

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**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA 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 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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. VS. Châu Văn Minh
2. TS. Nguyễn Hoài Nam

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 Hoài Nam.

Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

*Hà Nội, ngày      tháng      năm 2023*

**Tác giả**

**Lê Hoàng**

## LỜI CẢM ƠN

*Luận án này được thực hiện tại Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: “Nghiên cứu phân lập các hợp chất từ một số động vật Da gai ở vùng biển Trung bộ (vùng biển Bắc Trung Bộ đến biển Trung Trung Bộ Việt nam) nhằm tìm kiếm các hoạt chất có khả năng diệt tế bào ung thư thử nghiệm và kháng viêm nhằm tạo ra sản phẩm có tác dụng hỗ trợ tăng cường sức khỏe”, mã số: VAST.TĐ.DLB.03/16-18.*

*Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành và sâu sắc, sự cảm phục và kính trọng tới GS. VS. Châu Văn Minh và TS. Nguyễn Hoài Nam, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong thời gian làm luận án.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Học viện, Phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa sinh biển cùng tập thể cán bộ - các nhà khoa học của Viện đã quan tâm giúp đỡ và đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu thực hiện luận án này.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Dược liệu biển - Viện Hóa sinh biển, TS. Nguyễn Xuân Cường, TS. Nguyễn Văn Thanh và các cộng sự đã tạo điều kiện giúp đỡ và có những lời khuyên bổ ích những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận án.*

*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 trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.*

*Xin trân trọng cảm ơn!*

**Tác giả**

**Lê Hoàng**



## MỤC LỤC

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

## DANH MỤC CÁC BẢNG

## DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Giới thiệu chung về hải sâm .....	3
1.2. Các nghiên cứu về thành phần triterpene glycoside từ hải sâm .....	5
1.3. Các nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào của các triterpene glycoside từ các loài hải sâm .....	15
1.3.1. Các nghiên cứu trên thế giới.....	15
1.3.2. Các nghiên cứu trong nước.....	22
1.4. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu.....	23
1.4.1. Đặc điểm sinh học và phân bố hai loài hải sâm <i>Stichopus horrens</i> và <i>Holothuria edulis</i> .....	23
1.4.2. Tình hình nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học .....	26
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	28
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	28
2.1.1. Loài hải sâm <i>Stichopus horrens</i> .....	28
2.1.2. Loài hải sâm <i>Holothuria edulis</i> .....	28
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	29
2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất .....	29
2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học .....	30
2.2.3. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học .....	31
CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ .....	34
3.1. Phân lập các hợp chất từ loài hải sâm <i>Stichopus horrens</i> .....	34
3.2. Phân lập các hợp chất từ loài hải sâm <i>Holothuria edulis</i> .....	36
3.3. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập .....	38

3.3.1. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập từ loài hải sâm <i>Stichopus horrens</i> .....	38
3.3.2. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập từ loài hải sâm <i>Holothuria edulis</i> .....	42
<b>CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1. Thảo luận xác định cấu trúc hóa học từ loài hải sâm <i>Stichopus horrens</i></b> .....	<b>45</b>
4.1.1. Hợp chất SH1: Stichorrenoside A (hợp chất mới) .....	45
4.1.2. Hợp chất SH2: Stichorrenoside B (hợp chất mới) .....	51
4.1.3. Hợp chất SH3: Stichorrenoside C (hợp chất mới) .....	57
4.1.4. Hợp chất SH4: Stichorrenoside D (hợp chất mới) .....	63
4.1.5. Hợp chất SH5: Stichoposide A .....	69
4.1.6. Hợp chất SH6: Stichoposide B .....	71
4.1.7. Hợp chất SH7: $3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-}]\text{-23S-acetoxylolost-7-ene}$ .....	73
4.1.8. Hợp chất SH8: $3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-}]\text{-23S-hydroxylolost-7-ene}$ .....	76
4.1.9. Hợp chất SH9: Stichorrenoside E (hợp chất mới) .....	78
4.1.10. Hợp chất SH10: Thelenotoside B .....	85
4.1.11. Hợp chất SH11: Deacetyl thelenotoside B .....	88
4.1.12. Hợp chất SH12: Stichloroside B <sub>1</sub> .....	90
4.1.13. Hợp chất SH13: Stichloroside B <sub>2</sub> .....	93
4.1.14. Hợp chất SH14: Deacetylstichloroside B <sub>1</sub> .....	96
4.1.15. Hợp chất SH15: Stichloroside A <sub>1</sub> .....	98
4.1.16. Hợp chất SH16: Deacetylstichloroside A <sub>1</sub> .....	101
4.1.17. Hợp chất SH17: Deacetyltichloroside C <sub>1</sub> .....	104
<b>4.2. Thảo luận xác định cấu trúc hóa học từ loài hải sâm <i>Holothuria edulis</i></b> .....	<b>108</b>
4.2.1. Hợp chất HE1: Holothurin A <sub>5</sub> (hợp chất mới) .....	108

4.2.2. Hợp chất HE2: <i>Holothurin A<sub>2</sub></i> .....	115
4.2.3. Hợp chất HE3: <i>Marmoroside C</i> .....	117
4.2.4. Hợp chất HE4: <i>Moebioside A</i> .....	120
4.2.5. Hợp chất HE5: <i>Leucospilotaside A</i> .....	122
4.2.6. Hợp chất HE6: <i>Holothurin A</i> .....	124
4.2.7. Hợp chất HE7: <i>Holothurin B</i> .....	126
4.2.8. Hợp chất HE8: <i>Leucospilotaside C</i> .....	128
4.3. Thảo luận đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được .....	130
4.3.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư (TBUT).....	130
4.3.2. Khả năng diệt tế bào ung thư của <i>deacetylstichloroside C<sub>1</sub></i> (SH17) theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học.....	132
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	136
1. Kết luận .....	136
2. Kiến nghị .....	137
<b>NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN</b> .....	137
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b> .....	138
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	138
<b>PHỤ LỤC PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT ĐÃ BIẾT</b> .....	i

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
<i>Các phương pháp sắc ký:</i>		
CC/SKC	Column Chromatography	Sắc ký cột
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
<i>Các phương pháp phổ:</i>		
$^{13}\text{C}$ NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
CTPT	Molecular Formula	Công thức phân tử
1D/2D NMR	One-Dimensional/two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxide
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrum	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
KLPT	Molecular Weight	Khối lượng phân tử
$^1\text{H}$ NMR	Proton Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Chemical Shift Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác proton
HR-TOF-MS	High Resolution Time of-Flight Mass Spectrometer	Phổ khối phân giải cao thời gian bay
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
MeOH	Methanol	Metanol/rượu metylic
Mp	Melting point	Điểm chảy

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy	Phổ TOCSY
TMS	Tetramethyl Silane	Tetrametyl silan
<p><b>s:</b> singlet; <b>d:</b> doublet; <b>dd:</b> doublet doublet; <b>ddd:</b> doublet doublet doublet; <b>t:</b> triplet; <b>dt:</b> doublet triplet; <b>q:</b> quartet; <b>qui:</b> quintet; <b>m:</b> multiplet; <b>br:</b> broad.</p>		
<p><b>Tên của các hợp chất, lớp chất, nhóm thế, chức hóa học được sử dụng nguyên gốc theo tiếng Anh.</b></p>		
<p><i>Các dòng tế bào:</i></p>		
A549	Human lung adenocarcinoma epithelial cell line	Dòng tế bào ung thư biểu mô phổi
GĐTB	Cytotoxic assay	Gây độc tế bào
Hela	Hela human cervix cell line	Dòng tế bào ung thư cổ tử cung
HCT-116	Human colon epithelial carcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư trực tràng
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư gan người
HL-60	Human promyelocytic leukemia cell line	Dòng tế bào ung thư máu người
KMS-11	Human cellosaurus cell line	Dòng tế bào ung thư tủy người
L1210	Mouse lymphocytic leukemia) cell line	Dòng tế bào bệnh bạch cầu lympho chuột
LNCaP	Human prostate adenocarcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến người
LU	Lung carcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư phổi người
MCF7	Human breast adenocarcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư vú người
MKN-28	Human gastric cancer cell line	Dòng tế bào ung thư dạ dày người

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
KB	Human epidemoid carcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư biểu mô người
P388	Human leukaemia cell line	Dòng tế bào bạch cầu người
PRMI-7951	Human malignant melanoma cell line	Dòng tế bào u sắc tố ác tính
SK-Mel-2	Human melanoma cell line	Dòng tế bào hắc tố người
SK-OV-3	Human ovarian cancer cell line	Dòng tế bào ung thư buồng trứng
SGC-7901	Human gastric cancer cells line	Dòng tế bào ung thư dạ dày người
SpC-A4	Human mitochondrial adenocarcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư tuyến ty thể
TBUT	Cancer cell line	Tế bào ung thư
<b><i>Các thuật ngữ sinh học khác:</i></b>		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM
EC <sub>50</sub>	Effective concentration 50%	Nồng độ có hiệu quả ở 50% số mẫu thí nghiệm
EC <sub>100</sub>	Effective concentration 100%	Nồng độ có hiệu quả ở 100% số mẫu thí nghiệm
ED <sub>50</sub>	Effective dose 50%	Liều hiệu dụng ở 50%
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế ở 50%
LD <sub>50</sub>	Lethal dose 50%	Liều chết cấp tính ở 50%
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromua]

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. Một số hợp chất triterpene saponin thuộc nhóm 1 từ các loài hải sâm. ....	9
Bảng 2. Một số hợp chất triterpene saponin thuộc nhóm 2 từ các loài hải sâm. ....	13
Bảng 3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số chất trên hai dòng L1210 và KB. .....	16
Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của hợp chất philinopside A và B. ....	17
Bảng 5. Ảnh hưởng của hợp chất philinopside A lên sự phát triển của khối u Sarcoma- 180 <i>in vivo</i> . ....	19
Bảng 6. Khả năng ức chế của các hợp chất phân lập từ hải sâm <i>Cercodemas anceps</i> lên sự phát triển của năm dòng tế bào ung thư. ....	22
Bảng 7. Số liệu phổ NMR của <b>SH1</b> và hợp chất tham khảo.....	50
Bảng 8. Số liệu phổ NMR của <b>SH2</b> và hợp chất tham khảo.....	56
Bảng 9. Số liệu phổ NMR của <b>SH3</b> và hợp chất tham khảo.....	62
Bảng 10. Số liệu phổ NMR của <b>SH4</b> và hợp chất tham khảo.....	68
Bảng 11. Số liệu phổ NMR của <b>SH5</b> và hợp chất tham khảo.....	70
Bảng 12. Số liệu phổ NMR của <b>SH6</b> và hợp chất tham khảo.....	72
Bảng 13. Số liệu phổ NMR của <b>SH7</b> và hợp chất tham khảo.....	75
Bảng 14. Số liệu phổ NMR của <b>SH8</b> và hợp chất tham khảo.....	77
Bảng 15. Số liệu phổ NMR của <b>SH9</b> và hợp chất tham khảo.....	84
Bảng 16. Số liệu phổ NMR của <b>SH10</b> và hợp chất tham khảo.....	87
Bảng 17. Số liệu phổ NMR của <b>SH11</b> và hợp chất tham khảo.....	89
Bảng 18. Số liệu phổ NMR của <b>SH12</b> và hợp chất tham khảo.....	92
Bảng 19. Số liệu phổ NMR của <b>SH13</b> và hợp chất tham khảo.....	94
Bảng 20. Số liệu phổ NMR của <b>SH14</b> và hợp chất tham khảo.....	97
Bảng 21. Số liệu phổ NMR của <b>SH15</b> và hợp chất tham khảo.....	99
Bảng 22. Số liệu phổ NMR của <b>SH16</b> và hợp chất tham khảo.....	102
Bảng 23. Số liệu phổ NMR của <b>SH17</b> và hợp chất tham khảo.....	105
Bảng 24. Số liệu phổ NMR của <b>HE1</b> và hợp chất tham khảo. ....	114

Bảng 25. Số liệu phổ NMR của <b>HE2</b> và hợp chất tham khảo. ....	116
Bảng 26. Số liệu phổ NMR của <b>HE3</b> và hợp chất tham khảo. ....	118
Bảng 27. Số liệu phổ NMR của <b>HE4</b> và hợp chất tham khảo. ....	121
Bảng 28. Số liệu phổ NMR của <b>HE5</b> và hợp chất tham khảo. ....	123
Bảng 29. Số liệu phổ NMR của <b>HE6</b> và hợp chất tham khảo. ....	124
Bảng 30. Số liệu phổ NMR của <b>HE7</b> và hợp chất tham khảo. ....	127
Bảng 31. Số liệu phổ NMR của <b>HE8</b> và hợp chất tham khảo. ....	128
Bảng 32. Giá trị IC <sub>50</sub> của các chất triterpene saponin trên năm dòng tế bào. ....	131
Bảng 33. Tỷ lệ (%) tế bào MCF7 trong pha G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> , S, G <sub>2</sub> /M và apoptosis (sub-G <sub>1</sub> ) sau 48 giờ cảm ứng với hợp chất <b>SH17</b> ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 $\mu$ M. ....	133



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. Một số aglycone phổ biến của các hợp chất saponin từ hải sâm. ....	5
Hình 2. Một số mạch nhánh phần aglycone của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm ( <i>cấu trúc nhánh nằm trong đường đứt nét có cả ở các loài sao biển</i> ). ....	6
Hình 3. Một số cấu trúc chuỗi đường phổ biến của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm.....	7
Hình 4. Một số cấu trúc chuỗi đường phổ biến của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm ( <i>tiếp theo</i> ). ....	8
Hình 5. Sơ đồ chiết mẫu và phân lập các chất từ cặn CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> của <i>S. horrens</i> . ....	34
Hình 6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lớp nước của <i>S. horrens</i> . ....	35
Hình 7. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài <i>Holothuria edulis</i> . ....	37
Hình 8. Cấu trúc hóa học của <b>SH1</b> và chất tham khảo <b>SH6</b> . ....	45
Hình 9. Phổ HR-ESI-MS của <b>SH1</b> . ....	45
Hình 10. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>SH1</b> . ....	46
Hình 11. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>SH1</b> . ....	47
Hình 12. Phổ HSQC của <b>SH1</b> . ....	47
Hình 13. Phổ HMBC của <b>SH1</b> . ....	48
Hình 14. Phổ COSY của <b>SH1</b> . ....	49
Hình 15. Phổ ROESY của <b>SH1</b> . ....	49
Hình 16. Tương tác COSY, HMBC và ROESY chính của <b>SH1</b> . ....	51
Hình 17. Cấu trúc hóa học của <b>SH2</b> và hợp chất tham khảo <b>SH1</b> . ....	51
Hình 18. Phổ HR-ESI-MS của <b>SH2</b> . ....	52
Hình 19. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>SH2</b> . ....	52
Hình 20. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>SH2</b> . ....	53
Hình 21. Phổ HSQC của <b>SH2</b> . ....	53
Hình 22. Phổ HMBC của <b>SH2</b> . ....	54
Hình 23. Phổ COSY của <b>SH2</b> . ....	54
Hình 24. Phổ ROESY của <b>SH2</b> . ....	55
Hình 25. Các tương tác COSY và HMBC chính của <b>SH2</b> . ....	55

Hình 26. Cấu trúc hóa học của <b>SH3</b> và hợp chất tham khảo <b>SH1</b> .....	57
Hình 27. Phổ HR-ESI-MS của <b>SH3</b> .....	57
Hình 28. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH3</b> . ....	58
Hình 29. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH3</b> . ....	58
Hình 30. Phổ HSQC của <b>SH3</b> . ....	59
Hình 31. Phổ HMBC của <b>SH3</b> .....	60
Hình 32. Phổ COSY của <b>SH3</b> . ....	60
Hình 33. Phổ ROESY của <b>SH3</b> .....	61
Hình 34. Các tương tác COSY và HMBC chính của <b>SH3</b> . ....	61
Hình 35. Cấu trúc hóa học của <b>SH4</b> và hợp chất tham khảo <b>SH3</b> .....	63
Hình 36. Phổ HR-ESI-MS của <b>SH4</b> .....	63
Hình 37. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH4</b> . ....	64
Hình 38. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH4</b> . ....	65
Hình 39. Phổ HSQC của <b>SH4</b> . ....	65
Hình 40. Phổ HMBC của <b>SH4</b> .....	66
Hình 41. Phổ COSY của <b>SH4</b> . ....	66
Hình 42. Phổ ROESY của <b>SH4</b> .....	67
Hình 43. Các tương tác COSY và HMBC chính của <b>SH4</b> . ....	67
Hình 44. Cấu trúc hóa học của <b>SH5</b> và các tương tác HMBC chính.....	69
Hình 45. Cấu trúc hóa học của <b>SH6</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	71
Hình 46. Cấu trúc hóa học của <b>SH7</b> và các tương tác HMBC chính.....	74
Hình 47. Cấu trúc hóa học của <b>SH8</b> và các tương tác COSY và HMBC chính. ....	76
Hình 48. Cấu trúc hóa học của <b>SH9</b> và deacetyl thelenotoside B. ....	78
Hình 49. Phổ HR-ESI-MS của <b>SH9</b> .....	78
Hình 50. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH9</b> . ....	79
Hình 51. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH9</b> . ....	79
Hình 52. Phổ HSQC của <b>SH9</b> . ....	80
Hình 53. Phổ HMBC của <b>SH9</b> .....	81
Hình 54. Phổ COSY của <b>SH9</b> . ....	82

Hình 55. Phổ 1D TOCSY của <b>SH9</b> .....	82
Hình 56. Phổ 2D TOCSY của <b>SH9</b> .....	83
Hình 57. Phổ ROESY của <b>SH9</b> .....	83
Hình 58. Các tương tác COSY và HMBC chính của <b>SH9</b> . ....	84
Hình 59. Cấu trúc hóa học của <b>SH10</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	86
Hình 60. Cấu trúc hóa học của <b>SH11</b> .....	89
Hình 61. Cấu trúc hóa học của <b>SH12</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	91
Hình 62. Cấu trúc hóa học của <b>SH13</b> .....	93
Hình 63. Cấu trúc hóa học của <b>SH14</b> .....	96
Hình 64. Cấu trúc hóa học của <b>SH15</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	98
Hình 65. Cấu trúc hóa học của <b>SH16</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	101
Hình 66. Cấu trúc hóa học của <b>SH17</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	104
Hình 67. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài <i>Stichopus horrens</i> (Các hợp chất mới: <b>SH1- SH4</b> và <b>SH9</b> . Các hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên: <b>SH7, SH8, SH11</b> và <b>SH17</b> ). ....	107
Hình 68. Cấu trúc hóa học của <b>HE1</b> . ....	108
Hình 69. Phổ HR-ESI-MS của <b>HE1</b> . ....	108
Hình 70. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>HE1</b> .....	109
Hình 71. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>HE1</b> .....	109
Hình 72. Phổ HSQC của <b>HE1</b> .....	110
Hình 73. Phổ HMBC của <b>HE1</b> . ....	111
Hình 74. Phổ 1D TOCSY của <b>HE1</b> . ....	111
Hình 75. Phổ COSY của <b>HE1</b> .....	112
Hình 76. Phổ 2D TOCSY của <b>HE1</b> ....	112
Hình 77. Phổ ROESY của <b>HE1</b> ....	113
Hình 78. Các tương tác COSY, HMBC và ROESY chính của <b>HE1</b> .....	113
Hình 79. Cấu trúc hóa học của <b>HE2</b> . ....	115
Hình 80. Cấu trúc hóa học của <b>HE3</b> và các tương tác COSY, HMBC chính. ....	118
Hình 81. Cấu trúc hóa học của <b>HE4</b> . ....	120

Hình 82. Cấu trúc hóa học của <b>HE5</b> . .....	122
Hình 83. Cấu trúc hóa học của <b>HE6</b> . .....	124
Hình 84. Cấu trúc hóa học của <b>HE7</b> . .....	126
Hình 85. Cấu trúc hóa học của <b>HE8</b> . .....	128
Hình 86. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài <i>Holothuria edulis</i> . .....	129
Hình 87. Tác động của hợp chất <b>SH17</b> đến chu kỳ tế bào MCF7. ....	132
Hình 88. Tác động của <b>SH17</b> lên quá trình tự chết của tế bào MCF7. ....	134
Hình 89. Tác động của hợp chất <b>SH17</b> ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 $\mu$ M lên hình thái tế bào ung thư vú người MCF7. ....	134

## MỞ ĐẦU

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 một triệu km<sup>2</sup> 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 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 [1, 2].

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 [3]. Ở Việt Nam, tính đến năm 2023 các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học mới chỉ được tiến hành trên vài loài hải sâm thuộc hai giống *Stichopus* và *Holothuria*. 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 hóa 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:

❖ **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.

❖ **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.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Giới thiệu chung về hải sâm

Các động vật thuộc ngành Da gai được chia thành năm lớp bao gồm: Asterolea (Sao biển), Ophiuroidea (Đuôi rắn, Sao biển giòn), Crinoidea (Huệ biển, Sao lông), Holothuroidea (Hải sâm, Dưa chuột biển) và Echinoidea (Cầu gai, Nhím biển). Tính đến hiện tại, đã có khoảng 7.000 loài thuộc ngành Da gai (Echinoderm) đã được ghi nhận. Số lượng loài thuộc ngành Da gai không nhiều nhưng số lượng cá thể các sinh vật thuộc ngành này là rất lớn. Các động vật thuộc ngành Da gai thường mang những đặc điểm sinh học thú vị [3].

Hải sâm, hay còn được gọi là dưa chuột biển, sâm biển, đĩa biển (tên nước ngoài: Holothurian, sea-slug, treppang, beche-de-mer, gamat...), là loài động vật không xương sống. Thân hải sâm có dạng ống dài như quả dưa chuột, phình ra ở giữa và thon nhỏ ở hai đầu có chứa những gai thịt nhỏ. Miệng nằm ở phía trước với vành tua rõ rệt còn phía sau là hậu môn. Dọc thân là các dây chân ống. Da mềm với các phiến xương nằm rải rác dưới da [3]. Chiều dài thân trung bình của các loài hải sâm là từ 5 - 25 cm, tuy nhiên cá biệt có một số loài, như *Stichopus variegatus* có thể đạt tới chiều dài trên 1 m với đường kính thân khoảng 20 cm [2]. Có nhiều loại hải sâm thuộc các giống phổ biến như *Actinopyga*, *Holothuria* và *Stichopus*.

Trên thế giới, hải sâm có tới hàng nghìn loài, phân bố ở nhiều quốc gia như Nhật Bản, Trung Quốc, Úc, Malaysia, Ấn Độ, vùng Đông Phi... Ở Việt Nam, một số loài được tìm thấy phổ biến như là hải sâm đen (*Holothuria vagabunda*), hải sâm trắng (*H. scabra*), hải sâm vú (*Microthele nobilis*) và hải sâm mít (*Actinopyga echinites*). Chúng có mặt ở khắp tuyến biển từ bắc vào nam, nhiều nhất ở các tỉnh như Khánh Hòa, Phú Yên, Vũng Tàu, Phú Quốc, Côn Đảo và Kiên Giang. Chúng thường sống ở các dải nông ven bờ đến độ sâu khoảng 5 - 7 m, chủ yếu ở vịnh và những nơi nhiều đá ngầm. Di chuyển bằng cách phụt nước hoặc co duỗi các cơ. Ăn động vật, thực vật nhỏ ở đáy và bã hữu cơ. Nhiều nước trên thế giới đã tổ chức nuôi hải sâm để bảo vệ và chủ động nguồn nguyên liệu tiêu dùng.

Bộ phận dùng: Toàn con hải sâm được mổ bỏ ruột, rửa sạch rồi phơi hay sấy khô. Loại thịt có màu đen quánh, dính, da có nhiều gai bươu là tốt. Thịt hải sâm có 21,45% protein, 1,37% glucid, 0,27% lipid và 1,13% tro, trong tro chủ yếu gồm photpho: 0,22; canxi: 0,118; kali: 0,070 và sắt: 0,0014.

Theo Đông y, hải sâm có vị mặn, tính âm, có công dụng tư âm dưỡng huyết, bổ thận tráng dương, ích tinh nhuận táo, thường dùng cho những người bị suy nhược, thiếu máu, lao lực, phụ nữ sau khi sinh, thận dương hư nhược gây nên tình trạng liệt dương, xuất tinh sớm, di tinh, di niệu...

Về mặt thực phẩm, hải sâm là loại đồ biển có giá trị dinh dưỡng rất cao, rất giàu chất đạm, vitamin, các acid amin và các nguyên tố vi lượng, đặc biệt là iode và sắt. Hải sâm có hàm lượng cholesterol rất thấp, gần như không có, do đó hải sâm là thực phẩm bổ dưỡng rất tốt đối với những người bị rối loạn lipid máu, cao huyết áp, ung thư, xơ vữa động mạch, hoặc có bệnh lý mạch vành... Sau khi chế biến có mùi vị thơm ngon, rất hấp dẫn và thường có mặt trong các yến tiệc sang trọng nhất ở Ấn Độ, Malaysia, Nhật Bản, Hàn Quốc, Philippines, Trung Quốc... Thịt hải sâm có thể ăn tươi dưới dạng xào nấu, ướp muối, đóng hộp; nhưng chế biến khô là phương pháp phổ biến nhất hiện nay. Hải sâm phơi khô còn là mặt hàng xuất khẩu có giá trị kinh tế có sự cạnh tranh được với yến sào và bào ngư... Về mặt dược liệu, do có giá trị dinh dưỡng cao và tác dụng không kém vị nhân sâm, nên thịt hải sâm được coi là “nhân sâm của biển”. Nó chữa tình trạng cơ thể gầy yếu, thần kinh suy nhược, viêm phế quản, các chứng chảy máu, ho, mụn nhọt. Hải sâm thường được dùng dưới dạng nướng giòn và tán thành bột. Ngày uống ba lần, mỗi lần 6 - 10 g với nước ấm hay rượu. Ở Trung Quốc, hải sâm được dùng ở dạng thuốc đơn thuần hoặc chế biến thành thức ăn, vị thuốc như sau:

- *Chữa lao phổi*: Thành phần bao gồm hải sâm (500 g), bạch cập (250 g), mai rùa (nướng giòn, 1 cái). Tất cả được thái nhỏ, sao vàng, tán bột, rây mịn. Ngày uống 3 lần, mỗi lần 25 g với nước ấm.

- *Chữa cơ thể nhiệt táo, khối u*: Thành phần bao gồm hải sâm (30 g), mộc nhĩ (30 g), thái nhỏ và nhồi vào ruột già lợn, luộc chín như, ăn trong ngày.

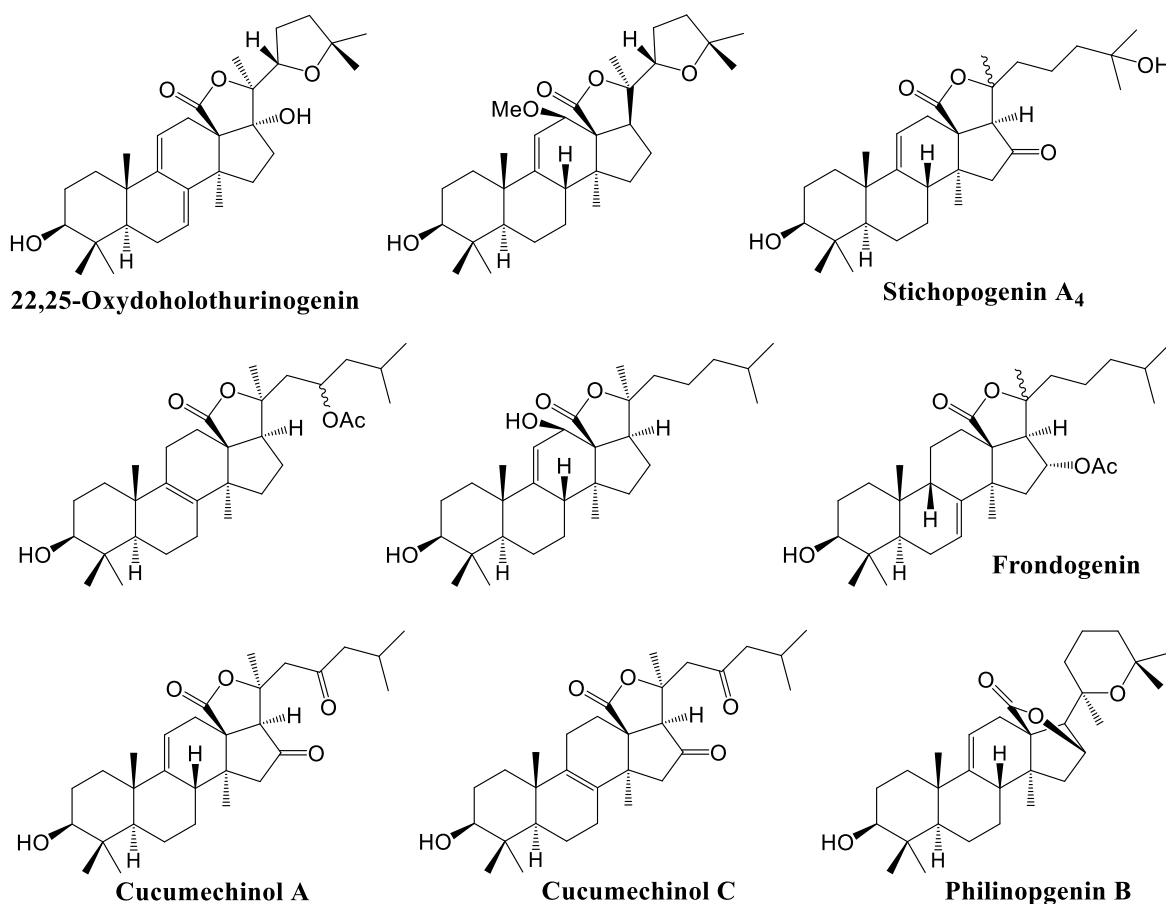
- *Thuốc bổ khí huyết và hạ huyết áp*: Thành phần bao gồm hải sâm (50 g, thái miếng), tỏi (30 g, giã nhỏ), gạo (100 g, vo sạch). Tất cả nấu kỹ, như thành cháo và ăn một lần trong ngày vào buổi sáng.

- *Thuốc bổ gan, thận, hạ huyết áp*: Hải sâm: (50 g), đỗ trọng (5 g) cho vào nồi cùng với nước dùng gà (100 mL), ít hành, gừng, muối. Nấu cho như thịt và ăn làm một lần trong ngày.

Ở nước ta, hải sâm cũng được sử dụng và chế biến ra nhiều món ăn và các bài thuốc có giá trị dược dụng cao.

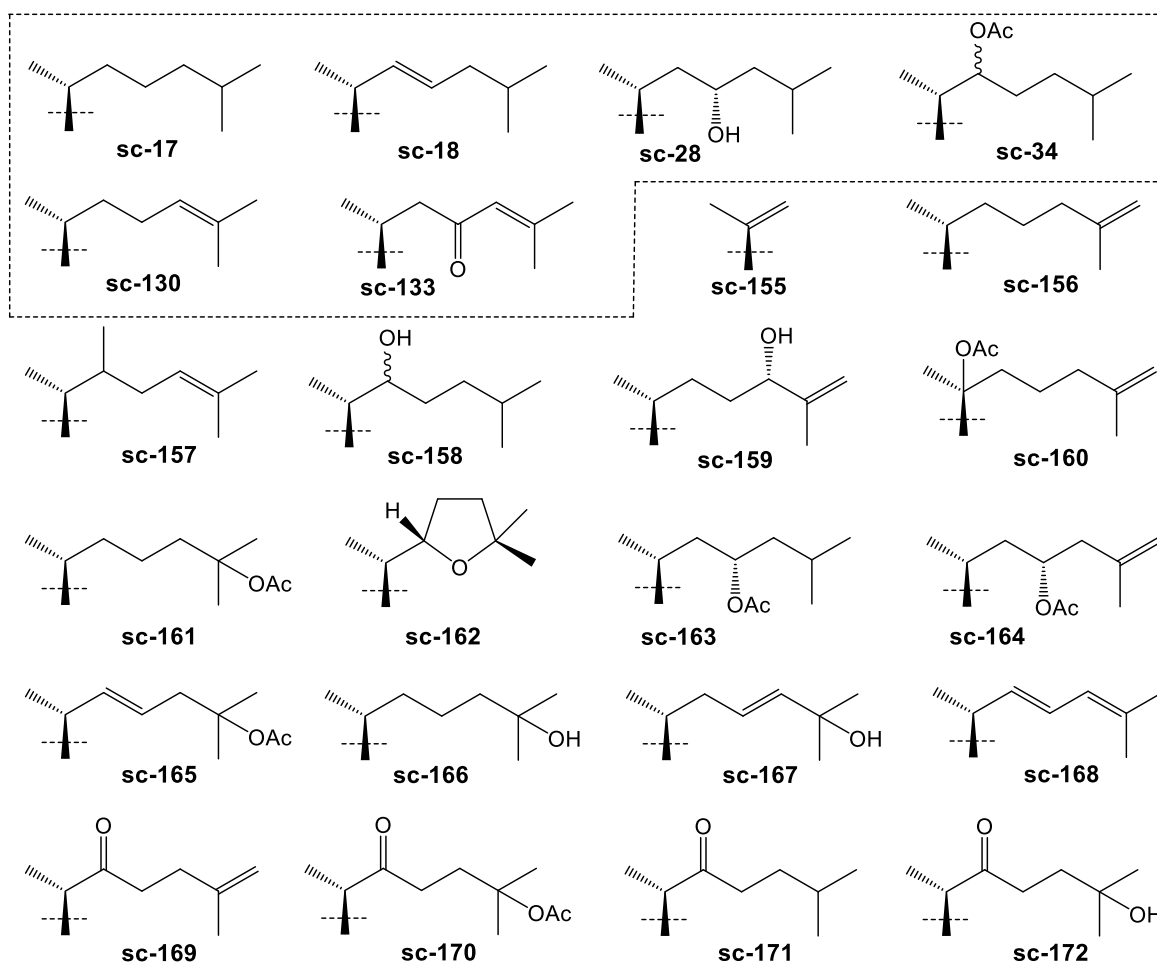


## 1.2. Các nghiên cứu về thành phần triterpene glycoside từ hải sâm



Hình 1. Một số aglycone phổ biến của các hợp chất saponin từ hải sâm [2].

Các nghiên cứu đã công bố cho thấy các loài hải sâm có chứa triterpene glycoside (saponin), các dẫn xuất sterol (glycoside và sulfate), acid béo, carotenoid, cerebroside và ganglioside, oligosaccharide và sulfate polysaccharide, các hợp chất chứa nitơ, phenolic, peptide, lactin... Tuy nhiên, thành phần hóa học chính và được các nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm nhiều nhất của các loài hải sâm là các hợp chất saponin. Khác với saponin của các loài sao biển là các dẫn xuất sterol glycoside, các saponin ở hải sâm là các triterpene glycoside với khung lanostane và khi bị sulfate hóa, nhóm sulfate chỉ nằm trên phần chuỗi đường chứ không nằm ở aglycone như ở các loài sao biển. Phần khung triterpene có cấu trúc khá đa dạng và có dạng holostane với cấu trúc đặc trưng bởi xuất hiện của nhóm  $\gamma$ -lactone ở vòng D tạo thành từ nhóm acid carboxylic ở C-18 và một nhóm hydroxy ở C-20 (nhóm 1: phổ biến nhất) hoặc ở C-16 (nhóm 2) [2]. Phần khung này thường có cấu trúc diene tại vị trí C-7/C-8, C-9/C-11 hoặc một liên kết đôi tại vị trí C-7/C-8, C-9/C-11, hoặc C-8/C-9. Phần chuỗi đường gắn ở vị trí C-3 và chứa từ hai đến sáu gốc đường (nhưng phổ biến nhất là có



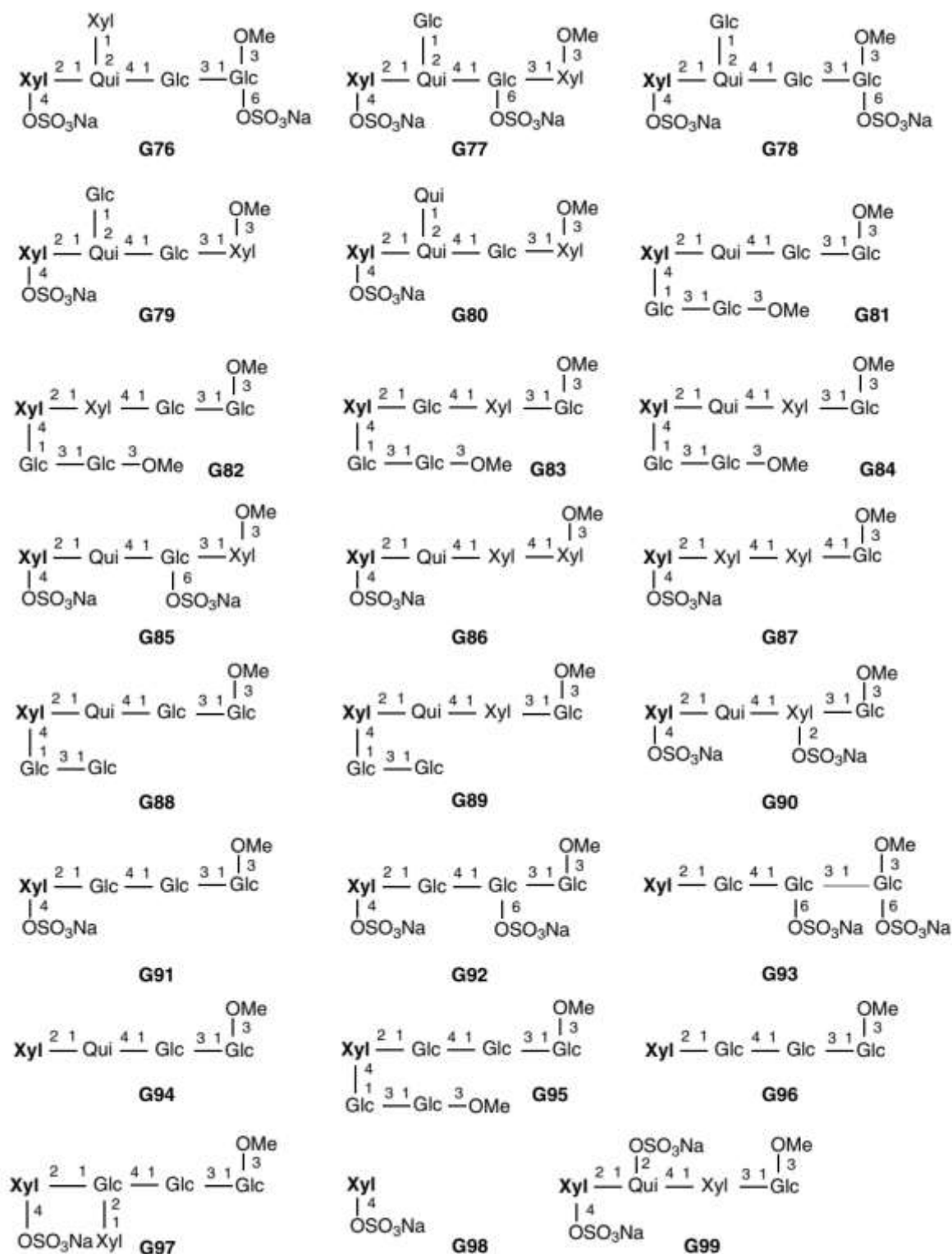
Hình 2. Một số mạch nhánh phần aglycone của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm (cấu trúc nhánh nằm trong đường đứt nét có cả ở các loài sao biển) [2].

bốn hoặc năm gốc đường) và từ không đến ba nhóm thế sulfate. Một đặc điểm thú vị là dù các chuỗi đường có cấu trúc thay đổi phức tạp, tuy nhiên gốc đường gắn trực tiếp với phần aglycone luôn là đường D-xylose có hoặc không chứa nhóm thế sulfate. Hiện nay, đã có khoảng 20 cấu trúc liên quan đến phần mạch nhánh của khung holostane và 30 cấu trúc có chuỗi đường đã được phát hiện từ các loài hải sâm [2].

Đã có hàng trăm hợp chất triterpene saponin được phân tách từ các loài hải sâm [4]. Quá trình nghiên cứu các hợp chất thuộc nhóm này được phát hiện đầu tiên bởi các nhà khoa học Nhật Bản với hai hợp chất chính holothurin A và holothurin B [5, 6]. Tiếp sau đó cũng có rất nhiều thông báo về các hợp chất tương tự từ các loài hải sâm thuộc lớp Holothurioidea, đặc biệt là trong khoảng một hai thập kỷ gần đây, đã có hàng loạt các công trình nghiên cứu phát hiện các saponin có bộ khung holostane từ các loài sinh vật biển này.



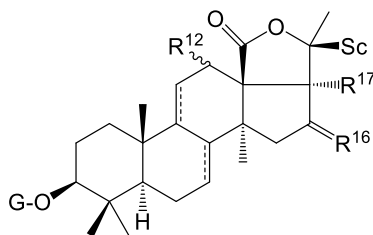
Hình 3. Một số cấu trúc chuỗi đường phổ biến của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm [2].



Hình 4. Một số cấu trúc chuỗi đường phổ biến của các hợp chất triterpene saponin từ hải sâm (*tiếp theo*) [2].

Dưới đây là bảng tập hợp một số hợp chất triterpene saponin đã được phân tách từ các loài hải sâm:

Bảng 1. Một số hợp chất triterpene saponin thuộc nhóm 1 từ các loài hải sâm.



