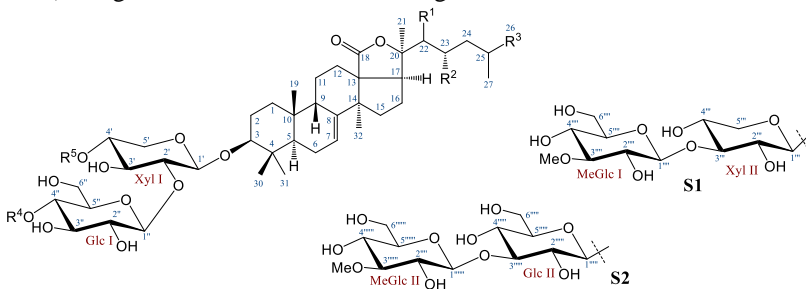
Vị trí	^a δ _C	δ _C ^{b,c}	δ _H ^{b,d} dạng peak (<i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycon</i>				
1	36,4	36,3	1,47 m	
2	27,1	27,2	1,98 m/2,19 m	
3	89,3	89,5	3,37 dd (3,0, 11,5)	
4	39,6	39,6	-	
5	48,4	48,2	1,06 t (7,5)	
6	23,4	23,4	2,02 m	
7	120,0	120,0	5,71 br s	
8	146,7	146,8	-	
9	47,6	47,4	3,50 br d (13,5)	
10	35,7	35,7	-	
11	23,0	23,0	1,55 m/1,81 m	
12	30,6	30,7	2,02 m/2,10 m	
13	58,7	58,6	-	
14	51,4	51,1	-	
15	34,4	34,4	1,68 m/1,81 m	
16	25,0	23,9	2,23 m/2,45 m	
17	54,5	54,0	2,58 dd (4,5, 10,5)	
18	179,6	180,8	-	
19	24,0	24,0	1,20 s	1, 5, 9, 10
20	82,9	85,1	-	
21	27,1	21,0	1,60 s	17, 20, 22
22	44,3	73,2	4,06 br d (9,5)	
23	68,7	31,1	1,92 m/2,02 m	
24	45,5	35,0	2,21 m/2,59 m	
25	24,8	146,1	-	
26	23,1	110,4	4,85 br s/4,79 br s	
27	22,3	22,6	1,71 s	24, 25, 26
30	17,4	17,4	1,21 s	3, 4, 5, 31
31	29,0	28,9	1,33 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,9	1,16 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl</i>				
1'	105,5	105,6	4,85*	3
2'	82,9	82,3	4,26*	
3'	77,8	77,9	4,26*	
4'	70,8	70,7	4,20 m	
5'	66,4	66,6	3,73 dd (11,0, 10,5)	
			4,37 dd (5,0, 11,0)	
<i>Glc</i>				
1''	105,9	105,5	5,41 d (7,5)	2'
2''	76,5	76,6	4,12 dd (7,5, 9,0)	
3''	77,9	77,8	4,26*	
4''	72,0	71,6	4,25*	
5''	77,8	78,3	3,95 m	
6''	63,0	62,6	4,40 dd (5,0, 12,0)	
			4,53 dd (2,5, 12,0)	

^aδ_C của stichoposide B, ^bđo trong pyridine-d₅, ^c125 MHz và ^d500 MHz. *Tín hiệu bị chồng lấp.



Hình 16. Tương tác COSY, HMBC và ROESY chính của **SH1**.

Chi tiết xác định cấu trúc 16 hợp chất còn lại (**SH5-SH8** và **SH10-SH17**) trong luận án và được tóm tắt trong Hình 67.



Sticherrenoside A (**SH1**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}_2$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = R^5 = \text{H}$

Sticherrenoside B (**SH2**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}_2$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = \text{NaSO}_3$, $R^5 = \text{H}$

Sticherrenoside C (**SH3**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OAc}$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = R^5 = \text{H}$

Sticherrenoside E (**SH9**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OAc}$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{H}$

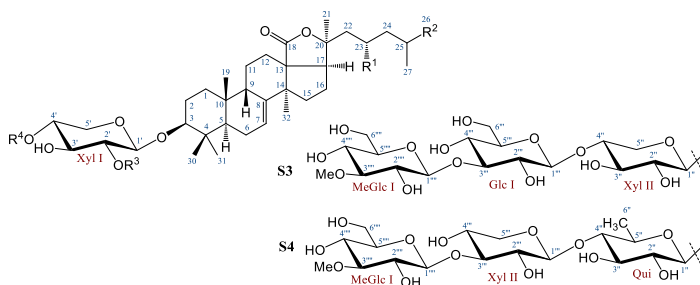
Thelenotaside B (**SH10**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OAc}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{H}$

Deacetyl thelenotaside B (**SH11**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{H}$

Stichloroside B₁ (**SH12**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OAc}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{S2}$

Stichloroside B₂ (**SH13**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OAc}$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{S2}$

Deacetylstichloroside B₁ (**SH14**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{CH}_2$, $R^4 = \text{S1}$, $R^5 = \text{S2}$



Stichorrenoside D (**SH4**): $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_2$, $R^3 = \text{Xyl}$, $R^4 = \text{H}$

Stichoposide A (**SH5**): $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{Qui}$, $R^4 = \text{H}$

Stichoposide B (**SH6**): $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{Glc}$, $R^4 = \text{H}$

3 β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1-2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxyholost-7-ene (**SH7**): $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{Xyl}$, $R^4 = \text{H}$

3 β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1-2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene (**SH8**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{Xyl}$, $R^4 = \text{H}$

Stichloroside A₁ (**SH15**): $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{S3}$, $R^4 = \text{S2}$

Deacetylstichloroside A₁ (**SH16**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{S3}$, $R^4 = \text{S2}$

Deacetyllichloroside C₁ (**SH17**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{S4}$, $R^4 = \text{S2}$

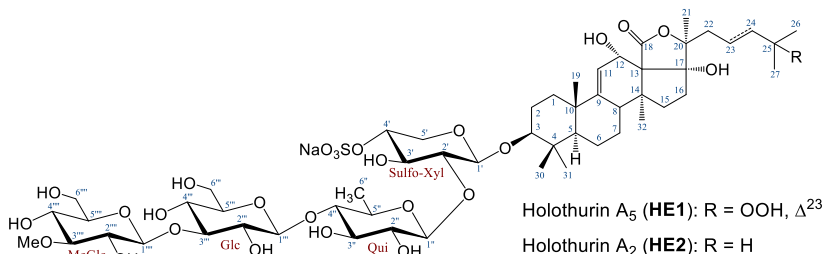
Hình 67. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *Stichopus horrens* (Các hợp chất mới: **SH1- SH4** và **SH9**. Các hợp chất lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên: **SH7, SH8, SH11** và **SH17**).

Các hợp chất phân lập được từ loài hải sâm *Stichopus horrens* thuộc khung cấu trúc holostane triterpene glycoside (Hình 67) là nhóm chất đặc trưng được biết đến từ các loài hải sâm. Tất cả các hợp chất được xác định cấu trúc đều có nhóm 18(20)-lactone và liên kết $\Delta^7(8)$ trong phần aglycone. Chuỗi đường của chúng có từ hai đến sáu monosaccharide bao gồm D-xylose, D-glucose, D-quinovose và methyl-glucose. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất mới này cung cấp thông tin liên quan đến sự đa dạng của sự chuyển đổi sinh hóa bên mạch nhánh và trong chuỗi glycoside từ các loài hải sâm thuộc giống *Stichopus*. Ngoài ra, các kết quả cho thấy có sự tương đồng cao với các nghiên cứu công bố trước đây.

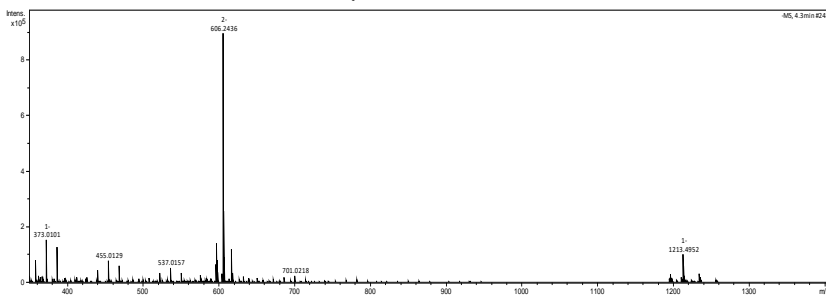
4.2. Thảo luận xác định cấu trúc hóa học từ loài hải sâm *Holothuria edulis*

4.2.1. Hợp chất **HE1**: *Holothurin A₅* (hợp chất mới)

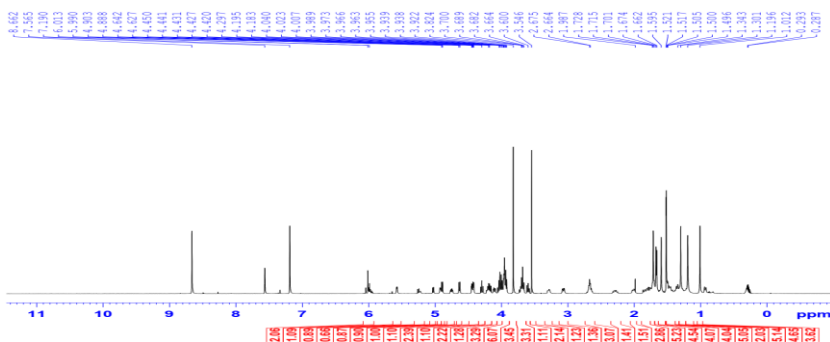
Hợp chất **HE1** được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử của nó được xác định là $\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{NaO}_{28}\text{S}$ với sự xuất hiện peak ion giả phân tử $[\text{M} - \text{Na}]^-$ tại m/z 1213,49521 trên phổ HR-ESI-MS (Hình 69)



Hình 68. Cấu trúc hóa học của **HE1** và chất tham khảo **HE2**.

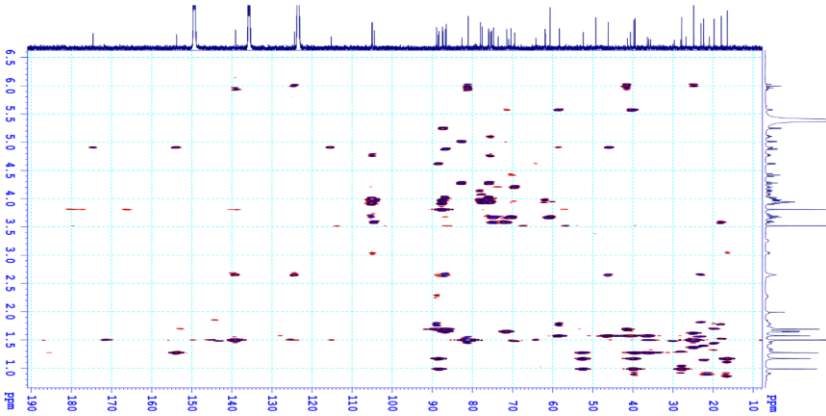


Hình 69. Phổ HR-ESI-MS của **HE1**.