Tên hợp chất	$\Delta$	R <sup>12</sup>	R <sup>16</sup>	R <sup>17</sup>	Sc	G	Loài hải sâm	TL
—	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-17	G70	<i>Cucumaria japonica</i>	[7]
Cucumechinoside C	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-133	G59	<i>C. echinata</i>	[8]
Cucumechinoside F	7,8	H	H <sub>2</sub>	H		G64		
Frondoside B	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-130	G71	<i>C. frondosa</i>	[9]
Cucumarioside A <sub>4</sub> -2	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-156	G70	<i>C. japonica</i>	[7]
Cucumarioside A <sub>7</sub> -3	7,8	H	H <sub>2</sub>	H		G74		[10, 11]
Calcigeroside C <sub>2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-133	G79	<i>Pentamera calcigera</i>	[12]
Calcigeroside D <sub>2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H		G77	<i>P. calcigera</i>	[13]
Philinopside A	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-130	G57	<i>Pentacta quadrangularis</i>	[14]
Philinopside B	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-156	G90		
Lefevreioside A <sub>2</sub>	7,8	H	$\alpha$ -OAc	H	sc-130	G57	<i>Cucumaria frondosa</i> <i>C. lefevrei</i>	[9] [15]
Cucumarioside A <sub>2</sub> -5	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-133	G70	<i>C. conicospermium</i>	[16]
Calcigeroside E	7,8	H	$\beta$ -OAc	H		G78	<i>Pentamera calcigera</i>	[12]
Frondoside A	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-17	G73	<i>C. frondosa</i>	[17]
Frondoside A1	7,8	H	$\beta$ -OAc	H		G57		
Cucumarioside A <sub>0</sub> -1	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-133	G73	<i>C. japonica</i>	[10, 11]
Cucumarioside A <sub>0</sub> -2	7,8	H	$\beta$ -OAc	H				
Neothyonoside C	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G61	<i>Neothyonidium magnum</i>	[18]
Frondoside D	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-28	G73	<i>Cucumaria frondosa</i>	[19]
Liouvilloside A	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G64	<i>Staurocucumis liouvillei</i>	[20]
Liouvilloside B	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-17			
Intercedenside A	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-168	G57	<i>Mensamaria intercedens</i>	[21]
Intercedenside B	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G61		
Intercedenside C	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-168	G54		
Thyonoside A	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G85	<i>Thyone aurea</i>	[22]
Thyonoside B	7,8	H	$\beta$ -OAc	H		G86		

Tên hợp chất	$\Delta$	R <sup>12</sup>	R <sup>16</sup>	R <sup>17</sup>	Sc	G	Loài hải sâm	TL
Okhotoside B <sub>1</sub>	7,8	H	$\beta$ -OAc	H		G91	<i>Cucumaria okhotensis</i>	[23]
Okhotoside B <sub>2</sub>	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G92	<i>C. okhotensis</i>	[23]
Okhotoside B <sub>3</sub>	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G93		
Okhotoside A <sub>1</sub> -1	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-133	G57		[24]
Okhotoside A <sub>2</sub> -1	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G97		
Philinopside A	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G58		<i>Pentacta quadrangularis</i>
Philinopside B	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156	G90	[25]	
Philinopside F	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G54	[26]	
Cucumarioside G <sub>1</sub>	7,8	H	OAc	H		G55	<i>Eupentacta fraudatrix</i>	[27]
Cucumarioside H	7,8	H	OAc	H	sc-18	G72	<i>E. pseudoquinquisemita</i>	[28]
Eximisoside A	7,8	H	OAc	H	sc-167	G53	<i>Psolus eximius</i>	[28]
Cucumechinoside A	7,8	H	= O	H	sc-133	G59	<i>Cucumaria echinata</i>	[8]
Cucumechinoside B	7,8	H	= O	H		G60		
Cucumechinoside D	7,8	H	= O	H		G64		
Cucumechinoside-E	7,8	H	= O	H		G60		
Cucumarioside A <sub>0</sub> -3	7,8	H	= O	H	sc-156	G73	<i>C. japonica</i>	[10, 11]
Cucumarioside A <sub>1</sub> -2	7,8	H	= O	H		G75		
Cucumarioside A <sub>2</sub> -3	7,8	H	= O	H	sc-17	G70		[7]
Cucumarioside A <sub>3</sub>	7,8	H	= O	H	sc-156	G71		[29]
Cucumarioside A <sub>4</sub> -4	7,8	H	= O	H		G70		[7]
Cucumarioside A <sub>6</sub> -2	7,8	H	= O	H		G76		
Cucumarioside A <sub>7</sub> -1	7,8	H	= O	H		G74		[10, 11]
Cucumarioside A <sub>7</sub> -2	7,8	H	= O	H	sc-17			[10, 11]
Liouvilloside A <sub>1</sub>	7,8	H	= O	H	sc-156	G59	<i>Staurocucumis liouvillei</i>	[30]
Philinopside E	7,8	H	= O	H	sc-156	G57	<i>Pentacta quadrangularis</i>	[25]
Frondoside A <sub>7</sub> -1	7,8	H	= O	H	sc-130	G74	<i>Cucumaria frondosa</i>	[31]
Violaceuside I	7,8	H	= O	H	sc-156	G54	<i>Pseudocolochirus violaceus</i>	[32]
Violaceuside II	7,8	H	= O	H		G61		
Violaceuside III	7,8	H	= O	H		sc-130		
Cucumarioside A <sub>7</sub> -3	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-156	G74	<i>Cucumaria miniata</i>	[10, 11]
Mollisoside A	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-169	G57	<i>Australostichopus mollis</i>	[33]

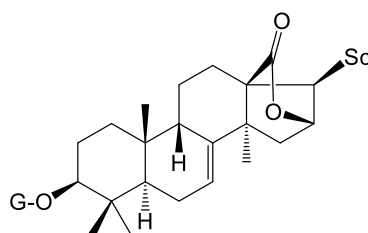
Tên hợp chất	$\Delta$	R <sup>12</sup>	R <sup>16</sup>	R <sup>17</sup>	Sc	G	Loài hải sâm	TL
Mollisoside B <sub>2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-156	G56	<i>A. mollis</i>	
Stichloroside A <sub>1</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-163	G82	<i>Stichopus chloronotus</i>	[34]
Stichloroside A <sub>2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-164			
Stichloroside B <sub>1</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-163	G83		
Stichloroside B <sub>2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-164			
Stichloroside C1	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-163	G84		
Stichloroside C2	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-164			
Frondoside A <sub>7-2</sub>	7,8	H	H <sub>2</sub>	H	sc-130	G74		
Hillaside A	7,8	H	H <sub>2</sub>	OH	sc-168	Xyl	<i>Holothuria hilla</i>	[35]
Intercedenside G	7,8	H	$\beta$ -OAc	H		G87	<i>Mensameria intercedens</i>	[36]
Pentactaside B	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G99	<i>Pentacta quadrangularis</i>	[37]
Pentactaside C	7,8	H	$\beta$ -OAc	H	sc-156			
Intercedenside D	7,8	H	$\beta$ -OAc	OH	sc-168	G54	<i>Mensameria intercedens</i>	[36]
Intercedenside E	7,8	H	$\beta$ -OAc	OH		G87		
Intercedenside H	7,8	H	$\beta$ -OAc	OH		G57		
Intercedenside F	7,8	H	$\beta$ -OAc	OH		sc-130		
Patagonicoside A	7,8	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-17	G68	<i>Psolus patagonicus</i>	[38]
Arguside A	9,11	$\alpha$ -OH	$\beta$ -OAc	H	sc-130	G94	<i>Bohadschia argus</i>	[39]
Arguside B	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-17	G81		[40]
Arguside C	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH		G95		
Holothurinoside A	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-162	G68	<i>Holothuria forskalii</i>	[41]
Holothurinoside B	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-165		<i>H. forskalii</i>	
17-Hydroxyfuscocineroside B	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-171	G58	<i>Bohadschia marmorata</i>	[42]
Arguside D	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-170	G96	<i>Bohadschia argus</i>	[43]
Arguside E	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-162			
Impatienside	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-157	G81	<i>Holothuria impatiens</i>	[44]
25-Hydroxyfuscocineroside B	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-172	G58	<i>Bohadschia marmorata</i>	[42]
Holothurinoside D	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-162	G50	<i>Holothuria forskalii</i>	[41]
—	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-17	G81	<i>Telenata ananas</i>	[45]
Fuscocineroside A	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-170	G58	<i>Holothuria fuscocinerea</i>	[46]
Fuscocineroside B	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-171			
Fuscocineroside C	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-162			

Tên hợp chất	$\Delta$	R <sup>12</sup>	R <sup>16</sup>	R <sup>17</sup>	Sc	G	Loài hải sâm	TL
Leucospilotaside C	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	H	sc-162	G98	<i>Holothuria leucospilota</i>	[47]
Pervicoside A (= Neothyoside A)	9,11	OH	H <sub>2</sub>	H	sc-161	G58	<i>Holothuria pervicax</i> <i>Neothyone gibbosa</i>	[48] [49]
Neothyoside B	9,11	OH	H <sub>2</sub>	H		G51	<i>N. gibbosa</i>	[49]
Pervicoside B	9,11	OH	H <sub>2</sub>	H	sc-130	G58	<i>Holothuria pervicax</i>	[48]
Pervicoside C	9,11	OH	H <sub>2</sub>	H			<i>H. pervicax</i>	
Echinoside A (= Holothurin A <sub>2</sub> )	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-17		<i>Actinopyga echinites</i> <i>Holothuria edulis</i>	[50] [51]
Griseaside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-158	G68	<i>Holothuria grisea</i>	[52]
17-Dehydroholothurinoside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-162		<i>H. grisea</i>	
22 $\xi$ -Hydroxyechinoside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-158	G58	<i>Actinopyga flammea</i>	[53]
22 $\xi$ -Hydroxy-24,25-didehydro echinoside A (= holothurin A <sub>1</sub> )	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-157			[54]
22 $\xi$ -Acetoxyechinoside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-34			
24-Dehydroechinoside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-130		<i>A. agassizi</i>	[54]
(24S)-Hydroxy-25,26-didehydro-echinoside A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-159		<i>A. flammea</i>	
Echinoside B (= Holothurin B <sub>1</sub> )	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-17	G51	<i>Actinopyga echinites</i> <i>A. mauritiana</i>	[50] [55]
24-Dehydroechinoside B	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-130		<i>A. mauritiana</i>	[56]
Holothurin A	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-162	G58	<i>Actinopyga sp.</i> <i>Actinopyga agassizi</i> <i>Holothuria leucospilota</i>	[54, 57, 58]
Holothurin B	9,11	OH	H <sub>2</sub>	OH		G51	<i>H. leucopista</i>	[59]
—	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH		G52	<i>Telenata ananas</i>	[45]
Holothurin B2	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-158			
Holothurin B3	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-162	G58	<i>Holothuria sp.</i>	[60]
Holothurin B4	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-167			
Hillaside C	9,11	$\alpha$ -OH	H <sub>2</sub>	OH	sc-166	G99	<i>Holothuria hilla</i>	[61]
Hillaside B	9,11	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OAc	OH		Xyl	<i>H. hilla</i>	[35]
Holotoxin A	9,11	H	= O	H	sc-156	G81	<i>Stichopus japonicus</i>	[62]



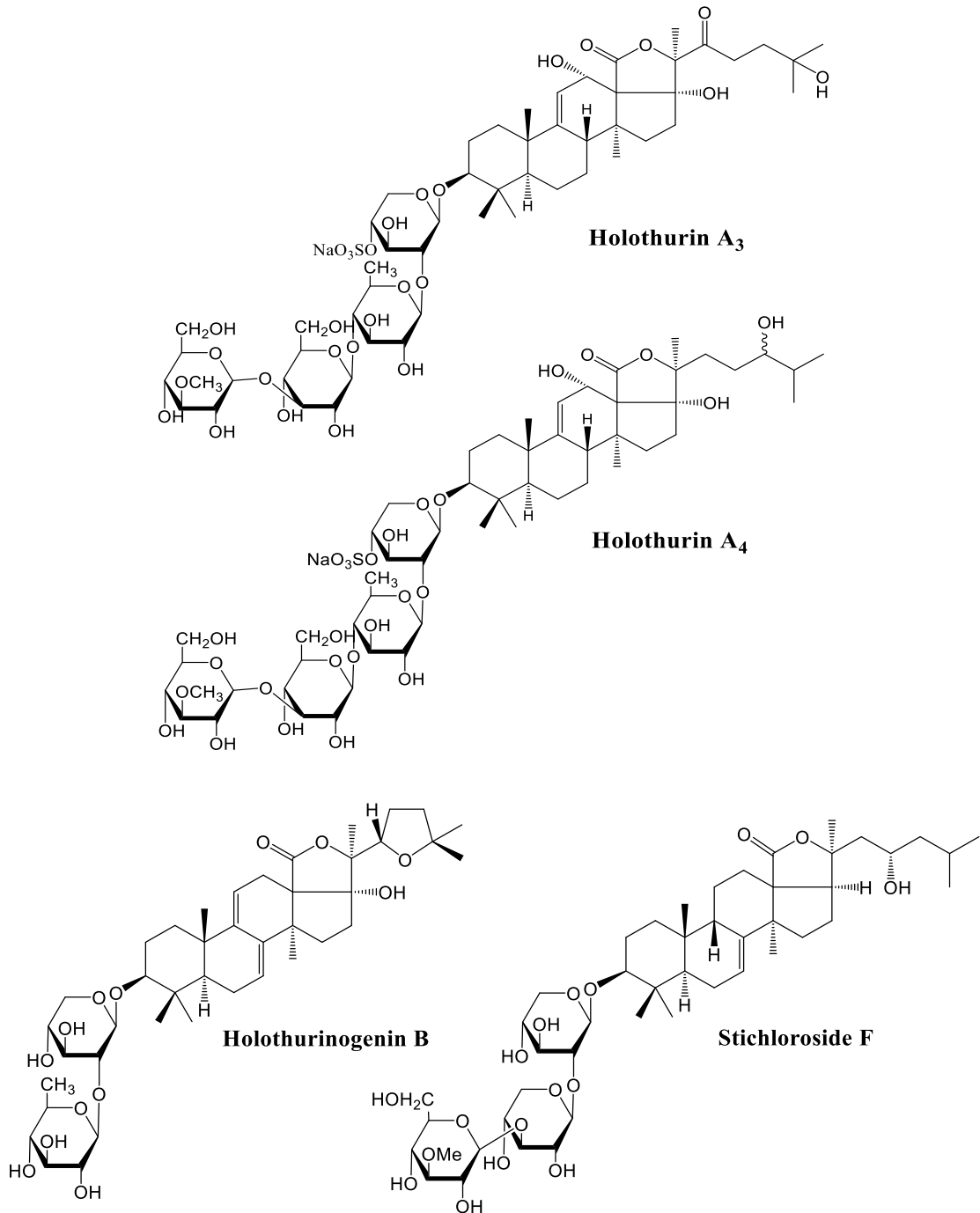
Tên hợp chất	$\Delta$	R <sup>12</sup>	R <sup>16</sup>	R <sup>17</sup>	Sc	G	Loài hải sâm	TL
Mollisoside B <sub>1</sub>	9,11	H	= O	H		G57	<i>Australostichopus mollis</i>	[33]
Psoluthurin A	9,11	H	= O	H		G51	<i>Psolus fabricii</i>	[63]
Neothyonidioside	9,11	H	= O	H		G57	<i>Neothyonidium magnum</i>	[64]
Cucumarioside A <sub>2</sub> -2	9,11	H	= O	H		G58	<i>Cucumaria japonica</i>	[7]
Psolusoside A	9,11	H	= O	H		G63	<i>Neothyonidium magnum</i> <i>Psolus fabricii</i>	[64] [65]
DS-penaustroside Ce	9,11	H	= O	H		G69	<i>Pentacta australis</i>	[66]
DS-penaustroside De	9,11	H	= O	H	sc-17	G69	<i>Pentacta australis</i>	[66]
Hemoiedemoside A	9,11	H	= O	H		G59	<i>Hemoiedema spectabilis</i>	[67]
Hemoiedemoside B	9,11	H	= O	H	sc-156	G64		
Mollisoside B <sub>1</sub>	9,11	H	= O	H	sc-169	G54	<i>Australostichopus mollis</i>	[33]
Parvimoside A	9,11	H	= O	H		G88	<i>Stichopus parvimensis</i>	[68]
Parvimoside B	9,11	H	= O	H	sc-17	G89		

Bảng 2. Một số hợp chất triterpene saponin thuộc nhóm 2 từ các loài hải sâm.



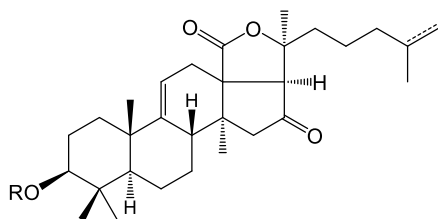
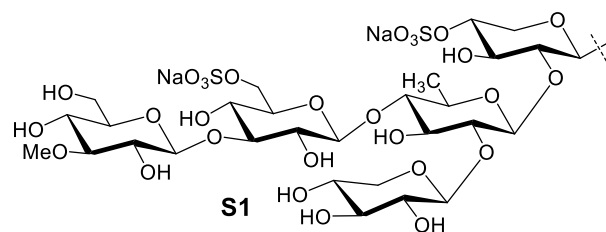
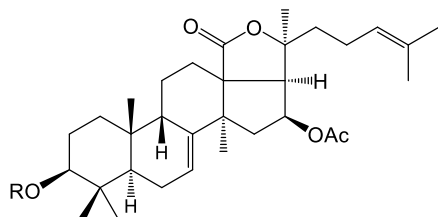
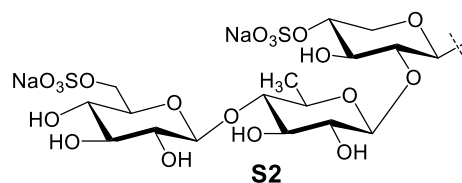
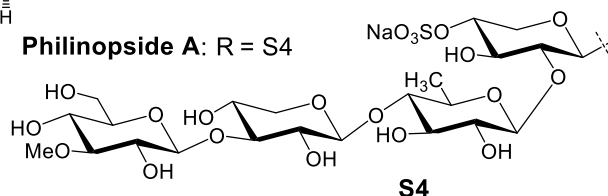
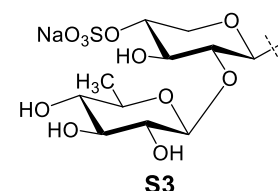
Tên	Sc	G	Loài hải sâm	TL
Cucumarioside G <sub>2</sub>	sc-155	G55	<i>Eupentacta fraudatrix</i> <i>Pentamera calcigera</i>	[69] [12]
Psolusoside B	sc-160	G66	<i>Psolus</i> sp.	[70]
Calcigeroside B	sc-155	G80	<i>P. calcigera</i>	[12]
Calcigeroside C <sub>1</sub>	sc-155	G79		
Calcigeroside C <sub>1</sub>	sc-155	G77		[71]

Các nghiên cứu tiến hành trong nước về thành phần triterpene saponin từ các loài hải sâm chủ yếu được nhóm nghiên cứu của GS. VS. Châu Văn Minh thực hiện và cũng cho thấy sự tương đồng với các công bố trên thế giới. Các hợp chất thu được đều có cấu trúc thuộc nhóm 1 (nhóm phổ biến). Các saponin đầu tiên được phát hiện là holothurin A và B từ các loài hải sâm *Holothuria vagabunda* và *H. martensii* sinh sống ở vùng biển Việt Nam [72]. Các nghiên cứu tiếp theo về các triterpene saponin



từ loài hải sâm *H. scabra* đã phân lập được ba hợp chất holothurin A-B, A<sub>2</sub> và ba hợp chất saponin mới được đặt tên là holothurin A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub> và holothurinogenin B [73, 74].

Từ loài *Stichopus chloronotus* đã phân lập và xác định được cấu trúc của hợp chất saponin mới được đặt tên là stichloroside F cùng với stichloroside A<sub>2</sub>, stichoposide D-E, neothyonidioside và holothurin B [75]. Hợp chất echinoside B và holothurin B cũng được công bố từ loài hải sâm *Holothuria atra* [76].

**Colochiroside A:** R = S1**Cercodemasoide A:** R = S1,  $\Delta^{25}$ **Cercodemasoide B:** R = S2**Cercodemasoide C:** R = S2,  $\Delta^{25}$ **Cercodemasoide D:** R = S3**Cercodemasoide E:** R = S3,  $\Delta^{25}$ **Philinopside A:** R = S4**S2****S4****S3**

Tiếp theo, nhóm tác giả đã công bố năm saponin mới được đặt tên lần lượt là cercodemasoide A-E, philinopside A và colochiroside A từ loài hải sâm có tên khoa học *Cercodemas anceps* [77].

### 1.3. Các nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào của các triterpene glycoside từ các loài hải sâm

#### 1.3.1. Các nghiên cứu trên thể giới

Thông kê các nghiên cứu đã công bố cho thấy, các triterpene glycoside từ hải sâm thể hiện nhiều hoạt tính sinh học như khả năng tán huyết (hemolytic), gây độc TBUT, kháng nấm và một số hoạt tính khác liên quan đến các hoạt động tương tác với màng tế bào của lớp chất này. Trong đó, hoạt tính được quan tâm nghiên cứu nhiều và có triển vọng ứng dụng nhất là các hoạt tính theo hướng chống ung thư.

Từ năm 1952 hoạt tính kháng u của các hợp chất triterpene glycoside được phát hiện bởi nhóm nghiên cứu của tác giả Nigrelli. Nhóm nghiên cứu đã chứng minh được khi tiêm dưới da dung dịch holothurin (phân đoạn có chứa các hợp chất glycoside từ loài hải sâm *Actinopyga agassizi*) ức chế sự phát triển của các tế bào khối u (Sarcoma-180) và kích thích sự giảm kích thước của khối u. Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy các hợp chất holothurin ở nồng độ 5  $\mu\text{g/mL}$  ức chế sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô (KB) [78].

Bảng 3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số chất trên hai dòng L1210, KB.

TT	Hợp chất	Giá trị IC <sub>50</sub> trên dòng tế bào ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		L1210	KB
1	Cucumechinoside A	1,7	4,0
2	Cucumechinoside B	2,9	6,3
3	Cucumechinoside C	2,8	4,0
4	Cucumechinoside D	8,4	7,6
5	Cucumechinoside E	20,0	36,0
6	Cucumechinoside F	2,7	3,6
7	Desulfated cucumechinoside A	0,34	1,2
8	Desulfated cucumechinoside B	0,32	0,7
9	Desulfated cucumechinoside C	0,26	1,1

Phân đoạn làm giàu saponin từ loài *Stichopus chloronotus* và *Thelenota ananas* ức chế sự phát triển của tế bào P-388 và từ loài hải sâm *Actinopyga mauritiana* ức chế sự phát triển của tế bào KB và L1210. Các saponin từ 19 loài hải sâm thuộc họ Holothuriidae và Stichopodidae ức chế sự phát triển của tế bào Sacoma-37 ở nồng độ từ 6,2 - 100  $\mu\text{g/mL}$  [78]. Holotoxin A<sub>1</sub> từ loài *Apostichopus japonicus* ức chế sự phát triển của khối u Ehrlich thể rắn và Sarcoma-37 từ 37-65 và từ 13-53% tương ứng ở liều 1,25 và 2,50 mg/kg [78]. Các triterpene saponin từ loài *Cucumaria echinata* có hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng L1210 và KB (Bảng 3) [8].

Các hợp chất DS-penaustroside A-B từ loài hải sâm *Pentacta australis* có hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng L1210 và KB tương ứng IC<sub>50</sub> = 0,12 và 0,62  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,1 và 4,6  $\mu\text{g/mL}$  [79]. Trong khi cucumarioside A<sub>3</sub> và A<sub>6</sub> từ loài hải sâm *Cucumaria japonica*; dẫn xuất desulfate của frondoside C từ loài *C. frondosa* có hoạt tính với giá trị IC<sub>50</sub> = 1,0  $\mu\text{g/mL}$  khi đánh giá trên các dòng tế bào ung thư P388, Schabel, A549, HT-29 và Mel-28 [29, 80]. Các dẫn xuất desulfate của calcigeroside B và C<sub>1</sub>- C<sub>2</sub> từ loài hải sâm *Pentamera calcigera* có thể hiện hoạt tính ở mức trung bình (IC<sub>50</sub> = 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) trên các dòng tế bào P388, A549, HT-29 và Mel-28 [12].

Tương tự thử nghiệm các hợp chất intercedenside A-I từ loài hải sâm *Mensamaria intercedens* có hoạt tính trên 10 dòng tế bào ung thư người (MCF7, A549, 1A9, CAKI-1, KB, U-87-MG, KB-VIN, PC-3, SK-Mel-2 và HCT-8) với giá

Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của hợp chất philinopside A và B.

Dòng tế bào	Giá trị IC <sub>50</sub> của hợp chất (μg/mL)	
	Philinopside A	Philinopside B
CAK1	3,00	2,00
HOS	1,80	1,10
KB-VIN	3,30	3,00
KB	3,50	3,00
SK-Mel-2	3,20	2,60
U87-MG	3,20	2,40
HCT-8	1,70	0,93
1A9	1,79	0,09
A549	1,70	0,75
PC3	1,70	1,70

trị ED<sub>50</sub> trong khoảng 0,6 - 4,3 μg/mL. Intercedenside A có hoạt tính chống ung thư *in vivo* trên dòng tế bào ung thư phổi Lewis và Sarcoma-180 chuột [21, 81]. Philinopside A và B phân lập từ loài *Pentacta quadrangularis* được đánh giá hoạt tính GĐTB trên 10 dòng tế bào ung thư. Các hợp chất này có hoạt tính mạnh trên tất cả các dòng tế bào ung thư (Bảng 4) [14]. Philinopside B với sự xuất hiện thêm nhóm sulfate ở C-2 của gốc đường thứ 3 (xylose) và liên kết đôi C-25/C-26 có hoạt tính tốt hơn. Ngoài ra, philinopside A ức chế mạnh sự phát triển, di căn và tạo mạch của tế bào HMECs theo kiểu phụ thuộc nồng độ với giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là  $1,4 \pm 0,17$ ,  $0,89 \pm 0,23$  và  $0,98 \pm 0,19$  μM [14]. Cũng từ loài hải sâm *P. quadrangularis*, hai hợp chất saponin dạng khung holostane có chứa ba gốc đường là pentactaside I và II, một saponin có hai gốc đường là pentactaside III được phát hiện có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư P388, A549, MCF7, MK N-28, HCT-116 và U87MG [82]; hai hợp chất pentactaside B-C có hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư P388, HCT-116, MCF7, MKN-28 và A549 [83]. Leucospilotaside B phân lập từ loài hải sâm *H. leucospilota* có hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên các dòng tế bào ung thư người (HL-60, MOLT-4, A549 và BEL-7402) [84].

Desulfated echinoside A (được biết đến từ loài hải sâm *Pearsonothuria graeffei*) ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư HepG2 và làm giảm sự hình thành ống ở tế bào nội mô người (ECV-304). Hợp chất này cũng có khả năng chống di căn

bằng cách ức chế sự hoạt hóa NF- $\kappa$ B phụ thuộc vào hệ metalloproteinase-9 và nhân tố hình thành nội mô mạch máu [85]. Được phân tách từ loài sao biển Viễn đông *Eupentacta fraudatrix*, ba cucumarioside H<sub>5</sub>-H<sub>7</sub> thể hiện độc tính đối với tế bào lympho chuột và gây tan máu trên tế bào hồng cầu chuột [86]. Các hợp chất cucumarioside A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>10</sub>, A<sub>13</sub> và B<sub>2</sub> từ loài hải sâm *E. fraudatrix* có hoạt tính mạnh trên các tế bào lympho lách chuột với khả năng gây độc tế bào chống lại tế bào ung thư Ehrlich. Cucumarioside B<sub>2</sub> thể hiện tính độc thấp hơn với tế bào ung thư Ehrlich [87-90]. Ngoài ra, ba hợp chất scabraside D, fuscocineroside C và 24-dehydroechinoside A được phát hiện lần đầu từ loài hải sâm *Holothuria scabra* và thể hiện hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư P388, A549, MKN-28, HCT-116 và MCF7 [91]. Pseudocnoside A từ hải sâm *Pseudocnus dubiosus leoninus*, có hoạt tính gây độc và chống tăng sinh trên các dòng tế bào ung thư A549 và HeLa [92].

Cucumarioside I<sub>2</sub> từ hải sâm *Eupentacta fraudatrix* có tác động tăng cường hoạt tính lysosome của đại thực bào [93]. Cucumarioside I, phân lập từ hải sâm *E. fraudatrix* có hoạt tính gây độc tế bào lympho lách chuột và tế bào ung thư Ehrlich [94]. Các hợp chất typicoside A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> và C<sub>2</sub> từ loài hải sâm *Actinocucumis typica* [95]; cladolosome B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>, C, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> và D từ loài hải sâm *Cladolabes schmeltzii* có hoạt tính gây độc tế bào và làm tan máu rất mạnh [96]. Được phân tách từ loài hải sâm *Holothuria nobilis*, hợp chất echinoside A ức chế sự phát triển của các khối u trên chuột cũng như khối u ung thư tuyến tiền liệt người cấy ghép ngoại lai trên chuột nude và ức chế sự liên kết không cộng hóa trị của topoisomerase2 $\alpha$  vào DNA [97]. Holothurinoside J<sub>1</sub> và holothurinoside K<sub>1</sub> được phân tách từ loài hải sâm *Bohadschia subrubra* thể hiện khả năng làm tan bào yếu và phản ứng orcinol [98].

Các nghiên cứu sâu về cơ chế cho thấy philinopside A có ảnh hưởng lên quá trình tạo mạch (angiogenesis) và phát triển của khối u được đánh giá trên nhiều mô hình thực nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Các kết quả nghiên cứu còn cho thấy, với sự ức chế mạnh ba giai đoạn quan trọng của quá trình tạo mạch (sự tăng sinh của các tế bào nội mô, sự dịch chuyển và sự hình thành ống) của hợp chất này, sự hình thành và phát triển của các mạch máu bị giảm đi đáng kể. Ở các nồng độ khác nhau, hợp chất này ức chế sự tăng sinh của tế bào nội mô vi ống ở người HMECs (Human Microvascular Endothelial Cells) lên tới 98,7%. Ở các nồng độ tương ứng, hợp chất này ức chế sự dịch chuyển của các tế bào HMECs tới 94,1%. Ở nồng độ 2 - 10  $\mu$ M, philinopside A

Bảng 5. Ảnh hưởng của hợp chất philinopside A lên sự phát triển của khối u Sarcoma-180 *in vivo*.

Khối u	Nhóm thử	Liều mg/kg/d×d	Số chuột (đầu/cuối)	Trọng lượng (g) (đầu/cuối)	Trọng lượng khối u (g)	Tỷ lệ ức chế (%)	Giá trị <i>p</i>
Sarcoma-180	Nước muối	-	16/16	21,1/27,8	1,80 ± 0,27	-	-
	Philinopside A	1 × 7	8/8	21,3/26,5	1,43 ± 0,54	20,6	>0,05
	Philinopside A	2 × 7	8/8	21,1/26,3	0,97 ± 0,33	46,1	<0,01
	Philinopside A	4 × 7	8/8	21,3/26,8	0,73 ± 0,09	59,4	<0,01
	5-FU	25 × 7	8/8	21,0/26,0	1,06 ± 0,54	41,1	<0,01

ức chế sự hình thành của các vi ống mới. Ngoài ra, hợp chất này còn làm giảm thể tích khối u Sarcoma-180 ở chuột theo cơ chế cảm ứng apoptosis của khối u cùng với các tế bào nội mô liên kết với khối u [99]. Hơn nữa, hợp chất này cũng ức chế phổ rộng các thụ thể tyrosine kinase RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) liên quan đến sự hình thành mạch bao gồm FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor-1), PDGF $\beta$  (Platelet-Derived Growth Factor receptor- $\beta$ ), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), cùng với EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), ở giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng từ 2,6 đến 4,9  $\mu$ M. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, philinopside A có thể biểu hiện là tác nhân ức chế hiệu quả các RTK, trong khi LD<sub>50</sub> ở chuột là 625 mg/kg theo đường uống [99].

Nghiên cứu hoạt tính kháng u và chống tạo mạch của philinopside E cho thấy, hợp chất này ức chế sự tăng sinh của các tế bào nội mô vi ống ở da và các tế bào nội mô mạch ở rốn với giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là 2,22 ± 0,31 và 1,98 ± 0,32  $\mu$ M. Ở nồng độ dưới 2,0  $\mu$ M hợp chất này có tác dụng cảm ứng apoptosis ở các tế bào nội mô, ức chế phụ thuộc nồng độ sự dịch chuyển, khả năng bám dính của các tế bào và sự hình thành các ống ở các tế bào đó và có hoạt tính chống tăng sinh trên nhiều dòng TBUT với giá trị IC<sub>50</sub> ~ 4,0  $\mu$ M. Đặc biệt, philinopside E làm giảm thể tích khối u Sarcoma-180 chuột thông qua cơ chế kích hoạt apoptosis ở cả tế bào u và các tế bào nội mô liên quan đến khối u. Hợp chất này cũng ức chế các thể hoạt động (đã được phosphoryl hóa) của các thụ thể yếu tố tăng trưởng mạch nội mô bao gồm KDR/Flk-1, VEGF2 ERK, FAK, paxillin và Akt. Như vậy, hợp chất này có hoạt tính chống tạo mạch có liên quan tới ức chế con đường tín hiệu của VEGFR2 và có hoạt tính kháng u triển

vọng với khả năng làm giảm sự tăng sinh của các tế bào khối u và gia tăng quá trình apoptosis của cả tế bào u và tế bào nội mô [100]. Ngoài ra, hợp chất này được khẳng định có tương tác đặc hiệu với miền ngoại bào của enzym kinase chèn vào thụ thể liên kết vùng KRD (domain-containing receptor) và khóa tương tác của nó với VEGF và con đường giáng hóa tín hiệu của nó [101]. Cả atagonicoside A (phân lập từ loài hải sâm *Psolus patagonicus*) và dẫn xuất desulfate của nó đều có tác dụng ức chế sự phát triển của ba dòng tế bào ung thư (Hep3B, MDA-MB231 và A549) và kích thích sự hoạt hóa NF- $\kappa$ B đồng thời với sự giáng hóa IK Ba ở tế bào A549 [102].

Desulfated echinoside A (được biết đến từ loài hải sâm *Pearsonothuria graeffei*) ức chế sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô tế bào gan HepG2 và làm giảm sự hình thành ống ở tế bào nội mô người (ECV-304). Hợp chất này cũng có khả năng chống sự di căn bằng cách ức chế NF- $\kappa$ B phụ thuộc vào hệ metalloproteinase-9 và nhân tố tăng trưởng nội mô mạch máu [85]. Echinoides A và DS-echinoides A có khả năng cô lập đáng kể tới chu kỳ tế bào của tế bào ung thư HepG2 ở giai đoạn G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Ở nồng độ 2,70  $\mu$ M, echinoides A đã tăng quần thể tế bào trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> từ 67,9% lên 75,2%. DS-echinoides A còn tác dụng mạnh mẽ, khiến 79,8% quần thể tế bào bị bắt giữ trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Echinoides A cũng làm giảm rõ rệt tỷ lệ biểu hiện mRNA của Bcl-2/Bax và điều chỉnh tăng mức độ biểu hiện mRNA của caspase-3, caspase-8 và caspase-9 trong các tế bào HepG2 [103].

Gần đây các nhà khoa học phát hiện DS-echinoides A đã ảnh hưởng đến sự di chuyển và xâm chiếm tế bào. DS-echinoides A đã ngăn chặn sự kết dính, di chuyển và xâm lấn của các tế bào ung thư HepG2 ở người và cho thấy sự giảm độ bám của tế bào phụ thuộc vào liều và thời gian và giảm tỷ lệ bám dính trung bình của tế bào xuống 67,6% và 39,5% ở nồng độ tương ứng 1,35  $\mu$ M và 2,7  $\mu$ M. Một sự ức chế phụ thuộc vào liều và thời gian của việc dàn trải và lan rộng tế bào đã được quan sát thấy khi có mặt của DS-echinoides A lên đến 80,9% và 36,4% ở cùng một liều. Hơn nữa, khi xử lý bằng DS-echinoides A gây ra sự ức chế phụ thuộc liều vào sự xâm lấn HepG2, với nồng độ glycoside tương tự cho tỷ lệ ức chế tương ứng là 60,5% và 81,4%. Phân tích miễn dịch hóa học cho thấy DS-echinoides A áp chế biểu hiện ma trận metalloproteinase-9 (MMP-9), đóng vai trò quan trọng trong việc phá vỡ màng đáy liên quan đến sự hình thành mạch, di căn. DS-echinoides A cũng làm tăng biểu



hiện ức chế mô của metalloproteinase-1 (TIMP-1) điều chỉnh kích hoạt MMP-9 [104].

Hai hoạt chất holothurin A và 24-dehydroechinoside A từ loài hải sâm *Pearsonothuria graeffei* ức chế mạnh quá trình di căn trên mô hình *in vitro* và *in vivo* thực nghiệm. Phân tích hóa miễn dịch cho thấy cả hai hợp chất này làm giảm mạnh sự biểu hiện của MMP-9 và kích thích mức độ biểu hiện của các tác nhân ức chế mô của TIMP-1 (một tác nhân điều tiết quan trọng của MMP-9). Theo kết quả đánh giá trên Western blot thực nghiệm, hai hợp chất này cũng loại bỏ đáng kể sự biểu hiện của VEGF. Ngược lại, xử lý với 24-dehydroechinoside không ảnh hưởng đến sự điều tiết giảm sự biểu hiện của NF- $\kappa$ B và làm giảm mạnh khả năng bám dính của tế bào HepG2 đến cả matrigel và ECV-304 và cũng ức chế sự dịch chuyển và xâm lấn của tế bào HepG2 một cách phụ thuộc nồng độ. Hợp chất này có khả năng ức chế di căn tốt hơn holothurin A. Tuy nhiên, chỉ có holothurin A gây ra điều tiết giảm sự biểu hiện của sự hoạt hóa NF- $\kappa$ B [105].

Được tìm thấy từ loài hải sâm *Colochirus anceps*, colochiroside A có thể hiện hoạt tính kháng ung thư *in vitro* và *in vivo* mạnh và không làm ảnh hưởng đến chức năng điều tiết miễn dịch ở chuột. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy colochiroside A có hoạt tính gây độc mạnh trên sáu dòng tế bào ung thư là P388, HL-60, A549, SpC-A4, MKN-28 và SGC-7901. Nghiên cứu tiếp theo cho thấy hợp chất này có khả năng ức chế mạnh tế bào ung thư phổi H-22 và Sarcoma-180 ở chuột. Tỷ lệ ức chế tối đa đối với tế bào H-22 là 52,2%, trong khi đối với tế bào S180 là 70,0%. Ngoài ra, hợp chất này không gây ảnh hưởng đến sự phát triển ở tuyến ức và lá lách ở chuột [106].

Frondoside A phân lập từ loài hải sâm *Cucumaria frondosa* thể hiện sự chống xâm lấn mạnh mẽ trên chuột gây ung thư vú di căn. Sau khi tiêm vào màng bụng của chuột có khối u cấy ghép tuyến vú, frondoside A ức chế sự di căn khối u tự phát trong phổi. Sự gia tăng hoạt động cyclooxygenase-2 (COX-2) thúc đẩy sự phát triển và di căn của khối u bằng cách tạo ra mức prostaglandin E2 (PGE2) cao tác động lên các thụ thể của prostaglandin E (chủ yếu là EP2 và EP4). Frondoside A đối kháng các thụ thể EP2 và EP4 của prostaglandin E. Frondoside A ức chế liên kết  $^3\text{H}$ -PGE2 với các tế bào biểu hiện EP2 hoặc EP4 tái tổ hợp ở nồng độ cao (IC<sub>50</sub> lần lượt là 16,5 và 3,7  $\mu\text{M}$ ). Hơn nữa, frondoside A cũng ức chế hoạt hóa cAMP nội bào liên kết với EP2

hoặc EP4 cùng với hoạt hóa tín hiệu ngoại bào ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase) qua trung gian EP4 [107]. Frondoside A cũng gây ra sự ức chế sự di căn của các tế bào và xâm lấn *in vitro* phụ thuộc nồng độ và thời gian. Bên cạnh đó, hợp chất này làm giảm mạnh sự tăng trưởng và di căn hạch bạch huyết của khối u xenograft LNM35 ở chuột athymic mà không có tác dụng phụ độc hại [108].

### 1.3.2. Các nghiên cứu trong nước

Được phân tách từ loài hải sâm *Holothuria scabra*, hai triterpene glycoside mới holothurin A<sub>3</sub> và A<sub>4</sub> có khả năng ức chế mạnh trên hai dòng tế bào ung thư người là KB và HepG2 với giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là 0,87 và 0,32 mg/mL đối với holothurin A<sub>3</sub> và 1,12 và 0,57 mg/mL đối với holothurin A<sub>4</sub> [74].

Bảng 6. Khả năng ức chế của các hợp chất phân lập từ hải sâm *Cercodemas anceps* lên sự phát triển của năm dòng tế bào ung thư [77].

Hợp chất	Giá trị IC <sub>50</sub> của các hợp chất ( $\mu$ M)				
	LNCaP	MCF7	KB	HepG2	SK-Mel-2
Colochiroside A	0,17 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,04
Cercodemasoide A	0,23 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,06
Cercodemasoide B	1,19 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,14	1,47 $\pm$ 0,17
Cercodemasoide C	1,92 $\pm$ 0,22	1,03 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,03	4,69 $\pm$ 0,31	1,25 $\pm$ 0,22
Cercodemasoide D	2,11 $\pm$ 0,13	1,09 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,05	2,05 $\pm$ 0,21	4,09 $\pm$ 0,26
Cercodemasoide E	3,30 $\pm$ 0,20	1,33 $\pm$ 0,33	1,37 $\pm$ 0,15	6,08 $\pm$ 0,74	7,36 $\pm$ 0,46
Philinopside A	1,19 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,24	0,85 $\pm$ 0,07
Ellipticine	1,99 $\pm$ 0,16	1,95 $\pm$ 0,12	2,07 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,16	2,15 $\pm$ 0,24

Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất triterpen glycoside từ loài hải sâm *Cercodemas anceps* cho thấy cả cercodemasoide A và colochiroside A có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên hai dòng tế bào ung thư KB và HepG2 với giá trị IC<sub>50</sub> từ 30 đến 70 nM và có hoạt tính mạnh trên các dòng tế bào ung thư LNCaP, MCF7 và SK-Mel-2 với giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng từ 0,11 đến 0,24  $\mu$ M. Hoạt tính mạnh cũng được ghi nhận ở hợp chất cercodemasoide B và philinopside A trên tất cả năm dòng tế bào ung thư được thử nghiệm với giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng từ 0,11 đến 1,47  $\mu$ M và ở các hợp chất cercodemasoide C-E trên hai dòng tế bào KB và MCF7 (IC<sub>50</sub> từ 0,32 đến 1,37  $\mu$ M) và cercodemasoide C trên dòng tế bào SK-Mel-2

( $IC_{50} = 1,25 \pm 0,22 \mu M$ ). Hoạt tính của các hợp chất này mạnh hơn khi so sánh với chất đối chứng dương ellipticine. Ngoài ra, cercodemasoide C-E có hoạt tính tốt đối với hai dòng tế bào LNCaP và HepG2 với giá trị  $IC_{50}$  từ 1,92 đến 6,08  $\mu M$  và hai hợp chất cercodemasoide D và E có hoạt tính tốt đối với dòng SK-Mel-2 với  $IC_{50} = 4,09 \pm 0,26$  và  $7,36 \pm 0,46 \mu M$  [77].

#### 1.4. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu

##### 1.4.1. Đặc điểm sinh học và phân bố hai loài hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis*

###### 1.4.1.1. Loài hải sâm *Stichopus horrens*

###### Hệ thống phân loại:

Ngành: Echinodermata

Lớp: Holothuroidea

Bộ: Synallactida

Họ: Stichopodidea

Giống: *Stichopus*

Loài: *Stichopus horrens* Selenka, 1867

###### Synonym:

*Holothuria lutea* Quoy & Gaimard, 1834

*Stichopus godeffroyi* Semper, 1868

*Stichopus godeffroyi* var. *pygmaeus* Semper, 1868

*Stichopus godefroyi* Semper, 1868

*Stichopus tropicalis* Fisher, 1907

*Stichopus variegatus* Semper, 1868



Hình nguyên sắc ([https://en.wikipedia.org/wiki/Stichopus\\_horrens](https://en.wikipedia.org/wiki/Stichopus_horrens))

**Phân bố:** Loài *S. horrens* phân bố rộng đã tìm thấy ở các nước thuộc Ấn Độ - Tây Thái Bình Dương. Loài này đã tìm thấy ở độ sâu 0 - 20 m nước trên rạn san hô, bãi triều đáy cát, đá dăm, ẩn dưới đá hoặc các rạn san hô chết. Ở nước ta thường tìm thấy trong các rạn đá, rạn san hô dọc ven bờ các tỉnh ở miền Trung.

**Mô tả:** Loài *S. horrens* thuộc họ Sticopodidae, bộ Synallactida, lớp Holothuroidea. Kích thước loài này thuộc loại trung bình, chiều dài từ 15 - 20 cm màu xanh nhạt hoặc trắng pha xanh. Cơ thể rất mềm, bao phủ xung quanh bởi nhiều nốt sần. Có khoảng 20 xúc tu miệng hình khiên. Gai xương dạng hình móc câu, hình côn và dạng bạng. Lát cắt ngang hình tứ giác nhưng phân bụng dẹt.

**Sinh học:** Loài này sinh sản bằng trứng (gonochoric) và chỉ có một buồng trứng. Sinh sản và thụ tinh đều diễn ra bên ngoài cơ thể ở trong môi trường nước biển. Phôi phát triển thành ấu trùng phù du (auricularia) rồi thành ấu trùng hình thùng (doliolaria), sau đó qua quá trình phát triển thành hải sâm non.

#### 1.4.1.2. Loài hải sâm *Holothuria edulis*



Hình nguyên sắc ([https://www.researchgate.net/figure/a-live-paratype-of-Holothuria-Halodeima-nigralutea-OLoughlin-sp-nov-from-Western\\_fig4\\_258996404](https://www.researchgate.net/figure/a-live-paratype-of-Holothuria-Halodeima-nigralutea-OLoughlin-sp-nov-from-Western_fig4_258996404))

#### **Hệ thống phân loại:**

Ngành: Echinodermata

Lớp: Holothuroidea

Bộ: Holothuriida

Họ: Holothuriidae

Giống: *Holothuria*

Loài: *Holothuria (Halodeima) edulis* Lesson, 1830

**Synonym:**

*Halodeima edulis* (Lesson)

*Holothuria (Thyone) edulis* Lesson, 1830

*Holothuria albida* Bell, 1887

**Phân bố:** *H. edulis* là một loài phổ biến và phổ biến ở Ấn Độ Dương - Thái Bình Dương. Nó sống dưới đáy biển ở độ sâu đến 20 m. Phạm vi phân bố của nó kéo dài từ Biển Đỏ và bờ biển Đông Phi đến Sri Lanka, Nhật Bản, Trung Quốc, Indonesia, Việt Nam, Philippines, Bắc Úc và các đảo khác nhau ở Thái Bình Dương. Loài này thích nghi trong một số môi trường sống khác nhau bao gồm cả trên nền cát hoặc bùn, trên đá vụn san hô và trong các thảm cỏ biển, trên các bãi đá ngầm, trên các sườn đá ngầm hoặc trong các hang hốc ở đảo.

**Mô tả:** *H. edulis* là một loài hải sâm thuộc họ Holothuriidae, bộ Holothuriidae, lớp Hải sâm Holothuroidea. Loài này có kích cỡ trung bình với chiều dài khoảng 20 - 30 cm. Thân có hình dạng gần như hình trụ với các đầu tròn nhưng có thể thu lại và mở co giãn cơ thể biến thành các hình dạng khác nhau. Loài hải sâm này thường có màu đen - đỏ sẫm ở mặt trên và màu hoa cà hồng ở mặt dưới, nhưng có thể có màu xám hoặc nâu sẫm. Da của loài *H. edulis* thường mềm, dẻo và rất mịn. Thân có các hàng dọc chân ống nhỏ, có thể co rút vào phía trong da, để lại các hốc nhỏ. Quanh miệng có 20 chân ống hình tròn được biến đổi thành xúc tu khi chúng đi kiếm ăn.

**Đặc điểm sinh học:** Loài *H. edulis* chủ yếu sống về ban đêm và có xu hướng ẩn náu vào ban ngày dưới các tảng đá hoặc mảnh san hô. Nó là động vật ăn thịt và kiếm ăn bằng cách ăn cát và các mảnh vụn tích tụ dưới đáy biển mà chúng thu được bằng các xúc tu kiếm ăn của mình. Sự vận động ở *H. edulis* rất chậm. Nó di chuyển chủ yếu nhờ nhu động của thành cơ thể, được hỗ trợ ở một mức độ hạn chế bởi các chân ống của nó. Nó cũng có thể neo các xúc tu kiếm ăn của mình vào cát và tự di chuyển theo. Nếu bị lật, có thể sử dụng các xúc tu để tự thăng bằng. Loài *H. edulis* có giới tính riêng biệt và sinh sản vào bất kỳ thời điểm nào trong năm với các giao tử được giải phóng vào cột nước. Ấu trùng là sinh vật phù du. Loài hải sâm này cũng có thể sinh sản vô tính bằng cách vỡ thành hai phần, mỗi phần sau đó hình thành lại các cơ quan bị thiếu.

### 1.4.2. Tình hình nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

**Variegatuside C:**  $\Delta^{9(11)}$ ,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = S$

**Variegatuside D:**  $\Delta^7, 9\beta H$ ,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = S$

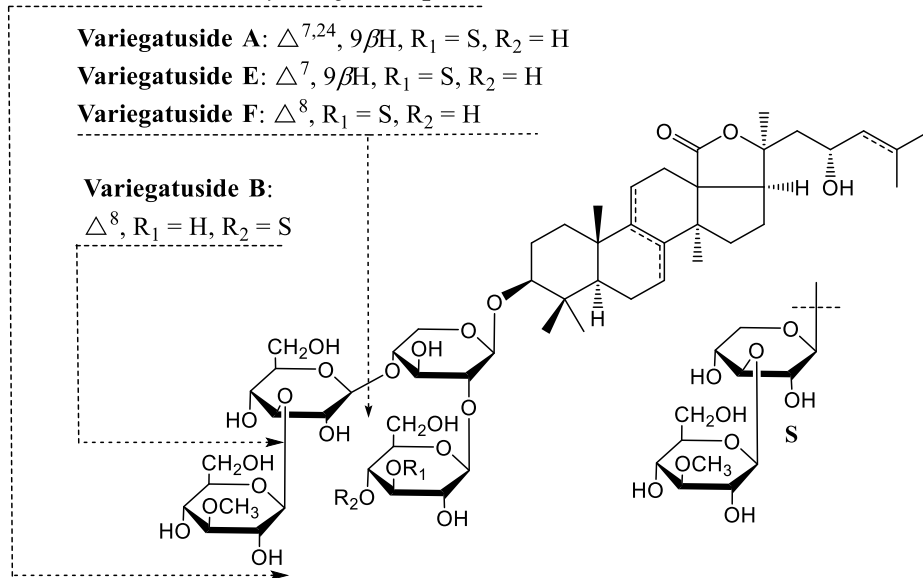
**Variegatuside A:**  $\Delta^{7,24}$ ,  $9\beta H$ ,  $R_1 = S$ ,  $R_2 = H$

**Variegatuside E:**  $\Delta^7, 9\beta H$ ,  $R_1 = S$ ,  $R_2 = H$

**Variegatuside F:**  $\Delta^8$ ,  $R_1 = S$ ,  $R_2 = H$

**Variegatuside B:**

$\Delta^8$ ,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = S$



Tính đến nay, chưa có nhiều các nghiên cứu được công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài hải sâm *H. edulis* và *S. horrens*. Các nghiên cứu đầu tiên về loài hải sâm *H. edulis* được các nhà khoa học Nga thực hiện từ những năm 1980 và đã phân tách được hai hợp chất triterpene glycoside là holothurin A [109] và holothurin A<sub>2</sub> [51]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, cận chiết của loài hải sâm này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư HL-60 [110] và hoạt tính chống oxy hóa [111].

Nghiên cứu về thành phần hóa học loài *S. horrens* (có tên đồng nghĩa *S. variegatus*) cũng được các nhà khoa học người Nga tiến hành từ những năm 1980 và đã phân lập được hợp chất triterpene glycoside có tên stichoposide D [112]. Gần đây, nhóm tác giả người Trung Quốc tiếp tục công bố sáu hợp chất triterpene glycoside không chứa nhóm sulfate được đặt tên là variegatuside A-F cùng với holothurin B từ loài hải sâm này [113]. Tuy nhiên, một điểm đáng lưu tâm là theo phân tích từ nhóm tác giả người Nga [114] cho thấy, việc công bố sự có mặt của hợp chất holothurin B từ loài này cho thấy có thể đối tượng nghiên cứu trong công trình của các nhà khoa học Trung Quốc [113] đã được giám định loài chưa chính xác và tên khoa học cũng được đưa sai trong bài báo là “*S. variegates*”. Theo nhóm tác giả ở trên, cấu trúc hóa học của variegatuside A-F đã bị xác định sai với sự xuất hiện của chuỗi đường có liên kết (1→3) giữa gốc đường thứ hai và gốc đường thứ ba (một cấu trúc chưa từng

xuất hiện ở các hợp chất triterpene glycoside từ các loài hải sâm) do nhầm lẫn vị trí của gốc đường glucose và xylose và dẫn đến phân tích sai dữ kiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Ngoài ra, những hợp chất này cũng chứa các liên kết đôi tại vị trí C-7/C-8 hoặc C-8/C-9 hoặc C-9/C-11, trong khi tất cả các hợp chất triterpene glycoside đã công bố từ loài này và các loài có liên quan đều có liên kết đôi ở vị trí C-7/C-8. Một điều rõ ràng là vị trí của liên kết đôi trong trường hợp này có khả năng bị chuyển vị sang vị trí C-8/C-9 và C-9/C-11 trong điều kiện môi trường acid. Do đó, các nhà khoa học người Nga đưa ra giả thiết rằng rất có thể phân đoạn (làm giàu) có chứa glycoside đã được xử lý/tác động trong môi trường acid ở quá trình phân tách các hợp chất làm tăng khả năng xác suất chuyển vị của liên kết đôi liên quan trong cấu trúc saponin [114].