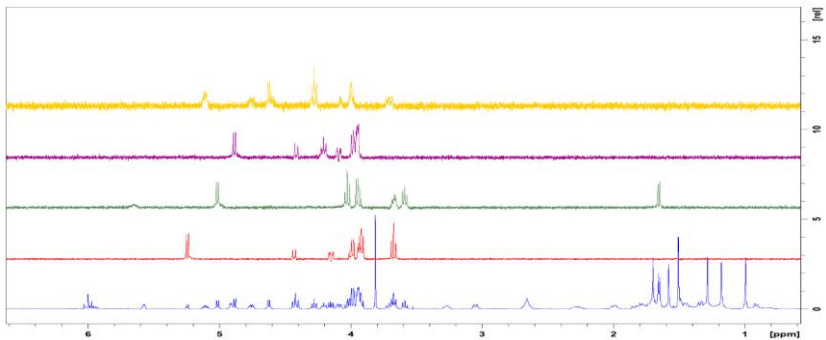


Hình 70. Phổ ¹H NMR của **HE1**.

cũng như peak ion $[M + Na]^+$ tại m/z 1259 trên phổ ESI-MS. Phổ ¹H NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của bốn proton anome [δ_H 4,62 (H-1'), 5,01 (H-1''), 4,88 (H-1''') và 5,25 (H-1'''), mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 7,5$ hoặc 8,0 Hz], có tương tác HSQC với các carbon tương ứng [δ_C 105,0 (C-1' và C-1''), 104,4 (C-1''') và 105,1 (C-1''')], chứng minh sự có mặt của bốn gốc đường. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HSQC, HMBC, ¹H-¹H COSY cùng với 1D và 2D TOCSY cho phép gán chính xác các số liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của cả bốn gốc đường được tóm tắt ở Bảng 24.



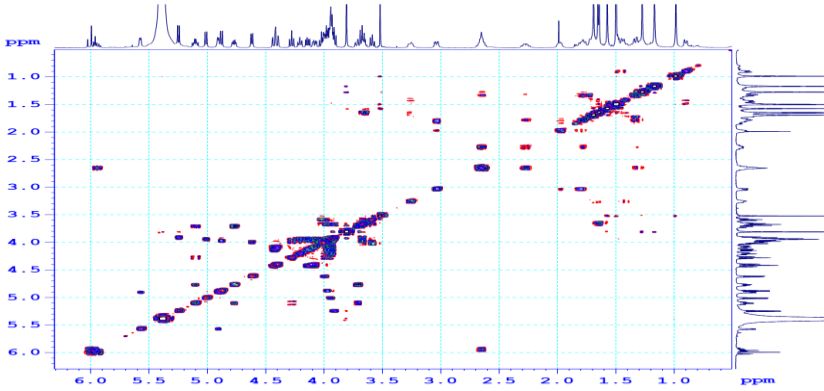
Hình 73. Phổ HMBC của **HE1**.



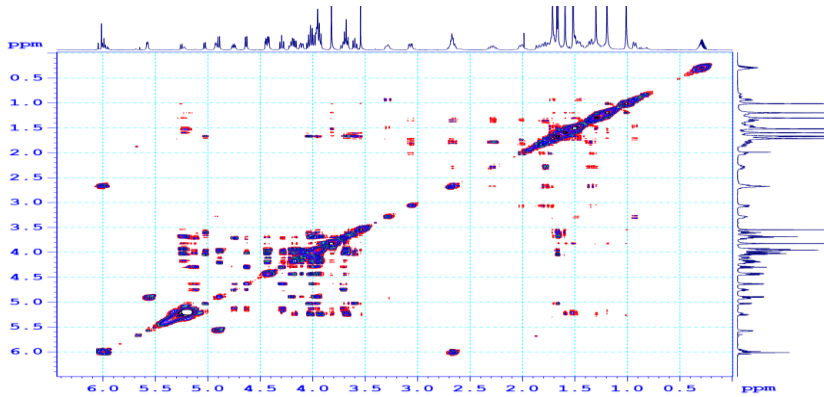
Hình 74. Phổ 1D TOCSY của **HE1**.

ở **HE1**. Tín hiệu ^{13}C NMR tại vị trí C-25 bị dịch chuyển rất mạnh về phía vùng trường thấp (δ_{C} 81,1) khi so với tín hiệu tương ứng của leucospirotaside A (δ_{C} 69,0) và holothurin B₄ (δ_{C} 69,5), chứng minh cho sự có mặt của nhóm hydroperoxy tại C-25. Các tương tác 2D COSY của H-22/H-23/H-24 cùng với các tương tác HMBC của H₃-21 với C-17, C-20 và C-22; H₃-26 và H₃-27 với C-24 và C-25 xác nhận chính xác cấu trúc mạch nhánh của **HE1**. Vị trí liên kết của chuỗi đường tại C-3 của aglycone được chứng minh bằng tương tác xa HMBC của δ_{H} 4,62 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1') với δ_{C} 88,4 (C-3).