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Loài hải sâm *Stichopus horrens*

- Mẫu hải sâm *S. horrens* được thu thập tại Hải Vân - Sơn Trà, tỉnh Thừa Thiên - Huế vào tháng 5/2016.
- Tên khoa học được GS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển (Viện Hàn lâm KHCNVN) giám định.
- Mẫu tiêu bản được lưu tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KHCNVN.



Hải sâm - *Stichopus horrens* Selenka, 1867

#### 2.1.2. Loài hải sâm *Holothuria edulis*

- Mẫu hải sâm *H. edulis* được thu thập tại khu vực Cù Lao Chàm, tỉnh Quảng Nam vào tháng 8/2016.
- Tên khoa học được GS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển (Viện Hàn lâm KHCNVN) giám định.
- Mẫu tiêu bản được lưu tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KHCNVN.



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



## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

#### 2.2.1.1. Xử lý mẫu

Mẫu hải sâm *Stichopus horrens* và *Holothuria edulis* sau khi thu về được tiến hành bảo quản theo quy trình chung sau:

- Loại muối và tạp bẩn bằng cách rửa sạch nhiều lần với nước cất.
- Để ráo nước ở nhiệt độ phòng, ép nhẹ bằng giấy lọc bản để thấm hết nước.
- Các mẫu được cho vào từng túi ni lông sạch, kèm theo ký hiệu mẫu được ghi trên giấy nền bằng bút chì để tránh bị mờ hoặc rách nát khi tiếp xúc với nước và ở điều kiện lạnh âm sâu.
- Lập danh sách mẫu hải sâm *S. horrens* và *H. edulis* với ký hiệu mẫu.

Các túi mẫu hải sâm *S. horrens* và *H. edulis* được lưu giữ trong tủ lạnh âm sâu (SANYO Ultra-low temperature freezer: MDF-U33V, ở -50°C) để đảm bảo mẫu không bị vi sinh vật phân hủy.

#### 2.2.1.2. Tạo dịch chiết tổng

Các mẫu hải sâm *S. horrens* và *H. edulis* được chiết theo quy trình như sau:

- Bước 1: Lấy mẫu ra khỏi tủ đông: Phải rất thận trọng trong quá trình lấy mẫu vì trong tủ lạnh âm sâu có sự tạo tuyết nên các túi mẫu sẽ bị dính vào nhau và rất dễ bị rách khi lấy ra. Nếu túi bị rách có thể sẽ làm mất ký hiệu mẫu gây ra sự cố không thể xác định được chính xác mẫu hoặc nhầm lẫn giữa các mẫu với nhau.
- Bước 2: Để giải đông mẫu lấy ra ở nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành rửa lại nhiều lần bằng nước cất trước khi cắt nhỏ và xay mẫu.
- Bước 3: Tiến hành cân, cắt nhỏ và xay mẫu đã rửa trên máy xay mẫu chuyên dụng (tùy theo loại mẫu hải sâm *S. horrens* hay *H. edulis* sử dụng các thiết bị xay và nghiền mẫu cho phù hợp).
- Bước 4: Tiến hành chiết ba lần sử dụng MeOH với mẫu đã được xay trên thiết bị chiết siêu âm ở nhiệt độ trong khoảng 40 - 60°C hoặc chiết với MeOH nóng trong 6 giờ, thời gian chiết mỗi lần ít nhất 60 phút.
- Bước 5: Các dịch chiết MeOH thu được của ba lần chiết được tiến hành lọc qua giấy lọc, dịch chiết được gom lại để chuẩn bị cất loại bỏ dung môi MeOH.

▪ **Bước 6:** Tiến hành cất quay loại bỏ MeOH khỏi dịch chiết trên thiết bị cất quay chân không. Trong quá trình cô quay phải đảm bảo nhiệt độ không quá 60°C để tránh làm biến đổi các hợp chất trao đổi thứ cấp có trong dịch chiết.

▪ **Bước 7:** Tiến hành cô quay đến khi không còn sự thay đổi về khối lượng cặn chiết thì thu được cặn MeOH tổng dưới dạng cao. Ghi ký hiệu theo từng đối tượng mẫu cụ thể và lưu cặn chiết tổng trong tủ lạnh cho đến khi tiến hành để nghiên cứu.

### 2.2.1.3. Tách chiết và phân lập các hợp chất

▪ Sắc ký lớp mỏng (TLC) được tiến hành trên bản mỏng đã tráng sẵn silica gel DC-Alufolien 60 F<sub>254</sub> (Merck 1,05715) và RP-18 F<sub>254S</sub> (Merck).

▪ Sắc ký lớp mỏng điều chế được tiến hành trên bản mỏng đã tráng sẵn silica gel 60G F<sub>254</sub> (Merck, 105875).

▪ Sắc ký cột (CC) được thực hiện với chất hấp phụ silica gel pha thường cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm (240 - 430 mesh) và pha đảo RP-18 (ODS-A, 12 nm S-150 mm, YMC Co., Ltd., Japan), Diaion HP-20 (Supelco), Sephadex LH-20 (Sigma)...

▪ Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Agilent 1260 Infinity II, đầu dò DAD và đầu dò khúc xạ (CA, Mỹ). Cột: Cosmosil 5C18-MS-II, 250 × 20 mm, 5,0 μm...

▪ Máy sắc ký lỏng trung áp MPLC (Isolera One, Biotage - Thụy Điển).

▪ Phương pháp tinh chế bằng kết tinh lại trong các dung môi hữu cơ phù hợp.

### 2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

▪ Góc quay cực  $[\alpha]_D$  được đo trên máy JASCO P2000 polarimeter.

▪ Phổ khối lượng (ESI-MS): Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electron Spray Ionization mass spectra) được đo trên máy Bruker Impact II Q-TOF spectrometer.

▪ Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass spectrometer.

▪ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Phổ <sup>1</sup>H (500 MHz) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) được đo trên máy Bruker AM500 và Avance III HD 500 FT-NMR Spectrometer (303K).

### 2.2.3. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

#### 2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư (TBUT)

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) công nhận nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn cho mục đích sàng lọc và phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được tiến hành theo phương pháp đã được công bố bởi Monks và các cộng sự [115]. Phép thử tiến hành tính hàm lượng protein tế bào tổng số dựa trên mật độ quang học (Optical Density - OD) đo được khi protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD đo được sẽ tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, vì vậy lượng tế bào càng nhiều (càng nhiều lượng protein) thì giá trị OD đo được càng lớn và ngược lại. Phép thử được tiến hành trong điều kiện như sau:

- Pha chất cần thử thành các dải nồng độ thích hợp.
- Làm rời tế bào bằng trypsin hóa tế bào thí nghiệm và đếm trong buồng đếm từ đó điều chỉnh mật độ cho thích hợp với thí nghiệm.
- Cho vào các giếng của đĩa 96 giếng chất thử đã pha ở các nồng độ, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ thích hợp ở trên vào các giếng này để nồng độ chất thử trong giếng đạt 200, 40, 8 và 1,6  $\mu\text{g/mL}$ . Ủ 48 giờ trong tủ ấm. Giếng không chứa chất thử nhưng có tế bào ung thư (180  $\mu\text{L}$ ) được dùng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, tế bào ở giếng này sẽ được cố định bằng trichloroacetic acid (TCA).
- Sau 48 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong thời gian 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong thời gian 30 phút ở 37°C, rửa ba lần bằng acetic acid và để khô ở nhiệt độ phòng.
- 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, tiến hành lắc nhẹ trong thời gian 10 phút.
- Đọc kết quả OD trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) ở bước sóng 515 - 540 nm.
- % Ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được tính bằng công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD (chất thử)} - \text{OD (ngày 0)}]}{\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}} \times 100$$

- Lặp lại 3 lần phép thử để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine (10, 2, 0,4, 0,08  $\mu\text{g/mL}$ ) được sử dụng làm chất đối chứng dương.

DMSO 10% luôn được sử dụng làm đối chứng âm. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Phép thử được tiến hành trên năm dòng tế bào ung thư: tiền liệt tuyến (LNCaP) vú (MCF7), biểu mô (KB), gan (HepG2) và sắc tố da melanoma (SK-Mel-2). 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. Thử nghiệm được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học.

Môi trường nuôi cấy tế bào sử dụng DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, Invitrogen) có thêm thành phần L-glutamine (Invitrogen), sodium piruvat (Invitrogen),  $\text{NaHCO}_3$ , 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 ấm  $\text{CO}_2$  (Sanyo), tủ lạnh sâu  $-80^\circ\text{C}$  (Biobase), bình niro lỏng (Trung Quốc), cân phân tích (Ohaus), máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường. Hệ thống máy trắc lưu tế bào (Flow cytometer, ACEA NovoCyte™ 2000, ACEA BioSciences - Mỹ).

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

### 2.2.3.2. Phương pháp đánh giá cơ chế tác động diệt tế bào ung thư

a. *Chuẩn bị mẫu*: Hợp chất **SH17** được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 100  $\mu\text{M}$  trong DMSO, sau đó pha loãng ở các dải nồng độ thử nghiệm là 0,1, 0,3 và 1,0  $\mu\text{M}$ .

b. *Chuẩn bị tế bào*: Dòng tế bào ung thư vú người (MCF7) được cung cấp bởi GS. J. H. Lee (Trường ĐHQG Kangwon, Hàn Quốc). Tế bào ung thư được nuôi cấy *in vitro* theo phương pháp Mosmann và các cộng sự [116]. Tế bào được nuôi cấy ở  $37^\circ\text{C}$  trong môi trường DMEM đã được bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100 U/mL penicillin và 100 mcg/mL streptomycin trong tủ cấy  $\text{CO}_2$  5% trong thời gian 48 giờ.

c. *Phân tích hàm lượng DNA của tế bào bằng máy flow cytometer (cell cycle analysis)* [117]: tế bào ung thư vú người (MCF7) được nuôi cấy trong các đĩa petri 100 mm × 20 mm trong môi trường DMEM ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> với 10% FBS, penicillin (100 units/mL) và streptomycin sulfate (100 µg/mL) với mật độ  $2,5 \times 10^5$  tế bào. Sau 24 giờ, tế bào được xử với hợp chất **SH17** pha sẵn trong DMSO ở các nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 µM. Sau 48 giờ, thu phần tế bào bám dính bằng trypsin và ly tâm 1000 xg, 5 phút để thu cặn tế bào. Rửa cặn tế bào bằng PBS, sau đó cố định tế bào trong ethanol 70% trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, ly tâm và rửa cặn tế bào hai lần bằng PBS. 500 µL dịch tế bào được bổ sung 5,0 µL RNase (2,5 mg/mL) và 2,5 µL propidium iodide (PI, 1,0 mg/mL). Dung dịch trên được ủ ở 37°C, thời gian 30 phút, sau đó phân tích bằng máy trắc lưu tế bào. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Novocyte dưới dạng biểu đồ.

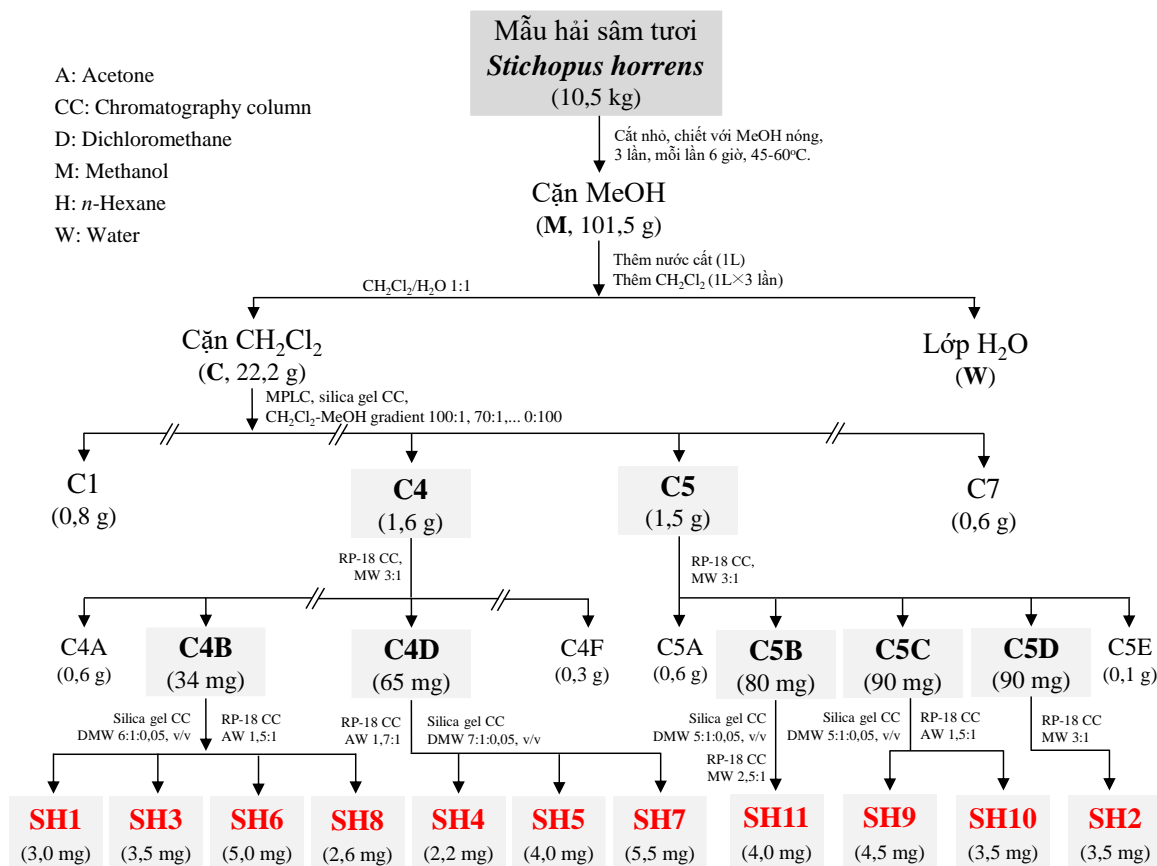
d. *Phân tích quá trình tự chết của tế bào (apoptosis)* [117]: tế bào ung thư vú người MCF7 được nuôi cấy trong các đĩa petri 100 mm × 20 mm trong môi trường DMEM ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> với 10% FBS, penicillin (100 units/mL) và streptomycin sulfate (100 µg/mL) với mật độ  $2,5 \times 10^5$  tế bào. Sau 24 giờ, tế bào được xử với hợp chất **SH17** pha sẵn trong DMSO ở các nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0 µM. Sau 48 giờ, thu cả phần dịch nổi và phần tế bào bám dính và ly tâm 1000 xg, 5 phút. Hút bỏ dịch nổi và rửa cặn tế bào bằng PBS. Hòa tan cặn tế bào với 300 - 500 µL binding buffer (tùy lượng tế bào). Với mỗi 100 µL dịch tế bào, bổ sung 5,0 µL FITC annexin V và 1,0 µL PI (100 µg/mL), sau đó ủ dịch tế bào ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trong thời gian 15 phút. Bổ sung 400 µL binding buffer và phân tích bằng máy trắc lưu tế bào. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Novocyte dưới dạng biểu đồ.

e. *Quan sát sự thay đổi hình thái tế bào dưới kính hiển vi (Microscope observation)*: Để đánh giá tác động của các hợp chất lên hình thái tế bào ung thư vú người MCF7, tế bào được nuôi trong các đĩa nuôi cấy 100 mm (mật độ  $5 \times 10^4$  tế bào). Sau 24 giờ, tế bào được ủ với hợp chất ở các nồng độ thử nghiệm (ngoại trừ đĩa đối chứng). Sau 48 giờ, tế bào được quan sát bằng kính hiển vi soi ngược CKX53 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) với độ phóng đại 10X và 20X.

Thực nghiệm được thực 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*

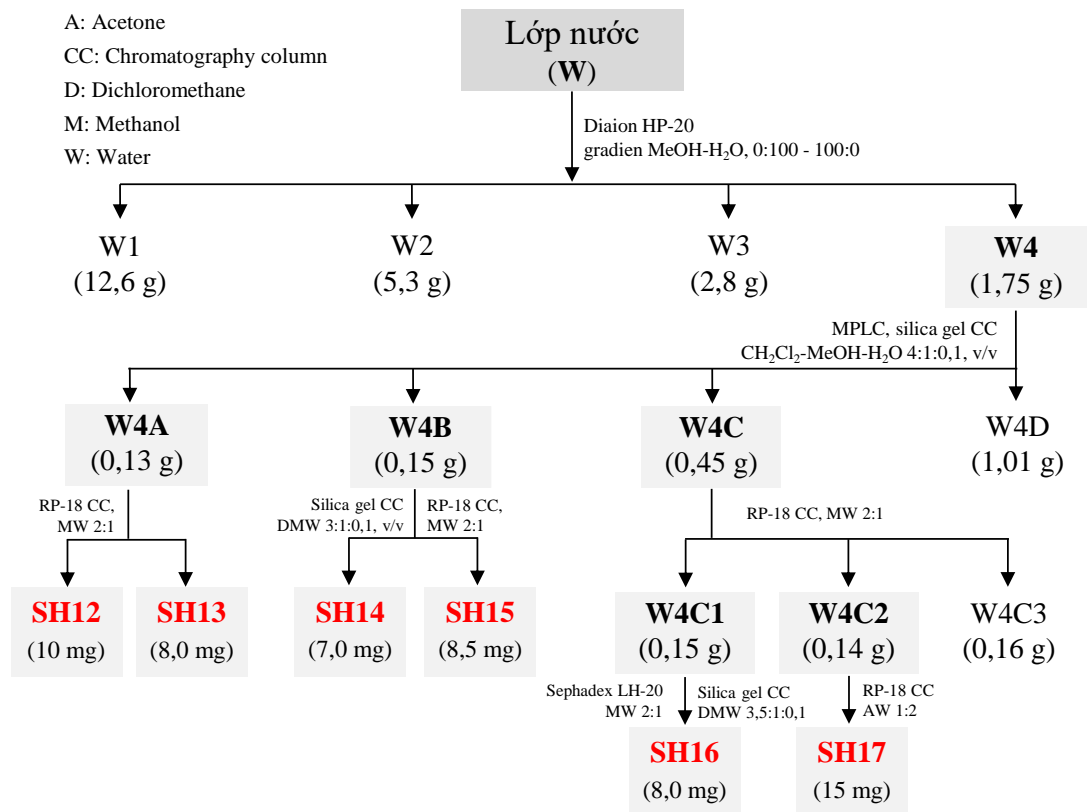


Hình 5. Sơ đồ chiết mẫu và phân lập các chất từ cặn  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  của *S. horrens*.

Mẫu tươi hải sâm *S. horrens* (10,5 kg) được cắt nhỏ và chiết bằng methanol nóng (3 lần, mỗi lần trong 6 giờ, nhiệt độ 45-60°C) thu được cặn chiết MeOH (M, 101,5 g) sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Cặn chiết M được phân tán vào trong nước cất (1L), sau đó chiết phân lớp với dung môi dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mỗi lần 1L  $\times$  3 lần) thu được cặn chiết cặn  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (C, 22,2 g) và phần nước (Hình 5).

Cặn chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (22,2 g) được đưa lên hệ thống sắc ký lỏng trung áp (MPLC), sử dụng sắc ký cột pha thường, hệ dung môi gradient rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH từ 100/1  $\rightarrow$  0/100 thu được bảy phân đoạn từ C1-C7. Phân đoạn C4 (1,6 g) được đưa lên sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (3:1, v/v) thu được sáu phân đoạn C4A-C4F. Tinh chế phân đoạn C4D (65 mg) bằng sắc ký cột nhồi silica gel pha thường và sử dụng hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (7:1:0,05, v/v/v), sau đó tiếp tục kết hợp sắc ký cột RP-18 rửa giải bằng acetone- $\text{H}_2\text{O}$  (1,7:1, v/v) thu được

ba hợp chất bao gồm **SH4** (2,2 mg), **SH5** (4,0 mg) và **SH7** (5,5 mg). Tiếp đến phân đoạn C4B (34 mg) được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (6:1:0,05, v/v/v) và tinh chế tiếp bằng sắc ký cột RP-18 rửa giải bằng acetone- $\text{H}_2\text{O}$  (1,5:1, v/v) thu được các hợp chất **SH1** (3,0 mg), **SH3** (3,5 mg), **SH6** (5,0 mg) và **SH8** (2,6 mg). Phân đoạn C5 (1,5 g) được phân tách thành 5 phân đoạn nhỏ (C5A-C5E), sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (3:1, v/v). Hợp chất **SH2** (3,5 mg) được tinh chế từ phân đoạn nhỏ C5D (90 mg) sau khi được phân tách trên sắc ký cột nhồi silica gel pha thường và sử dụng hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (5:1:0,05, v/v/v) và tinh chế tiếp bằng sắc ký cột RP-18 rửa giải bằng  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:1, v/v). Tinh chế phân đoạn C5B (80 mg) trên sắc ký cột silica gel pha thường và sử dụng hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (5:1:0,05, v/v/v) và tinh chế tiếp bằng sắc ký cột RP-18 rửa giải bằng  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (2,5:1, v/v) thu được hợp chất **SH11** (4,0 mg). Hai hợp chất **SH9** (4,5 mg) và **SH10** (3,5 mg) được tinh chế từ phân đoạn C5C (90 mg) trên sắc ký cột silica gel pha thường và sử dụng hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (5:1:0,05, v/v/v) sau đó kết hợp với sắc ký cột RP-18 và sử dụng pha động acetone- $\text{H}_2\text{O}$  (1,5:1, v/v) làm dung môi rửa giải.



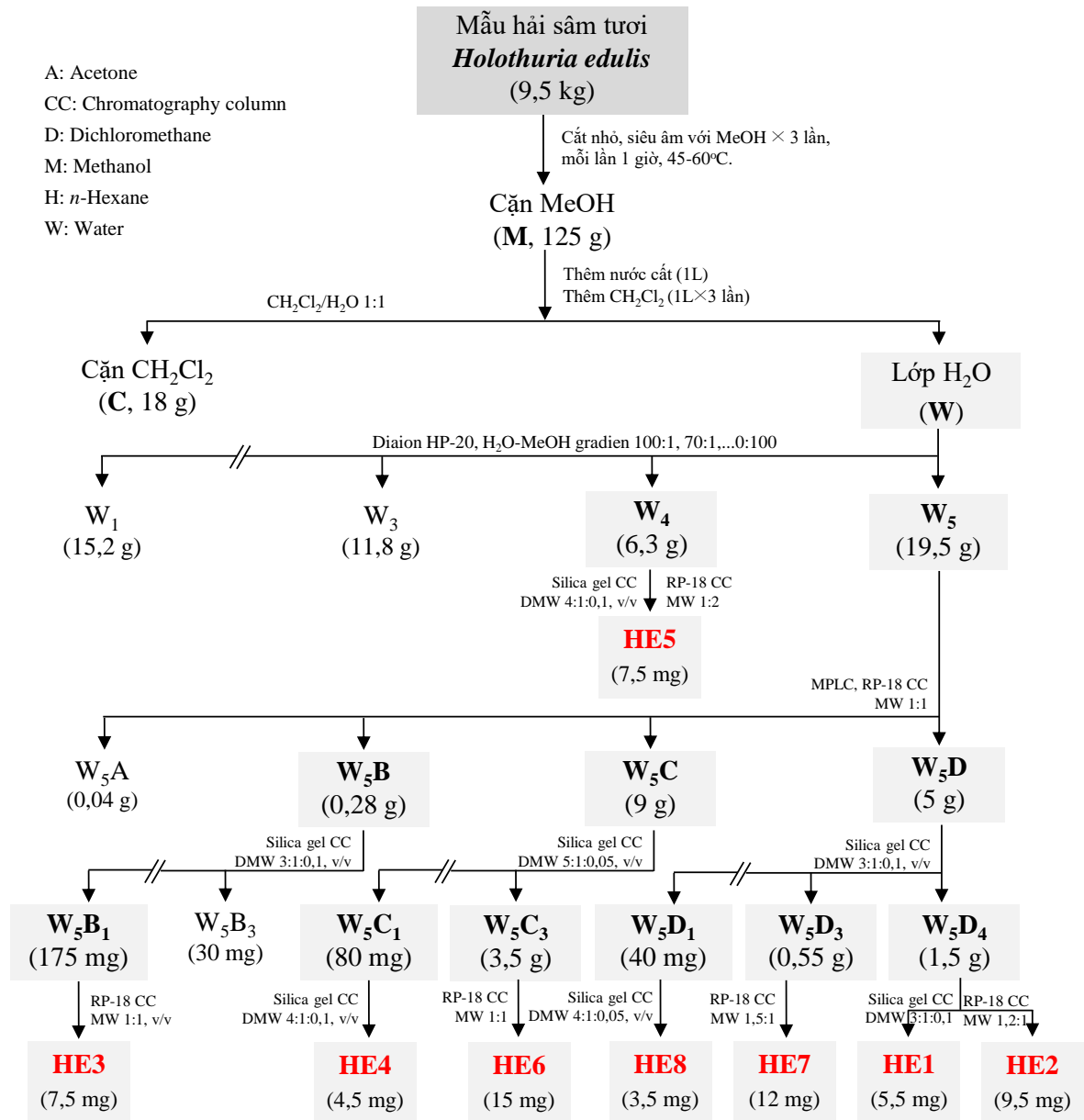
Hình 6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lớp nước của *S. horrens*.

Lớp nước được đưa lên cột Diaion HP-20 với gradient hệ dung môi lần lượt là 100% nước → MeOH-H<sub>2</sub>O 25:75 → MeOH-H<sub>2</sub>O 50:50 → 100% MeOH (mỗi hệ dung môi sử dụng thể tích ~1L) thu được bốn phân đoạn từ W1→W4. Phân đoạn W4 (1,75 g) được phân tách trên hệ thống MPLC sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1:0,1, v/v/v) thu được bốn phân đoạn W4A (0,13 g), W4B (0,15 g), W4C (0,45 g) và W4D (0,40 g). Phân đoạn W4A sau đó được sử dụng qua sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) thu được hai hợp chất **SH12** (10 mg) và **SH13** (8,0 mg). Tương tự, phân đoạn W4B được đưa qua sắc ký cột pha đảo RP-18 giải hấp bằng hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) thu được hợp chất **SH14** (7 mg) và phân đoạn W4B1 (20 mg). Hợp chất **SH15** (8,5 mg) thu được từ phân đoạn W4B1 (20 mg) bởi phân tách trên sắc ký cột pha thường sử dụng hệ dung môi giải hấp CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1:0,1, v/v/v). Phân đoạn W4C được phân tách trên sắc ký cột pha đảo RP-18 sử dụng pha động MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) thu được ba phân đoạn W4C1→W4C3. Tương tự như trên, phân đoạn W4C1 (0,15 g) cũng được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3,5:1:0,1, v/v/v) thu được phân đoạn W4C1A (18 mg). Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, thu được hợp chất **SH16** (8 mg) từ phân đoạn W4C1A (18 mg) được giải hấp trên cột Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) rồi tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3,5:1:0,1, v/v/v). Phân đoạn W4C2 (0,14 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3,5:1:0,1, v/v/v) thu được phân đoạn W4C2A (45 mg). Cuối cùng, hợp chất **SH17** (15 mg) thu được từ phân đoạn W4C2A sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 tinh chế và hệ dung môi rửa giải acetone-nước (1:2, v/v, Hình 6).

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

Mẫu hải sâm tươi *H. edulis* (9,5 kg) được cắt nhỏ và chiết bằng MeOH trong điều kiện siêu âm (3 lần, mỗi lần 1 giờ, nhiệt độ 45-60°C) thu được cặn chiết MeOH (M, 125 g). Cặn chiết này được phân tán vào nước (1L) sau đó chiết phân bố lỏng/lỏng với CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1L) thu được cặn chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18,0 g) và lớp nước (W). Lớp nước được đưa lên cột Diaion HP-20 sử dụng gradient với hệ dung môi lần lượt là 100% nước → MeOH-H<sub>2</sub>O, 25:75 → MeOH-H<sub>2</sub>O, 50:50 → MeOH-H<sub>2</sub>O 75:25 → 100% MeOH thu được năm phân đoạn (W<sub>1</sub>→W<sub>5</sub>, Hình 7).





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

Phân đoạn W<sub>5</sub> (19,5 g) được phân tách sử dụng máy sắc ký lỏng trung áp MPLC, cột nhồi pha đảo RP-18 (Biotage KP-C18-HS 240g) với hệ dung môi rửa giải MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) thu được bốn phân đoạn W<sub>5</sub>A  $\rightarrow$  W<sub>5</sub>D. Phân đoạn W<sub>5</sub>B (0,28 g) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột silica gel pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1:0,1, v/v/v) thu được ba phân đoạn W<sub>5</sub>B<sub>1</sub> (175 mg), W<sub>5</sub>B<sub>2</sub> (25 mg) và phân đoạn W<sub>5</sub>B<sub>3</sub> (30 mg). Hợp chất **HE3** (7,5 mg) được tinh chế từ phân đoạn W<sub>5</sub>B<sub>1</sub> sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Phân đoạn W<sub>5</sub>C (9 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:1:0,05, v/v/v) thu được ba phân đoạn tương ứng là W<sub>5</sub>C<sub>1</sub>

(80 mg), W<sub>5</sub>C<sub>2</sub> (720 mg) và W<sub>5</sub>C<sub>3</sub> (3,5 g). Phân đoạn W<sub>5</sub>C<sub>1</sub> được phân tách sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) thu được phân đoạn W<sub>5</sub>C<sub>1a</sub> (35 mg). Phân đoạn W<sub>5</sub>C<sub>1a</sub> (35 mg) sau đó được tinh chế trên sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1:0,1, v/v/v) thu được hợp chất **HE4** (4,5 mg). Bằng cách tương tự, hợp chất **HE6** (15 mg) thu được từ phân đoạn W<sub>5</sub>C<sub>3</sub> (3,5 g) sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Phân đoạn W<sub>5</sub>D (5 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1:0,1, v/v/v) thu được bốn phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>1</sub> (0,04 g), W<sub>5</sub>D<sub>2</sub> (0,10 g), W<sub>5</sub>D<sub>3</sub> (0,55 g) và phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>4</sub> (1,5 g). Phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>1</sub> được đưa qua sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (1,5:1, v/v) thu được phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>1a</sub> (16 mg). Tiếp đến phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>1a</sub> sau đó được đưa lên sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (4,5:1:0,05) thu được hợp chất **HE8** (3,5 mg). Sử dụng sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H<sub>2</sub>O (1,5:1, v/v), từ phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>3</sub> (550 mg) hợp chất **HE7** (12 mg) đã được tinh chế thành công. Phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>4</sub> (1,5 g) tương tự được đưa qua sắc ký cột pha đảo RP-18 hệ dung môi rửa giải MeOH-H<sub>2</sub>O (1,2:1, v/v) thu được hợp chất **HE2** (9,5 mg), phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>4a</sub> (22 mg) và phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>4b</sub> (100 mg). Phân đoạn W<sub>5</sub>D<sub>4a</sub> sau đó được đưa qua sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1:0,1, v/v/v) thu được hợp chất **HE1** (5,5 mg).

Cuối cùng, phân đoạn W<sub>4</sub> (6,3 g) được đưa lên sắc ký cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (1:2, v/v) thu được hai phân đoạn W<sub>4</sub>A (820 mg) và W<sub>4</sub>B (420 mg). Phân đoạn W<sub>4</sub>B (420 mg) được đưa lên sắc ký cột pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (3,5:1:0,1, v/v/v) thu được phân đoạn W<sub>4</sub>B<sub>1</sub> (85 mg). Phân đoạn W<sub>4</sub>B<sub>1</sub> (85 mg) được phân tách trên sắc ký cột pha đảo sử dụng hệ dung môi MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1,5, v/v) tiếp tục rửa giải trên sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1:0,1, v/v/v) thu được hợp chất **HE5** (7,5 mg).

### 3.3. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập

#### 3.3.1. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập từ loài hải sâm *Stichopus horrens*

##### 3.3.1.1. Hợp chất **SH1**: *Stichorrenoside A* (hợp chất mới)

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_D^{25} -33$  (c 0,05, MeOH);

CTPT: C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub>;

KLPT:  $M = 764$ ;

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  787,42449  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{41}H_{64}NaO_{13}]^+$ ,  $M = 787,42392$ );

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 7.

### 3.3.1.2. Hợp chất **SH2**: *Stichorrenoside B (hợp chất mới)*

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_D^{25} -15$  ( $c$  0,05, MeOH);

CTPT:  $C_{41}H_{63}NaO_{16}S$ ;

KLPT:  $M = 866$ ;

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  889,36328  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{41}H_{63}Na_2O_{16}S]^+$ ,  $M = 889,36268$ );

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 8.

### 3.3.1.3. Hợp chất **SH3**: *Stichorrenoside C (hợp chất mới)*

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_D^{25} -41$  ( $c$  0,05, MeOH);

CTPT:  $C_{43}H_{66}O_{14}$ ;

KLPT:  $M = 806$ ;

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  829,43509  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{43}H_{66}NaO_{14}]^+$ ,  $M = 829,43448$ );

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 9.

### 3.3.1.4. Hợp chất **SH4**: *Stichorrenoside D (hợp chất mới)*

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_D^{25} -45$  ( $c$  0,05, MeOH);

CTPT:  $C_{42}H_{64}O_{13}$ ;

KLPT:  $M = 776$ ;

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  799,42442  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{42}H_{64}NaO_{13}]^+$ ,  $M = 799,42392$ );

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 10.

3.3.1.5. *Hợp chất SH5: Stichoposide A*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{43}H_{68}O_{13}$ ;

KLPT:  $M = 792$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 11.

3.3.1.6. *Hợp chất SH6: Stichoposide B*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{43}H_{68}O_{14}$ ;

KLPT:  $M = 808$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 12.

3.3.1.7. *Hợp chất SH7: 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene (hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên)*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{42}H_{66}O_{13}$ ;

KLPT:  $M = 778$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 13.

3.3.1.8. *Hợp chất SH8: 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxylolost-7-ene (hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên)*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{40}H_{64}O_{12}$ ;

KLPT:  $M = 736$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 14.

3.3.1.9. *Hợp chất SH9: Stichorrenoside E (hợp chất mới)*

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_D^{20} -41$  (c 0,05, MeOH);

CTPT:  $C_{55}H_{86}O_{23}$ ;

KLPT:  $M = 1114$ ;

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  1137,54571  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{55}H_{86}NaO_{23}]^+$ ,  $M = 1137,54525$ );

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 15.

3.3.1.10. Hợp chất **SH10**: *Thelenotoside B*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{55}H_{88}O_{23}$ ;

KLPT:  $M = 1116$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 16.

3.3.1.11. Hợp chất **SH11**: *Deacetyl thelenotoside B (hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên)*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{53}H_{86}O_{22}$ ;

KLPT:  $M = 1074$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 17.

3.3.1.12. Hợp chất **SH12**: *Stichloroside B<sub>1</sub>*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{68}H_{110}O_{33}$ ;

KLPT:  $M = 1454$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 18.

3.3.1.13. Hợp chất **SH13**: *Stichloroside B<sub>2</sub>*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{68}H_{108}O_{32}$ ;

KLPT:  $M = 1436$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 19.

3.3.1.14. Hợp chất **SH14**: *Deacetylstichloroside B<sub>1</sub>*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{66}H_{106}O_{31}$ ;

KLPT:  $M = 1394$ ;

Số liệu phổ  $^1\text{H}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 20.

3.3.1.15. Hợp chất **SH15**: Stichloroside  $A_1$

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $\text{C}_{68}\text{H}_{110}\text{O}_{33}$ ;

KLPT:  $M = 1454$ ;

Số liệu phổ  $^1\text{H}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 21.

3.3.1.16. Hợp chất **SH16**: Deacetylstichloroside  $A_1$

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $\text{C}_{66}\text{H}_{108}\text{O}_{32}$ ;

KLPT:  $M = 1412$ ;

Số liệu phổ  $^1\text{H}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 22.

3.3.1.17. Hợp chất **SH17**: Deacetyltichloroside  $C_1$  (**hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên**)

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $\text{C}_{66}\text{H}_{108}\text{O}_{31}$ ;

KLPT:  $M = 1396$ ;

Số liệu phổ  $^1\text{H}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  
xem Bảng 23.

3.3.2. Thông số vật lý và các dữ kiện phổ của các hợp chất đã phân lập từ loài hải sâm *Holothuria edulis*

3.3.2.1. Hợp chất **HE1**: Holothurin  $A_5$  (**hợp chất mới**)

Chất bột, màu trắng;

Góc quay cực riêng:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -15$  ( $c$  0,1, MeOH);

CTPT:  $\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{NaO}_{28}\text{S}$ ;

KLPT:  $M = 1236$ ;

Phổ ESI-MS/MS:  $m/z$  1213  $[\text{M} - \text{Na}]^-$ , 1181  $[(\text{M} - \text{Na}) - \text{O}_2]^-$ , 1163  $[1181 - \text{H}_2\text{O}]^-$ , 1119  $[1163 - \text{O}_2]^-$ , 1005  $[1181 - 7\text{H}_{12}\text{O}_5]^-$ , 843  $[1181 - 7\text{H}_{12}\text{O}_5 - 6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ , 825

[1181 - 7H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 697 [1181 - 7H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 695 [carbohydrate chain - Na]<sup>-</sup>, 519 [(carbohydrate chain - Na) - 7H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>, 357 [(carbohydrate chain - Na) - 7H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>, 211 [(carbohydrate chain - Na) - 7H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> - 6H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 97 [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>.

Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS):  $m/z$  1213,49521 [M - Na]<sup>-</sup> (tính toán lý thuyết cho ion [C<sub>54</sub>H<sub>85</sub>O<sub>28</sub>S]<sup>-</sup>, M = 1213,49481);

Số liệu phổ <sup>1</sup>H (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  
xem Bảng 24.

### 3.3.2.2. Hợp chất **HE2**: *Holothurin A<sub>2</sub>*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: C<sub>66</sub>H<sub>108</sub>O<sub>31</sub>;

KLPT: M = 1396;

Số liệu phổ <sup>1</sup>H (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  
xem Bảng 25.

### 3.3.2.3. Hợp chất **HE3**: *Marmoroside C*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: C<sub>56</sub>H<sub>87</sub>NaO<sub>29</sub>S;

KLPT: M = 1278;

Số liệu phổ <sup>1</sup>H (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  
xem Bảng 26.

### 3.3.2.4. Hợp chất **HE4**: *Moebioside A*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: C<sub>43</sub>H<sub>65</sub>NaO<sub>19</sub>S;

KLPT: M = 940;

Số liệu phổ <sup>1</sup>H (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  
xem Bảng 27.

### 3.3.2.5. Hợp chất **HE5**: *Leucospilotaside A*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>NaO<sub>18</sub>S;

KLPT: M = 898;

Số liệu phổ <sup>1</sup>H (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) và <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  
xem Bảng 28.

### 3.3.2.6. Hợp chất **HE6**: *Holothurin A*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{59}H_{85}NaO_{27}S$ ;

KLPT:  $M = 1280$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 29.

### 3.3.2.7. Hợp chất **HE7**: *Holothurin B*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{41}H_{63}NaO_{17}S$ ;

KLPT:  $M = 882$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

xem Bảng 30.

### 3.3.2.8. Hợp chất **HE8**: *Leucospilotaside C*

Chất bột, màu trắng;

CTPT:  $C_{35}H_{53}NaO_{13}S$ ;

KLPT:  $M = 736$ ;

Số liệu phổ  $^1H$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) và  $^{13}C$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):

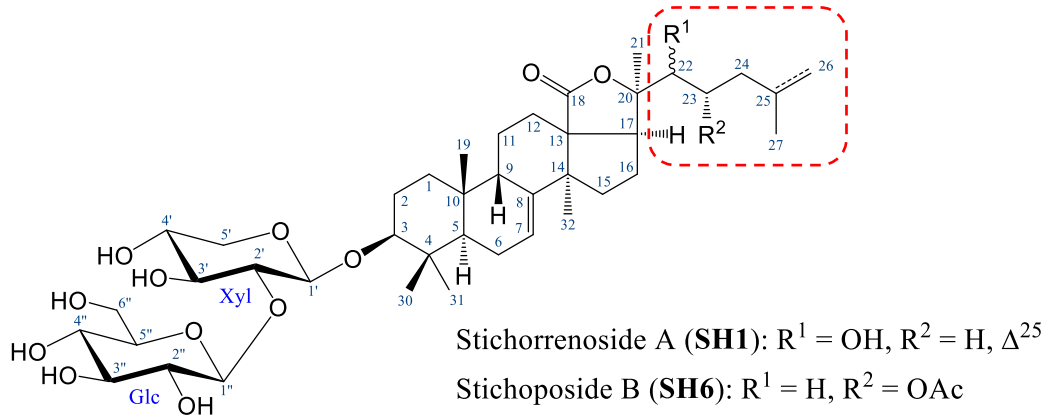
xem Bảng 31.



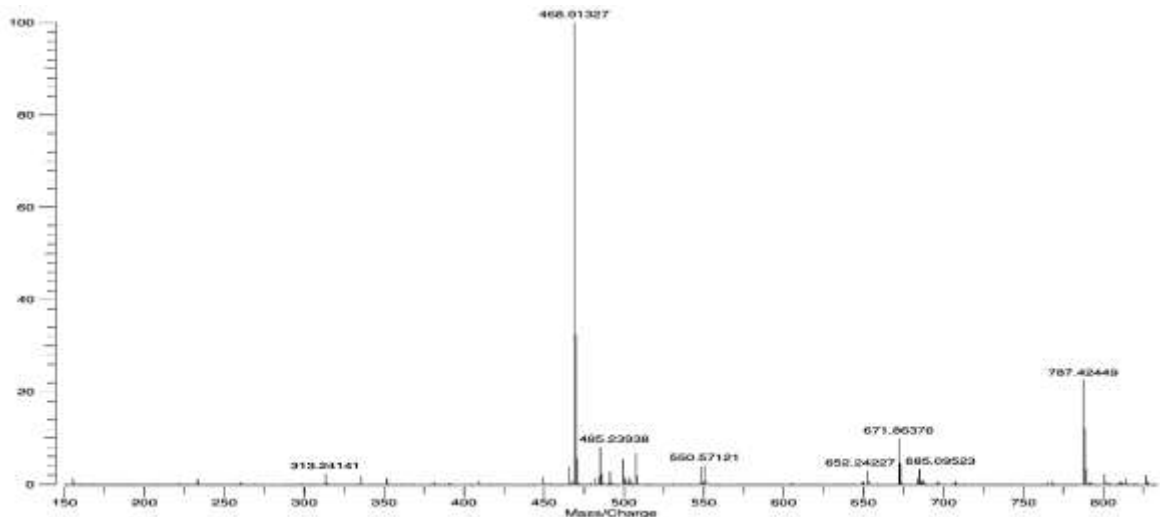
## CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 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)

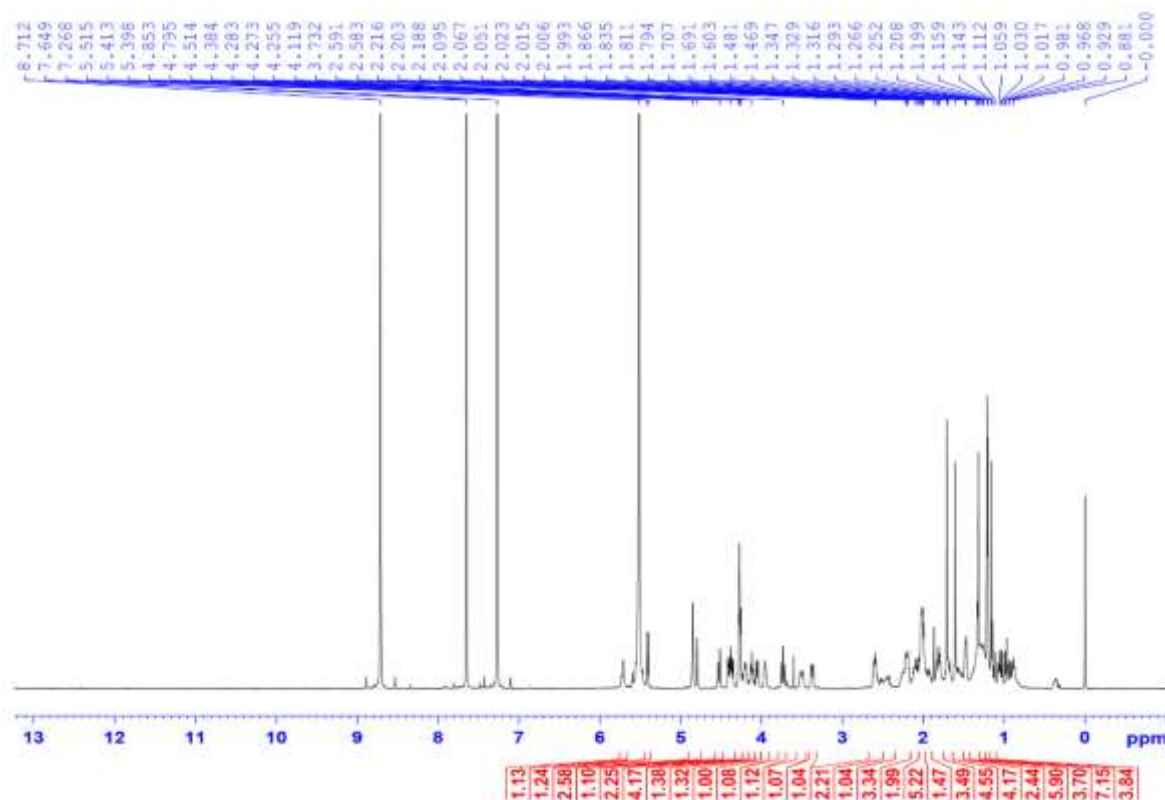


Hình 8. Cấu trúc hóa học của SH1 và chất tham khảo SH6.



Hình 9. Phổ HR-ESI-MS của SH1.