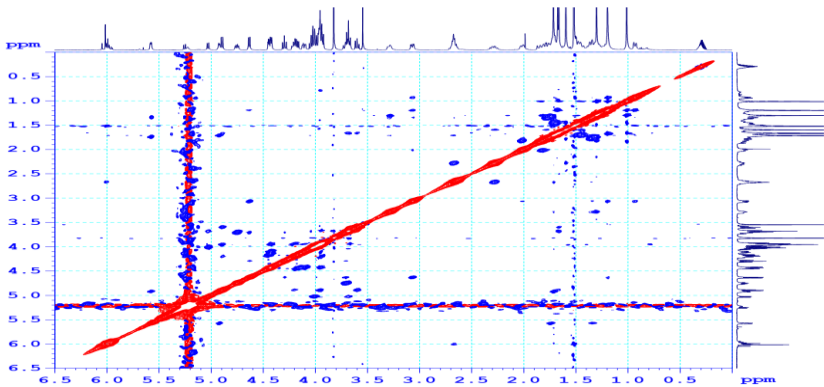
Cấu hình tương đối các trung tâm bất đối của phần aglycone trong **HE1** được chứng minh dựa vào các tương tác trên phổ thực nghiệm ROESY. Tương tác giữa H-3 với H-5 và H₃-31 và H-1' xác nhận cấu hình α ở C-3. Ngoài ra, các tương tác giữa H₃-19 với H₃-30 cho phép phân định rõ ràng cùng phía và cấu hình β của các nhóm *tert*-methyl tại C-19 và C-30.



Hình 75. Phổ COSY của HE1.



Hình 76. Phổ 2D TOCSY của HE1.



Hình 77. Phổ ROESY của HE1.

Như vậy, cấu trúc hóa học của hợp chất **HE1** được xác định là 3β - O -[3- O -methyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-quinovopyran- $osyl$ -(1 \rightarrow 2)-4- O -sodiumsulfate- β -D-xylopyranosyl]-25-hydroperoxyholost-9(11), 23 E -diene-12 α ,17 α -diol. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là holothurin A₅. Sự xuất hiện của nhóm -OOH khá hiếm gặp trong tự nhiên và tính đến hiện tại đây là trường hợp đầu tiên phát hiện được sự xuất hiện của nhóm thế này trong các hợp chất saponin từ các loài hải sâm.

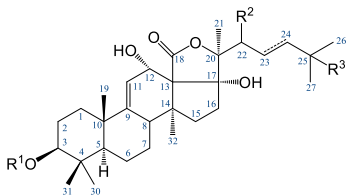
Bảng 24. Số liệu phổ NMR của **HE1** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_C$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ($J = \text{Hz}$)	HMBC
<i>Aglycon</i>				
1	36,5	36,1	1,30 m/1,71 m	
2	27,2	26,7	1,80 m/1,99 m	
3	88,8	88,4	3,04 dd (4,0, 11,5)	
4	40,1	39,7	-	
5	52,8	52,4	0,90 br d (11,0)	
6	21,3	20,9	1,45 m/1,66 m	
7	28,5	28,1	1,43 m/1,70 m	
8	41,0	40,6	3,27 dd (5,5, 12,0)	
9	154,4	153,8	-	
10	39,9	39,4	-	
11	115,4	115,2	5,57 br d (5,0)	
12	71,0	71,0	4,91 d (5,0)	18
13	58,7	58,4	-	
14	46,4	46,1	-	
15	36,9	36,4	1,33 m/1,78 m	
16	39,2	35,6	2,28 m/2,64 m	
17	87,5	89,0	-	
18	173,7	174,6	-	
19	22,7	22,3	1,28 s	1, 5, 9, 10
20	92,4	86,5	-	
21	21,5	23,0	1,69 s	17, 20, 22
22	208,0	41,3	2,64 m	
23	34,1	124,4	5,95 ddd (6,5, 9,0, 15,5)	
24	34,7	139,1	6,01 d (15,5)	
25	81,4	81,1	-	
26	26,2	24,9	1,49 s	24, 25, 27
27	26,1	24,8	1,50 s	24, 25, 26
30	16,9	16,5	0,98 s	3, 4, 5, 31
31	28,2	27,8	1,19 s	3, 4, 5, 30
32	20,0	19,8	1,57 s	8, 13, 14, 15
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,4	105,0	4,62 d (7,5)	3
2'	83,5	82,6	4,00 dd (7,5, 9,0)	

Vị trí	δ_C^a	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ($J = \text{Hz}$)	HMBC
3'	75,4	75,4	4,28 t (9,0)	
4'	76,5	75,9	5,10 m	
5'	64,4	64,2	3,71 dd (11,0, 11,5) 4,77 dd (5,0, 11,5)	
<i>Qui</i>				
1"	105,6	105,0	5,01 d (8,0)	2'
2"	75,6	75,9	3,94 dd (8,0, 9,0)	
3"	75,9	75,2	4,02 t (9,0)	
4"	86,8	86,7	3,59 t (9,0)	
5"	72,1	71,4	3,67 dd (9,0, 6,0)	
6"	18,2	17,9	1,64 d (6,0)	4", 5"
<i>Glc</i>				
1'''	105,0	104,4	4,88 d (8,0)	4"
2'''	74,2	73,6	3,97 dd (8,0, 9,0)	
3'''	88,1	87,3	4,21 t (9,0)	
4'''	69,6	69,5	3,93*	
5'''	77,8	77,6	3,94*	
6'''	61,9	61,8	4,08 dd (5,5, 12,0) 4,41 br d (12,0)	
<i>Ome-Glc</i>				
1''''	106,0	105,1	5,25 d (8,0)	3'''
2''''	75,1	74,8	3,92 dd (8,0, 9,0)	
3''''	88,1	87,5	3,67 t (9,0)	
4''''	70,7	70,4	3,98 t (9,0)	
5''''	78,4	78,0	3,94 m	
6''''	62,2	61,9	4,14 dd (5,5, 12,0) 4,43 dd (2,0, 12,0)	
3''''-OMe	61,0	60,7	3,81 s	3''''