Hợp chất SH1 được tinh chế ở 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  $\delta_{\text{C}}$  105,6 (C-1') và 105,4 (C-1''), có tương tác HSQC tương ứng với các proton anome tại  $\delta_{\text{H}}$  4,85 (1H, H-1') và 5,41 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1''). Phân tích phổ  $^{13}\text{C}$  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  $\gamma$ -lactone carbonyl [ $\delta_{\text{C}}$  180,8 (C-18)], sáu nhóm methyl [ $\delta_{\text{H}}$  1,20 (3H, s,

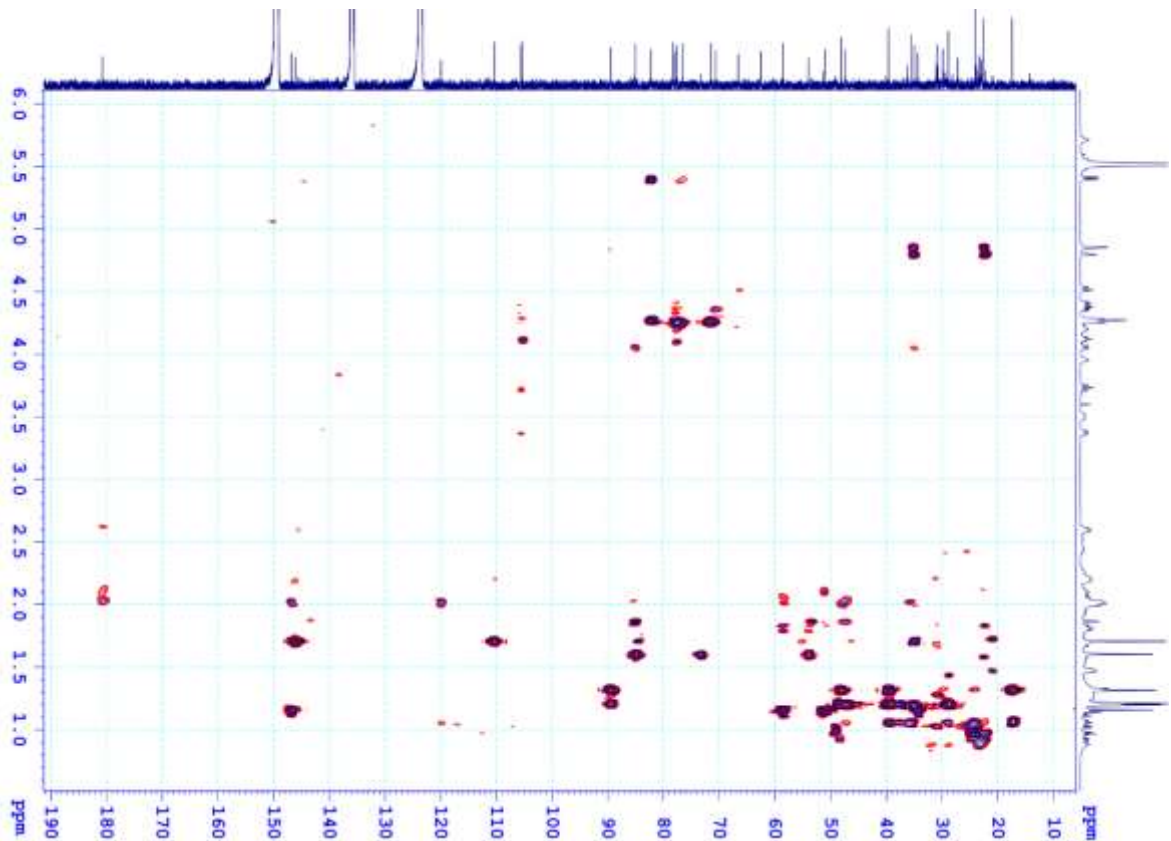


Hình 10. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của **SH1**.

H-19)/ $\delta_{\text{C}}$  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 (Bảng 7). 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  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY cho phép gán toàn bộ số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR cho cả hai gốc đường của **SH1** (Bảng 7).

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  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranoside [120]. Vị trí liên kết của gốc đường glucose tại C-2' của đường xylose được chứng minh bằng tương tác HMBC của  $\delta_{\text{H}}$  5,41 (H-1'') với  $\delta_{\text{C}}$  82,3 (C-2'). Ngoài ra, các số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR phần aglycone của **SH1** cũng tương tự như các số liệu phổ tương ứng của stichoposide B [120] 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 [ $\delta_{\text{C}}$  31,1 (C-23) và 35,0 (C-24)/ $\delta_{\text{H}}$  1,92 (H-23a), 2,02 (H-23b), 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 phần đầu mạch [ $\delta_{\text{C}}$  146,2 (C, C-25) và 110,4 (CH<sub>2</sub>, C-26)/ $\delta_{\text{H}}$  4,79 (H-

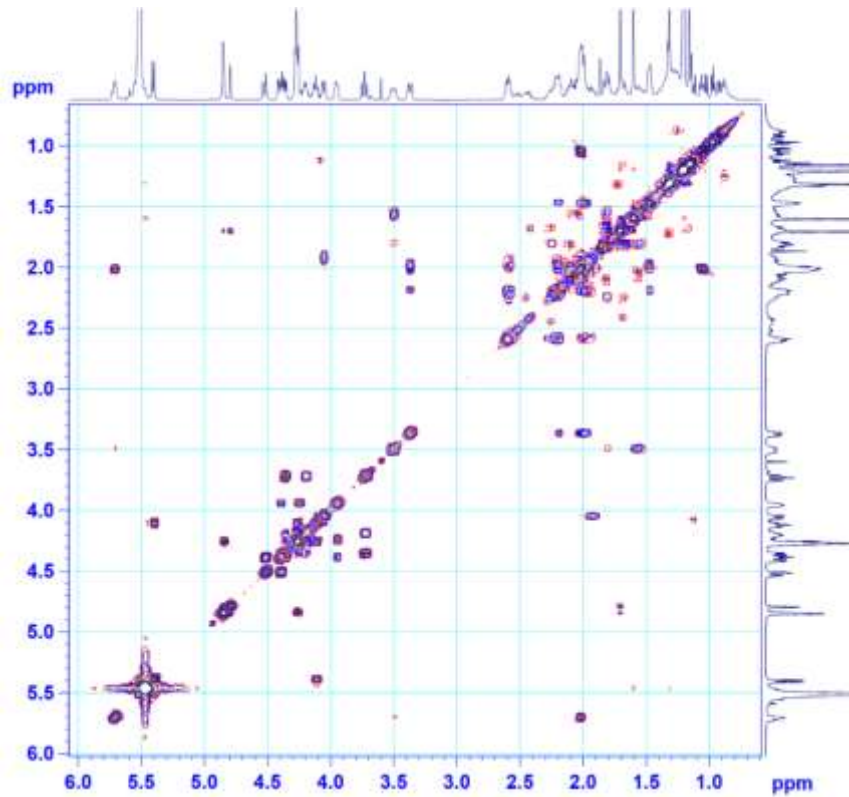




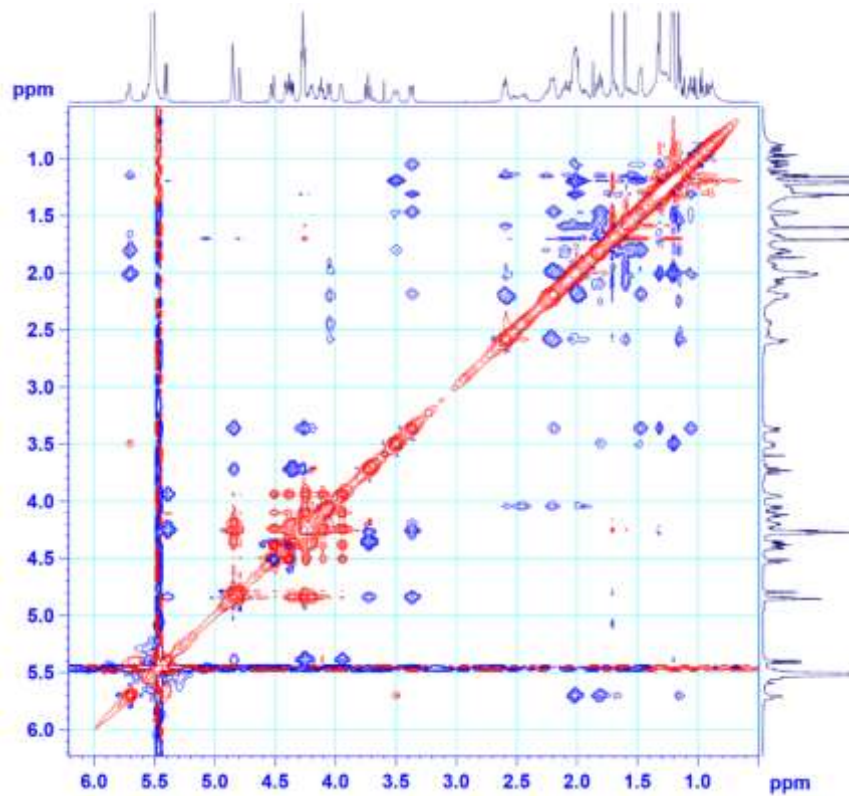
Hình 13. Phổ HMBC của **SH1**.

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  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  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 H<sub>3</sub>-31 chứng minh cho lập thể  $\alpha$  thường gặp của H-3. Proton H-17 có tương tác với cả hai proton H<sub>3</sub>-21 và H<sub>3</sub>-32 chứng minh cho lập thể  $\alpha$  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 H<sub>3</sub>-19 (Hình 15-16). 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  $3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl}]\text{-22}\xi\text{-hydroxyholost-7,25-diene}$ . Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside A.



Hình 14. Phổ COSY của **SH1**.



Hình 15. Phổ ROESY của **SH1**.



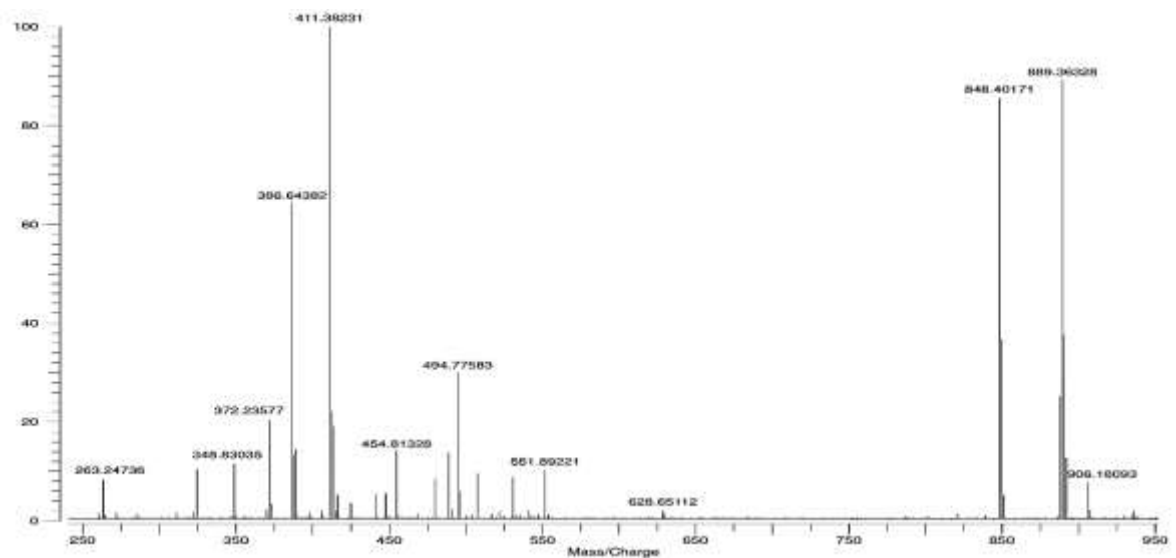
Bảng 7. Số liệu phổ NMR của **SH1** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</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)	

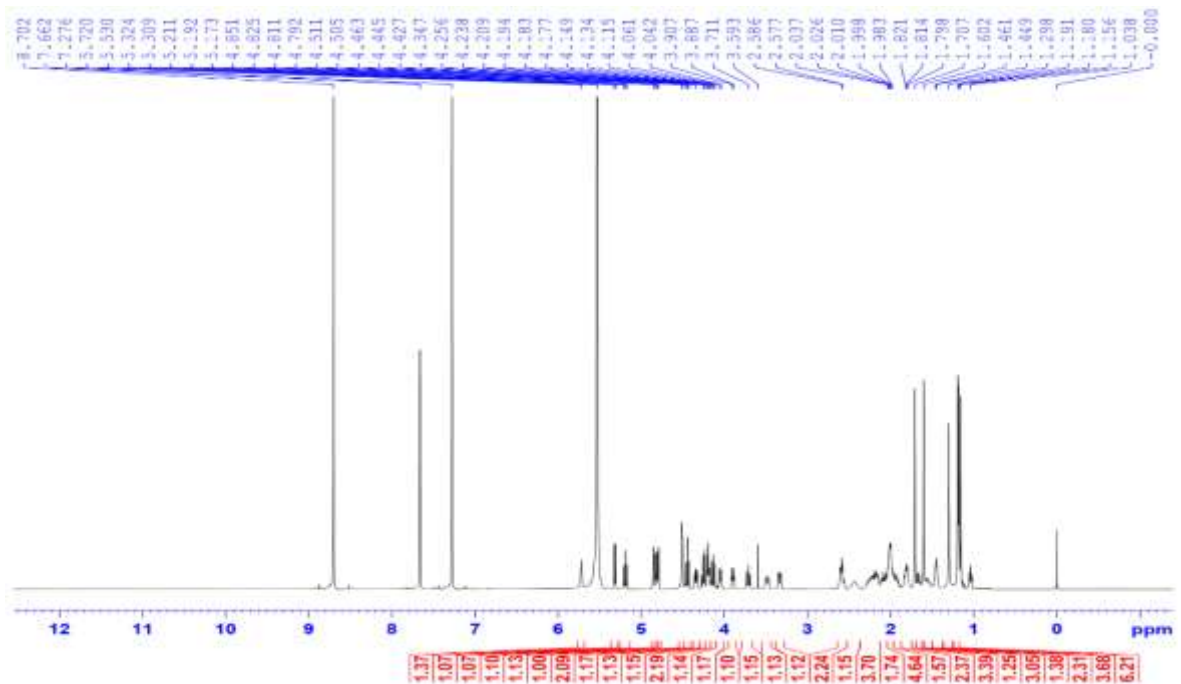
<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của stichoposide B [120], <sup>b</sup>đo trong pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.



dạng holostane disaccharide với gốc carbohydrate bị sulfate hóa chỉ ở trên gốc đường thứ nhất (xylose) hoặc thứ hai (glucose). Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của **SH2** với **SH1** cho thấy sự tương đồng, ngoại trừ sự thay đổi rất lớn độ dịch chuyển hóa học ở các tín hiệu của gốc đường glucose. Các tín hiệu của C-4" của **SH2** bị dịch chuyển mạnh về phía vùng trường thấp [ $\delta_{\text{C}}$  76,4 (C-4" )/ $\delta_{\text{H}}$  5,19 (H-4" )], khi so sánh với các tín hiệu tương ứng của **SH1** [ $\delta_{\text{C}}$  71,5 (C-4" )/ $\delta_{\text{H}}$  4,25 (H-4" )], gợi ý cho sự có mặt của một nhóm sulfate tại C-4". Nhận định này được chứng minh bằng quan sát trên phổ HR-ESI-MS với peak ion giả phân tử phù hợp ghi nhận tại  $m/z$  889,36328 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[\text{C}_{41}\text{H}_{63}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{S}]^+$ , 889,36268).

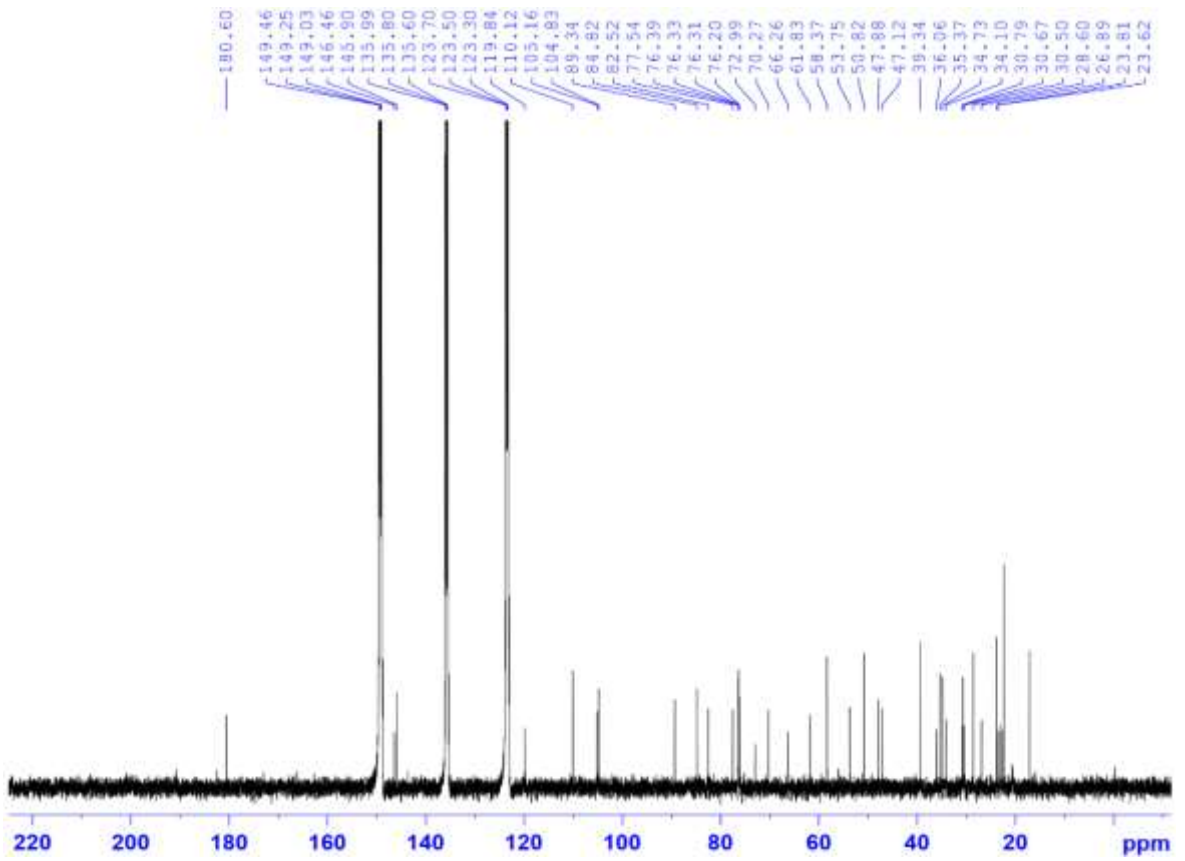


Hình 18. Phổ HR-ESI-MS của **SH2**.

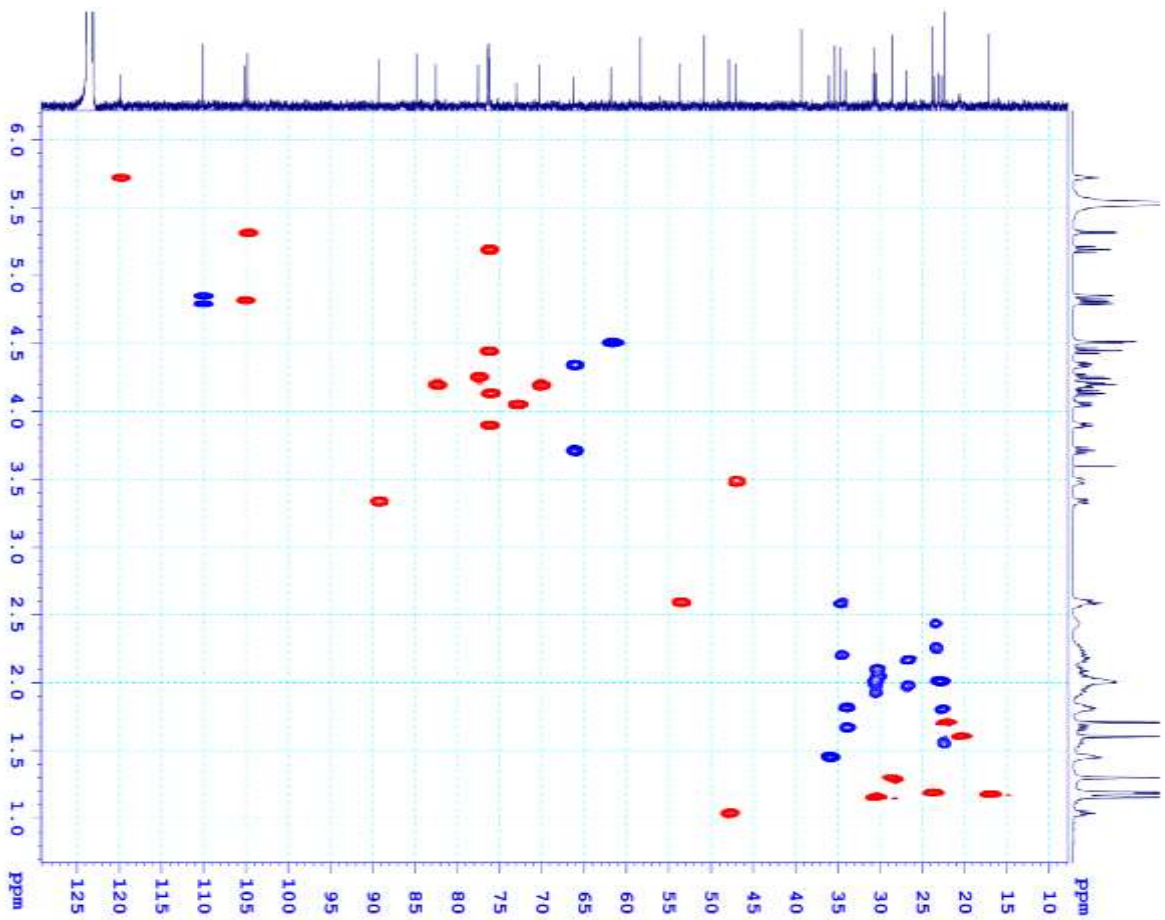


Hình 19. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của **SH2**.

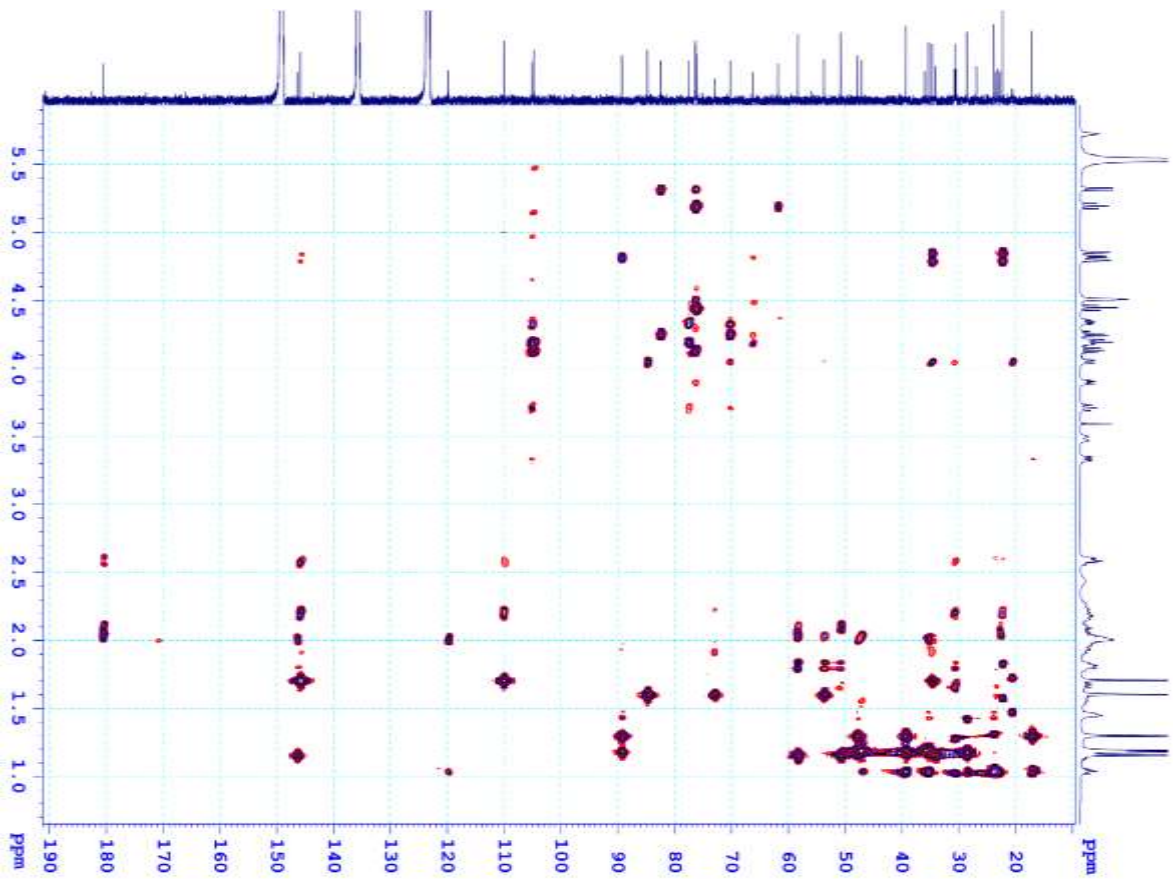




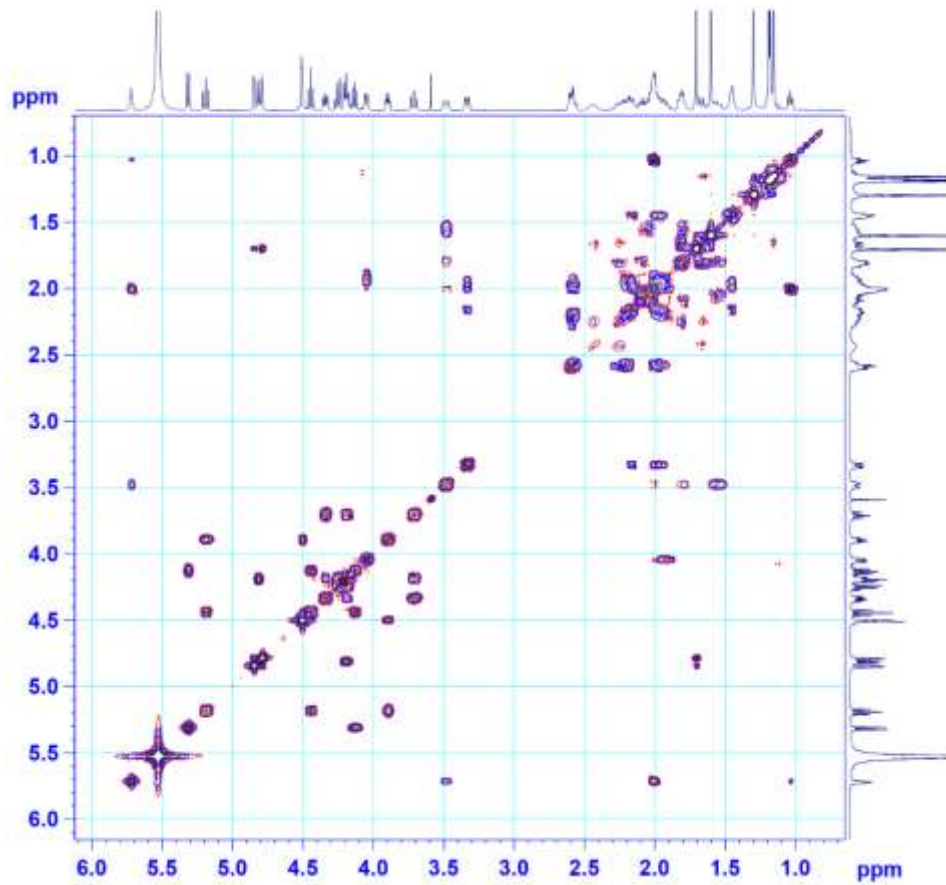
Hình 20. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH2.



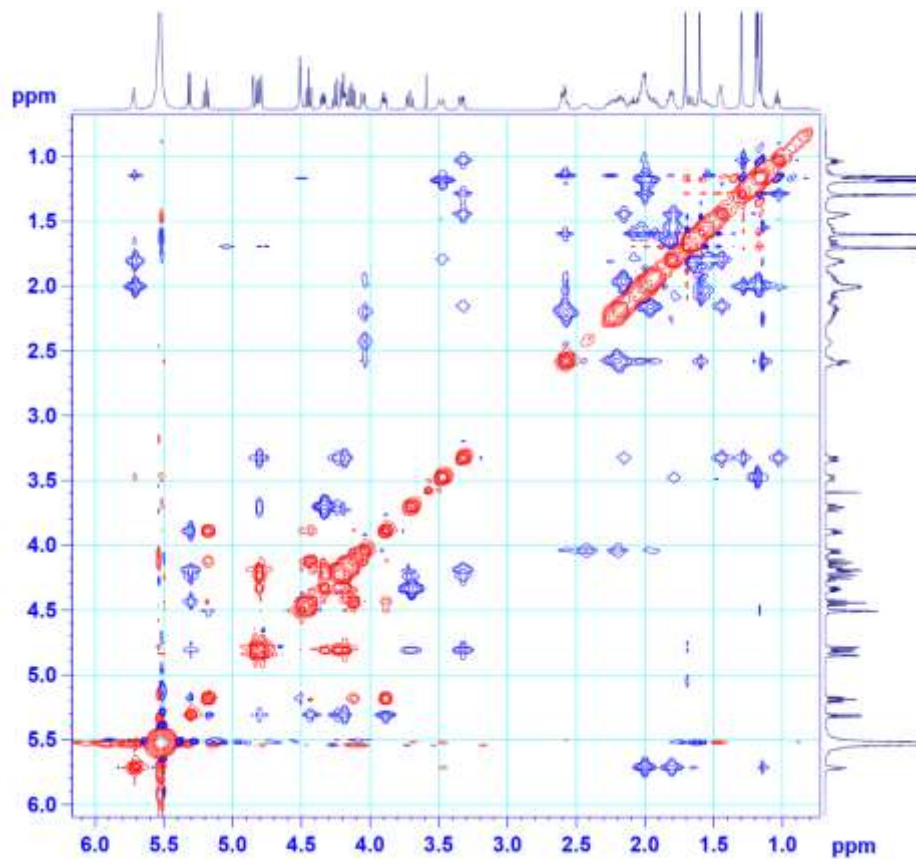
Hình 21. Phổ HSQC của SH2.



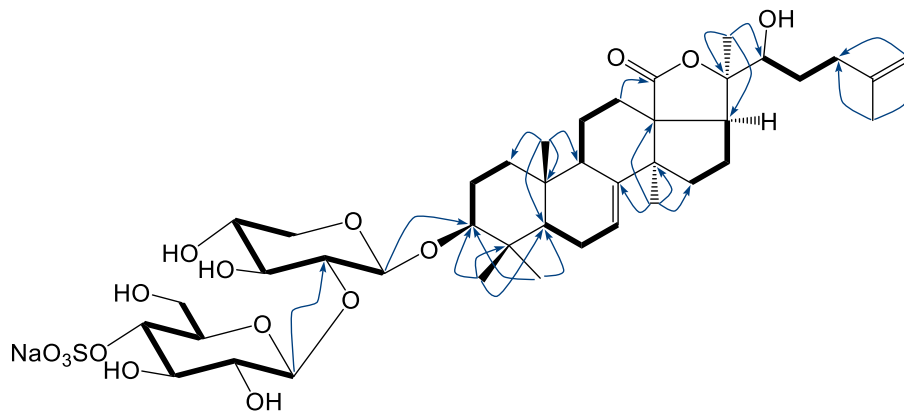
Hình 22. Phổ HMBC của SH2.



Hình 23. Phổ COSY của SH2.



Hình 24. Phổ ROESY của **SH2**.



Hình 25. Các tương tác COSY (—) và HMBC (↷) chính của **SH2**.

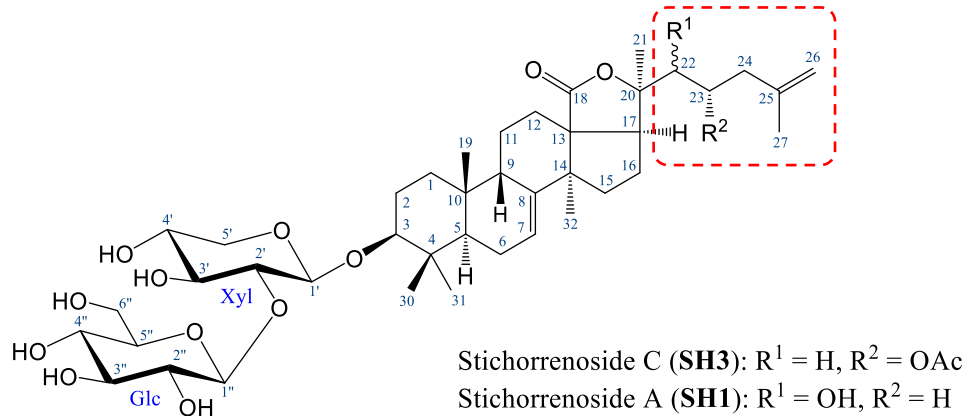
Ngoài ra, sự có mặt của một nhóm thế sulfate còn được khẳng định bằng sự phù hợp về số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của gốc đường thứ hai trong **SH2** [ $\delta$ c 104,8 (C-1''), 76,2 (C-2''), 76,3 (C-3''), 76,4 (C-4''), 76,3 (C-5'') và 61,8 (C-6'')] với các số liệu tương ứng của gốc đường (4-*O*-sulfo)- $\beta$ -D-glucopyranose của coscinasteroside C [121] [ $\delta$ c 105,4 (C-1), 75,3 (C-2), 77,8 (C-3), 76,8 (C-4), 76,4 (C-5) và 62,6 (C-6)] và sulfatericalysine D [122] [ $\delta$ c 105,1 (C-1), 75,6 (C-2), 76,5 (C-3), 77,5 (C-4), 76,7 (C-5) và 62,3 (C-6)]. Như vậy, cấu trúc hóa học của **SH2** được chứng minh là 3 $\beta$ -*O*-[4-*O*-sodiumsulfate- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-22 $\xi$ -hydroxy-holost-7,25-diene, một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside B.

Bảng 8. Số liệu phổ NMR của **SH2** và hợp chất tham khảo.

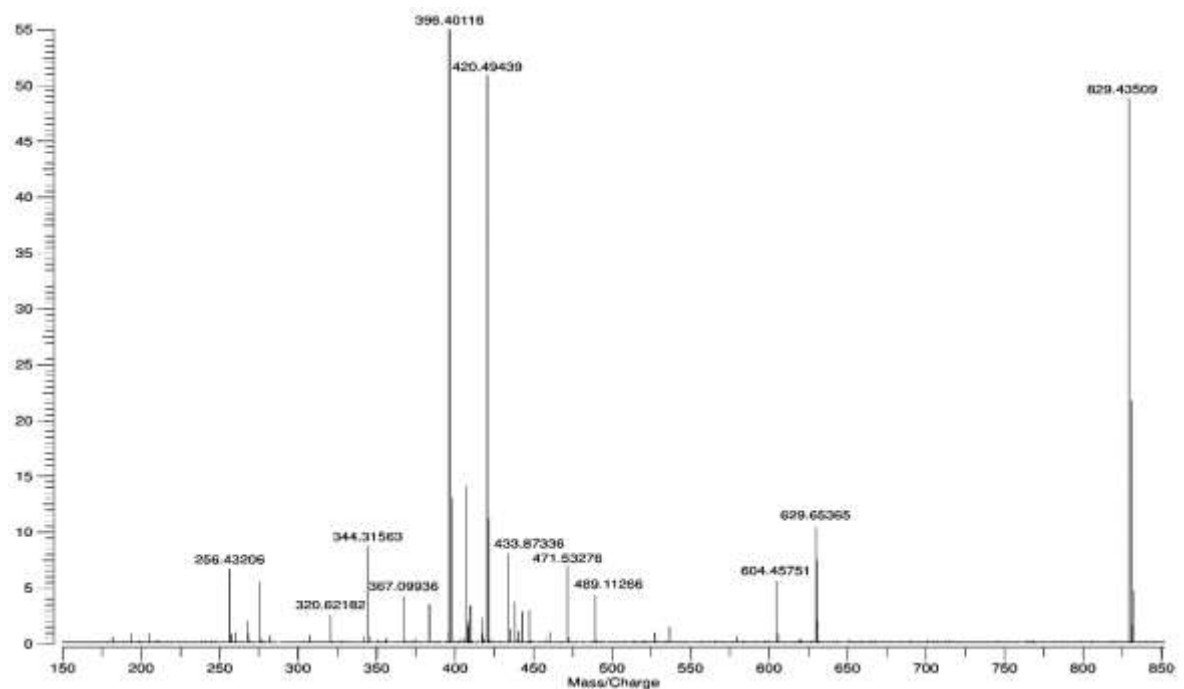
Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [121]	<sup>b</sup> $\delta_C$	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,3		36,1	1,45 m	
2	27,2		26,9	1,97 m/2,16 m	
3	89,5		89,3	3,33 dd (3,5, 12,0)	
4	39,6		39,3	-	
5	48,1		47,9	1,04 dd (7,5, 8,0)	
6	23,4		23,1	2,01 m	
7	120,0		119,8	5,72 br s	
8	146,8		146,5	-	
9	47,4		47,1	3,49 br d (14,0)	
10	35,6		35,4	-	
11	23,0		22,7	1,55 m/1,80 m	
12	30,7		30,5	2,04 m/2,10 m	
13	58,6		58,4	-	
14	51,1		50,8	-	
15	34,3		34,1	1,66 m/1,82 m	
16	23,9		23,6	2,25 m/2,43 m	
17	54,0		53,7	2,59 dd (4,5, 10,5)	
18	180,8		180,6	-	
19	24,0		23,8	1,19 s	1, 5, 9, 10
20	85,0		84,8	-	
21	21,0		20,6	1,60 s	17, 20, 22
22	73,2		73,0	4,02 br d (9,5)	
23	31,1		30,8	1,92 m/2,00 m	
24	35,0		34,7	2,20 m/2,58 m	
25	146,1		145,9	-	
26	110,3		110,1	4,79 br s/4,85 br s	
27	22,6		22,4	1,71 s	24, 25, 26
30	17,4		17,1	1,18 s	3, 4, 5, 31
31	28,9		28,6	1,30 s	3, 4, 5, 30
32	30,9		30,7	1,16 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl</i>					
1'	105,6		105,2	4,82 d (7,0)	3
2'	82,3		82,5	4,20*	
3'	77,9		77,5	4,26 t (9,0)	
4'	70,6		70,3	4,19*	
5'	66,6		66,3	3,71 dd (10,0, 11,0) 4,34 dd (5,0, 11,0)	
<i>Sulfo-Glc</i>					
1"	105,4	105,4	104,8	5,31 d (7,5)	2'
2"	76,6	75,3	76,2	4,13 dd (7,5, 9,0)	
3"	77,7	77,8	76,3	4,44 t (9,0)	
4"	71,5	76,8	76,4	5,19 t (9,0)	
5"	78,3	76,4	76,3	3,90 m	
6"	62,5	62,6	61,8	4,51 m	

<sup>a</sup> $\delta_C$  của **SH1**, <sup>b</sup> $\delta_C$  của gốc đường (4-*O*-sulfo)- $\beta$ -D-glucopyranose coscinasteroside C [121], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

### 4.1.3. Hợp chất SH3: Stichorrenoside C (hợp chất mới)



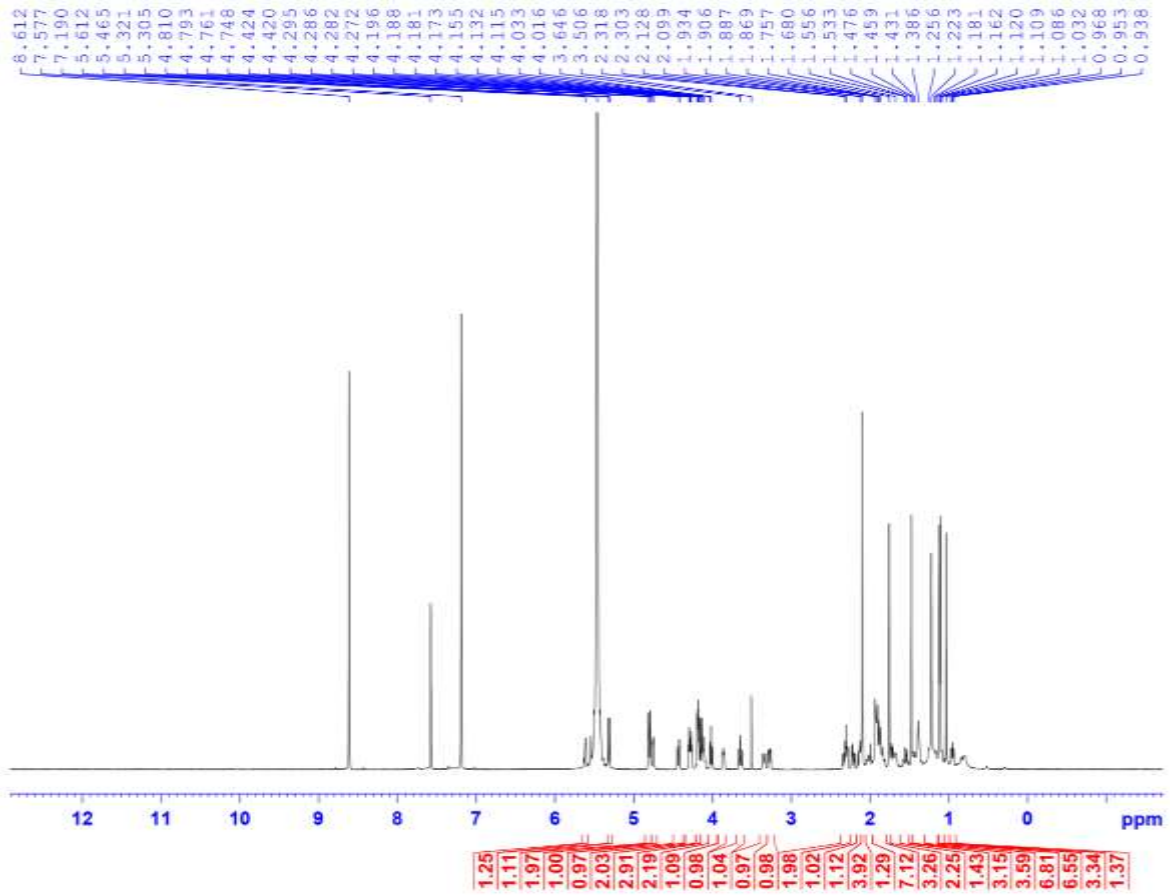
Hình 26. Cấu trúc hóa học của **SH3** và hợp chất tham khảo **SH1**.



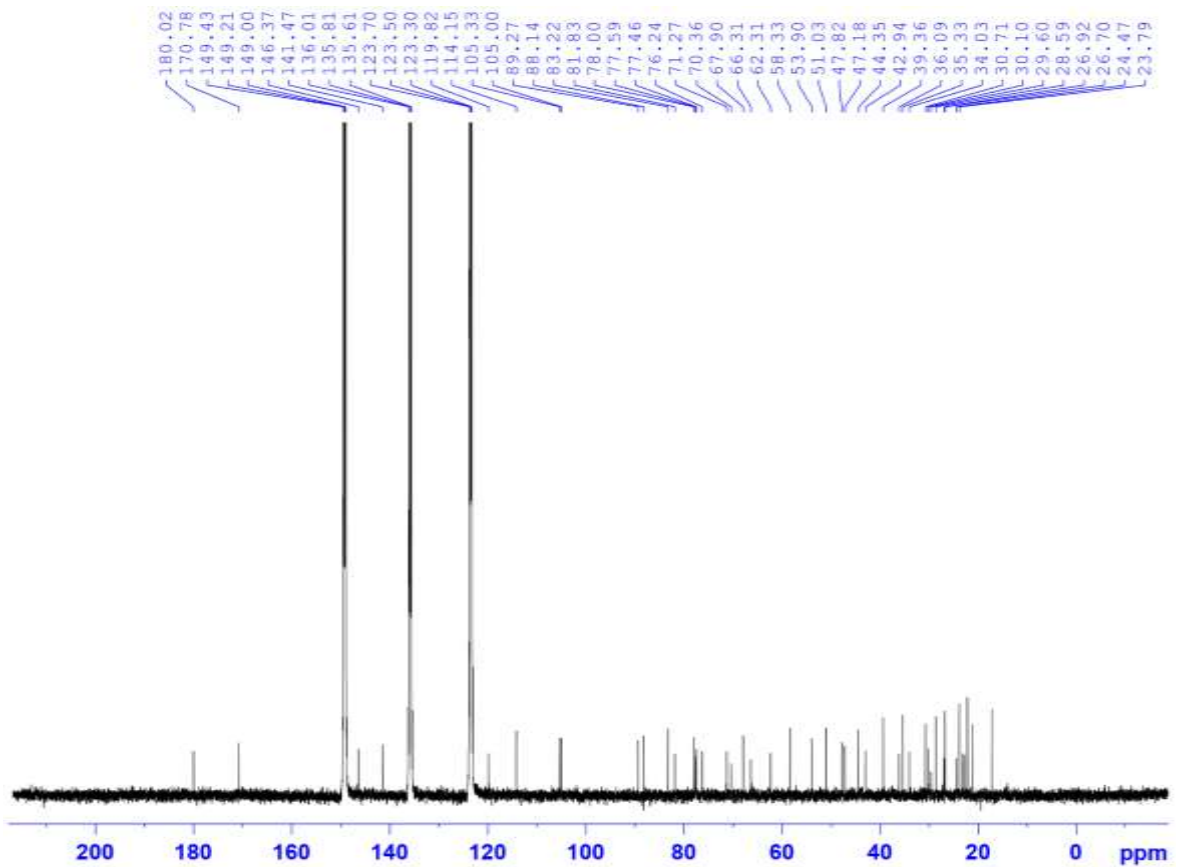
Hình 27. Phổ HR-ESI-MS của **SH3**.

Hợp chất **SH3** được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. CTPT của **SH3** được xác định là  $C_{43}H_{66}O_{14}$  dựa trên phân tích phổ HR-ESI-MS của **SH3** (Hình 27) với peak ion giả phân tử tại  $m/z$  829,43509  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{43}H_{66}NaO_{14}]^+$ , 829,43448). Các phổ NMR của **SH3** cho thấy đây cũng là một dẫn xuất của holostane triterpene glycoside với hai liên kết olefinic ( $\Delta^{7(8)}$  và  $\Delta^{25(26)}$ ), một nhóm carbonyl lactone (C-18), một nhóm hydroxy (C-3) liên kết với một chuỗi oligosaccharide bao gồm hai gốc đường (D-xylose và D-glucose). Hai liên kết carbon của **SH3** [ $\delta_C$  44,3 (C-24) và 22,1 (C-27)] cùng với hai tín hiệu olefinic [ $\delta_C$  141,4 (C-25) và  $\delta_C$  114,1 (C-26)] đã xác nhận sự hiện diện của một nối đôi tại C-25/C-26. Ngoài ra, trên phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của **SH3** cho thấy xuất hiện cộng hưởng đối với



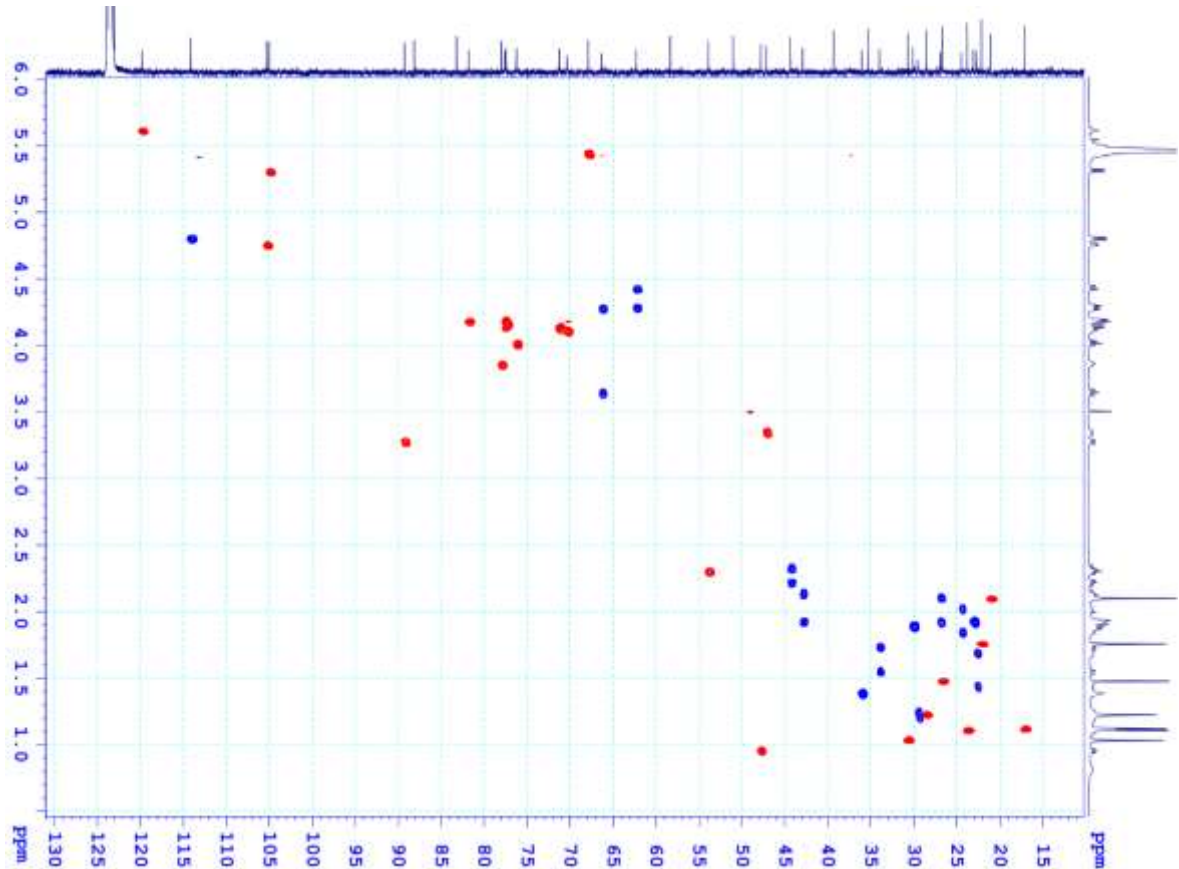


Hình 28. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH3.

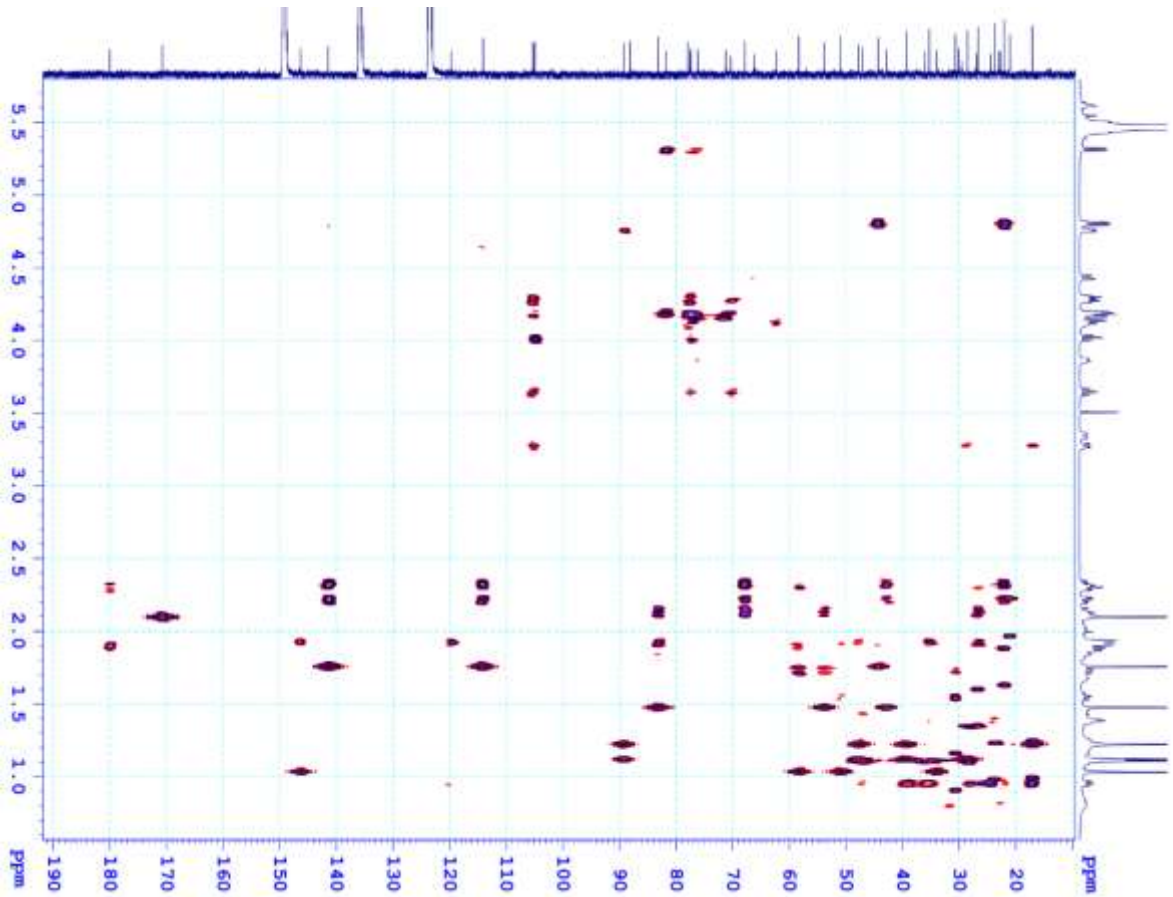


Hình 29. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH3.

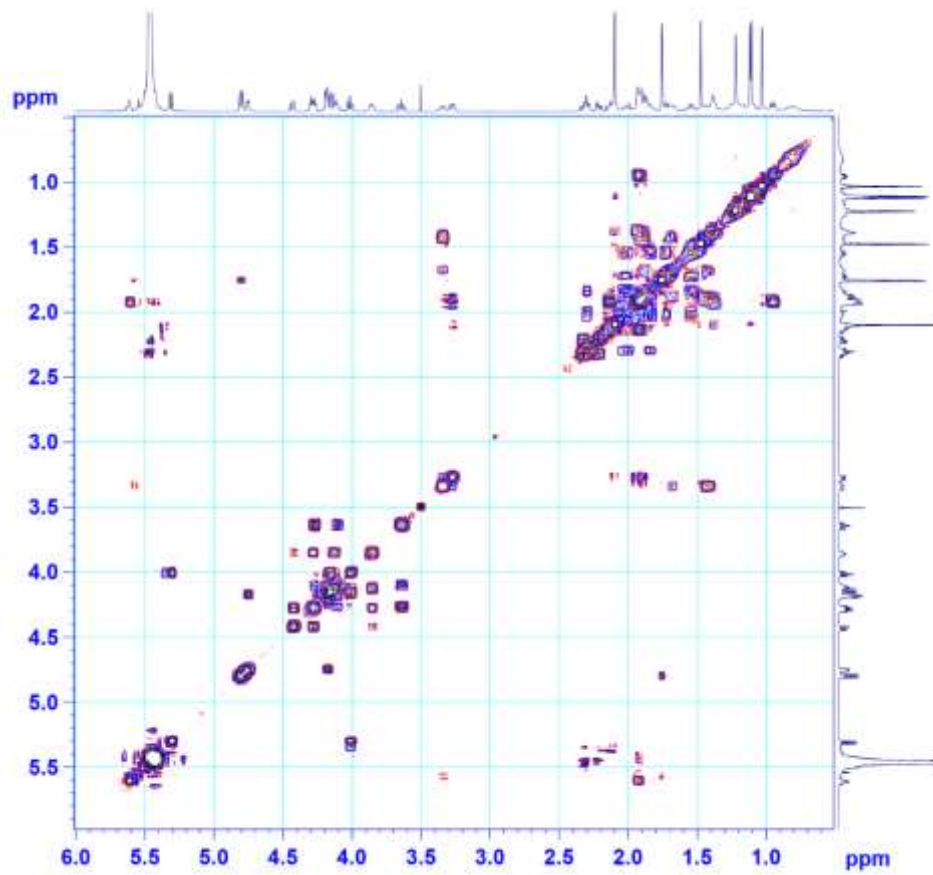
một liên kết đôi khác tại C-7/C-8 [ $\delta_C$  119,8 (C-7)/ $\delta_H$  5,61 (br s, H-7) và 146,4 (C-8)] (Hình 29). Quan sát số liệu phổ NMR của **SH3** cho thấy sự tương đồng với các số liệu của **SH1**. Sự thay đổi lớn nhất liên quan đến các tín hiệu cộng hưởng NMR ở phần mạch nhánh với sự xuất hiện thêm các tín hiệu của một nhóm thế acetate [ $\delta_C$  170,8 (C=O) và 21,1 (CH<sub>3</sub>)/ $\delta_H$  2,10 (3H, s)]. Kết hợp các phổ <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC và NOESY (Hình 31-33) cho phép gán tất cả số liệu <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR và thiết lập cấu hình tương đối các trung tâm bất đối của phần aglycone. Phân tích trên phổ COSY xuất hiện các tín hiệu của H-22/H-23/H-24 và các tương tác xa trên phổ HMBC của H<sub>3</sub>-21 ( $\delta_H$  1,48) với C-17 ( $\delta_C$  53,9), C-20 ( $\delta_C$  83,2) và C-22 ( $\delta_C$  42,9) và H<sub>3</sub>-27 ( $\delta_H$  1,76) với C-24 ( $\delta_C$  44,3), C-25 ( $\delta_C$  141,5) và C-26 ( $\delta_C$  114,1), chứng minh rõ ràng cho vị trí của nhóm thế acetate tại C-23 và liên kết đôi tại vị trí C-25/C-26, tương ứng. Ngoài ra, cấu trúc của phần mạch nhánh còn được khẳng định thêm bằng sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của **SH3** với các số liệu tương ứng của synallactoside A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub> và C [123]. Như vậy, cấu trúc hóa học của **SH3** là 3 $\beta$ -O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23*S*-acetoxylolost-7,25-diene. Đây cũng là một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside C.



Hình 30. Phổ HSQC của **SH3**.

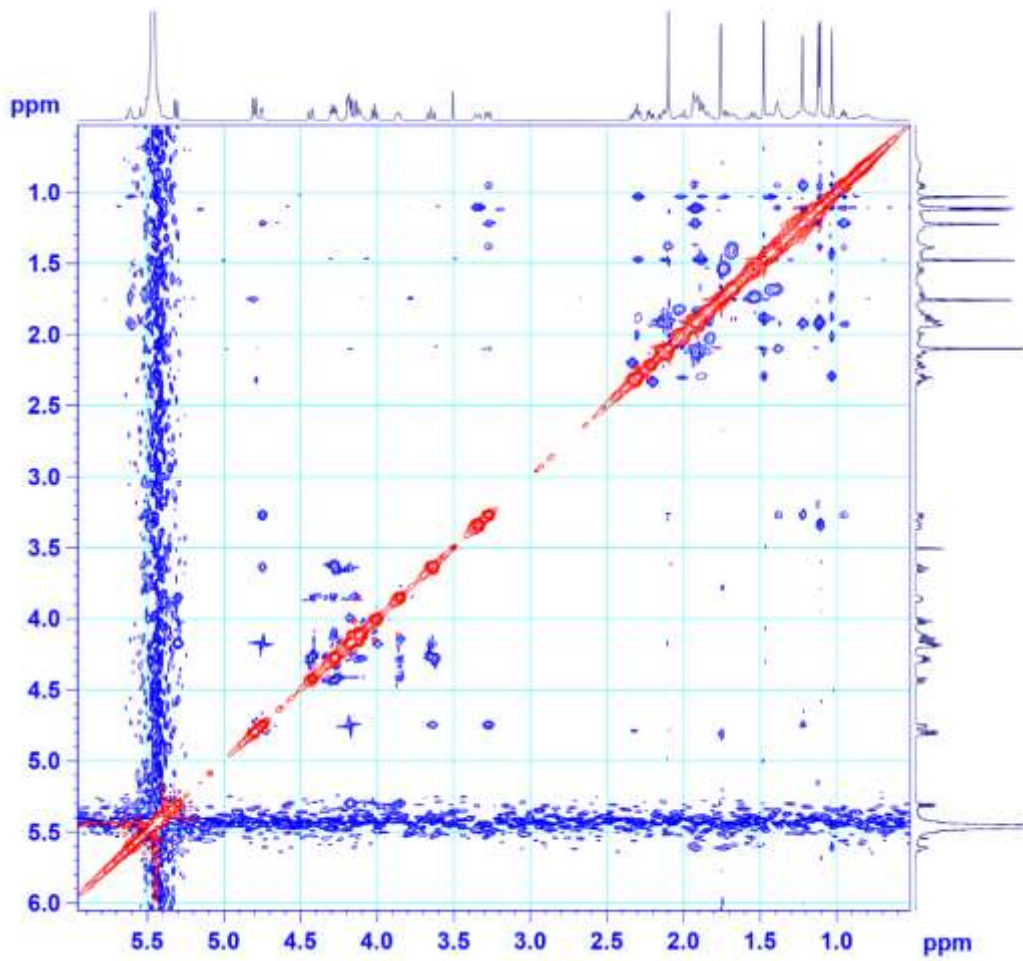


Hình 31. Phổ HMBC của SH3.

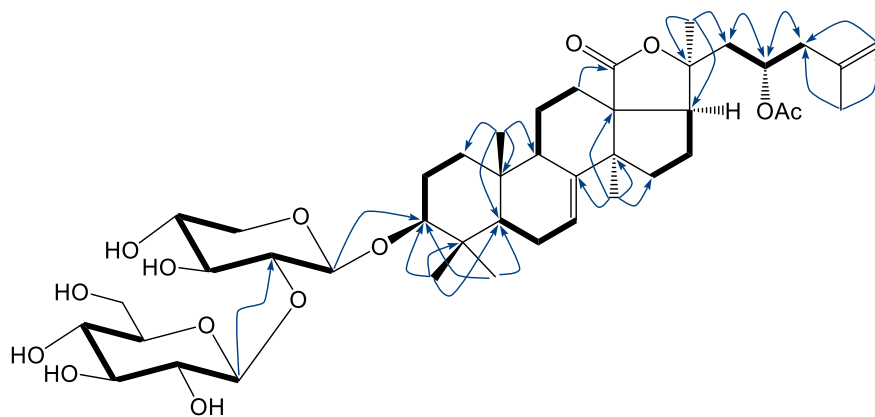


Hình 32. Phổ COSY của SH3.





Hình 33. Phổ ROESY của **SH3**.



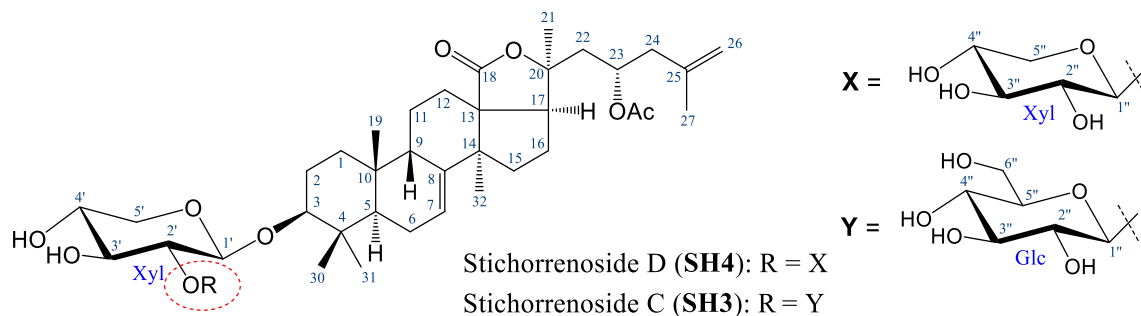
Hình 34. Các tương tác COSY (—) và HMBC (↷) chính của **SH3**.

Bảng 9. Số liệu phổ NMR của **SH3** và hợp chất tham khảo.

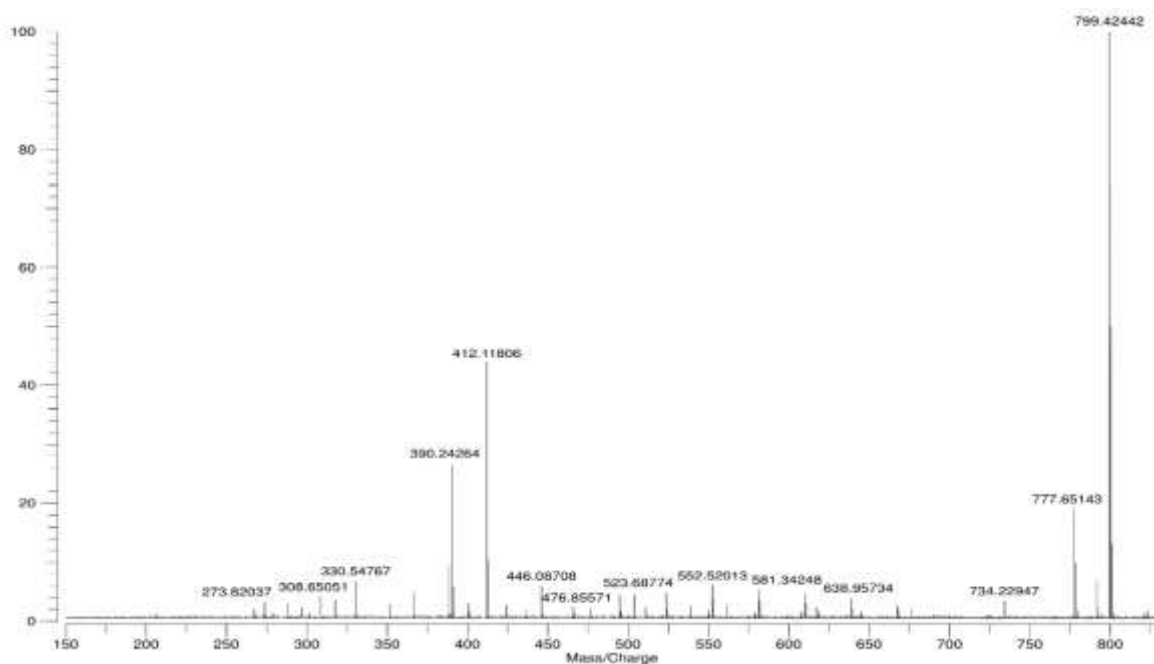
Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,3	36,1	1,48 m	
2	27,2	26,9	1,92 m/2,12 m	
3	89,5	89,3	3,28 dd (4,0, 12,0)	
4	39,6	39,4	-	
5	48,2	47,8	0,95 t (7,5)	
6	23,4	23,1	1,92 m	
7	120,0	119,8	5,61 br s	
8	146,8	146,4	-	
9	47,4	47,2	3,35 br d (14,5)	
10	35,7	35,3	-	
11	23,0	22,7	1,43 m/1,68 m	
12	30,7	30,1	1,89 m	
13	58,6	58,3	-	
14	51,1	51,0	-	
15	34,4	34,0	1,55 m/1,73 m	
16	23,9	24,5	1,84 m/2,02 m	
17	54,0	53,9	2,29 dd (4,0, 10,0)	
18	180,8	180,0	-	
19	24,0	23,8	1,10 s	1, 5, 9, 10
20	<b>85,1</b>	<b>83,2</b>	-	
21	<b>21,0</b>	<b>26,7</b>	1,48 s	17, 20, 22
22	<b>73,2</b>	<b>42,9</b>	1,92 m/2,13 m	
23	<b>31,1</b>	<b>67,9</b>	5,43 m	
24	<b>35,0</b>	<b>44,3</b>	2,21 dd (5,0, 14,0) 2,33 dd (8,0, 14,0)	
25	<b>146,1</b>	<b>141,4</b>	-	
26	<b>110,4</b>	<b>114,1</b>	4,79 br s/4,81 br s	
27	22,6	22,1	1,76 s	24, 25, 26
30	17,4	17,1	1,12 s	3, 4, 5, 31
31	28,9	28,6	1,22 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,7	1,03 s	8, 13, 14, 15
C=O		170,8	-	
CH <sub>3</sub>		21,1	2,10 s	
<i>Xyl</i>				
1'	105,6	105,3	4,75 d (7,5)	3
2'	82,3	81,8	4,18*	
3'	77,9	77,6	4,18*	
4'	70,7	70,4	4,10 m	
5'	66,6	66,3	4,26 dd (4,5, 11,0) 3,65 dd (10,5, 11,0)	
<i>Glc</i>				
1''	105,5	105,0	5,31 d (8,0)	2'
2''	76,6	76,2	4,02 dd (8,0, 9,0)	
3''	77,8	77,5	4,15 t (9,0)	
4''	71,6	71,3	4,13 t (9,0)	
5''	78,3	78,0	3,86 m	
6''	62,6	62,3	4,28 dd (4,5, 12,0) 4,43 dd (2,0, 12,0)	

<sup>a</sup> $\delta_C$  của **SH1**, <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.1.4. Hợp chất SH4: Stichorrenoside D (hợp chất mới)

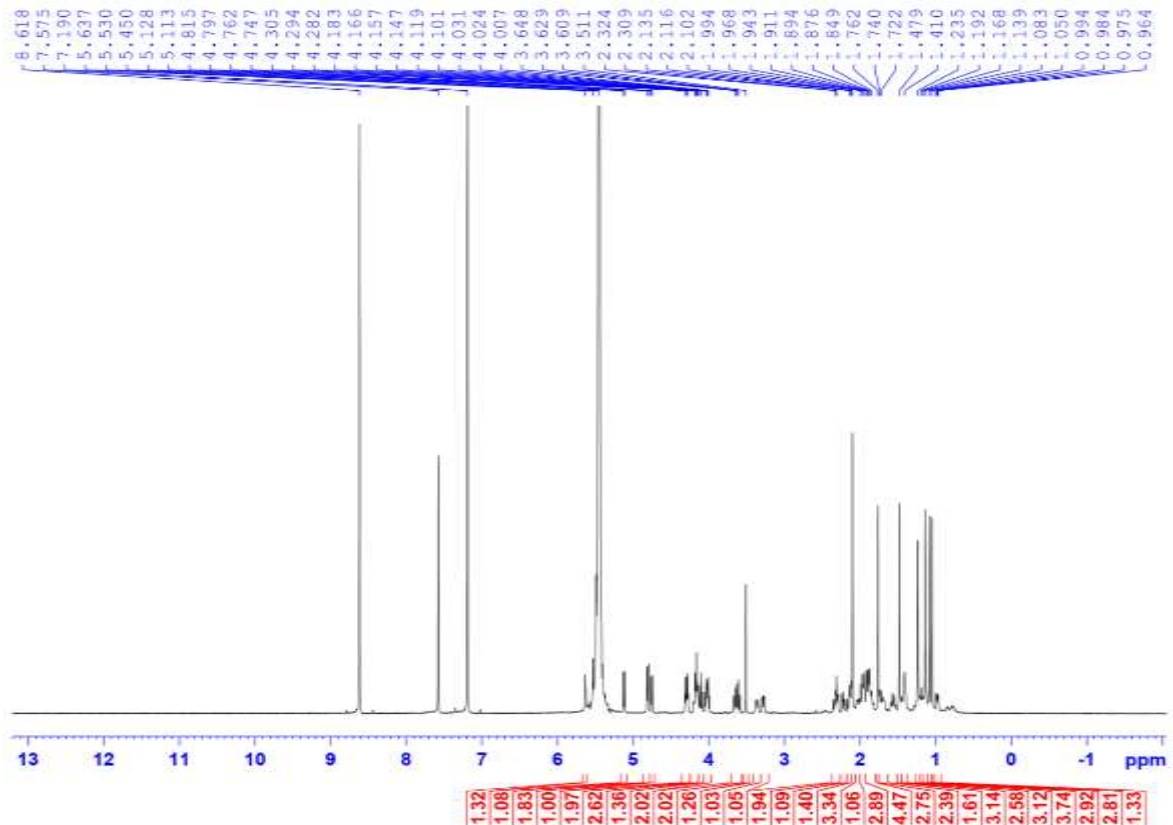


Hình 35. Cấu trúc hóa học của SH4 và hợp chất tham khảo SH3.



Hình 36. Phổ HR-ESI-MS của SH4.

Hợp chất dạng bột, màu trắng sau khi SH4 được tinh chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (Hình 36) xuất hiện peak ion giả phân tử tại  $m/z$  799,42442  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{42}H_{64}NaO_{13}]^+$ ,  $M = 799,42392$ ) cùng với phổ  $^{13}C$  NMR cho phép xác định CTPT của hợp chất này là  $C_{42}H_{64}O_{13}$ . Các hằng số tương tác lớn ( $^3J_{H-1/H-2} = 7,5$  Hz) của mỗi proton anome chứng tỏ cấu hình  $\beta$  của các gốc đường và ở dạng pyranose. Hơn nữa, thực nghiệm trên phổ HMQC và  $^1H$ - $^1H$  COSY (Hình 39-41) cho phép gán tuần tự hầu hết các tín hiệu cộng hưởng cho mỗi gốc đường cũng như tương quan của tất cả các vị trí cộng hưởng của proton với carbon tương ứng của chúng. Phân tích các số liệu phổ 1D NMR của SH4 cho thấy độ dịch chuyển hóa học tương tự như các số liệu của SH3, ngoại trừ sự khác nhau rõ rệt ở các tín hiệu liên quan đến gốc đường thứ hai với sự mất đi các tín hiệu của một nhóm oxymethylene ở SH4. Điều này cũng được khẳng định bằng phổ HR-ESI-MS với sự

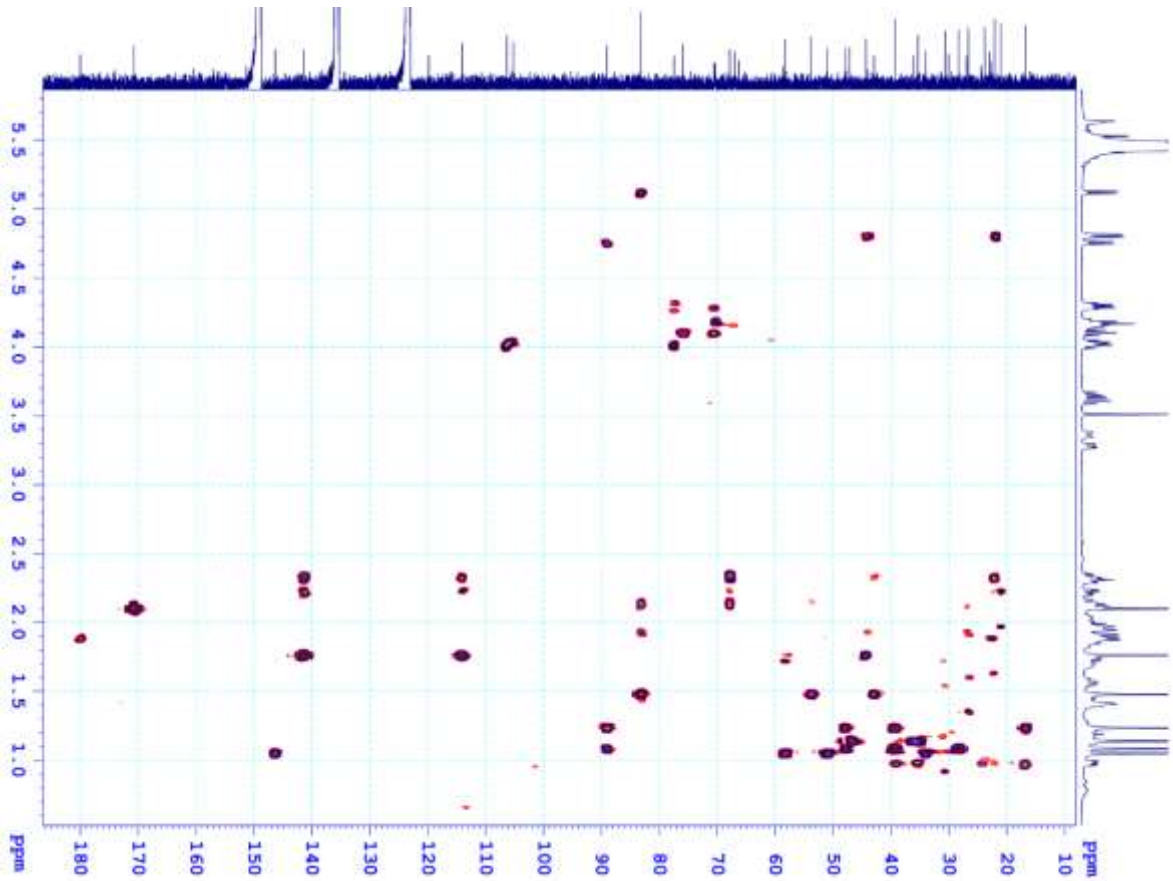


Hình 37. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của **SH4**.

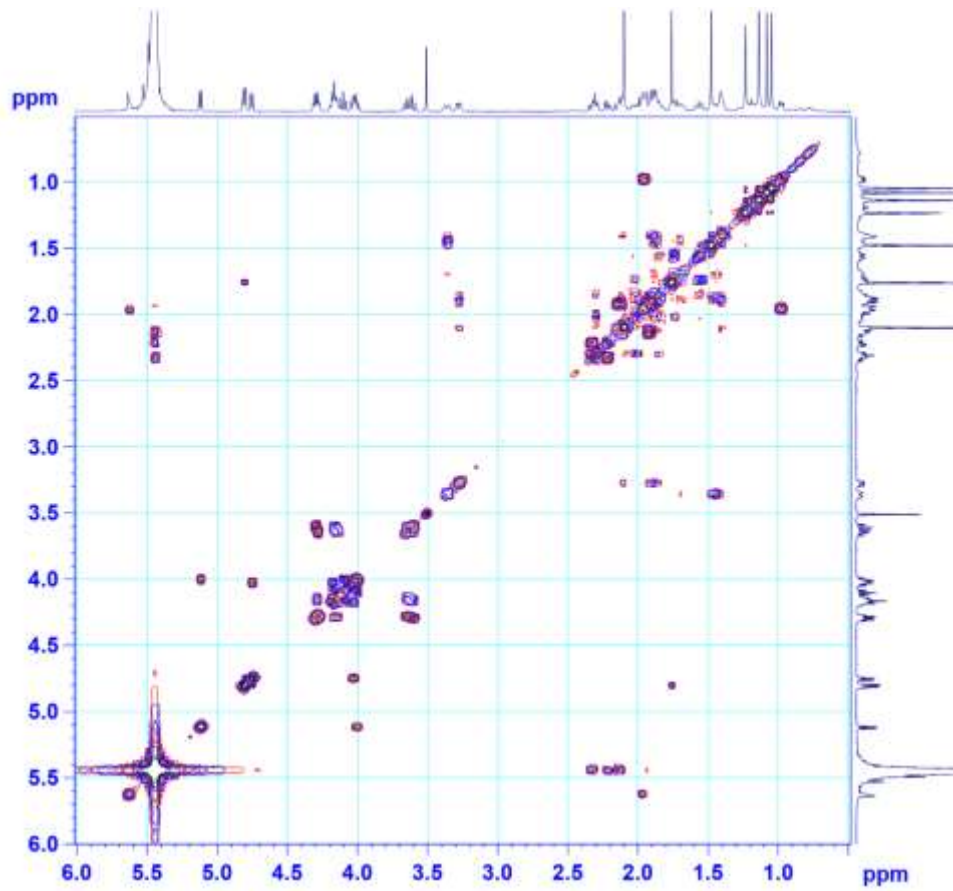
xuất hiện của peak ion giả phân tử tại  $m/z$  799,42442  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{NaO}_{13}]^+$ , 799,42392) tương ứng với CTPT  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$  của **SH4**.

Các số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR phần chuỗi đường của **SH4** tương tự như của  $3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl}]\text{-23S-acetoxylolost-7-ene}$  [120] và khác hoàn toàn so với các số liệu của  $3\text{-O-}[\alpha\text{-L-arabinopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl}]\text{-3}\beta,6\alpha,16\beta,24\alpha\text{-tetrahydroxy-20(R),25-epoxycycloartane}$  [124] chứng minh chuỗi đường của **SH4** là  $\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranoside}$ . Để xác định trình tự vị trí các liên kết của các gốc đường được tiến hành phân tích các tương tác trên phổ thực nghiệm HMBC. Trước tiên là tương tác giữa  $\delta_{\text{H}}$  4,76 (H-1') với  $\delta_{\text{C}}$  89,1 (C-3) chỉ ra rằng gốc xyl1 liên kết với phần aglycone tại vị trí C-3, tương tác giữa  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (H-1'') proton anome của gốc xyl2 với carbon C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  83,2) của gốc xyl1 cho phép xác định vị trí liên kết của gốc xyl2 với xyl1 tại C-2' (Hình 42). Từ các phân tích đã nêu kết hợp phân tích chi tiết các tương tác khác trên các phổ HSQC, HMBC,  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY và ROESY xác định cấu trúc hóa học của **SH4** là  $3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl}]\text{-23S-acetoxylolost-7,25-diene}$ , một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside D.



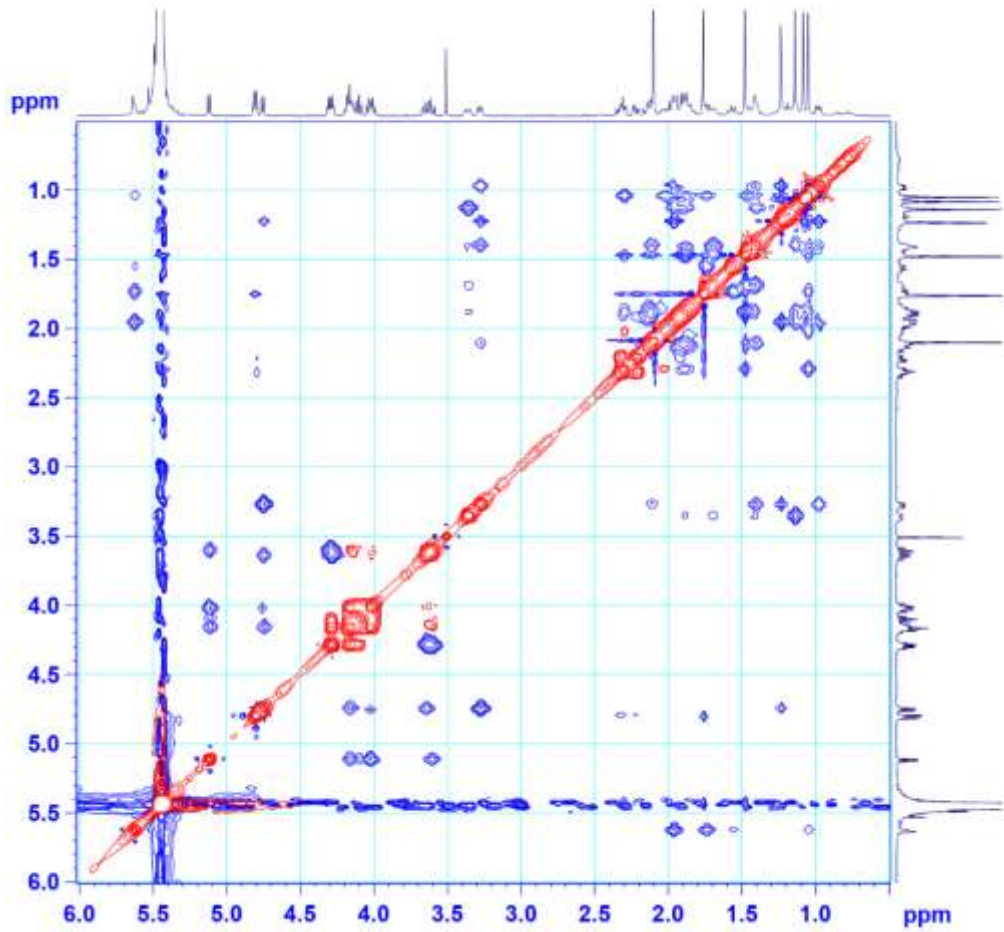


Hình 40. Phổ HMBC của SH4.

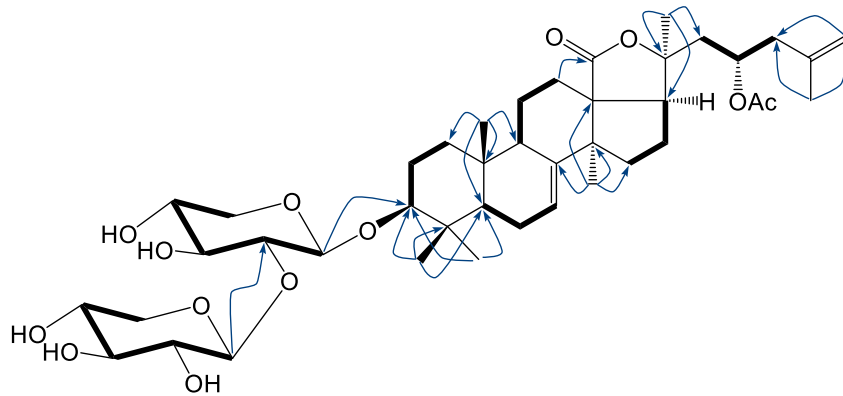


Hình 41. Phổ COSY của SH4.





Hình 42. Phổ ROESY của **SH4**.



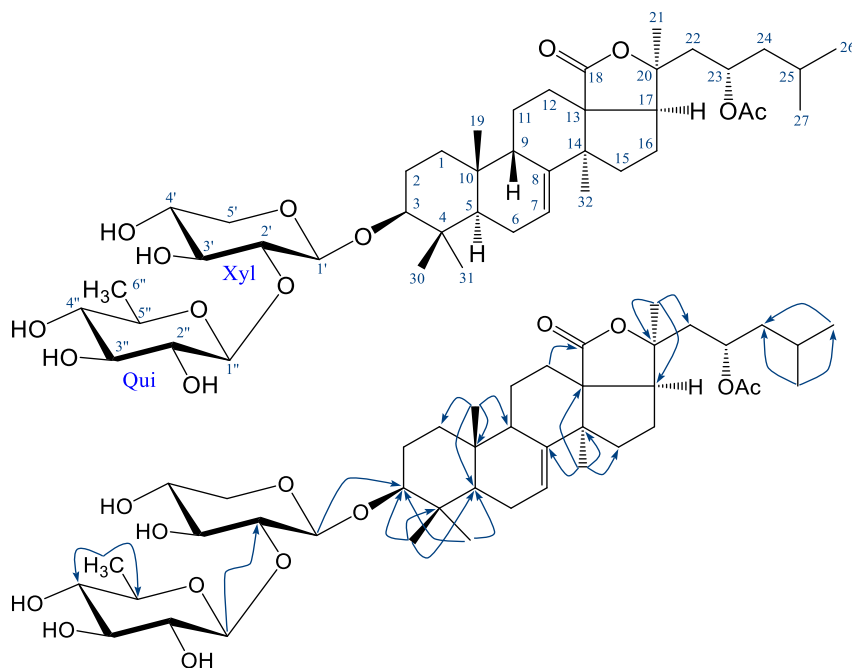
Bảng 10. Số liệu phổ NMR của **SH4** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [125]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,1	36,1	1,40 m	
2	27,4	27,0	1,88 m/2,10 m	
3	89,7	89,1	3,28 dd (3,5, 12,0)	
4	39,8	39,4	-	
5	48,3	47,9	0,98 dd (7,5, 10,0)	
6	22,9	23,1	1,95 m	
7	120,0	119,9	5,64 br s	
8	146,5	146,4	-	
9	47,6	47,2	3,36 br d (14,0)	
10	35,8	35,4	-	
11	23,0	22,7	1,44 m/1,70 m	
12	30,5	30,1	1,87 m	18
13	58,6	58,3	-	
14	51,4	51,0	-	
15	34,4	34,0	1,55 m/1,74 m	
16	24,9	24,6	1,83 m/2,02 m	
17	54,4	53,9	2,29 dd (4,5, 10,5)	
18	179,4	180,0	-	
19	24,2	23,8	1,14 s	1, 5, 9, 10
20	83,1	83,2	-	
21	27,1	26,7	1,48 s	17, 20, 22
22	44,2	42,9	1,92 m/2,14 m	
23	68,2	67,9	5,45 m	
24	45,5	44,4	2,22 m/2,32 m	
25	24,7	141,5	-	
26	22,3	114,1	4,79 br s/4,81 br s	24, 25, 27
27	23,2	22,2	1,76 s	24, 25, 26
30	17,2	16,8	1,08 s	3, 4, 5, 31
31	28,7	28,3	1,23 s	3, 4, 5, 30
32	31,1	30,7	1,05 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O	170,5	170,7	-	
CH <sub>3</sub>	21,2	21,1	2,10 s	C=O
<i>Xyl-1</i>				
1'	107,1	105,3	4,76 d (7,5)	3
2'	84,4	83,2	4,03 dd (7,5, 9,0)	
3'	78,2	77,5	4,18 t (9,0)	
4'	71,0	70,4	4,15 m	
5'	66,9	66,3	3,65 dd (10,5, 11,0) 4,28 dd (5,0, 11,0)	
<i>Xyl-2</i>				
1''	105,7	106,4	5,12 d (7,5)	2'
2''	76,7	76,0	4,01 dd (7,5, 9,0)	
3''	78,2	77,5	4,10 t (9,0)	
4''	71,2	70,6	4,17 m	
5''	67,6	67,0	3,61 dd (10,5, 11,0) 4,30 dd (5,0, 11,0)	

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của 3β-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene [125], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz.



#### 4.1.5. Hợp chất SH5: Stichoposide A



Hình 44. Cấu trúc hóa học của **SH5** và các tương tác HMBC chính.

Hợp chất **SH5** (Hình 44) được làm sạch dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D NMR (Hình S1-S2 trong phần Phụ lục) chỉ ra **SH5** cũng là một dẫn xuất của holostane triterpene glycoside với một liên kết olefinic (C-7/C-8), một nhóm carbonyl lactone (C-18), một nhóm hydroxy liên kết với một chuỗi oligosaccharide gồm hai gốc đường (D-xylose và D-quinose). Độ dịch chuyển hóa học trong khoảng  $\delta_C \sim 178 - 180$  ppm trên phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **SH5** tại vị trí C-18 đặc trưng cho một nhóm thế 18(20)-lactone holostane aglycone. Quan sát phổ 1D NMR và phổ HSQC của chuỗi đường trong **SH5** xuất hiện hai cặp tín hiệu proton anome phân chia doublet [ $\delta_H$  4,73 (1H,  $J = 7,5$  Hz, H-1') và 5,09 (1H,  $J = 7,5$  Hz, H-1'')], liên quan tới chúng là tín hiệu của hai carbon anome [ $\delta_C$  105,2 (C-1') và 105,5 (C-1'')] cho thấy sự hiện diện của hai gốc monosaccharide liên kết với nhau bằng liên kết  $\beta$ -glycosidic. Ngoài ra, cấu hình D-glycosidic được xác định cho tất cả các monosaccharide trong **SH5** trên cơ sở con đường sinh tổng hợp và các dẫn xuất triterpene glycoside tương tự được công bố từ các loài hải sâm trước đó. Phân tích các tương tác chính trên các phổ  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY và HSQC cho thấy hai gốc đường xylose và quinose trong chuỗi carbohydrate của **SH5**. Chi tiết các vị trí của các liên kết giữa các glycosidic dựa trên phân tích các phổ HSQC và HMBC (Hình S3-S4 trong phần Phụ lục). Cuối cùng, gốc đường điển hình của các loài hải sâm, chuỗi oligosaccharide của **SH5** được xác định liên kết xylose (2'→1'') quinose.

Bảng 11. Số liệu phổ NMR của **SH5** và hợp chất tham khảo.

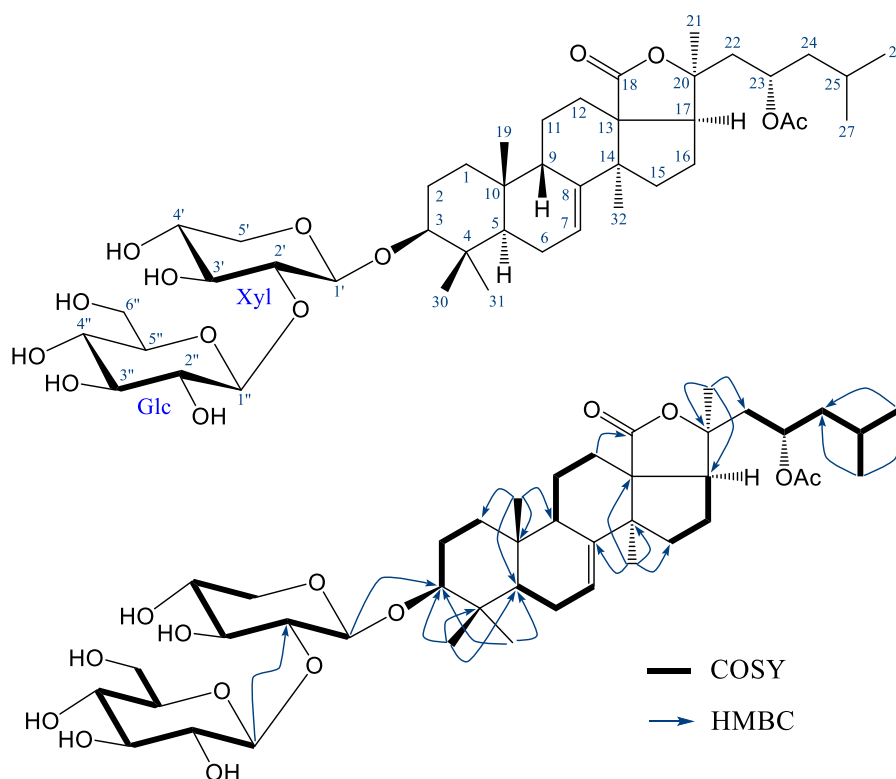
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1		36,0	1,41 m	
2		26,9	1,88 m/2,12 m	
3		89,1	3,26 dd (3,5, 11,5)	
4		39,3	-	
5		47,8	0,97 dd (6,0, 9,0)	
6		23,1	1,98 m	
7		119,8	5,66 br s	
8		146,4	-	
9		47,1	3,36 br d (13,5)	
10		35,3	-	
11		22,7	1,45 m/1,68 m	
12		30,0	1,88 m	18
13		58,3	-	
14		51,0	-	
15		33,9	1,56 m/1,75 m	
16		24,5	1,84 m/2,05 m	
17		53,9	2,33 dd (4,5, 10,5)	
18		180,1	-	
19		23,8	1,15 s	1, 5, 9, 10
20		83,2	-	
21		26,6	1,48 s	17, 20, 22
22		44,9	1,23 m/1,72 m	
23		68,2	5,38 m	
24		43,7	1,82 m/2,12 m	
25		24,3	1,50 m	
26		21,9	0,89 d (6,0)	24, 25, 27
27		22,9	0,84 d (6,0)	24, 25, 26
30		17,1	1,09 s	3, 4, 5, 31
31		28,5	1,24 s	3, 4, 5, 30
32		30,7	1,05 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O		171,1	-	
CH <sub>3</sub>		21,2	2,14 s	C=O
<i>Xyl</i>				
1'	105,5	105,2	4,73 d (7,5)	3
2'	83,6	83,2	4,01 dd (7,5, 9,0)	
3'	77,8	77,4	4,17 t (9,0)	
4'	70,8	70,3	4,13 m	
5'	66,5	66,2	3,63*/4,28 dd (5,0, 11,5)	
<i>Qui</i>				
1''	106,0	105,5	5,09 d (7,5)	2'
2''	76,7	76,5	3,98 dd (7,5, 9,0)	
3''	77,8	77,1	4,07 t (9,0)	
4''	76,9	76,2	3,65*	
5''	73,4	73,0	3,68*	
6''	18,4	18,2	1,56 d (6,0)	4'', 5''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của phần chuỗi đường của 3β-*O*-[β-*D*-quinovopyranosyl-(1→2)-β-*D*-xylopyranosyl]-23*S*-hydroxyho lost-7-ene [120], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Phân tích phổ 1D và 2D NMR của phần aglycone của **SH4** chỉ ra các cộng hưởng của 30 carbon với tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi điển hình tại C-7/C-8 [ $\delta_C$  119,8 (C-7) và 146,4 (C-8)]. Các vị trí này được xác nhận bởi các tương tác HMBC giữa H<sub>2</sub>-6, H<sub>3</sub>-32 với C-7 và C-8. Bên cạnh đó có tương tác HMBC đặc trưng giữa tín hiệu của nhóm methyl H<sub>3</sub>-21 và C-20, xác nhận vị trí C-20 ( $\delta_C$  83,2 ppm), trong khi tương tác HMBC giữa H<sub>2</sub>-12 ( $\delta_H$  1,88) và H-17 ( $\delta_H$  2,33) với tín hiệu tại  $\delta_C$  180,0 ppm xác nhận sự có mặt của một nhóm carbonyl lactone tại C-18 phần aglycone.