δ_C^a của marmoroside C, $\delta_C^{b,d}$ đo trong pyridine- d_5 , $^{125} \text{MHz}$ và $^{500} \text{MHz}$. *Tín hiệu bị chồng lấp.

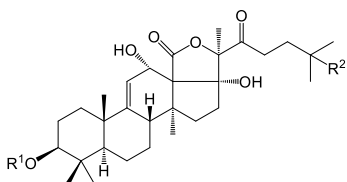
Các hợp chất từ loài *Holothuria edulis* thuộc khung cấu trúc holostane triterpene glycoside đều có nhóm 18(20)-lactone và liên kết $\Delta^{9,11}$ trong phần aglycone (Hình 86). Chuỗi đường của chúng có từ một đến bốn monosaccharide bao gồm D-xylose, D-quinovose, D-glucose và methyl-glucose, trong đó có cả gốc đường đã bị sulfate hóa. Kết quả phân lập và xác định hợp chất mới (**HE1**) cung cấp thông tin liên quan đến sự đa dạng của quá trình chuyển đổi sinh hóa bên mạch nhánh và trong chuỗi glycoside từ các loài hải sâm thuộc chi *Holothuria*. Ngoài ra, các kết quả cho thấy có sự tương đồng cao với các nghiên cứu công bố trước đó liên quan đến lớp Holothuroidea nói riêng và các loài hải sâm nói chung. Đối với các glycoside có liên kết đôi $\Delta^{9,11}$, sự hiện diện của 18(20)-lactone và một nhóm oxy gần với liên kết đôi cùng với nhóm 16-OH có vai trò rất quan trọng như tác nhân trung gian cho hoạt tính sinh học.



Holothurin A₅ (**HE1***): Δ^{23} , $R^1 = S1$, $R^2 = H_2$, $R^3 = OOH$

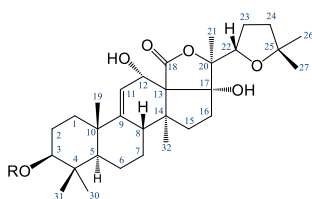
Holothurin A₂ (**HE2**): $R^1 = S1$, $R^2 = H_2$, $R^3 = H$

Marmoroside C (**HE3**): $R^1 = S1$, $R^2 = O$, $R^3 = OAc$



Moebioside A (**HE4**): $R^1 = S2$, $R^2 = OAc$

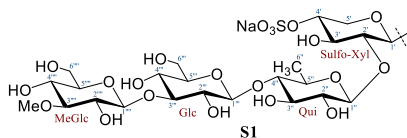
Leucospilotaside A (**HE5**): $R^1 = S2$, $R^2 = OH$



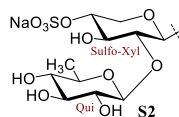
Holothurin A (**HE6**): $R = S1$

Holothurin B (**HE7**): $R = S2$

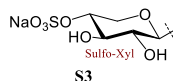
Leucospilotaside C (**HE8**): $R = S3$



S1



S2



S3

(*Hợp chất mới)

Hình 86. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *Holothuria edulis*.

Chi tiết xác định cấu trúc 07 hợp chất còn lại (**HE2-HE8**) trong luận án và được tóm tắt trong Hình 86.

4.3. Thảo luận đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

4.3.1. Hoạt tính gây độc tế bào (GĐTB) ung thư

Phép thử hoạt tính gây độc tế bào thực chất là để đánh giá tỷ lệ tế bào sống/chết của tế bào sau khi được cho tác dụng với các mẫu thử nghiệm. Đây là phép thử đầu tiên và cơ bản nhất trong nghiên cứu, sàng lọc các hợp chất thiên nhiên nhằm phát triển các loại thuốc hoặc các sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư (TBUT) là LNCaP, MCF7, KB, HepG2 và SK-Mel-2 của tất cả các hợp chất đã được phân lập từ hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* được tóm tắt ở Bảng 32. Kết quả hai hợp chất stichloroside B₁ (**SH12**) và deacetylstichloroside C₁ (**SH17**) từ loài hải sâm *S. horrens* có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên tất cả năm dòng tế bào ung thư nêu trên với giá trị IC₅₀ từ 0,10 đến 0,34 μM , mạnh hơn cả chất đối chứng dương ellipticine với giá trị IC₅₀ từ 1,34 đến 1,95 μM .

Các hợp chất **SH4**, **SH5**, **SH7**, **SH10**, **SH13–SH16**, **HE2**, **HE6** và **HE7** cũng thể hiện hoạt tính mạnh trên năm dòng tế bào ung thư đã nêu trên

Bảng 32. Giá trị IC₅₀ của các chất triterpene saponin trên năm dòng tế bào.