Các số liệu phổ NMR của **SH5** tương tự như các số liệu của **SH3** ngoại trừ không còn xuất hiện các tín hiệu của một liên kết đôi bị thế hai vị trí ở đầu mạch (C-25/C-26) của phần aglycone và một nhóm oxymethylene (C-6'') thuộc gốc đường, mà thay vào đó là sự xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của hai nhóm *sec*-methyl (C-26 và C-6''). Liên quan đến số liệu NMR của chuỗi đường với các số liệu phổ tương ứng của  $3\beta$ -O-[ $\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23*S*-hydroxyholost-7-ene [120] kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC cho phép xác định hợp chất **SH5** chính là stichoposide A [120, 126].

#### 4.1.6. Hợp chất **SH6**: Stichoposide B



Hình 45. Cấu trúc hóa học của **SH6** và các tương tác COSY, HMBC chính.

Bảng 12. Số liệu phổ NMR của **SH6** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,4	35,9	1,35 m	
2	27,1	26,8	1,90 m/2,06 m	
3	89,3	89,3	3,26 dd (4,0, 12,0)	
4	39,6	39,2	-	
5	48,4	47,7	0,93 dd (6,0, 9,0)	
6	23,4	22,9	1,90 m	
7	120,0	119,7	5,61 br s	
8	146,7	146,3	-	
9	47,6	47,0	3,31 br d (14,5)	
10	35,7	35,2	-	
11	23,0	22,6	1,41 m/1,65 m	
12	30,6	29,9	1,88 m	
13	58,7	58,2	-	
14	51,4	50,9	-	
15	34,4	33,9	1,53 m/1,74 m	
16	25,0	24,4	1,82 m/2,04 m	
17	54,5	53,9	2,33 dd (4,0, 10,5)	
18	179,6	180,1	-	
19	24,0	23,7	1,08 s	1, 5, 9, 10
20	82,9	83,3	-	
21	27,1	26,5	1,48 s	17, 20, 22
22	44,3	43,6	1,80 m/2,09 m	
23	68,7	68,3	5,36 m	
24	45,5	44,9	1,22 m/1,49 m	
25	24,8	24,2	1,48 s	
26	23,1	21,8	0,88 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,3	22,8	0,84 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,4	17,0	1,09 s	3, 4, 5, 31
31	29,0	28,5	1,19 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,6	1,03 s	8, 13, 14, 15
C=O	170,6	171,2	-	
CH <sub>3</sub>	21,3	21,2	2,16 s	
<i>Xyl</i>				
1'	105,5	105,2	4,72 d (7,5)	3
2'	82,9	81,3	4,16*	
3'	77,8	77,4	4,17*	
4'	70,8	70,1	4,09 m	
5'	66,4	66,1	3,63 dd (10,0, 11,0) 4,26 dd (5,0, 11,0)	
<i>Glc</i>				
1''	105,9	104,6	5,29 d (7,5)	2'
2''	76,5	75,9	3,99 dd (7,5, 9,0)	
3''	77,9	77,2	4,13 t (9,0)	
4''	72,0	71,1	4,05 t (9,0)	
5''	77,8	77,8	3,84 m	
6''	63,0	62,2	4,22 dd (5,0, 12,0) 4,41 dd (2,5, 12,0)	

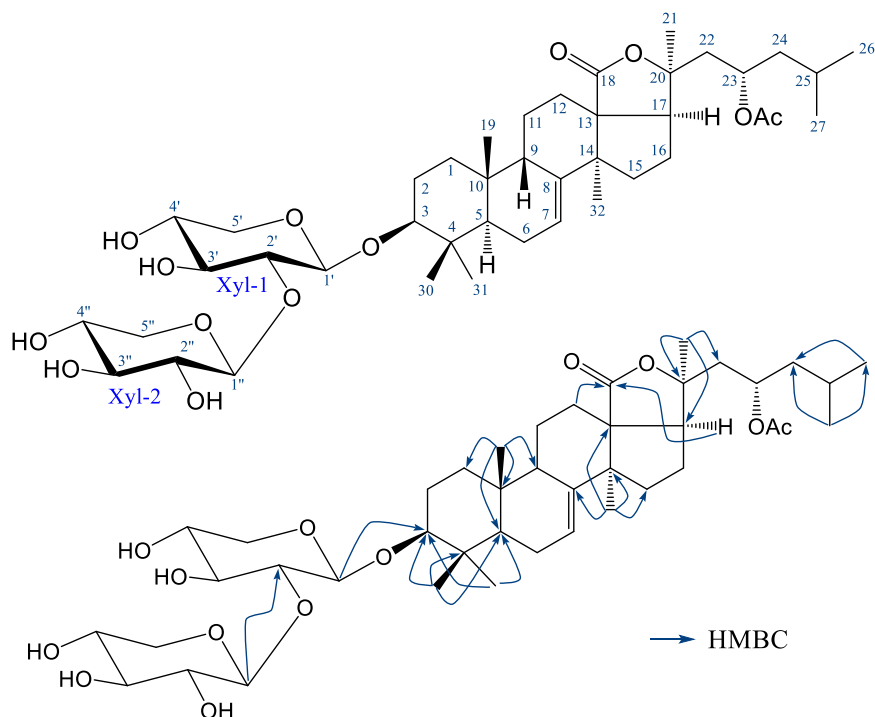
<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của *stichoposide B* [120], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Hợp chất **SH6** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR của **SH6** (Hình S5-S9 trong phần Phụ lục) gợi ý đây cũng là một dẫn xuất triterpene diglycoside với sự xuất hiện tín hiệu của hai anome [ $\delta_{C/H}$  105,2 (C-1')/4,72 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1') và  $\delta_{C/H}$  104,6 (C-1'')/5,29 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1'')]. Phân tích sâu hơn về phổ 1D và 2D NMR của **SH6** cho phép xác định gốc monosaccharide liên kết trong cấu trúc là xylose và glucose. Ngoài ra, các tín hiệu của mỗi đơn vị monosaccharide được suy ra từ một hệ spin độc lập trên phổ  $^1H$ - $^1H$  COSY (Hình S9 trong phần Phụ lục). Những tín hiệu này cho thấy đặc trưng của chuỗi disaccharide liên kết với cấu hình  $\beta$ -glycosidic. Các vị trí của các liên kết của các gốc đường dựa trên các tương tác HMBC của **SH6** (Hình 45). Các phổ NMR cũng tương tự như các phổ của **SH3** ngoại trừ sự xuất hiện các tín hiệu của một nhóm methine và hai nhóm *sec*-methyl thay cho một liên kết đôi bị thế hai vị trí nằm ở đầu mạch nhánh và một nhóm *tert*-methyl.

Xem xét cấu trúc hóa học của **SH3** cho phép dự đoán vị trí của một nhóm methine tại C-25 và hai nhóm *tert*-methyl tại C-26/C-27. Nhận định này được khẳng định thêm bởi sự phù hợp về số liệu phổ  $^1D$  NMR của **SH6** với các số liệu đã công bố của stichoposide B [120]. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D COSY và HMBC cho phép xác định **SH6** (Hình 45) chính là stichoposide B [120, 126].

#### 4.1.7. Hợp chất **SH7**: *3 $\beta$ -O-[[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene*

Hợp chất **SH7** được tìm thấy dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR (Hình S10-S13 trong phần Phụ lục) xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của 42 carbon. Trong đó phần aglycone các tín hiệu quan sát được bao gồm bảy nhóm methyl [ $\delta_{H/C}$  1,16 (3H, s, H-19)/23,9 (C-19), 1,48 (3H, s, H-21)/26,7 (C-21), 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26)/22,0 (C-26), 0,85 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27)/23,0 (C-27), 1,10 (3H, s, H-30)/16,8 (C-30), 1,25 (3H, s, H-31)/28,4 (C-31) và 1,05 (3H, s, H-32)/30,8 (C-32)], một nhóm carbonyl lactone [ $\delta_C$  179,9 (C-18)] và một doublet-doublet của một nhóm oxymethine [ $\delta_{H/C}$  3,30 (1H,  $J = 4,0, 11,5$  Hz, H-3)/89,1 (C-3)]. Những gợi ý trên cho thấy hợp chất **SH7** có cấu trúc phần aglycone là một holostane triterpenoid, dạng cấu trúc điển hình trước đó được báo cáo trong các loài hải sâm. Chi tiết gán các tín hiệu NMR liên quan với gốc aglycone (Bảng 13) dựa trên các phổ thực nghiệm COSY, HMQC và HMBC.



Hình 46. Cấu trúc hóa học của **SH7** và các tương tác HMBC chính.

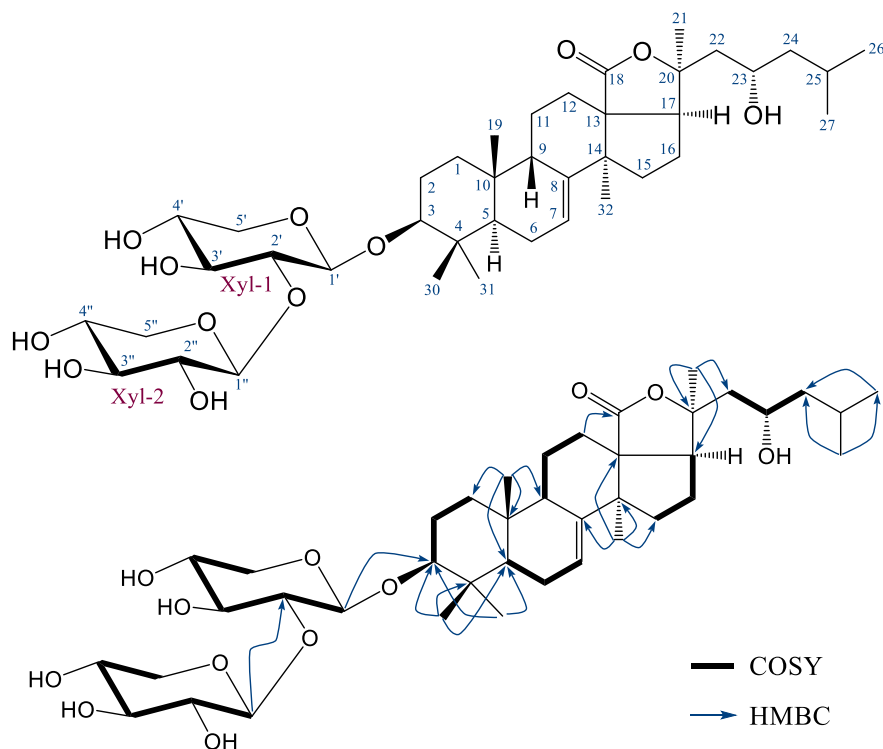
Phân tích các dữ liệu trên phổ NMR cho thấy hợp chất **SH7** (Hình 46) có cấu trúc gần giống với stichorrenoside D (**SH4**). Điểm khác nhau giữa hai hợp chất này có liên quan đến phần mạch nhánh của phần aglycone của một cấu trúc triterpene diglycoside, trong đó có sự hydro hóa ở liên kết đôi (C-25/C-26) ở **SH7** [ $\delta_{H/C}$  1,53 (1H, m, H-25/24,4 (C-25) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26)/22,0 (C-26)] so với **SH4** [ $\delta_{H/C}$  4,79 (1H, br s, H-26a) và 4,81 (1H, br s, H-26b)/114,1 (C-26) và 141,5 (C-25)]. Các vị trí thay đổi này của **SH7** một lần nữa được xác nhận trên các tương tác 2D HMBC giữa  $\delta_H$  0,91 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz, H<sub>3</sub>-26) và 0,85 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz, H<sub>3</sub>-27) với  $\delta_C$  43,8 (C-24), 24,4 (C-25), 22,0 (C-26) và 23,0 (C-27) (Hình S13 trong phần Phụ lục). So sánh số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của **SH7** với các số liệu đã được công bố kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC cho phép xác định hợp chất này chính là  $3\beta$ -O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23*S*-acetoxyholost-7-ene [120, 125]. Hợp chất **SH7** đã được thu nhận dưới dạng một progenin từ quá trình phân cắt stichoposide E [120, 125]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ thiên nhiên.

Bảng 13. Số liệu phổ NMR của **SH7** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_C$ [125]	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,1	36,2	1,42 m	
2	27,4	27,1	1,90 m/2,14 m	
3	89,7	89,1	3,30 dd (4,0, 11,5)	
4	39,8	39,4	-	
5	48,3	47,9	1,00 dd (6,5, 9,5)	
6	22,9	23,2	1,98 m	
7	120,0	119,9	5,64 d (3,5)	
8	146,5	146,5	-	
9	47,6	47,3	3,39 br d (14,0)	
10	35,8	35,4	-	
11	23,0	22,8	1,45 m/1,70 m	
12	30,5	30,1	1,88 m	18
13	58,6	58,4	-	
14	51,4	51,1	-	
15	34,4	34,1	1,58 m/1,75 m	
16	24,9	24,6	1,85 m/2,04 m	
17	54,4	54,0	2,32 dd (4,0, 10,5)	18
18	179,4	179,9	-	
19	24,2	23,9	1,16 s	1, 5, 9, 10
20	83,1	83,3	-	
21	27,1	26,7	1,48 s	17, 20, 22
22	44,2	45,1	1,24 m/1,53 m	
23	68,2	68,2	5,39 m	
24	43,5	43,8	1,84 m/2,12 m	
25	24,7	24,4	1,53 m	
26	22,3	22,0	0,91 d (6,5)	24, 25, 27
27	23,2	23,0	0,85 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,2	16,8	1,10 s	3, 4, 5, 31
31	28,7	28,4	1,25 s	3, 4, 5, 30
32	31,1	30,8	1,05 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O	170,5	170,9	-	
CH <sub>3</sub>	21,2	21,2	2,14 s	C=O
<i>Xyl-1</i>				
1'	107,1	105,3	4,77 d (7,5)	3
2'	84,4	83,2	4,04 dd (7,5, 9,0)	
3'	78,2	77,7	4,18 t (9,0)	
4'	71,0	70,5	4,14 m	
5'	66,9	66,4	3,66 dd (10,5, 11,0) 4,29 dd (5,0, 11,0)	
<i>Xyl-2</i>				
1''	105,7	106,5	5,14 d (8,0)	2'
2''	76,7	76,1	4,02 dd (8,0, 9,0)	
3''	78,2	77,7	4,11 t (9,0)	
4''	71,2	70,7	4,17 m	
5''	67,6	67,1	3,62 dd (10,5, 11,0) 4,32 dd (5,0, 11,0)	

$^a\delta_C$  của 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene [125],  $^c\delta_C$  đo trong dung môi pyridine- $d_5$ ,  $^d125$  MHz và  $^e500$  MHz.

**4.1.8. Hợp chất SH8: 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene**



Hình 47. Cấu trúc hóa học của **SH8** và các tương tác COSY và HMBC chính.

Hợp chất **SH8** (Hình 47) cũng được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR (Hình S14-S19 trong phần Phụ lục) xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của 41 carbon. Các số liệu phổ 1D NMR của **SH8** gần như trùng khớp với các số liệu NMR tương ứng của **SH7**, ngoại trừ có sự mất đi các tín hiệu của một nhóm thế acetyl tại C-23 [ $\delta_C$  68,2 (C-23)/ $\delta_H$  5,39 (1H, m, H-23),  $\delta_C$  170,9 (OAc) và  $\delta_C$  21,2/ $\delta_H$  2,14 (3H, s, OAc)] thay vào đó là một nhóm hydroxy [ $\delta_C$  65,2/ $\delta_H$  3,96 (1H, m)], điều này phù hợp với những quan sát được trên phổ  $^{13}C$  NMR khi chỉ thấy xuất hiện của 41 carbon. Những gợi ý này phù hợp với các tín hiệu tương ứng quan sát được trên phổ 2D HSQC (Bảng 14). Hơn nữa, xác nhận đầy đủ sự xuất hiện của một nhóm hydroxy tại C-23 bởi các tương tác chính trên phổ 2D HMBC được tóm tắt trong Hình 47.

Sự tương quan số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của **SH8** với các số liệu phổ NMR tương ứng của stichloroside F [75] và 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene [120], kết hợp với phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY chứng minh **SH8** chính là 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene [120].



Bảng 14. Số liệu phổ NMR của **SH8** và hợp chất tham khảo.

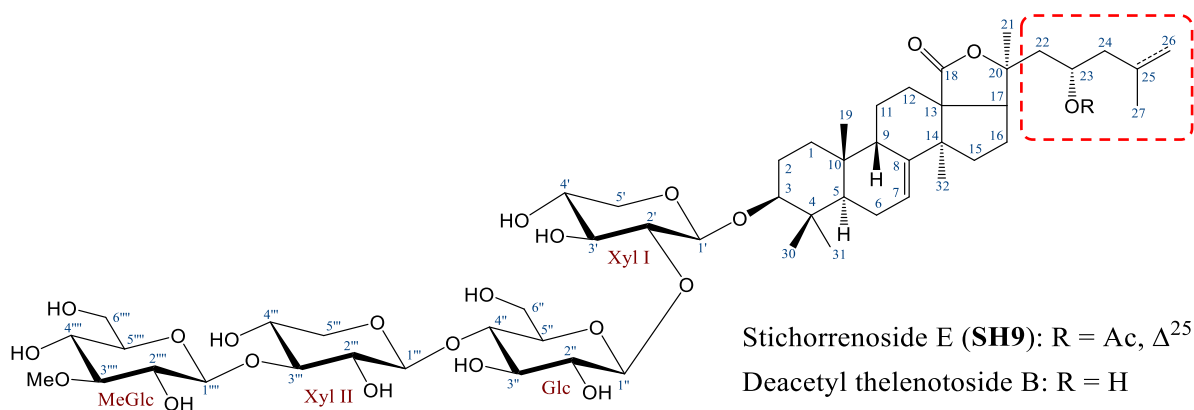
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [75]	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,3		36,2	1,42 m	
2	27,2		27,1	1,89 m/2,12 m	
3	89,1		89,1	3,30 dd (3,0, 11,5)	
4	39,5		39,4	-	
5	48,1		48,0	1,00 t (7,5)	
6	23,3		23,2	1,98 m	
7	119,9		119,8	5,66 br s	
8	146,9		146,6	-	
9	47,5		47,3	3,45 br d (13,5)	
10	36,6		35,4	-	
11	23,0		22,8	1,47 m/1,73 m	
12	30,5		30,3	1,92 m/2,01 m	18
13	58,6		58,6	-	
14	51,4		51,2	-	
15	34,3		34,2	1,62 m/1,76 m	
16	25,2		25,0	1,85 m/2,04 m	
17	53,7		53,5	2,44 dd (4,0, 10,0)	
18	180,2		180,3	-	
19	24,6		23,9	1,16 s	1, 5, 9, 10
20	84,9		85,0	-	
21	28,1		27,9	1,79 s	17, 20, 22
22	47,6		47,2	1,94 m/2,11 m	
23	65,4		65,2	3,96 m	
24	49,2		48,9	1,24 m/1,65 m	
25	24,0		24,4	1,97 m	
26	23,8		21,9	0,95 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,1		23,5	0,90 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,6		16,8	1,10 s	3, 4, 5, 31
31	28,9		28,4	1,26 s	3, 4, 5, 30
32	31,0		30,8	1,08 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl-1</i>					
1'		105,7	105,3	4,73 d (7,5)	3
2'		84,0	83,4	4,04 dd (7,5, 9,0)	
3'		78,2	77,7	4,17 t (9,0)	
4'		71,0	70,5	4,13 m	
5'		66,9	66,4	3,65 dd (10,5, 11,0) 4,27 dd (5,0, 11,0)	
<i>Xyl-2</i>					
1''		107,1	106,5	5,14 d (7,5)	2'
2''		76,7	76,1	4,02 dd (7,5, 9,0)	
3''		78,2	77,7	4,11 t (9,0)	
4''		71,2	70,7	4,15 m	
5''		67,6	67,1	3,62 dd (10,5, 11,0) 4,30 dd (5,0, 11,0)	

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của phần aglycone của stichloroside F [75], <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> của phần chuỗi đường của 3β-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl]-23S-hydroxyholost-7-ene [120], <sup>c</sup>đo trong pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz.

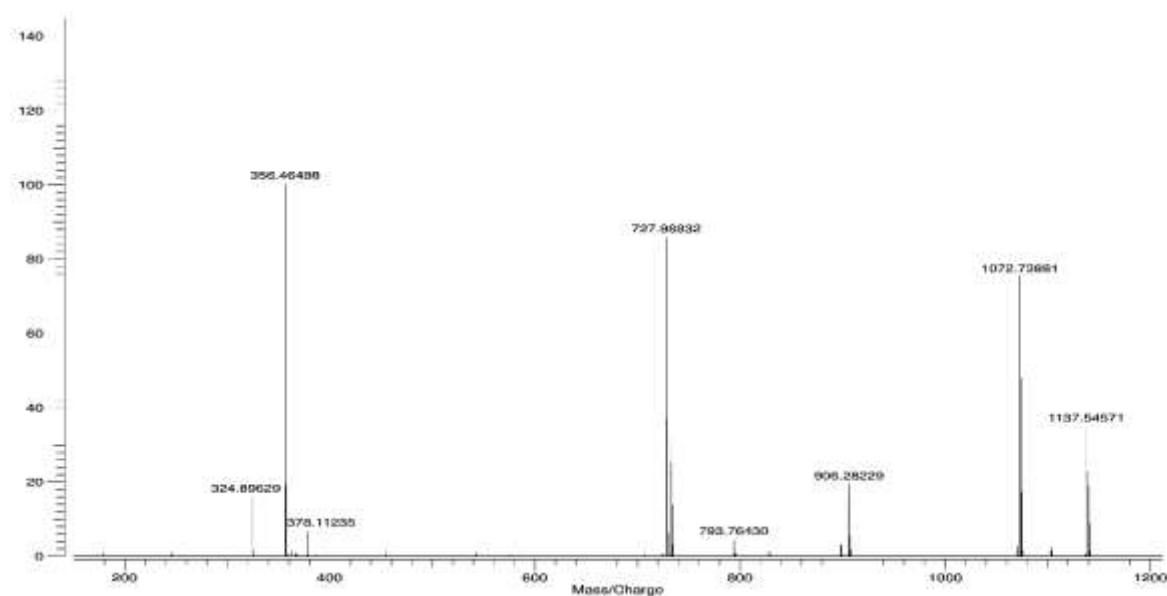
Hợp chất **SH8** đã được thu nhận dưới dạng một progenin trong quá trình phân cắt của stichoposide E [120, 125]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên **SH8** được báo cáo từ thiên nhiên.

#### 4.1.9. Hợp chất **SH9**: *Stichorrenoside E* (hợp chất mới)

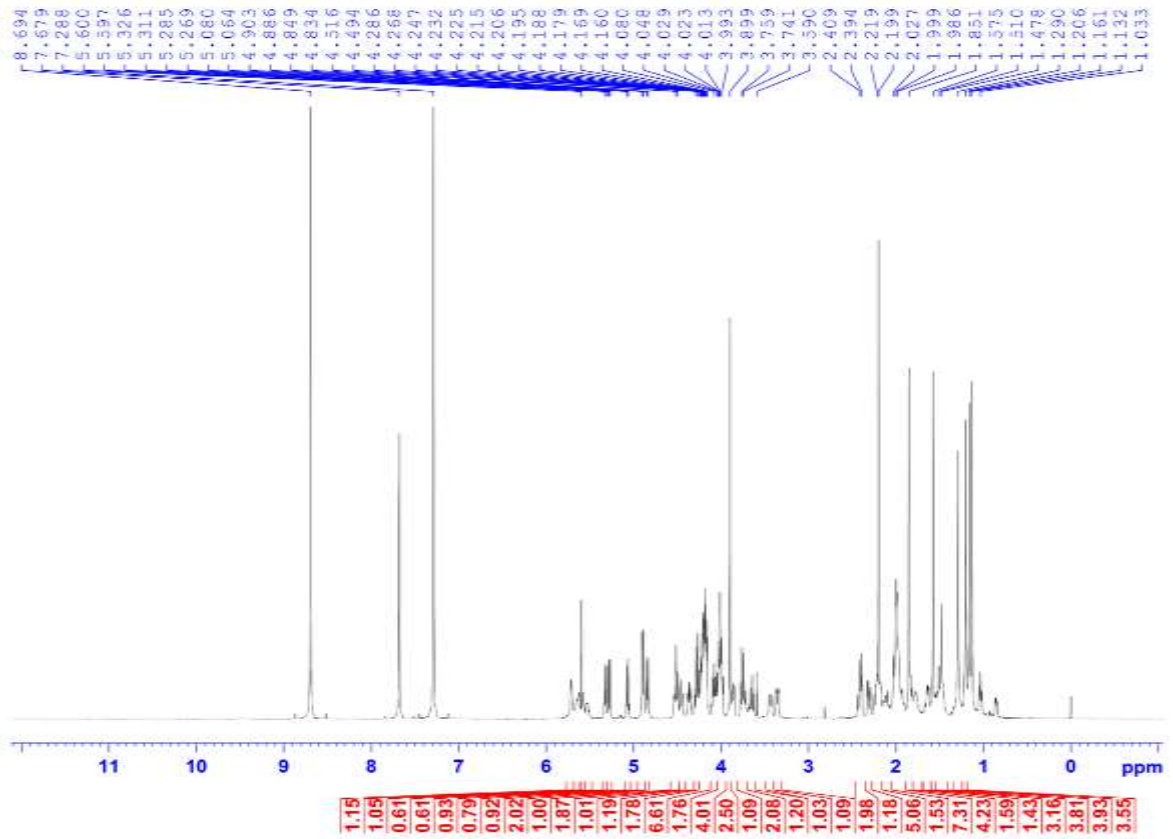
Hợp chất **SH9** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng với CTPT  $C_{55}H_{86}O_{23}$  được xác định bởi phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS (Hình 49) peak ion giả phân tử tại  $m/z$  1137,54571  $[M + Na]^+$  (tính toán lý thuyết cho ion  $[C_{55}H_{86}NaO_{23}]^+$ , 1137,54525). Khác biệt với các hợp chất từ **SH1** đến **SH8**, các phổ 1D và 2D NMR của **SH9** đặc trưng cho một triterpene tetraglycoside với các tín hiệu của bốn carbon anome  $[\delta_C$  105,2 (C-1'), 104,8 (C-1''), 104,3 (C-1''') và 104,6 (C-1''')], có tương tác HSQC tương ứng với bốn proton anome tương ứng  $[\delta_H$  4,84 (H-1'), 5,32 (H-1''), 5,07 (H-1''') và 5,28 (H-1''')], mỗi tín hiệu 1H, d,  $J = 7,5$  hoặc 8,0 Hz. Những tín hiệu thể hiện chuỗi tetrasaccharide và cấu hình liên kết  $\beta$ -glycosidic.



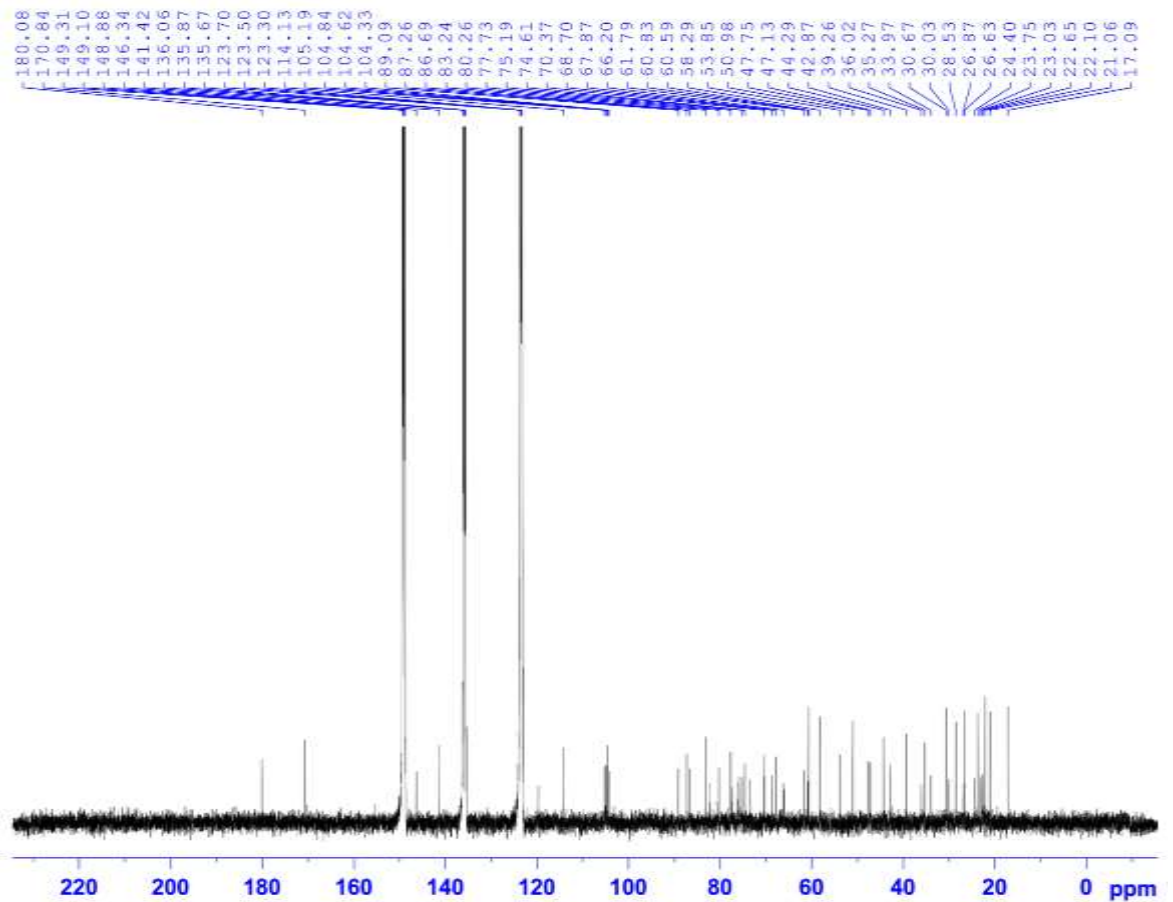
Hình 48. Cấu trúc hóa học của **SH9** và deacetyl thelenotoside B.



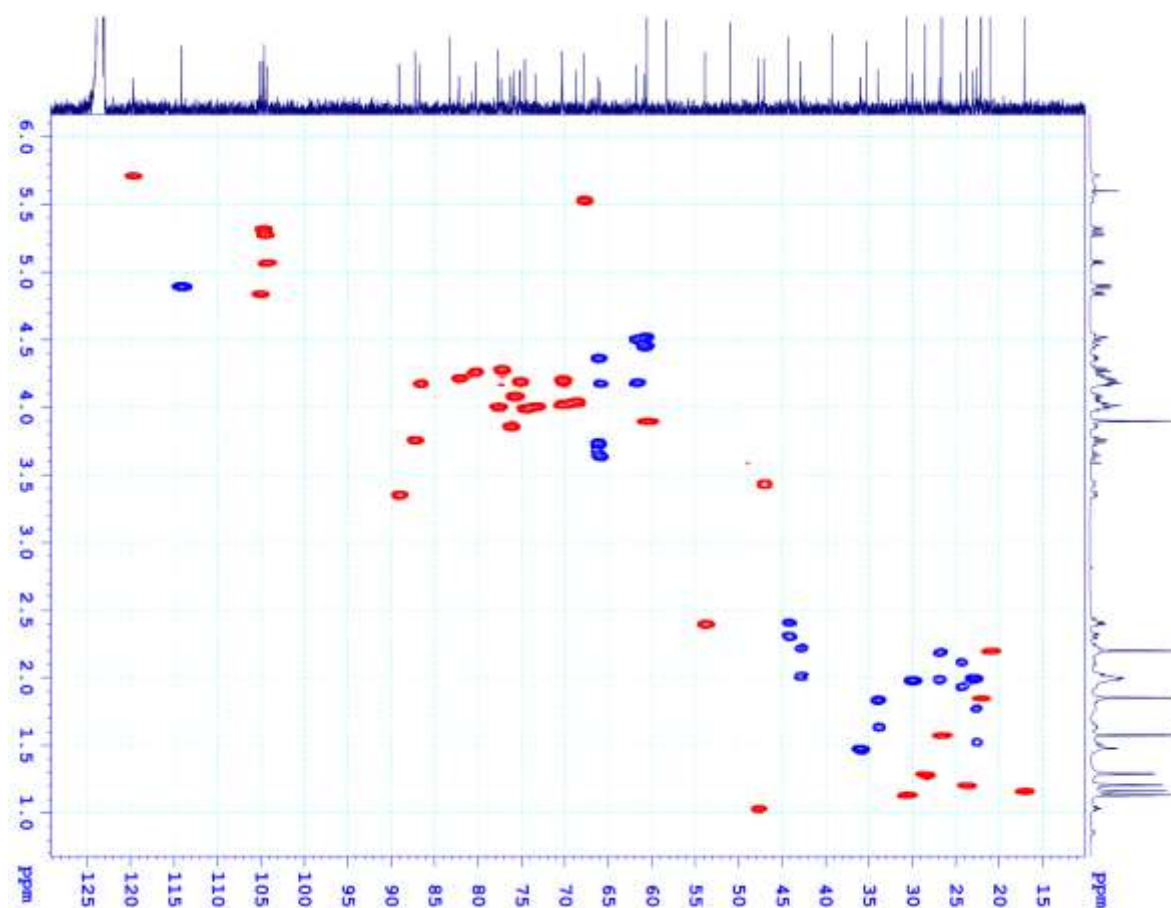
Hình 49. Phổ HR-ESI-MS của **SH9**.



Hình 50. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH9.

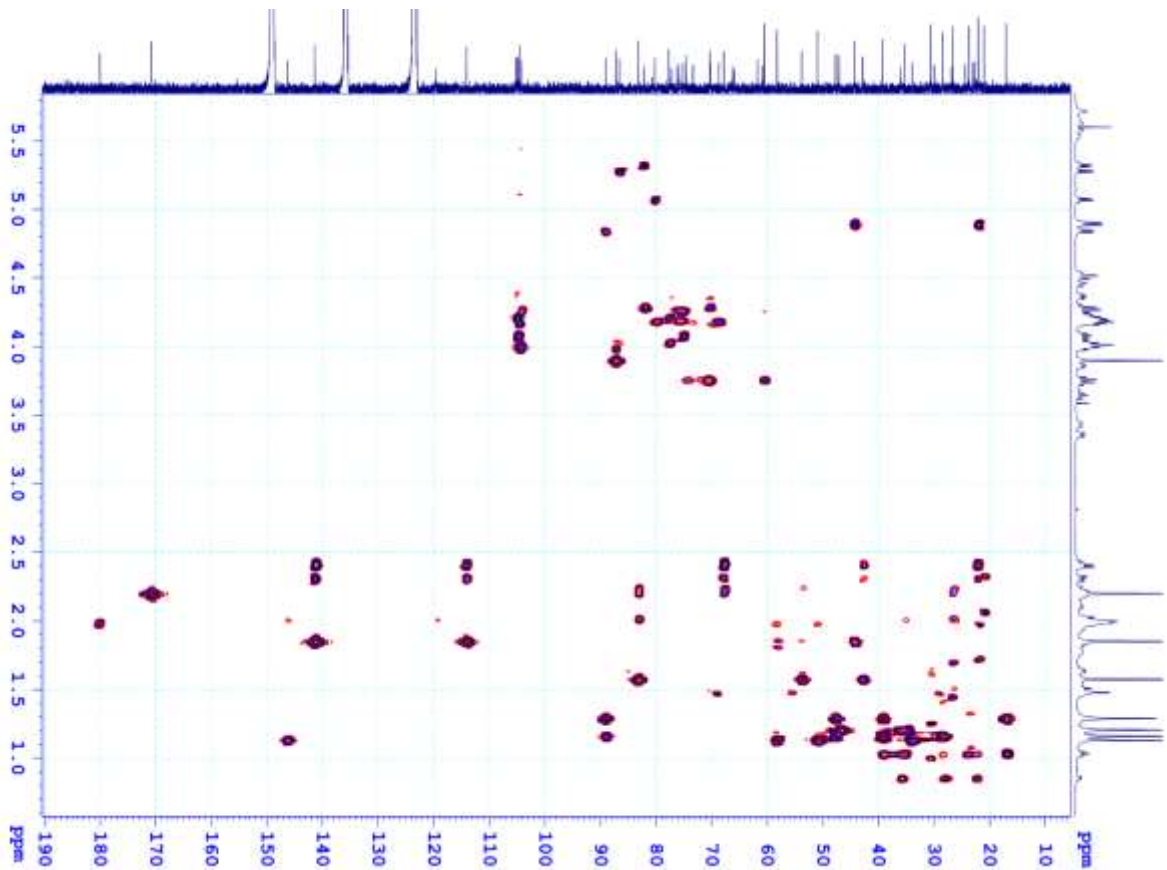


Hình 51. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH9.



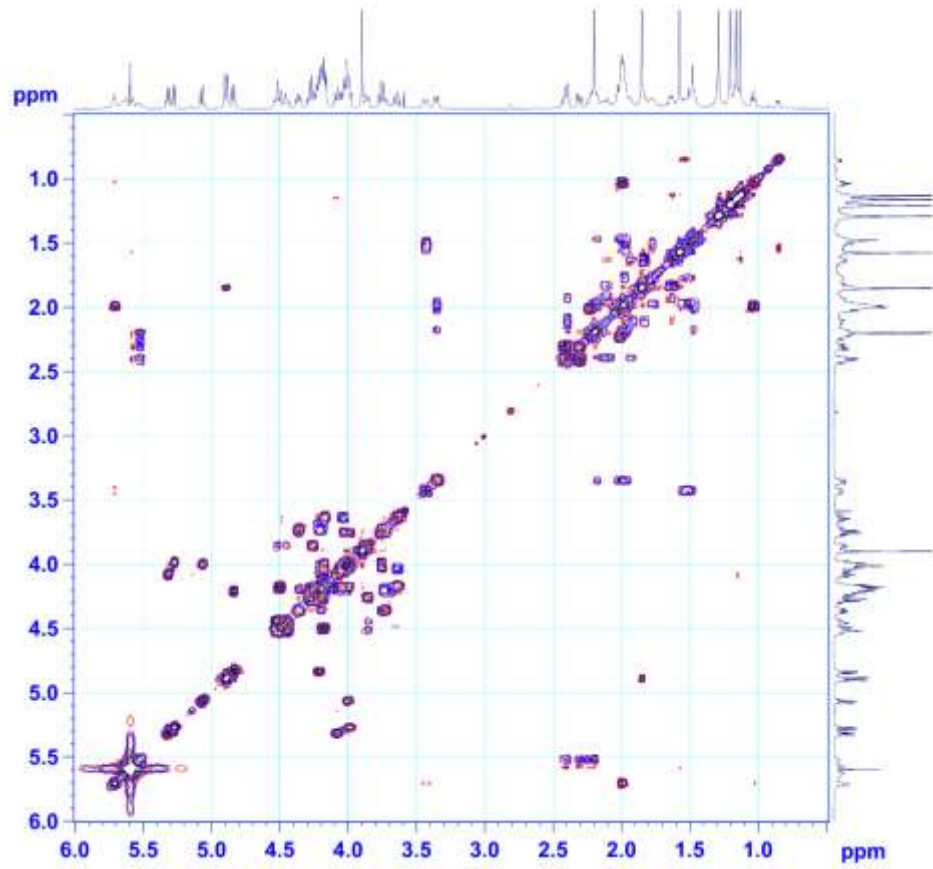
Hình 52. Phổ HSQC của **SH9**.

Các dữ liệu trên các phổ 1D và 2D NMR của **SH9** chỉ ra rằng holostane triterpene tetraglycoside cũng là khung cấu trúc của hợp chất này. Các tín hiệu NMR liên quan đến phần aglycone được phân tích dựa trên các phổ thực nghiệm 2D HSQC, HMBC, COSY và TOCSY (Hình 53-56). Bên cạnh đó, những dữ liệu NMR quan sát thấy trên phần aglycone giống với của stichoposide C [120], ngoại trừ các tín hiệu có sự thay đổi liên quan đến chuỗi tetraglycoside (Bảng 15). Tuy nhiên, khi kiểm tra chi tiết các tín hiệu cộng hưởng NMR của chuỗi tetraglycoside trong **SH9** một lần nữa xác nhận được các tín hiệu của chuỗi đường này tương tự như chuỗi đường của deacetyl thelenotoside B [120] đã được công bố trước đó. Gần đây các nghiên cứu cũng khẳng định rằng phần lớn các triterpene glycoside từ các loài hải sâm gốc monosaccharide đầu tiên là xylose liên kết ở C-3 (phần aglycone), quinovose là gốc monosaccharide thứ hai và glucose (hoặc xylose) như gốc monosaccharide thứ ba trong chuỗi đường chính. Các gốc monosaccharide bị methyl hóa luôn luôn là gốc liên kết đầu cuối. Xem xét các chuỗi oligosaccharide của các triterpene glycoside được phân lập trước đó từ hải sâm này có mối liên quan chặt chẽ với nhau và có cấu

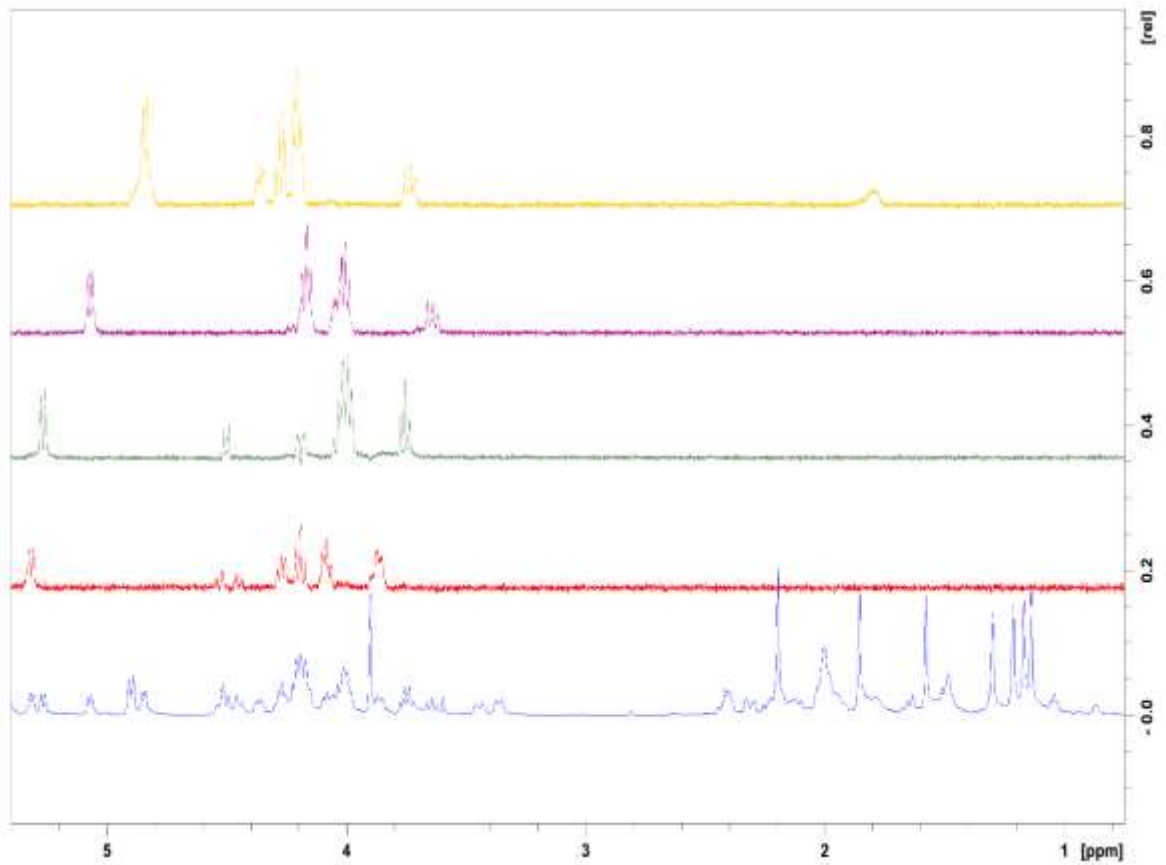


Hình 53. Phổ HMBC của **SH9**.

trúc liên kết chung của chuỗi oligosaccharide như 3-*O*-methyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl. Một số gợi ý liên quan đến cấu trúc của chuỗi oligosaccharide cũng có thể có  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2) bên phần phân nhánh liên quan đến monosaccharide thứ hai. Sự thay đổi các trình tự liên kết hoặc thêm các monosaccharide của chuỗi oligosaccharide phân nhánh ở monosaccharide thứ hai dẫn đến sự hình thành các dẫn xuất glycoside có các chuỗi oligosaccharide khác nhau. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY cùng với 1D và 2D TOCSY (Hình 55-56) cho phép gán chính xác toàn bộ số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của tất cả bốn gốc đường (Bảng 15). Các số liệu phổ này tương tự như các số liệu tương ứng của deacetyl thelenoside B [120], cho phép xác định chuỗi bốn gốc đường của **SH9** là 3-*O*-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranoside. Trong đó trình tự liên kết của các gốc đường được chứng minh bằng các tương tác HMBC (Hình 58) của H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  5,28) với C-3''' ( $\delta_{\text{C}}$  86,7), H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  5,07) với C-4''' ( $\delta_{\text{C}}$  80,3) và H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,32) với C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  82,2). Ngoài ra, so sánh các số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR phần aglycone của **SH9** với các số liệu phổ

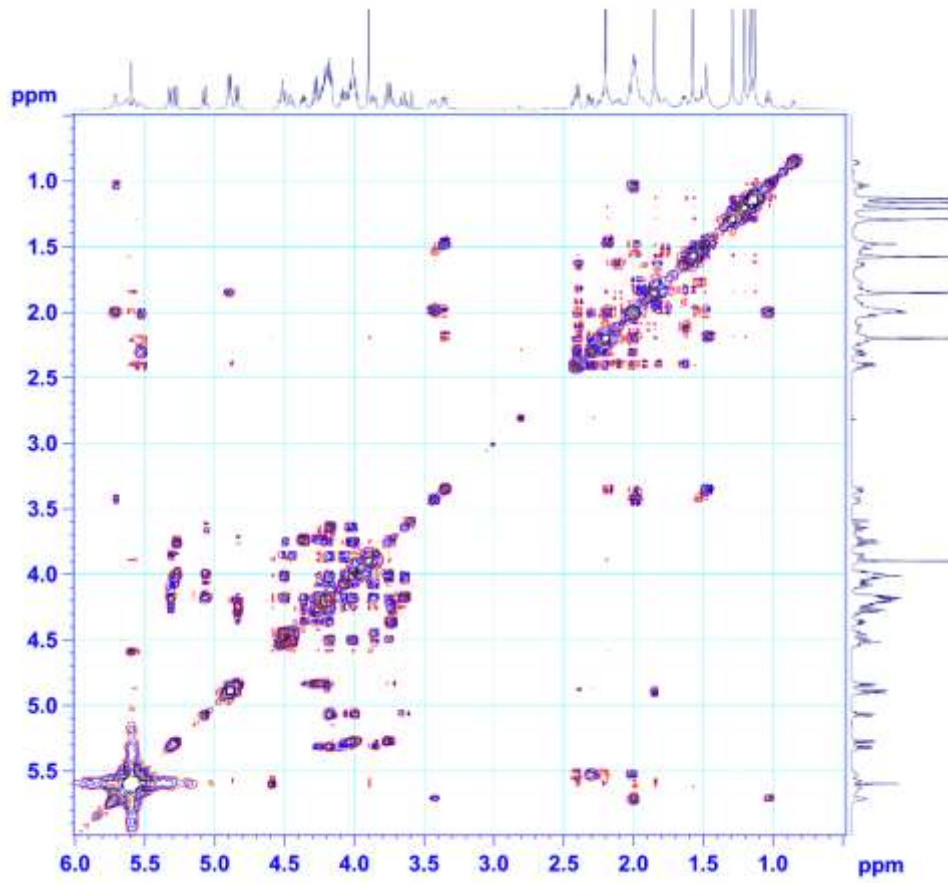


Hình 54. Phổ COSY của SH9.

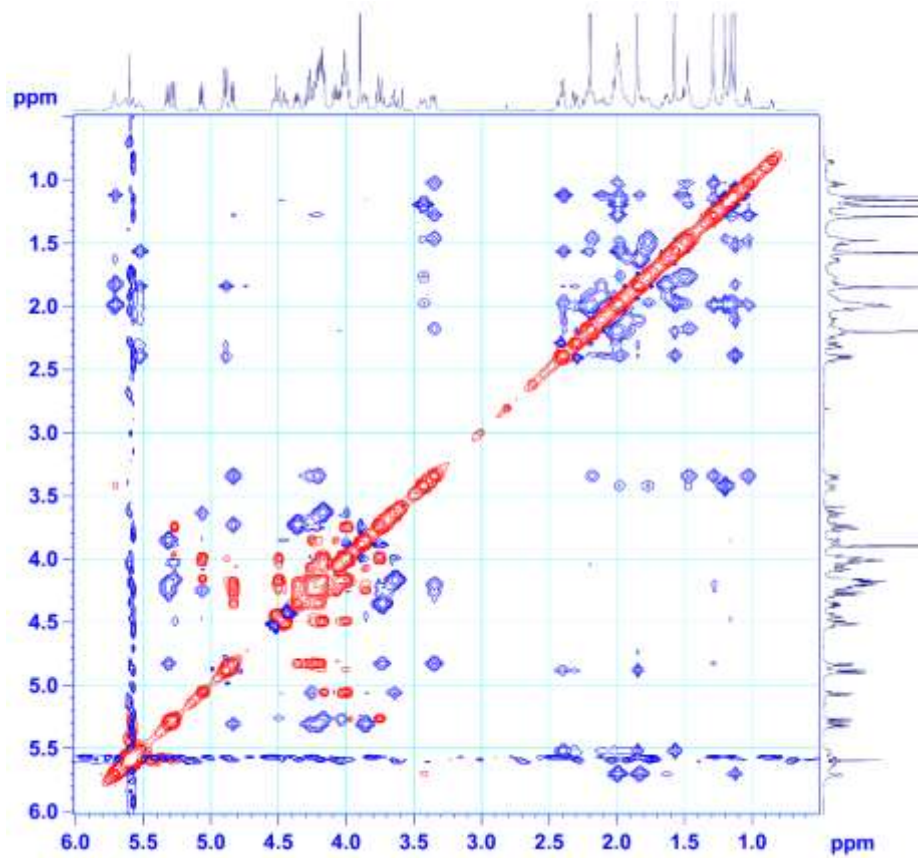


Hình 55. Phổ 1D TOCSY của SH9.



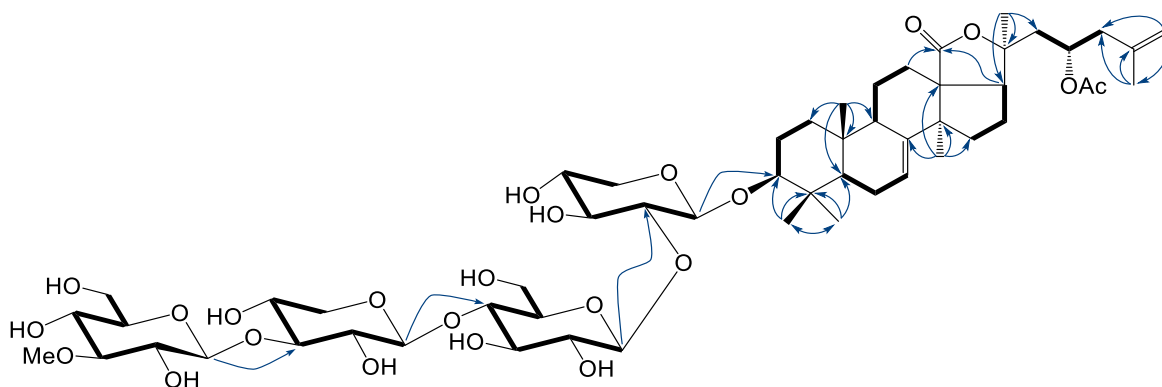


Hình 56. Phổ 2D TOCSY của SH9.



Hình 57. Phổ ROESY của SH9.

tương ứng của stichoposide C [120], kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY cho phép chứng minh cấu trúc hóa học của hợp chất này là 3-*O*-[3-*O*-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23*S*-acetoxy- holost-7,25-diene. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là stichorrenoside E.



Hình 58. Các tương tác COSY (—) và HMBC (↗) chính của **SH9**.

Bảng 15. Số liệu phổ NMR của **SH9** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [120]	<sup>b</sup> $\delta_C$ [120]	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,4	36,4	36,0	1,46 m	
2	27,1	27,2	26,8	1,98 m/2,18 m	
3	89,2	89,2	89,1	3,35 dd (3,5, 11,5)	
4	39,6	39,6	39,3	-	
5	48,4	48,6	47,7	1,03 t (8,0)	
6	23,5	23,5	23,0	1,99 m	
7	120,0	120,0	119,8	5,71 br s	
8	146,8	146,9	146,3	-	
9	47,3	47,6	47,1	3,43 br d (14,0)	
10	35,7	35,8	35,3	-	
11	23,0	23,1	22,6	1,53 m/1,76 m	
12	30,6	31,0	30,0	1,97 m	18
13	58,7	58,8	58,3	-	
14	51,4	51,5	50,9	-	
15	34,5	34,5	33,9	1,64 m/1,84 m	
16	24,8	25,3	24,4	1,94 m/2,12 m	
17	54,5	54,1	53,9	2,40 m	
18	179,7	180,0	180,0	-	
19	24,0	24,0	23,7	1,21 s	1, 5, 9, 10
20	83,2	84,7	83,2	-	
21	27,0	28,0	26,6	1,57 s	17, 20, 22
22	43,3	47,6	42,9	2,01 m/2,22 m	
23	68,3	65,8	67,8	5,53 m	
24	44,6	49,3	44,3	2,31 dd (5,0, 12,0)/2,41 m	
25	141,6	24,8	141,4	-	
26	114,3	23,8	114,1	4,88 br s/4,90 br s	24, 25, 27

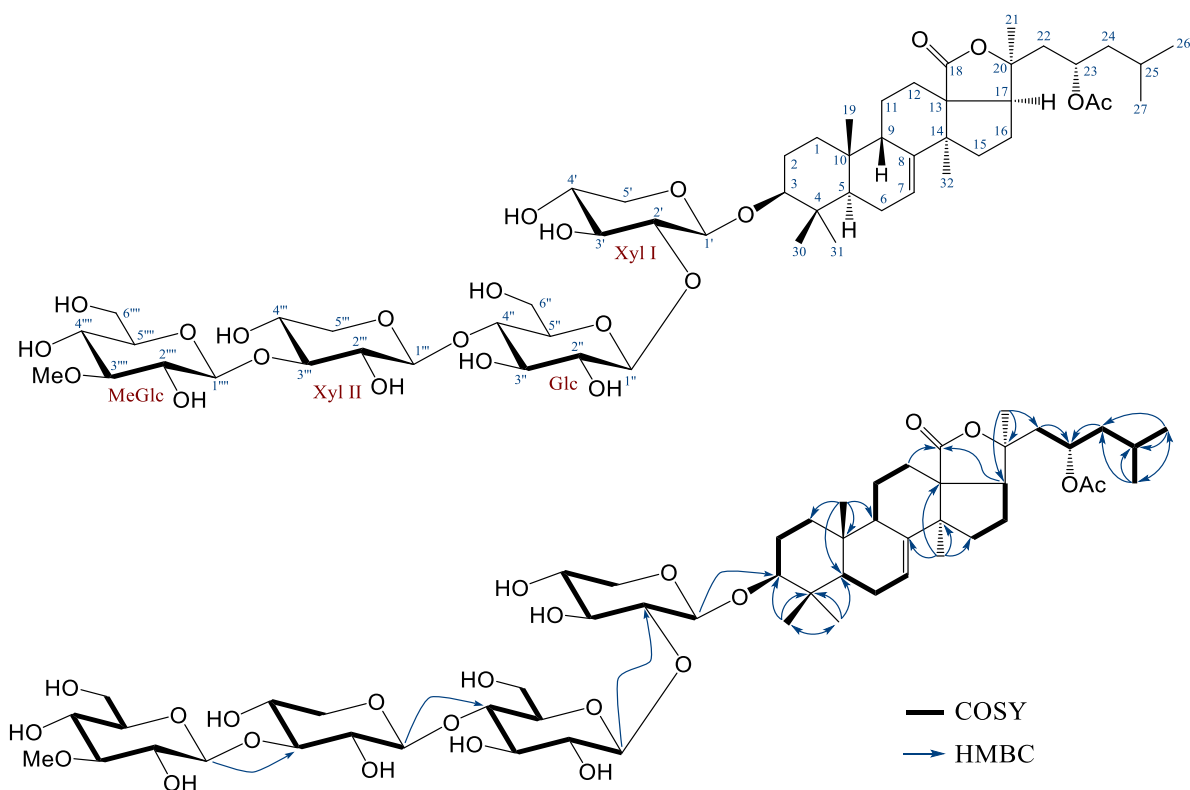


Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [120]	<sup>b</sup> $\delta_C$ [120]	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
27	22,3	22,3	22,1	1,85 s	24, 25, 26
30	17,4	17,1	17,1	1,16 s	3, 4, 5, 31
31	28,9	28,7	28,5	1,29 m	3, 4, 5, 30
32	30,9	31,0	30,7	1,13 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>					
C=O	170,1		170,8	-	
Me	21,1		21,1	2,20 s	C=O
<hr/>					
<i>Xyl I</i>					
1'		105,4	105,2	4,84 d (7,5)	3
2'		83,5	82,2	4,21*	
3'		77,7	77,3	4,28 t (9,0)	
4'		70,9	70,3	4,20*	
5'		66,4	66,2	3,73 t (11,0)	
				4,37 dd (5,0, 11,0)	
<hr/>					
<i>Glc</i>					
1''		105,5	104,8	5,32 d (7,5)	1'
2''		76,4	75,9	4,08 dd (7,5, 9,0)	
3''		75,8	75,2	4,18 t (9,0)	
4''		80,9	80,3	4,26 t (9,0)	
5''		76,4	76,3	3,86 m	
6''		61,6	60,8	4,45 dd (2,0, 12,0)	
				4,52 dd (3,0, 12,0)	
<hr/>					
<i>Xyl II</i>					
1'''		104,7	104,3	5,07 d (8,0)	4''
2'''		73,4	73,4	4,00 dd (8,0, 9,0)	
3'''		87,8	86,7	4,17*	
4'''		69,1	68,7	4,04 m	
5'''		66,5	66,0	3,64 t (11,0)/4,17*	
<hr/>					
<i>OMe-Glc</i>					
1''''		105,1	104,6	5,28 d (8,0)	3'''
2''''		75,0	74,6	3,99*	
3''''		87,8	87,3	3,76 t (9,0)	
4''''		70,9	70,4	4,01*	
5''''		78,1	77,7	4,00*	
6''''		62,4	61,8	4,18 dd (3,0, 12,0)	
				4,50 br d (12,0)	
3''''-OMe		60,6	60,6	3,90 s	3'''

<sup>a</sup> $\delta_C$  của phần aglycone của stichoposide C [120], <sup>b</sup> $\delta_C$  của deacetyl thelenoside B [120], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.1.10. Hợp chất SH10: Thelenoside B

Hợp chất **SH10** (Hình 59) được làm sạch dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR của **SH10** xuất hiện tín hiệu thuộc chuỗi oligosaccharide với bốn proton anome [ $\delta_H$  4,85 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1'), 5,33 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), 5,10 (1H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-1''') và 5,29 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''')], tương quan với nhau dựa trên phổ thực nghiệm HSQC với các carbon tương ứng [ $\delta_C$  105,5 (C-1'), 105,3 (C-1''), 104,7 (C-1''') và 105,0 (C-1''')]. Các hằng số tương tác lớn ( $J = 7-8$



Hình 59. Cấu trúc hóa học của **SH10** và các tương tác COSY, HMBC chính.

H<sub>z</sub>) của mỗi proton anome được xác định cấu hình  $\beta$ -glycosidic. Ngoài ra, chuỗi oligosaccharide được xác định là một tetraglycoside bởi thực nghiệm quan sát trên phổ COSY và HSQC cho phép xác định tuần tự tương quan các tín hiệu tương ứng của mỗi gốc đường. Bốn gốc đường dạng pyranose và các vị trí liên kết bởi có sự thay đổi độ dịch chuyển hóa học [C-2' ( $\delta_C$  82,7, xyl1), C-4'' ( $\delta_C$  80,6, glc) và C-3''' ( $\delta_C$  87,1, xyl2)]. Điều này được khẳng định thêm dựa vào các tương tác HMBC cho phép xác định chính xác các vị trí liên kết các gốc đường (Hình S20-S25 trong phần Phụ lục). Những quan sát và thực nghiệm NMR cũng cho thấy chuỗi tetraglycoside của **SH10** tương đồng như chuỗi đường đã được chứng minh trong **SH9** và được công bố trước đó từ deacetyl thelenoside B (**SH11**) [120] (Bảng 16). Phần aglycone phổ biến của **SH10** thuộc khung holostane từ các tín hiệu trong phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của một nhóm 18(20)-lactone [ $\delta_C$  180,3 (C-18) và 83,5 (C-20)] và chứa liên kết  $\Delta^{7(8)}$  [ $\delta_C$  120,0 (C-7) và 146,7 (C-8)]. Bên cạnh đó, khi phân tích các số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của **SH10** cho thấy độ dịch chuyển hóa học tương tự như các số liệu của **SH9**, ngoại trừ sự xuất hiện các tín hiệu của một nhóm methine [ $\delta_{\text{H/C}}$  1,62 (1H, m, H-25)/24,6 (C-25)] và hai nhóm *sec*-methyl [ $\delta_{\text{H/C}}$  0,94 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26)/23,2 (C-26) và 0,99 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27)/22,2 (C-27)] thay cho một liên kết đôi bị thế hai vị trí nằm

Bảng 16. Số liệu phổ NMR của **SH10** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,4	36,4	36,4	1,50 m	
2	27,1	27,2	27,2	2,00 m/2,21 m	
3	89,3	89,2	89,3	3,37 dd (3,5, 12,0)	
4	39,6	39,6	39,6	-	
5	48,4	48,6	48,1	1,05 dd (7,5, 8,0)	
6	23,4	23,5	23,4	2,02 m	
7	120,0	120,0	120,0	5,72 m	
8	146,7	146,9	146,7	-	
9	47,6	47,6	47,5	3,46 br d (14,0)	
10	35,7	35,8	35,6	-	
11	23,0	23,1	22,9	1,72 m/1,97 m	
12	30,6	31,0	30,3	1,98 m	18
13	58,7	58,8	58,6	-	
14	51,4	51,5	51,3	-	
15	34,4	34,5	34,3	1,67 m/1,85 m	
16	25,0	25,3	24,8	1,85 m/2,15	
17	54,5	54,1	54,2	2,42 dd (4,0, 10,0)	
18	179,6	180,0	180,3	-	
19	24,0	24,0	24,1	1,23 s	1, 5, 9, 10
20	82,9	84,7	83,5	-	
21	27,1	28,0	26,9	1,58 s	17, 20, 22
22	44,3	47,6	44,0	1,93 m/2,22 m	
23	68,7	65,8	68,5	5,48 m	
24	45,5	49,3	45,3	1,34 m/1,62 m	
25	24,8	24,8	24,6	1,62 m	
26	23,1	23,8	23,2	0,94 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,3	22,3	22,2	0,99 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,4	17,1	17,4	1,17 s	3, 4, 5, 31
31	29,0	28,7	28,8	1,30 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	31,0	31,0	1,13 s	8, 13, 14, 15
C=O	170,6		171,3	-	
Me	21,3		21,4	2,23 s	C=O
<i>Xyl I</i>					
1'		105,4	105,5	4,85 d (8,0)	3
2'		83,5	82,7	4,23*	
3'		77,7	77,7	4,29 t (9,0)	
4'		70,9	70,7	4,22*	
5'		66,4	66,5	3,75 dd (10,0, 11,0) 4,38 dd (5,0, 11,0)	
<i>Glc</i>					
1''		105,5	105,3	5,33 d (8,0)	1'
2''		76,4	76,3	4,10 dd (8,0, 9,0)	

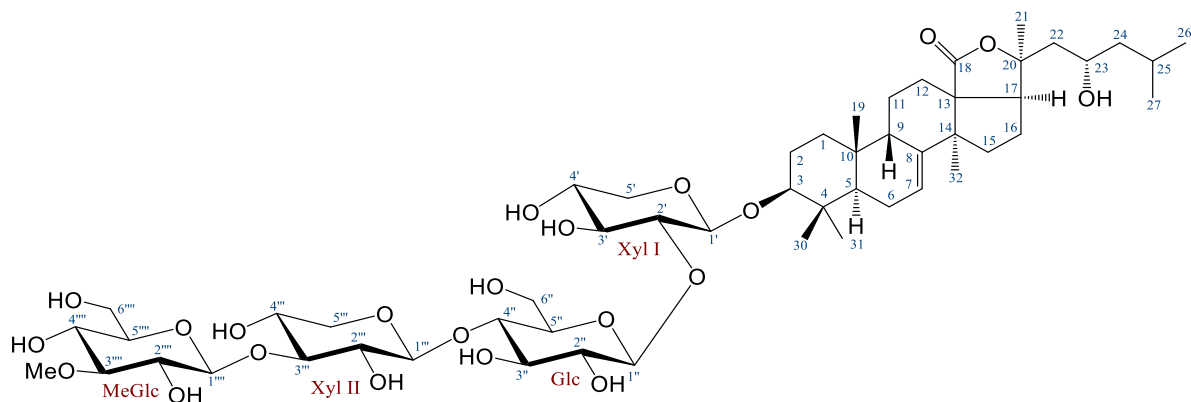
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
3"		75,8	75,5	4,20*	
4"		80,9	80,6	4,31 t (9,0)	
5"		76,4	76,6	3,87 m	
6"		61,6	61,1	4,46 dd (2,0, 12,0) 4,56 dd (3,5, 12,0)	
<i>Xyl II</i>					
1'''		104,7	104,7	5,10 d (7,0)	4"
2'''		73,4	73,7	4,02*	
3'''		87,8	87,1	4,18*	
4'''		69,1	69,0	4,06*	
5'''		66,5	66,4	3,64 dd (10,5 11,0) 4,18*	
<i>OMe-Glc</i>					
1''''		105,1	105,0	5,29 d (8,0)	3'''
2''''		75,0	74,9	4,00*	
3''''		87,8	87,7	3,77 t (9,0)	
4''''		70,9	70,7	4,06*	
5''''		78,1	78,1	4,01*	
6''''		62,4	62,1	4,20* 4,52 dd (2,0, 12,0)	
3''''-OMe		60,6	60,9	3,90 s	3'''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của phần aglycone của stichoposide D [120], <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> của deacetyl thelenoside B [120], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

ở phần đầu mạch nhánh [δ<sub>C</sub> 141,4 (C, C-25), δ<sub>H/C</sub> 4,88 (1H, br s, H-26a)/4,90 (1H, br s, (H-26b)/114,1 (C-26)] và một nhóm *tert*-methyl [δ<sub>H/C</sub> 1,85 (3H, s, H-27)/22,1 (C-27)]. So sánh số liệu phổ với các số liệu tương ứng của stichoposide D [120] và deacetyl thelenoside B [120], kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY chứng minh **SH10** chính là thelenoside B [127].

#### 4.1.11. Hợp chất **SH11**: Deacetyl thelenoside B

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, hợp chất **SH11** (Hình 60) được tìm thấy từ cặn CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> của loài hải sâm *Stichopus horrens* dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR của **SH11** cho thấy đây cũng là một holostane triterpene tetraglycoside. Phân tích dữ liệu phổ <sup>13</sup>C NMR phần aglycone của **SH11** (Hình S27) cho thấy sự hiện diện của một tín hiệu đặc trưng cho nhóm 18(20)-lactone [δ<sub>C</sub> 180,4 (C-18)]. Ngoài ra, độ chuyển dịch hóa học của carbon từ C-1 đến C-32 tương đối trùng khớp với các tín hiệu tương ứng trên phổ <sup>13</sup>C NMR của **SH10**, ngoại trừ sự mất đi các tín hiệu của một nhóm acetyl [δ<sub>C</sub> 171,3 (OAc) và δ<sub>C</sub> 21,4/δ<sub>H</sub> 2,23 (3H, s, OAc)].



Hình 60. Cấu trúc hóa học của **SH11**.

So sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **SH11** với các số liệu đã được công bố (Bảng 17) kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY (Hình S26-S31 trong phần Phụ lục) chứng minh **SH11** chính là deacetyl thelenoside B [120]. Hợp chất này đã được thu nhận là một proagenin trong quá trình phân cắt stichoposide D [120]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân tách từ thiên nhiên.

Bảng 17. Số liệu phổ NMR của **SH11** và hợp chất tham khảo.

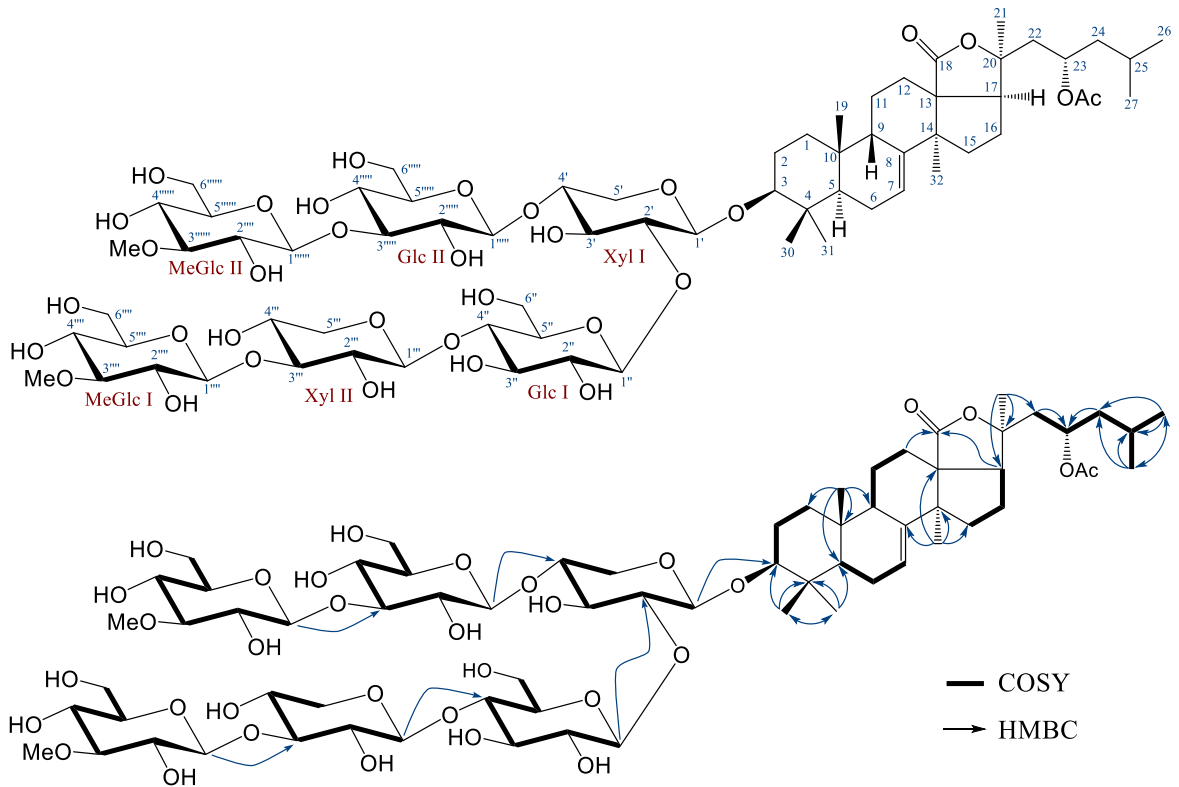
Vị trí	$^a\delta_{\text{C}}$ [120]	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,4	36,0	1,38 m	
2	27,2	26,9	1,88 m/2,08 m	
3	89,2	89,1	3,27 dd (3,5, 12,0)	
4	39,6	39,3	-	
5	48,6	47,8	0,95 m	
6	23,5	23,1	1,91 m	
7	120,0	119,7	5,65 m	
8	146,9	146,6	-	
9	47,6	47,2	3,41 br d (13,0)	
10	35,8	35,3	-	
11	23,1	22,7	1,44 m/1,70 m	
12	31,0	30,2	1,92 m/1,98 m	18
13	58,8	58,5	-	
14	51,5	51,1	-	
15	34,5	34,1	1,58 m/1,75 m	
16	25,3	24,9	1,83 m/2,02 m	
17	54,1	53,3	2,45 dd (4,0, 10,0)	
18	180,0	180,4	-	
19	24,0	23,8	1,13 s	1, 5, 9, 10
20	84,7	85,0	-	
21	28,0	27,8	1,78 s	17, 20, 22
22	47,6	47,1	1,92 m/2,10 m	
23	65,8	65,2	3,96 m	

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
24	49,3	48,8	1,22 m/1,64 m	
25	24,8	24,3	1,96 m	
26	23,8	21,9	0,93 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,3	23,5	0,89 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,1	17,1	1,07 s	3, 4, 5, 31
31	28,7	28,6	1,21 s	3, 4, 5, 30
32	31,0	30,7	1,07 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl I</i>				
1'	105,4	105,2	4,75 d (7,5)	3
2'	83,5	82,4	4,12*	
3'	77,7	77,4	4,18 t (9,0)	
4'	70,9	70,4	4,10*	
5'	66,4	66,2	3,64 dd (10,5, 11,0) 4,27 dd (5,0, 11,0)	
<i>Glc</i>				
1''	105,5	104,9	5,22 d (7,5)	1'
2''	76,4	75,9	3,99*	
3''	75,8	75,2	4,09*	
4''	80,9	80,3	4,17 t (9,0)	
5''	76,4	76,3	3,76 m	
6''	61,6	60,9	4,35 dd (2,0, 12,0) 4,45 dd (3,5, 12,0)	
<i>Xyl II</i>				
1'''	104,7	104,4	4,99 d (7,5)	4''
2'''	73,4	73,4	3,91*	
3'''	87,8	86,7	4,08*	
4'''	69,1	68,7	3,95*	
5'''	66,5	66,1	3,55 dd (10,5, 11,0) 4,08*	
<i>OMe-Glc</i>				
1''''	105,1	104,7	5,19 d (7,5)	3'''
2''''	75,0	74,7	3,90*	
3''''	87,8	87,3	3,66 t (9,0)	
4''''	70,9	70,4	3,93*	
5''''	78,1	77,8	3,91*	
6''''	62,4	61,8	4,09*/4,41 dd (2,0, 12,0)	
3''''-OMe	60,6	60,6	3,80 s	3'''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của deacetyl thelenoside B [120], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz.  
\*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.1.12. Hợp chất SH12: Stichloroside B<sub>1</sub>

Các phổ NMR của SH12 cũng đặc trưng cho một hợp chất triterpene saponin. Tuy nhiên, khác với các hợp chất SH1–SH11, chuỗi đường trong phân tử của SH12 có tới sáu gốc đường được minh chứng bằng sự xuất hiện các tín hiệu của sáu carbon anome [δ<sub>C</sub> 104,9 (C-1'), 104,6 (C-1''), 104,3 (C-1'''), 104,8 (C-1'''), 102,3 (C-1''') và



Hình 61. Cấu trúc hóa học của **SH12** và các tương tác COSY, HMBC chính.

104,6 (C-1'''''')) có tương tác HSQC với sáu proton anome tương ứng [ $\delta_{\text{H}}$  4,78 (H-1'), 5,29 (H-1''), 5,05 (H-1'''), 5,30 (H-1''''), 5,00 (H-1''''') và 5,27 (H-1''''''), mỗi tín hiệu 1H, d,  $J = 7,0$  hoặc  $8,0$  Hz]. Quan sát các phổ 1D và 2D NMR của **SH12** (Hình S32-S37 trong phần Phụ lục) cho thấy có sự tương đồng như **SH10** với một chuỗi tetrasaccharide [methyl-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-xylopyranosyl]. Sự khác biệt về độ chuyển dịch hóa học xuất hiện tín hiệu của gốc xylose thứ nhất tại C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  77,5/ $\delta_{\text{H}}$  4,27) cùng với sự xuất hiện thêm hai tín hiệu anome thứ năm và thứ sáu tương ứng [ $\delta_{\text{C}}$  102,3 (C-1''''''')/ $\delta_{\text{H}}$  5,00 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''''''') và  $\delta_{\text{C}}$  104,6 (C-1''''''')/ $\delta_{\text{H}}$  5,27 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''''''')]. Các tín hiệu của hai monosaccharide được xác định là glucose và methyl-glucose dựa phân tích NMR của **SH10** và các công bố trước đó [120]. Vị trí của các liên kết glycosidic được chứng minh bởi các tương tác trên phổ HMBC giữa  $\delta_{\text{H}}$  5,00 (H-1''''''', glc2) với  $\delta_{\text{C}}$  77,5 (C-4', xyl1) giữa  $\delta_{\text{H}}$  5,27 (H-1''''''', methyl-glc) với  $\delta_{\text{C}}$  86,7 (C-3''''''', glc2).

Sự tương đồng về số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **SH11** với các số liệu đã được công bố (Bảng 18) kết hợp với phân tích chi tiết các tương tác nhận được trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY chứng minh **SH11** chính là stichloroside B<sub>1</sub> [128]. Hợp chất này còn có tên gọi khác là stichoposide D [120].

Bảng 18. Số liệu phổ NMR của **SH12** và hợp chất tham khảo.

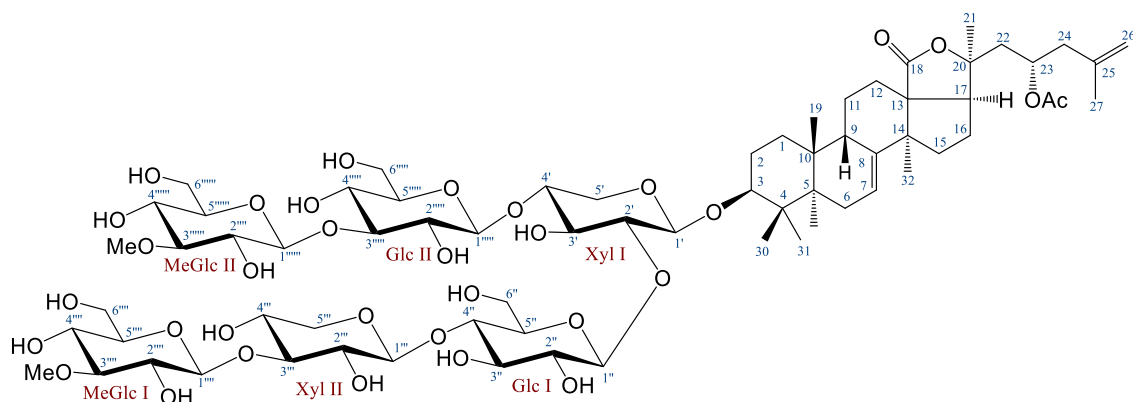
Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [120]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,4	36,0	1,42 m/1,47 m	
2	27,1	26,8	1,96 m/2,12 m	
3	89,3	89,0	3,30 dd (3,5, 12,0)	
4	39,6	39,2	-	
5	48,4	47,7	1,01 m	
6	23,4	23,0	1,98 m	7, 8
7	120,0	119,7	5,71 br s	
8	146,7	146,4	-	
9	47,6	47,1	3,43 br d (13,5)	
10	35,7	35,3	-	
11	23,0	22,7	1,51 m/1,77 m	
12	30,6	30,0	1,97 m	18
13	58,7	58,2	-	
14	51,4	50,9	-	
15	34,4	34,0	1,65 m/1,84 m	
16	25,0	24,5	1,93 m/2,14 m	
17	54,5	53,9	2,43 dd (3,5, 10,0)	18
18	179,6	180,0	-	
19	24,0	23,7	1,21 s	1, 5, 9, 10
20	82,9	83,2	-	
21	27,1	26,6	1,58 s	17, 20, 22
22	44,3	43,7	1,91 m/2,20 m	23
23	68,7	68,3	5,47 m	
24	45,5	44,9	1,32 m/1,60 m	23
25	24,8	24,2	1,60 m	
26	23,1	21,9	0,98 d (6,0)	24, 25, 27
27	22,3	22,9	0,94 d (6,0)	24, 25, 26
30	17,4	17,1	1,14 s	3, 4, 5, 31
31	29,0	28,5	1,25 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,7	1,13 s	8, 13, 14, 15
CO	170,6	171,0	-	
Me	21,3	21,2	2,24 s	C=O
<i>Xyl I</i>				
1'	105,3	104,9	4,78 d (7,0)	3, 5'
2'	82,8	81,6	4,19*	1'
3'	75,6	75,1	4,15*	
4'	78,1	77,5	4,27*	
5'	64,0	63,6	3,70*/4,48*	
<i>Glc I</i>				
1''	105,4	104,6	5,29 d (8,0)	2'
2''	76,3	75,7	4,02*	
3''	75,6	75,3	4,27*	
4''	80,9	80,3	4,22*	
5''	76,3	76,2	3,83*	
6''	62,4	60,9	4,48*	
<i>Xyl II</i>				
1'''	104,9	104,3	5,05 d (8,0)	4''
2'''	73,3	73,1	4,01*	
3'''	87,7	87,1	4,29	
4'''	69,1	68,7	4,03	
5'''	66,4	66,0	3,62 dd (6,0, 12,0)/4,17	



Vị trí	$^a\delta_C$ [120]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>MeGlc I</i>				
1 <sup>'''</sup>	105,3	104,8	5,30 d (8,0)	3 <sup>'''</sup>
2 <sup>'''</sup>	75,0	74,6	3,97*	
3 <sup>'''</sup>	87,7	87,2	3,76 t (9,0)	
4 <sup>'''</sup>	70,8	70,3	4,02*	
5 <sup>'''</sup>	78,1	77,7	3,96*	
6 <sup>'''</sup>	62,4	61,8	4,18*/4,50*	
3 <sup>'''</sup> -OMe	60,5	60,6	3,89 s	3 <sup>'''</sup>
<i>Glc II</i>				
1 <sup>''''</sup>	102,9	102,3	5,00 d (8,0)	4'
2 <sup>''''</sup>	73,0	73,4	4,01*	
3 <sup>''''</sup>	88,1	86,7	4,16*	
4 <sup>''''</sup>	69,9	69,3	4,03*	
5 <sup>''''</sup>	78,1	77,7	4,01*	
6 <sup>''''</sup>	62,4	61,7	4,18*/4,43*	
<i>MeGlc II</i>				
1 <sup>'''''</sup>	105,4	104,6	5,27 d (8,0)	3 <sup>'''''</sup>
2 <sup>'''''</sup>	75,0	74,6	3,97*	
3 <sup>'''''</sup>	87,7	87,2	3,76 t (9,0)	
4 <sup>'''''</sup>	70,8	70,4	4,02*	
5 <sup>'''''</sup>	78,1	77,7	3,96*	
6 <sup>'''''</sup>	62,4	61,8	4,18*/4,50*	
3 <sup>'''''</sup> -OMe	60,5	60,6	3,88 s	3 <sup>'''''</sup>

<sup>a</sup> $\delta_C$  của stichoposide D [120], <sup>b</sup>đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Các tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.1.13. Hợp chất SH13: Stichloroside B<sub>2</sub>



Hình 62. Cấu trúc hóa học của SH13.

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, hợp chất SH13 (Hình 62) được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng từ phần nước của loài hải sâm *S. horrens*. Phân tích các số liệu phổ 1D và 2D NMR của hợp chất SH13 (Hình S38-S43 trong phần Phụ lục) cho thấy hợp chất này tương tự trong các số liệu phổ của hợp chất SH12 với khung cấu trúc holostane triterpene oligoglycoside. Sự tương đồng cao liên quan đến chuỗi hexasaccharide với phân nhánh ở monosaccharide đầu tiên (D-xylose1) và chứa D-glucose, D-xylose2 và 3-O-metyl-D-glucose (ở đầu cuối), ở vị trí thứ hai, thứ ba và

Bảng 19. Số liệu phổ NMR của **SH13** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$	<sup>b</sup> $\delta_C$ [129]	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,0	36,4	36,3	1,47 m	
2	26,8	27,3	27,1	1,97 m/2,12 m	
3	89,0	88,9	89,4	3,31 dd (4,0, 12,0)	
4	39,2	39,6	39,5	-	
5	47,7	48,1	48,0	1,01 t (7,5)	
6	23,0	23,2	23,3	1,98 m	7, 8
7	119,7	120,3	120,0	5,71 br s	
8	146,4	146,7	146,7	-	
9	47,1	47,6	47,5	3,43 br d (14,5)	
10	35,3	35,6	35,6	-	
11	22,7	22,9	22,9	1,53 m/1,78 m	
12	30,0	30,3	30,3	2,00 m	18
13	58,3	58,6	58,6	-	
14	50,9	51,3	51,3	-	
15	34,0	34,7	34,3	1,64 m/1,84 m	
16	24,5	24,8	24,7	1,93 m/2,13 m	
17	53,9	54,3	54,2	2,40 m	18
18	180,0	179,9	180,4	-	
19	23,7	24,2	24,0	1,20 s	1, 5, 9, 10
20	83,3	83,3	83,5	-	
21	26,6	27,0	26,9	1,58 s	17, 20, 22
22	43,6	43,2	43,2	2,01 m/2,22 m	23
23	68,3	68,4	68,2	5,53 m	
24	44,9	44,8	44,6	2,31 dd (5,5, 14,0) 2,42 m	23
25	24,2	141,8	141,7	-	
26	21,9	114,4	114,4	4,89 br s/4,91 br s	24, 25, 27
27	22,9	22,4	22,4	1,85 s	24, 25, 26
30	17,1	17,9	17,4	1,14 s	3, 4, 5, 31
31	28,5	29,3	28,8	1,25 s	3, 4, 5, 30
32	30,7	30,9	30,9	1,13 s	8, 13, 14, 15
CO	171,0	170,6	171,2	2,20 s	
Me	21,2	21,7	21,4	-	CO
<i>Xyl I</i>					
1'	104,9	105,8	105,2	4,78 d (7,5)	3, 5'
2'	81,6	83,7	81,8	4,20*	1'
3'	75,1	76,1	75,5	4,15*	
4'	77,5	78,0	77,8	4,28*	
5'	63,6	64,4	63,9	3,71*/4,48*	
<i>Glc I</i>					
1''	104,6	103,3	105,1	5,30 d (7,5)	2'
2''	75,7	74,2	76,0	4,02*	
3''	<b>75,3</b>	<b>70,2</b>	<b>75,6</b>	4,28*	
4''	<b>80,3</b>	<b>88,7</b>	<b>80,6</b>	4,22*	
5''	76,2	78,9	76,5	3,84 m	
6''	60,8	62,7	61,2	4,48*	
<i>Xyl II</i>					
1'''	104,3	105,5	104,6	5,05 d (8,0)	4''

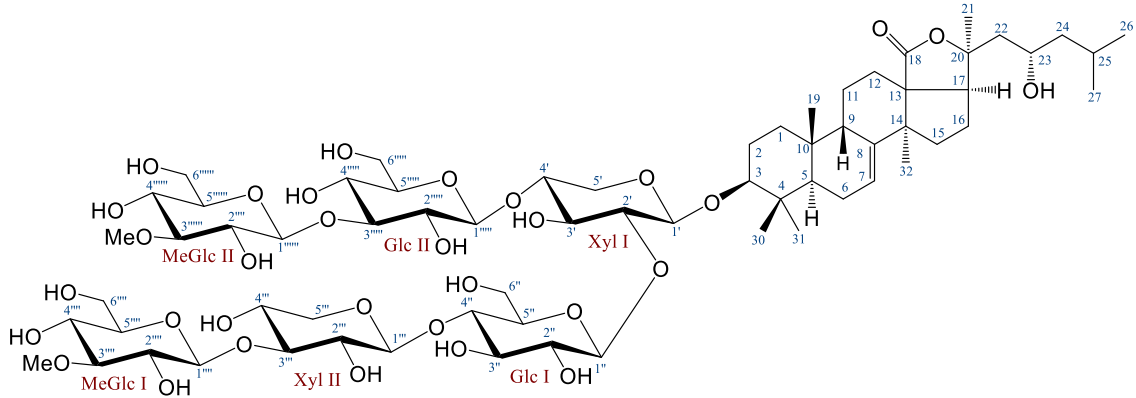
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub>	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [129]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
2'''	73,1	75,7	73,5	4,01*	
3'''	87,1	88,1	87,4	4,30*	
4'''	68,7	77,2	69,0	4,02*	
5'''	66,0	67,1	66,3	3,64 dd (10,5, 11,5) 4,18*	
<i>MeGlc I</i>					
1''''	104,8	106,2	105,1	5,31 d (8,0)	3'''
2''''	74,6	78,8	74,9	3,98*	
3''''	87,2	88,7	87,5	3,76 t (9,0)	
4''''	70,3	71,8	70,6	4,02*	
5''''	77,7	75,5	78,0	4,02*	
6''''	61,8	61,6	62,1	4,18*/4,50*	
3''''-OMe	60,6	61,3	60,9	3,90 s	3''''
<i>Glc II</i>					
1'''''	102,3	106,0	102,6	5,00 d (8,0)	4'
2'''''	73,3	74,1	73,7	4,01*	
3'''''	86,7	88,7	86,9	4,18*	
4'''''	69,3	71,1	69,6	4,01*	
5'''''	77,7	78,0	77,8	3,96*	
6'''''	61,6	62,7	61,9	4,18*/4,44*	
<i>MeGlc II</i>					
1''''''	104,6	106,3	104,9	5,28 d (8,0)	3''''''
2''''''	<b>74,6</b>	<b>78,8</b>	<b>74,9</b>	3,98*	
3''''''	87,2	88,7	87,5	3,76 t (9,0)	
4''''''	70,4	71,8	70,7	4,02*	
5''''''	77,7	75,5	78,0	4,02*	
6''''''	61,7	61,6	62,1	4,18*/4,50*	
3''''''-OMe	60,5	61,3	60,9	3,89 s	3''''''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của **SH12**, <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> của stichloroside B<sub>2</sub> [129], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

đường thứ tư, tương ứng. Phân nhánh còn lại được xác định là D-glucose và *O*-metyl-D-glucose (đầu cuối). Sự khác biệt lớn nhất của hợp chất **SH13** so với **SH12** là sự xuất hiện liên quan đến các tín hiệu cộng hưởng của một liên kết đôi bị thế hai vị trí nằm ở phần đầu mạch Δ<sup>25(26)</sup> (**SH13**) thay cho các tín hiệu của một nhóm methine và một nhóm methyl trên các phổ của hợp chất **SH12**. Tương tác HMBC giữa H<sub>3</sub>-27 (δ<sub>H</sub> 1,85) và C-24 (δ<sub>C</sub> 44,6), C-25 (δ<sub>C</sub> 141,7) và C-26 (δ<sub>C</sub> 114,4) chứng minh vị trí của liên kết đôi xuất hiện thêm tại C-25/C-26. Như vậy, **SH13** được xác định là stichloroside B<sub>2</sub> [128]. Tuy nhiên, khi so sánh số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của **SH13** với các số liệu tương ứng của stichloroside B<sub>2</sub> [129] thì thấy có sự khác biệt quá lớn tại các vị trí C-3'', C-4'' và C-2'''''' (Bảng 19). Tài liệu này công bố giá trị phổ <sup>13</sup>C NMR của stichloroside B<sub>2</sub> tại C-3'' và C-2'''''' tương ứng tại δ<sub>C</sub> 70,2 và 78,8. Tuy nhiên cũng chính tài liệu này lại công bố số liệu tại C-3'' và C-2'''''' của một hợp chất có cấu trúc

tương tự là astichoposide C tương ứng tại  $\delta_C$  76,6 và 75,2 [129], phù hợp với số liệu của **SH13**. Như vậy, khác biệt này có thể là do sai sót trong quá trình nhập dữ liệu phổ vào bảng.

#### 4.1.14. Hợp chất **SH14**: *Deacetylstichloroside B<sub>1</sub>*



Hình 63. Cấu trúc hóa học của **SH14**.

Hợp chất **SH14** được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR của **SH14** cho thấy sự hiện diện của một triterpene glycoside có chứa một nhóm carbonyl xyclopentanone [ $\delta_C$  180,7 (C=O, C-18)] và một liên kết olefinic [ $\delta_C$  119,7 (CH, C-7)/ $\delta_H$  5,69 (1H, br s, H-7) và 147,1 (C, C-8)]. Phổ  $^{13}C$  NMR và HSQC của **SH14** cho thấy sự xuất hiện của 66 nguyên tử carbon, trong đó 30 carbon được chỉ định cho phần triterpene aglycone, trong khi 36 carbon còn lại thuộc chuỗi oligosaccharide. Đối với chuỗi oligosaccharide, trình tự gốc đường và các liên kết giữa các gốc đường được xác định bằng phổ thực nghiệm 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY và ROESY, Hình S47-S49 trong phần Phụ lục) và so sánh với dữ liệu được công bố trước đó. Sự thay đổi độ chuyển dịch hóa học đối với các tín hiệu proton/carbon được tóm tắt trong Bảng 20. So sánh giữa dữ liệu NMR của **SH14** với **SH12** cho thấy có sự tương đồng lớn về độ dịch chuyển hóa học của các vị trí trong cấu trúc. Điểm khác duy nhất liên quan đến tín hiệu của một nhóm acetyl không còn xuất hiện trong **SH14**. Điều này cho phép dự đoán **SH14** là dẫn xuất deacetyl của **SH12**. Tín hiệu carbon C-23 của **SH14** bị dịch chuyển mạnh về phía vùng trường cao tại  $\delta_C$  65,1 khi so sánh với tín hiệu tương ứng của **SH12** tại  $\delta_C$  68,3 một lần nữa khẳng định sự mất đi nhóm acetyl tại C-23 của **SH14**. Ngoài ra, khi xem xét số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của **SH14** với các số liệu phổ tương ứng của **SH11** và **SH12** (Bảng 20), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC, COSY và ROESY chứng minh **SH14** chính là deacetylstichloroside B<sub>1</sub> [128].