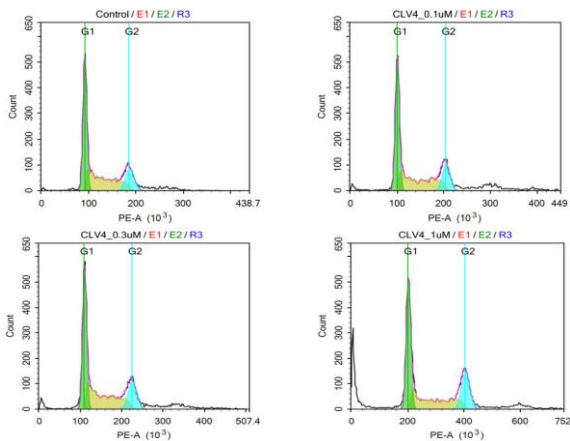
Hợp chất	Giá trị IC ₅₀ (μM) trên các dòng tế bào				
	LNCaP	MCF7	KB	HepG2	SK-Mel-2
SH1	51,56 ± 4,19	41,86 ± 4,21	33,48 ± 2,20	37,93 ± 4,55	43,53 ± 1,66
SH2	51,47 ± 1,45	59,52 ± 4,58	45,44 ± 2,00	55,28 ± 4,75	67,15 ± 4,70
SH3	10,06 ± 0,47	7,25 ± 0,78	11,00 ± 0,20	7,03 ± 0,88	10,82 ± 0,72
SH4	3,13 ± 0,40	2,11 ± 0,27	2,36 ± 0,36	1,92 ± 0,61	2,27 ± 0,22
SH5	3,02 ± 0,33	2,12 ± 0,30	2,82 ± 0,29	2,97 ± 0,37	2,70 ± 0,23
SH6	7,60 ± 0,30	6,36 ± 0,22	8,86 ± 0,24	5,28 ± 0,25	5,77 ± 0,48
SH7	2,70 ± 0,28	2,08 ± 0,44	3,11 ± 0,32	2,04 ± 0,73	2,21 ± 0,19
SH8	59,31 ± 4,77	52,24 ± 2,96	48,42 ± 5,22	53,75 ± 5,08	41,94 ± 1,74
SH9	9,35 ± 0,23	8,95 ± 0,49	7,48 ± 0,22	6,87 ± 0,25	10,59 ± 0,44
SH10	1,90 ± 0,13	1,56 ± 0,23	0,95 ± 0,08	1,33 ± 0,10	1,14 ± 0,11
SH11	11,62 ± 1,05	11,45 ± 0,30	10,72 ± 0,18	8,45 ± 0,23	10,25 ± 0,61
SH12	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02
SH13	1,40 ± 0,21	0,85 ± 0,23	1,36 ± 0,18	0,96 ± 0,16	1,31 ± 0,19
SH14	1,45 ± 0,16	1,08 ± 0,04	1,51 ± 0,22	1,16 ± 0,06	1,38 ± 0,08
SH15	1,24 ± 0,08	1,04 ± 0,14	1,22 ± 0,14	1,20 ± 0,13	0,85 ± 0,10
SH16	1,32 ± 0,18	1,12 ± 0,08	1,63 ± 0,20	1,18 ± 0,11	1,25 ± 0,05
SH17	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,26 ± 0,06
HE1	66,22 ± 6,32	49,08 ± 6,44	46,65 ± 2,28	57,53 ± 6,27	63,53 ± 3,49
HE2	0,96 ± 0,09	0,81 ± 0,07	0,75 ± 0,09	0,76 ± 0,06	0,84 ± 0,05
HE3	82,75 ± 3,91	76,45 ± 6,29	67,31 ± 6,93	75,76 ± 7,60	68,55 ± 3,18
HE4	57,61 ± 5,54	55,99 ± 6,43	64,72 ± 4,94	59,59 ± 3,38	61,65 ± 5,67
HE5	>100	91,47 ± 3,30	91,27 ± 5,41	93,56 ± 4,95	>100
HE6	1,30 ± 0,18	2,29 ± 0,47	1,79 ± 0,33	2,03 ± 0,49	2,49 ± 0,21
HE7	2,74 ± 0,29	3,35 ± 0,47	2,75 ± 0,31	2,63 ± 0,28	3,66 ± 0,41
HE8	>100	>100	>100	>100	>100
Elipicine	1,95 ± 0,20	1,34 ± 0,16	1,79 ± 0,28	1,38 ± 0,28	1,91 ± 0,20

với giá trị IC₅₀ từ 0,75 đến 3,66 μM. Ba hợp chất **SH3**, **SH9** và **SH11** có hoạt tính tốt với giá trị IC₅₀ từ 5,28 đến 11,62 μM, trong khi các hợp chất **SH1**, **SH8**, **HE1**, **HE3** và **HE4** có hoạt tính trung bình hoặc yếu với IC₅₀ từ 33,48 đến 82,75 μM. Hợp chất **HE5** chỉ có hoạt tính rất yếu trên ba dòng TBUT là MCF7 (IC₅₀ = 91,47 ± 3,30 μM), KB (IC₅₀ = 91,27 ± 5,41 μM) và HepG2 (IC₅₀ = 93,56 ± 4,95 μM) còn các hợp chất **HE8** không có hoạt tính (IC₅₀ > 100 μM) trên tất cả năm dòng tế bào ung thư được thử nghiệm. Xem xét cấu trúc hóa học của các hợp chất saponin đã phân lập được cho thấy, sự có mặt

của nhóm -OAc hoặc -OH tại vị trí C-25 có thể làm suy giảm đáng kể hoạt tính GĐTB của của các hợp chất này trên các dòng TBUT được thử nghiệm.

4.3.2. Khả năng diệt tế bào ung thư của deacetylstichloroside C₁ (SH17) theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học

4.3.2.1. Tác động của hợp chất SH17 đến chu kì tế bào ung thư vú người MCF7



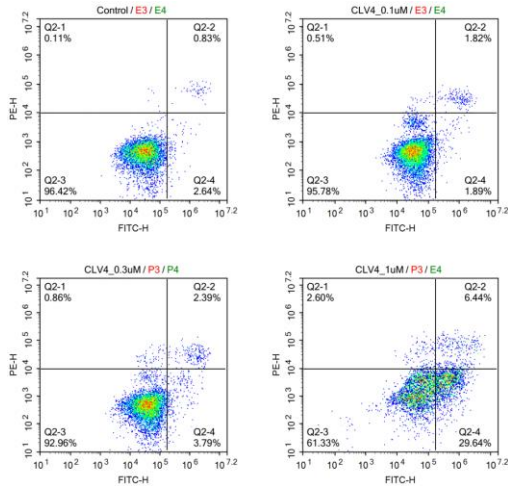
Hình 87. Tác động của hợp chất SH17 đến chu kì tế bào MCF7.

Bảng 33. Tỷ lệ (%) tế bào MCF7 trong pha G₀/G₁, S, G₂/M và apoptosis (sub-G₁) sau 48 giờ cảm ứng với hợp chất SH17 ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 μM.

Mẫu	Tế bào ở các pha của chu trình phân bào (%)			
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	sub-G ₁
Control	40,33	34,96	15,86	1,23
SH17_0,1 μM	37,29	31,18	14,82	2,86
SH17_0,3 μM	35,84	30,64	16,09	3,79
SH17_1,0 μM	32,52	24,82	18,05	16,88

Phân tích tế bào cho thấy, tỷ lệ tế bào tăng lên ở giai đoạn sub-G₁ lần lượt là 2,86, 3,79 và 16,88% (Hình 87 và Bảng 33) khi được xử lý với hợp chất SH17 ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 μM. Đồng thời, phần trăm tế bào ở pha G₀/G₁ và pha S giảm dần theo sự gia tăng nồng độ của hợp chất SH17. Chứng tỏ hợp chất SH17 bắt giữ tế bào ở giai đoạn sub-G₁ theo nồng độ. Điều này cho thấy, hợp chất SH17 tác động đến chu kì tế bào ở pha sub-G₁.

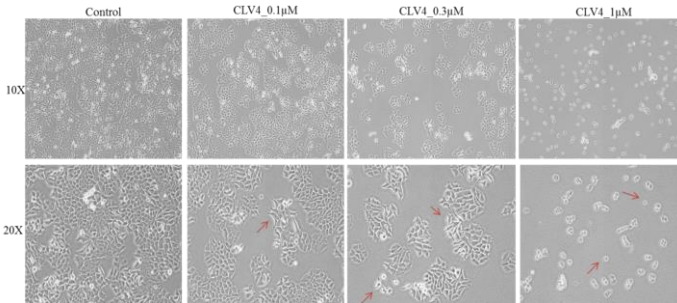
4.3.2.2. Tác động của SH17 lên quá trình tự chết của tế bào ung thư vú người MCF7



Hình 88. Tác động của hợp chất **SH17** lên quá trình tự chết của MCF7.

Kết quả cho thấy tế bào sau khi xử lý với hợp chất **SH17** ở nồng độ 1,0 μM di chuyển sang giai đoạn apoptosis với tỉ lệ là 36,08%. Trong khi đó, phần trăm các tế bào tự chết ở mẫu control chỉ là 3,47% (Hình 88). Điều này cho thấy hợp chất **SH17** đã gây ra sự tự chết tế bào MCF7.

4.3.2.3. Tác động của hợp chất **SH17** lên sự thay đổi hình thái tế bào MCF7



Hình 89. Tác động của hợp chất **SH17** ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 μM lên hình thái tế bào ung thư vú người MCF7.

Việc hợp chất gây ra quá trình apoptosis trên tế bào MCF7 được xác nhận trên sự thay đổi hình thái tế bào MCF7 sau khi xử lý với hợp chất **SH17** ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 μM . Có thể thấy rõ mật độ tế bào giảm dần theo sự gia tăng nồng độ của hợp chất này. Đặc biệt, ở nồng độ 1,0 μM , các chất nhuộm sắc cô đặc tối đa trở thành một khối dính vào lớp màng bao quanh nhân tế bào (Hình 89).

KẾT LUẬN

➤ Về nghiên cứu thành phần hóa học

Sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký đã phân lập được 17 hợp chất triterpene glycoside từ hải sâm *Stichopus horrens* và 08 hợp chất triterpene glycoside từ hải sâm *Holothuria edulis*.

Sử dụng các phương pháp phổ hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (một chiều và hai chiều) và phổ khối lượng phân giải cao đã chứng minh được cấu trúc hóa học của 25 hợp chất triterpene glycoside thu được. Trong đó:

1. Từ loài hải sâm *S. horrens*: Năm hợp chất mới được đặt tên là stichorrenoside A-E (**SH1-SH4** và **SH9**), cùng với bốn hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên bao gồm: 3β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxyholost-7-ene (**SH7**), 3β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene (**SH8**), deacetyl thelenoside B (**SH9**) và deacetylchloroside C₁ (**SH9**).

2. Từ loài hải sâm *H. edulis*: Một hợp chất mới được đặt tên là holothurin A₅ (**HE1**).

➤ Về nghiên cứu hoạt tính sinh học

1. Đã đánh giá được hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được trên năm dòng tế bào ung thư người là LNCaP, MCF7, KB, HepG2 và SK-Mel-2. Kết quả cho thấy các hợp chất này đều có hoạt tính trên tất cả năm dòng tế bào ung thư được thử nghiệm ngoại trừ hợp chất **HE5** chỉ có hoạt tính trên ba dòng MCF7, KB và HepG2 và hợp chất **HE8** không có hoạt tính trên tất cả các dòng tế bào ung thư được thử nghiệm. Trong đó hai hợp chất stichloroside B₁ (**SH12**) và deacetylstichloroside C₁ (**SH17**) có hoạt tính gây độc rất mạnh trên tất cả 5 dòng tế bào ung thư nêu trên với giá trị IC₅₀ từ 0,10 đến 0,34 μ M, mạnh hơn cả chất đối chứng dương ellipticine (IC₅₀ từ 1,34 đến 1,95 μ M).

2. Đã đánh giá khả năng diệt tế bào ung thư của hợp chất deacetylstichloroside C₁ theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học. Kết quả cho thấy hợp chất này tác động đến chu kỳ tế bào ở pha sub-G₁ và gây ra sự tự chết tế bào MCF7.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* tác giả nhận thấy:

1. Hợp chất stichloroside B₁ (**SH12**) và deacetylstichloroside C₁ (**SH17**) thể hiện hoạt tính gây độc rất mạnh trên cả năm dòng tế bào ung thư được thử nghiệm. Do đó cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động của hai hợp chất này để định hướng ứng dụng.

2. Tiếp tục mở rộng nghiên cứu về các loài hải sâm khác để góp phần khẳng định được giá trị dược liệu của nguồn hải sâm quý giá của Việt Nam.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Lần đầu tiên từ hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* phân bố ở vùng biển Việt Nam được tiến hành nghiên cứu thành công thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào, đánh giá được khả năng diệt tế bào ung thư của hợp chất tiềm năng theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học.

2. Đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của sáu hợp chất mới trong đó từ loài hải sâm *S. horrens* có năm hợp chất mới là stichorrenoside A-E và bốn hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên 3 β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene, 3 β -O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxylolost-7-ene, deacetyl thelenoside B, deacetyltichloroside C₁ và một hợp chất mới là holothurin A₅ từ loài hải sâm *H. edulis*.

3. Phần aglycone của hai hợp chất stichorrenoside A và B có chứa nhóm -OH ở vị trí C-22 và cấu trúc 7,25-dien là aglycone có cấu trúc mới. Gốc đường 4-O-sodium sulfate- β -D-glucopyranose ở hợp chất stichorrenoside B và nhóm -OOH tại vị trí C-25 ở hợp chất được holothurin A₅ tìm thấy lần đầu tiên ở các hợp chất triterpene glycoside từ hải sâm tại thời điểm công bố.

4. Lần đầu tiên đánh giá khả năng diệt tế bào ung thư của hợp chất deacetylstichloroside C₁ theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học. Kết quả cho thấy hợp chất này tác động đến chu kỳ tế bào ở pha sub-G₁ và gây ra sự tự chết tế bào MCF7.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. L. Hoang, L.T. Vien, T.T.H. Hanh, N.V. Thanh, N.X. Cuong, N.H. Nam, D.C. Thung, N.V. Ivanchina, D.T. Thao, P.S. Dmitrenok, A.A. Kicha, P.V. Kiem, C.V. Minh. *Triterpene glycosides from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria edulis**. Nat. Prod. Res., 2020, 34(8), 1061-1067.
 2. L.T. Vien, L. Hoang, T.T.H. Hanh, N.V. Thanh, N.X. Cuong, N.H. Nam, D.C. Thung, P.V. Kiem, C.V. Minh. *Triterpene tetraglycosides from the sea cucumber *Stichopus horrens**. Nat. Prod. Res., 2018, 32(9), 1039-1043.
 3. N.X. Cuong, L.T. Vien, L. Hoang, T.T.H. Hanh, D.T. Thao, N.V. Thanh, N.H. Nam, D.C. Thung, P.V. Kiem, C.V. Minh. *Cytotoxic triterpene diglycosides from the sea cucumber *Stichopus horrens**. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2017, 27(13), 2939-2942.
 4. L. Hoang, L.T. Vien, T.T.H. Hanh, N.P. Thao, N.V. Thanh, N.X. Cuong, N.H. Nam, D.C. Thung, N.V. Ivanchina, D.T. Thao, P.S. Dmitrenok, A.A. Kicha, P.V. Kiem, C.V. Minh. *Structure elucidation of four triterpene diglycosides from the sea cucumber *Stichopus horrens**. Vietnam J. Chem., 2017, 55(6e), 11-16.
-