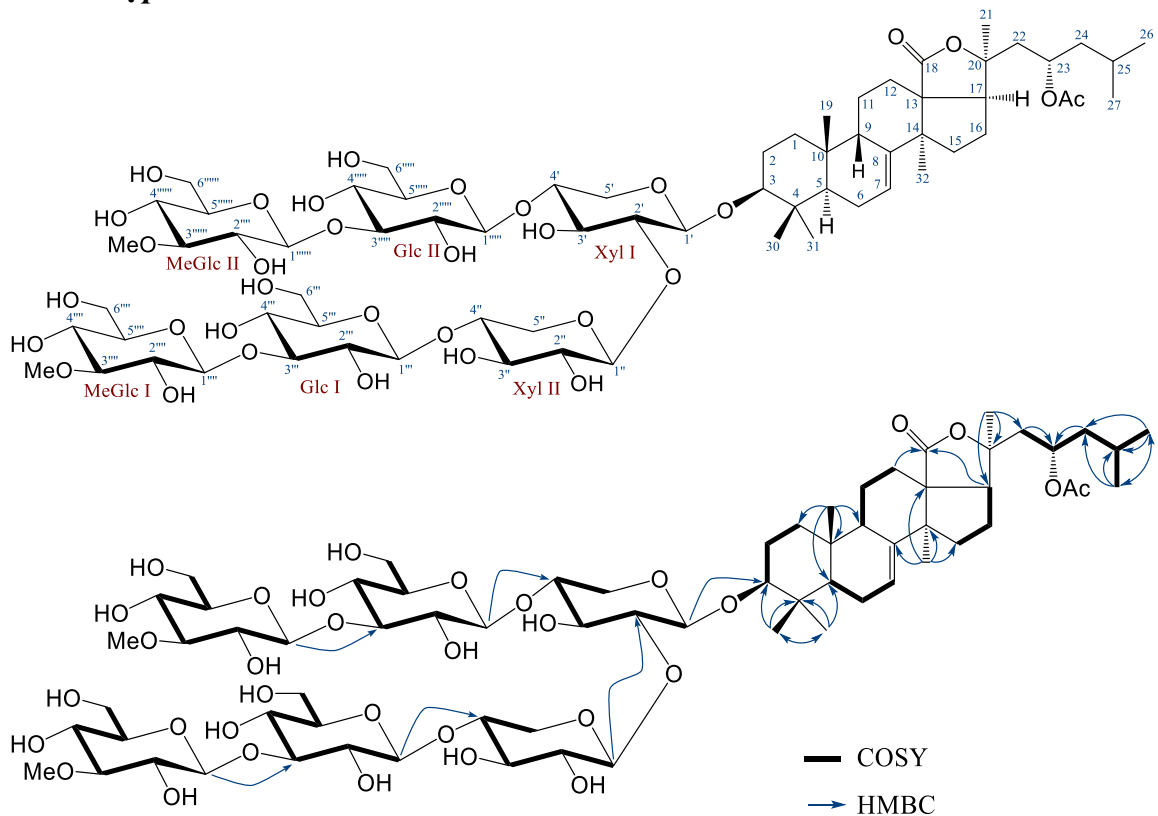
Bảng 20. Số liệu phổ NMR của **SH14** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$	<sup>b</sup> $\delta_C$	$\delta_C^{c,d}$	$\delta_H^{c,e}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,0	36,0	36,3	1,45 m	
2	26,8	26,9	27,1	1,94 m/2,12 m	
3	89,0	89,1	89,2	3,30 dd (3,5, 11,5)	
4	39,2	39,3	39,5	-	
5	47,7	47,8	48,1	1,01 m	
6	23,0	23,1	23,3	1,98 m	7, 8
7	119,7	119,7	119,7	5,69 br s	
8	146,4	146,6	147,1	-	
9	47,1	47,2	47,5	3,52 br d (13,5)	
10	35,3	35,3	35,6	-	
11	22,7	22,7	22,9	1,52 m/1,80 m	
12	30,0	30,2	30,6	2,00 m/2,11 m	18
13	58,2	58,5	58,5	-	
14	50,9	51,1	51,5	-	
15	34,0	34,1	34,2	1,66 m/1,77 m	
16	24,5	24,9	26,1	2,24 m	
17	53,9	53,3	55,3	2,61 t (7,5)	18
18	180,0	180,4	180,7	-	
19	23,7	23,8	24,0	1,21 s	1, 5, 9, 10
20	83,2	85,0	84,7	-	
21	26,6	27,8	26,5	1,71 s	17, 20, 22
22	43,7	47,1	46,2	1,98 m/2,18 m	23
23	68,3	65,2	65,1	4,18 m	
24	44,9	48,8	48,5	1,40 m/1,70 m	23
25	24,2	24,3	24,7	2,02 m	
26	21,9	21,9	23,5	0,92 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,9	23,5	22,3	0,96 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,1	17,1	17,4	1,13 s	3, 4, 5, 31
31	28,5	28,6	28,8	1,24 s	3, 4, 5, 30
32	30,7	30,7	31,0	1,11 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl I</i>					
1'	104,9		105,2	4,78 d (7,5)	3, 5'
2'	81,6		82,2	4,16*	1'
3'	75,1		75,5	4,16*	
4'	77,5		77,8	4,27*	
5'	63,6		63,9	3,67*/4,45*	
<i>Glc I</i>					
1''	104,6		105,2	5,29 d (7,5)	2'
2''	75,7		76,2	4,04*	
3''	75,3		75,6	4,26*	
4''	80,3		80,6	4,26*	
5''	76,2		76,6	3,83*	
6''	60,9		61,2	4,44*/4,52*	
<i>Xyl II</i>					
1'''	104,3		104,7	5,08 d (7,5)	4''
2'''	73,1		73,7	4,00*	
3'''	87,1		87,1	4,15*	
4'''	68,7		69,0	4,04*	
5'''	66,0		66,4	3,62/4,17	

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub>	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>MeGlc I</i>					
1 <sup>'''</sup>	104,8		105,3	5,31 d (8,0)	3 <sup>'''</sup>
2 <sup>'''</sup>	74,6		75,0	3,97*	
3 <sup>'''</sup>	87,2		87,7	3,75 t (9,0)	
4 <sup>'''</sup>	70,3		70,6	4,04*	
5 <sup>'''</sup>	77,7		78,1	3,99*	
6 <sup>'''</sup>	61,8		62,1	4,20*/4,50*	
3 <sup>'''</sup> -OMe	60,6		60,9	3,88 s	3 <sup>'''</sup>
<i>Glc II</i>					
1 <sup>''''</sup>	102,3		102,7	5,00 d (8,0)	4'
2 <sup>''''</sup>	73,4		73,4	4,01*	
3 <sup>''''</sup>	86,7		87,6	4,28*	
4 <sup>''''</sup>	69,3		69,6	4,04*	
5 <sup>''''</sup>	77,7		77,9	3,95*	
6 <sup>''''</sup>	61,7		62,0	4,20*/4,43*	
<i>MeGlc II</i>					
1 <sup>'''''</sup>	104,6		105,1	5,28 d (7,5)	3 <sup>'''''</sup>
2 <sup>'''''</sup>	74,6		75,0	3,97*	
3 <sup>'''''</sup>	87,2		87,7	3,75 t (9,0)	
4 <sup>'''''</sup>	70,4		70,6	4,04*	
5 <sup>'''''</sup>	77,7		78,2	3,99*	
6 <sup>'''''</sup>	61,8		62,1	4,20*/4,50*	
3 <sup>'''''</sup> -OMe	60,6		60,8	3,89 s	3 <sup>'''''</sup>

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của *SH12*, <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> của *SH11*, <sup>c</sup>đo trong pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.1.15. Hợp chất *SH15*: Stichloroside A<sub>1</sub>



Hình 64. Cấu trúc hóa học của *SH15* và các tương tác COSY, HMBC chính.

Bảng 21. Số liệu phổ NMR của **SH15** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [120]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	35,7	36,0	1,45 m/1,48 m	
2	26,8	26,9	1,93 m/2,12 m	
3	88,5	88,9	3,30 dd (3,5, 11,5)	
4	-	39,2	-	
5	47,3	47,8	1,04 dd (5,5, 10,0)	
6	22,6	23,1	2,03 m	7, 8
7	119,2	119,8	5,72 br s	
8	146,2	146,4	-	
9	46,8	47,2	3,45 br d (13,0)	
10	35,0	35,3	-	
11	22,2	22,7	1,52 m/1,78 m	
12	29,7	30,0	1,97 m	18
13	57,8	58,3	-	
14	50,8	51,0	-	
15	33,8	34,0	1,65 m/1,83 m	
16	24,5	24,5	1,93 m/2,13 m	
17	53,5	54,0	2,42 dd (4,0, 10,0)	18
18	179,5	180,0	-	
19	24,1	23,8	1,23 s	1, 5, 9, 10
20	83,1	83,2	-	
21	26,6	26,6	1,57 s	17, 20, 22
22	43,2	43,7	1,92 m/2,20 m	23
23	67,8	68,2	5,47 m	
24	44,7	45,0	1,32 m/1,60 m	23
25	23,7	24,3	1,60 m	
26	22,8	22,9	0,93 d (6,0)	24, 25, 27
27	22,0	21,9	0,98 d (6,0)	24, 25, 26
30	17,0	16,8	1,11 s	3, 4, 5, 31
31	28,5	28,2	1,27 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,7	1,14 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O	170,3	170,9	-	
Me	21,3	21,2	2,22 s	C=O
<i>Xyl I</i>				
1'	103,7	104,8	4,77 d (7,5)	3, 5'
2'	81,5	82,8	4,02*	1'
3'	74,5	75,2	4,23*	
4'	76,5	77,5	4,30*	
5'	62,9	63,7	3,69 dd (10,0, 11,0)/4,47*	
<i>Xyl II</i>				
1''	104,5	105,9	5,10 d (7,5)	2'
2''	74,5	75,5	4,00*	
3''	74,5	75,3	4,13*	
4''	77,1	78,3	4,28*	

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak (J = Hz)	HMBC
5''	63,4	64,4	3,61 dd (10,5, 11,0)/4,47*	
<i>Glc I</i>				
1'''	100,9	102,7	4,98 d (8,0)	4''
2'''	72,1	73,2	4,01*	
3'''	87,0	87,2	4,28*	
4'''	68,6	69,3	4,01*	
5'''	76,5	77,8	3,95*	
6'''	60,9	61,8	4,19*/4,42*	
<i>MeGlc I</i>				
1''''	103,7	104,9	5,32 d (8,0)	3'''
2''''	73,5	74,7	3,97*	
3''''	85,9	87,3	3,75 t (9,0)	
4''''	69,4	70,3	4,02*	
5''''	76,8	77,8	4,01*	
6''''	60,9	61,8	4,19*/4,50*	
3''''-OMe	59,8	60,5	3,88 s	3'''
<i>Glc II</i>				
1'''''	101,2	102,4	5,02 d (7,5)	4'
2'''''	72,1	73,2	4,01*	
3'''''	87,0	87,2	4,28*	
4'''''	68,6	69,3	4,01*	
5'''''	76,5	77,5	3,95*	
6'''''	60,9	61,7	4,19*/4,42*	
<i>MeGlc II</i>				
1''''''	103,7	104,9	5,31 d (8,0)	3''''
2''''''	73,5	74,7	3,97*	
3''''''	85,9	87,3	3,75 t (9,0)	
4''''''	69,4	70,3	4,02*	
5''''''	76,8	77,8	4,01*	
6''''''	60,9	61,8	4,19*/4,50*	
3''''''-OMe	59,8	60,5	3,88 s	3''''

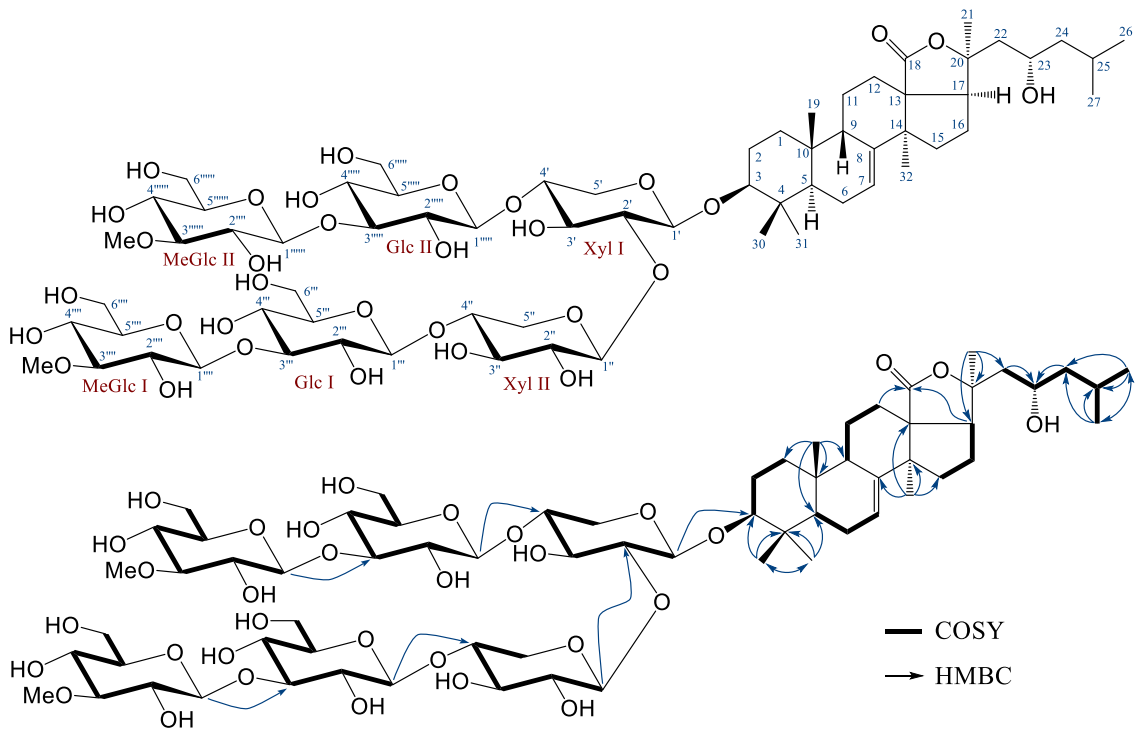
<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của stichoposide E đo trong DMSO-d<sub>6</sub> [120], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Hợp chất **SH15** cũng được phân lập dưới dạng chất bột, màu trắng. Các số liệu phổ NMR của nó cho thấy có sự tương đồng như các số liệu phổ NMR tương ứng của hợp chất **SH12**. Trên phổ <sup>13</sup>C NMR và HSQC hiện diện tổng số 68 carbon, trong đó còn có sự xuất hiện các tín hiệu của sáu gốc đường với các tín hiệu đặc trưng của 06 carbon/proton anome tại δ<sub>C</sub> 104,8 (C-1')/δ<sub>H</sub> 4,77 (H-1'), δ<sub>C</sub> 105,9 (C-1'')/δ<sub>H</sub> 5,10 (H-1''), δ<sub>C</sub> 102,7 (C-1''')/δ<sub>H</sub> 4,98 (H-1'''), δ<sub>C</sub> 104,9 (C-1''''')/δ<sub>H</sub> 5,32 (H-1'''''), δ<sub>C</sub> 102,4 (C-1''''''')/δ<sub>H</sub> 5,02 (H-1''''''') và δ<sub>C</sub> 104,9 (C-1''''''''')/δ<sub>H</sub> 5,31 (H-1''''''''') (Bảng 21). Chi tiết phân tích dữ liệu <sup>13</sup>C NMR của **SH15** và so sánh với **SH12** nhận thấy hai hợp chất



này có sự khác nhau về độ dịch chuyển hóa học liên quan đến phần saccharide. Sự khác biệt giữa chúng về độ dịch chuyển hóa học ở vùng tín hiệu nằm trong gốc đường thứ hai và thứ ba của chuỗi chính: gốc đường thứ hai của **SH15** là một xylose thay cho một đơn vị glucose trong **SH12** và gốc đường thứ ba của **SH15** là một glucose thay cho một đơn vị xylose trong **SH12**. Vị trí liên kết của gốc đường thứ hai tại C-2' của đơn vị đường thứ nhất được xác định bằng tương tác xa HMBC giữa H-1'' ( $\delta_H$  5,10) và C-2' ( $\delta_C$  82,8) và vị trí liên kết của đơn vị đường thứ ba tại C-4'' của đơn vị đường thứ hai được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa H-1''' ( $\delta_H$  4,98) và C-4'' ( $\delta_C$  78,3). Ngoài ra, tham khảo số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của **SH15** với các số liệu đã được công bố (Bảng 21) kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC và COSY (Hình S53-S54 trong phần Phụ lục) chứng minh **SH15** chính là stichloroside A<sub>1</sub> [128], còn có tên gọi khác là stichoposide E [120] (Hình 64).

#### 4.1.16. Hợp chất **SH16**: *Deacetylstichloroside A<sub>1</sub>*



Hình 65. Cấu trúc hóa học của **SH16** và các tương tác COSY, HMBC chính.

Hợp chất **SH16** cũng được phân lập dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR của **SH16** (Hình S55-S60 trong phần Phụ lục) cho thấy xuất hiện 66 carbon, ít hơn hai carbon so với **SH15**. Sự xuất hiện các tín hiệu của sáu gốc đường vẫn được xác nhận với sự có mặt các tín hiệu đặc trưng của sáu cacbon/proton anome tại  $\delta_{C/H}$  104,8 (C-1')/4,76 (H-1'), 106,1 (C-1'')/5,10 (H-1''), 102,8 (C-1''')/4,99

Bảng 22. Số liệu phổ NMR của **SH16** và hợp chất tham khảo.

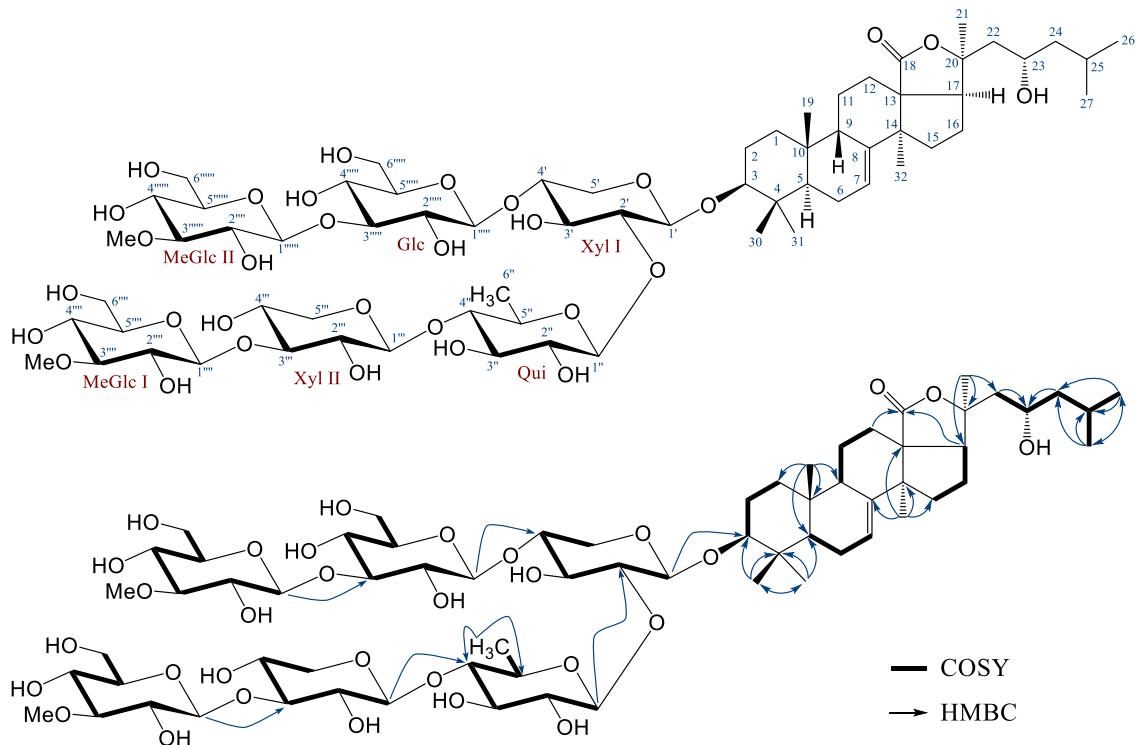
Vị trí	$^a\delta_C$ [120]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	35,7	36,1	1,48 m	
2	26,8	26,9	1,94 m/2,13 m	
3	88,5	88,9	3,31 dd (3,5, 11,5)	
4	-	39,3	-	
5	47,3	47,9	1,05 m	
6	22,6	23,1	2,05 m	7, 8
7	119,2	119,7	5,74 br s	
8	146,2	146,6	-	
9	46,8	47,3	3,52 br d (13,5)	
10	35,0	35,4	-	
11	22,2	22,8	1,55 m/1,80 m	
12	29,7	30,3	2,02 m/2,10 m	18
13	57,8	58,5	-	
14	50,8	51,1	-	
15	33,8	34,1	1,70 m/1,85 m	
16	24,5	25,0	1,94 m/2,13 m	
17	53,5	53,4	2,55 dd (4,0, 10,0)	18
18	179,5	180,3	-	
19	24,1	23,9	1,22 s	1, 5, 9, 10
20	83,1	85,0	-	
21	26,6	27,9	1,87 s	17, 20, 22
22	43,2	47,1	2,02 m/2,20 m	23
23	67,8	65,2	4,05	
24	44,7	48,8	1,32 m/1,73 m	23
25	23,7	24,4	2,06 m	
26	22,8	23,5	0,98 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,0	21,9	1,02 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,0	16,8	1,12 s	3, 4, 5, 31
31	28,5	28,3	1,28 s	3, 4, 5, 30
32	30,9	30,8	1,17 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl I</i>				
1'	103,7	104,8	4,76 d (7,5)	3, 5'
2'	81,5	82,9	4,02*	1'
3'	74,5	75,3	4,24*	
4'	76,5	77,4	4,30*	
5'	62,9	63,7	3,68 dd (9,5, 11,5)/4,46*	
<i>Xyl II</i>				
1''	104,5	106,1	5,10 d (7,5)	2'
2''	74,5	75,5	4,02*	
3''	74,5	75,4	4,14*	
4''	77,1	78,3	4,28*	
5''	63,4	64,4	3,62 dd (11,0, 11,5)/4,46*	
<i>Glc I</i>				

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
1'''	100,9	102,8	4,99 d (8,0)	4''
2'''	72,1	73,2	4,02*	
3'''	87,0	87,3	4,26*	
4'''	68,6	69,4	4,02*	
5'''	76,5	77,6	3,95*	
6'''	60,9	61,8	4,18/4,43	
<i>MeGlc I</i>				
1''''	103,7	105,0	5,31 d (8,0)	3'''
2''''	73,5	74,7	3,97*	
3''''	85,9	87,4	3,74 t (9,0)	
4''''	69,4	70,3	4,04*	
5''''	76,8	77,9	4,00*	
6''''	60,9	61,8	4,20*/4,50*	
3''''-OMe	59,8	60,6	3,88 s	3''''
<i>Glc II</i>				
1'''''	101,2	102,4	5,01 d (7,5)	4'
2'''''	72,1	73,2	4,02*	
3'''''	87,0	87,3	4,26*	
4'''''	68,6	69,4	4,02*	
5'''''	76,5	77,6	3,95*	
6'''''	60,9	61,8	4,18*/4,43*	
<i>MeGlc II</i>				
1''''''	103,7	105,0	5,30 d (8,0)	3''''
2''''''	73,5	74,7	3,97*	
3''''''	85,9	87,4	3,74 t (9,0)	
4''''''	69,4	70,3	4,04*	
5''''''	76,8	77,9	4,00*	
6''''''	60,9	61,8	4,20*/4,50*	
3''''''-OMe	59,8	60,6	3,88 s	3''''''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của stichoposide E đo trong dung môi DMSO-d<sub>6</sub> [120], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

(H-1'''), 105,0 (C-1''''/5,31 (H-1''''), 102,4 (C-1''''')/5,01 (H-1''''') và 105,0 (C-1''''''/5,30 (H-1''''')). Mặt khác, sự không xuất hiện của một nhóm acetyl trên các phổ NMR của **SH16** đã giải thích được tại sao số carbon ít hơn của **SH15**. Tương tự hợp chất **SH14**, tín hiệu cacbon C-23 của **SH16** bị dịch chuyển mạnh về phía vùng trường cao tại δ<sub>C</sub> 65,2 khi so sánh với tín hiệu tương ứng của **SH15** tại δ<sub>C</sub> 68,2 một lần nữa khẳng định sự mất đi nhóm acetyl tại C-23 của **SH16**. So sánh số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của **SH16** với các số liệu đã được công bố của stichoposide E [120], kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC, COSY và ROESY (Hình S59-S60 trong phần Phụ lục) cho phép xác định hợp chất này chính là deacetyltichloroside A<sub>1</sub> [128]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân tách từ thiên nhiên.

#### 4.1.17. Hợp chất SH17: Deacetyltichloroside C<sub>1</sub>



Hình 66. Cấu trúc hóa học của SH17 và các tương tác COSY, HMBC chính.

Hợp chất SH17 (Hình 66) được tìm thấy dưới dạng bột, màu trắng. Các phổ NMR của SH17 cũng đặc trưng cho một hợp chất triterpene saponin. Trên phổ <sup>1</sup>H NMR của SH17 xuất hiện sáu tín hiệu proton anome [ $\delta_{\text{H}}$  4,76 (H-1'), 5,13 (H-1''), 4,87 (H-1'''), 5,33 (H-1''''), 5,01 (H-1''''') và 5,30 (H-1'''''), mỗi tín hiệu 1H, d,  $J = 7,5$  hoặc 8,0 Hz], có tương tác HSQC với các carbon anome tương ứng [ $\delta_{\text{C}}$  105,2 (C-1'), 105,3 (C-1''), 104,9 (C-1'''), 105,0 (C-1''''), 102,6 (C-1''''') và 105,2 (C-1''''')], chứng minh cho sự có mặt của sáu gốc đường (Bảng 23). Không giống như ở các hợp chất SH12–SH16, sự xuất hiện tín hiệu của một nhóm methyl [ $\delta_{\text{C}}$  16,08 (C-6)/ $\delta_{\text{H}}$  1,72 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-6)] chứng minh sự có mặt của một gốc đường quinovose hoặc fucose trong phân tử của SH17. Tín hiệu proton H-4'' của gốc đường này xuất hiện tại  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz) chứng minh đây là một quinovose (Hình S61-S63 trong phần Phụ lục). Vị trí liên kết của gốc đường quinovose tại C-2' của đường xylose thứ nhất được xác định bằng tương tác xa HMBC giữa H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,13) và C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  83,1) và vị trí liên kết của đơn vị đường xylose thứ hai tại C-4'' của đường quinovose được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  4,87) và C-4'' ( $\delta_{\text{C}}$  86,0). So sánh số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của SH17 với các số liệu tương ứng của stichloroside F [75] và astichoposide C [120] (Bảng 23), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D

HMBC, COSY và ROESY (Hình S64-S66 trong phần Phụ lục) chứng minh hợp chất **SH17** là deacetyltichloroside C<sub>1</sub> [128]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân tách từ thiên nhiên.

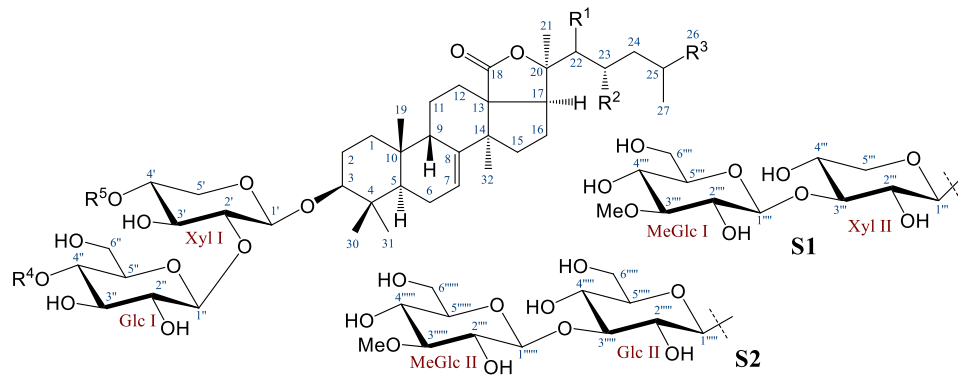
Bảng 23. Số liệu phổ NMR của **SH17** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [75]	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>					
1	36,3		36,3	1,48 m	
2	27,2		27,2	1,95 m/2,14 m	
3	89,1		89,3	3,31 dd (3,5, 11,0)	
4	39,5		39,6	-	
5	48,1		48,1	1,07 t (8,0)	
6	23,3		23,4	2,08 m	7, 8
7	119,9		119,9	5,77 br s	
8	146,9		146,9	-	
9	47,5		47,5	3,53 br d (14,5)	
10	36,6		35,6	-	
11	23,0		23,0	1,55 m/1,82 m	
12	30,5		30,5	2,03 m/2,10 m	18
13	58,6		58,8	-	
14	51,4		51,4	-	
15	34,3		34,4	1,70 m/1,86 m	
16	25,2		25,2	1,93 m/2,14 m	
17	53,7		53,7	2,55 dd (4,0, 10,0)	18
18	180,2		180,6	-	
19	24,6		24,1	1,26 s	1, 5, 9, 10
20	84,9		85,3	-	
21	28,1		28,1	1,87 s	17, 20, 22
22	47,6		47,3	2,02 m/2,20 m	23
23	65,4		65,4	4,05 m	
24	49,2		49,1	1,33 m/1,74 m	23
25	24,0		24,6	2,05 m	
26	23,8		23,8	0,98 d (7,0)	24, 25, 27
27	22,1		22,2	1,02 d (6,5)	24, 25, 26
30	17,6		17,4	1,16 s	3, 4, 5, 31
31	28,9		28,8	1,31 s	3, 4, 5, 30
32	31,0		31,0	1,17 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl I</i>					
1'		105,3	105,2	4,76 d (7,5)	3, 5'
2'		83,1	83,1	4,05*	1'
3'		75,4	75,6	4,25*	
4'		78,1	77,7	4,31*	
5'		64,0	63,9	3,69*/4,46*	
<i>Qui</i>					
1''		105,4	105,3	5,13 d (8,0)	2'
2''		76,4	76,2	4,00*	
3''		75,5	75,2	4,06*	
4''		85,8	86,0	3,63 t (9,0)	
5''		71,7	71,7	3,75*	

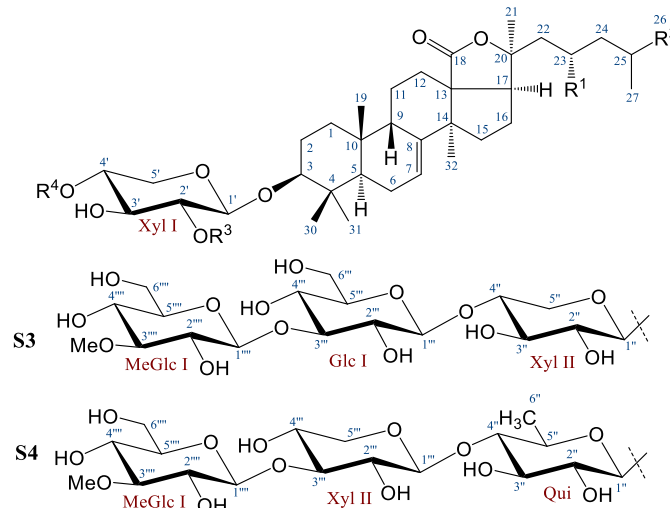
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [75]	<sup>b</sup> δ <sub>C</sub> [120]	δ <sub>C</sub> <sup>c,d</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>c,e</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
6"		18,0	18,1	1,72 d (6,5)	4", 5"
<i>Xyl II</i>					
1'''		105,4	104,9	4,87 d (7,5)	4"
2'''		72,9	73,6	4,00*	
3'''		87,7	86,9	4,22*	
4'''		69,0	69,0	4,04*	
5'''		66,4	66,4	3,67*/4,20*	
<i>MeGlc I</i>					
1''''		105,3	105,0	5,33 d (7,5)	3'''
2''''		74,9	74,9	3,97*	
3''''		87,7	87,6	3,75*	
4''''		70,8	70,6	4,03*	
5''''		78,1	78,1	4,01*	
6''''		62,4	62,1	4,18*/4,50*	
3''''-OMe		60,4	60,8	3,89 s	3''''
<i>Glc</i>					
1'''''		102,8	102,6	5,01 d (8,0)	4'
2'''''		73,2	73,4	4,01*	
3'''''		88,1	87,5	4,27*	
4'''''		69,9	69,6	4,04*	
5'''''		78,1	77,9	3,95*	
6'''''		62,4	62,0	4,18*/4,43*	
<i>MeGlc II</i>					
1''''''		105,4	105,2	5,30 d (8,0)	3''''
2''''''		74,9	74,9	3,97*	
3''''''		87,7	87,7	3,75*	
4''''''		70,8	70,7	4,03*	
5''''''		78,1	78,1	4,01*	
6''''''		62,4	62,1	4,18*/4,50*	
3''''''-OMe		60,4	60,9	3,89 s	3''''''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của phần aglycone của stichloroside F [75], <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> của phần chuỗi đường của astichoposide C [120], <sup>c</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>d</sup>125 MHz và <sup>e</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

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 Δ<sup>7(8)</sup> 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.



- Stichorrenoside A (**SH1**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}_2$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = R^5 = \text{H}$   
 Stichorrenoside B (**SH2**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}_2$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{NaSO}_3$ ,  $R^5 = \text{H}$   
 Stichorrenoside C (**SH3**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = R^5 = \text{H}$   
 Stichorrenoside E (**SH9**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{H}$   
 Thelenotoside B (**SH10**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{H}$   
 Deacetyl thelenotoside B (**SH11**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{H}$   
 Stichloroside B<sub>1</sub> (**SH12**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{S2}$   
 Stichloroside B<sub>2</sub> (**SH13**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{S2}$   
 Deacetylstichloroside B<sub>1</sub> (**SH14**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ,  $R^3 = \text{CH}_2$ ,  $R^4 = \text{S1}$ ,  $R^5 = \text{S2}$

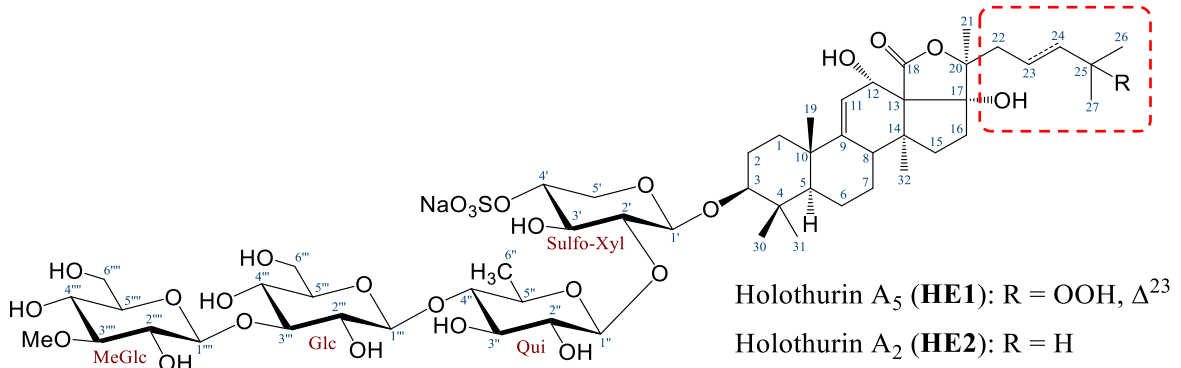


- Stichorrenoside D (**SH4**):  $R^1 = \text{OAc}$ ,  $R^2 = \text{CH}_2$ ,  $R^3 = \text{Xyl}$ ,  $R^4 = \text{H}$   
 Stichoposide A (**SH5**):  $R^1 = \text{OAc}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{Qui}$ ,  $R^4 = \text{H}$   
 Stichoposide B (**SH6**):  $R^1 = \text{OAc}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{Glc}$ ,  $R^4 = \text{H}$   
 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxylolost-7-ene (**SH7**):  $R^1 = \text{OAc}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{Xyl}$ ,  $R^4 = \text{H}$   
 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxylolost-7-ene (**SH8**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{Xyl}$ ,  $R^4 = \text{H}$   
 Stichloroside A<sub>1</sub> (**SH15**):  $R^1 = \text{OAc}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{S3}$ ,  $R^4 = \text{S2}$   
 Deacetylstichloroside A<sub>1</sub> (**SH16**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{S3}$ ,  $R^4 = \text{S2}$   
 Deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (**SH17**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{S4}$ ,  $R^4 = \text{S2}$

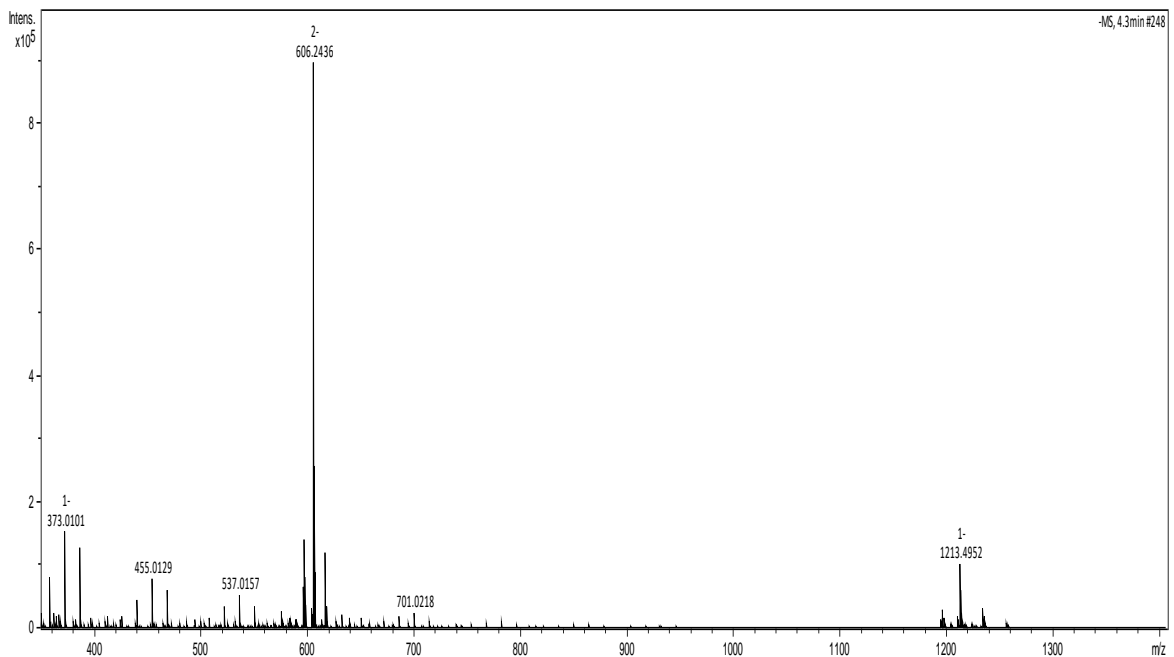
Hình 67. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *Stichopus horrens* (Các hợp chất mới: **SH1- SH4** và **SH9**. Các hợp chất phân lập lần đầu tiên từ thiên nhiên: **SH7, SH8, SH11** và **SH17**).

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

### 4.2.1. Hợp chất HE1: Holothurin A<sub>5</sub> (hợp chất mới)



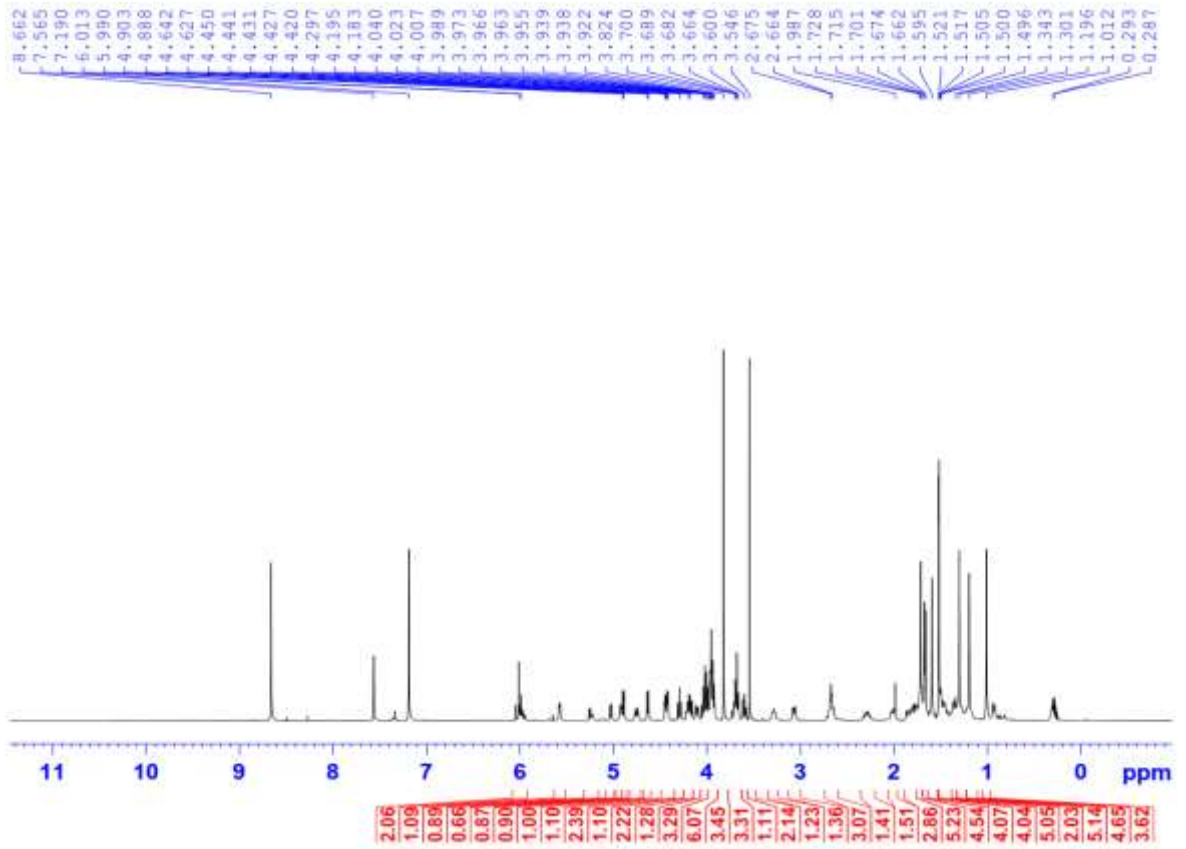
Hình 68. Cấu trúc hóa học của **HE1**.



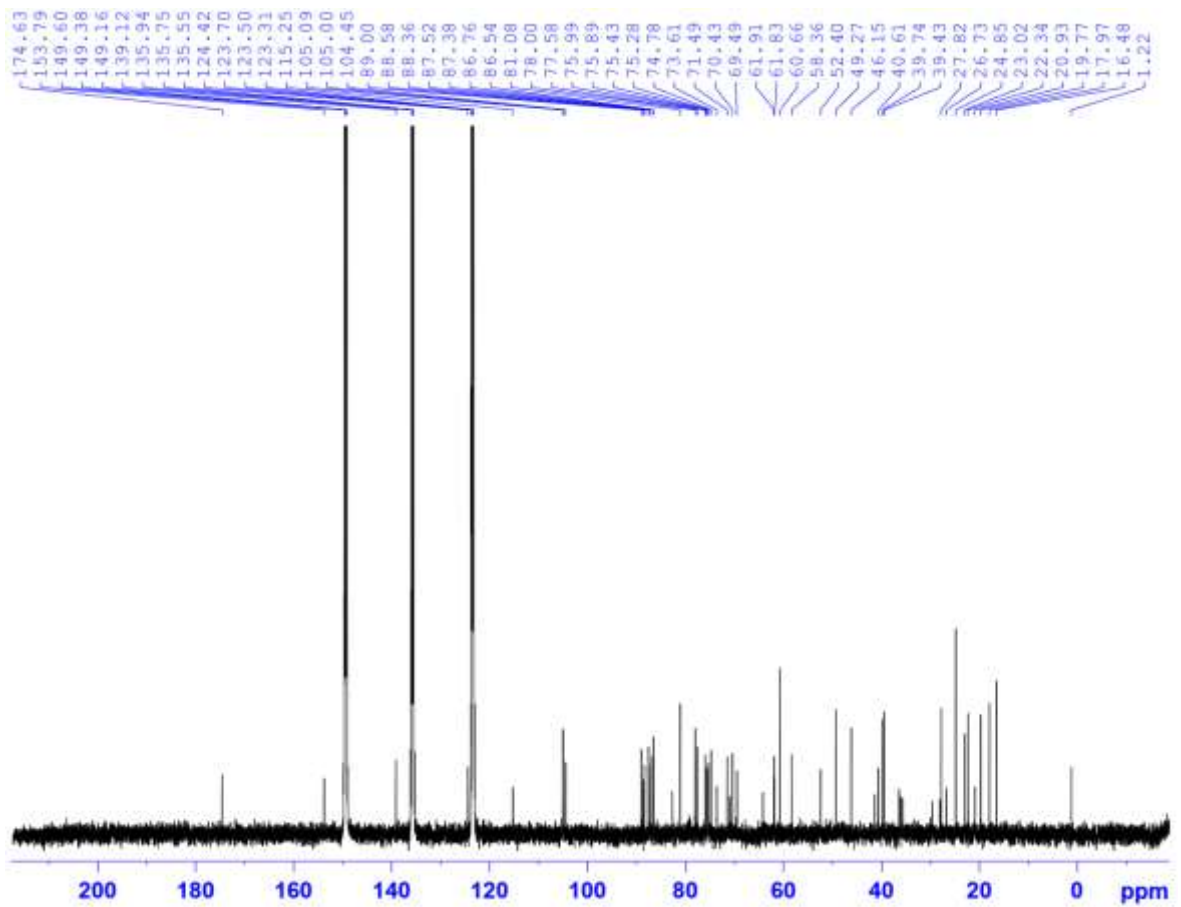
Hình 69. Phổ HR-ESI-MS của **HE1**.

Hợp chất **HE1** được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử của nó được xác định là  $C_{54}H_{85}NaO_{28}S$  với sự xuất hiện peak ion giả phân tử  $[M - Na]^-$  tại  $m/z$  1213,49521 trên phổ HR-ESI-MS (Hình 69) cũng như peak ion  $[M + Na]^+$  tại  $m/z$  1259 trên phổ ESI-MS. Phổ  $^1H$  NMR của **HE1** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của bốn proton anome [ $\delta_H$  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 [ $\delta_C$  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, 1D và 2D TOCSY (Hình 72-77) cho phép gán chính xác các số liệu phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của cả bốn gốc đường được tóm tắt ở ở Bảng 24.

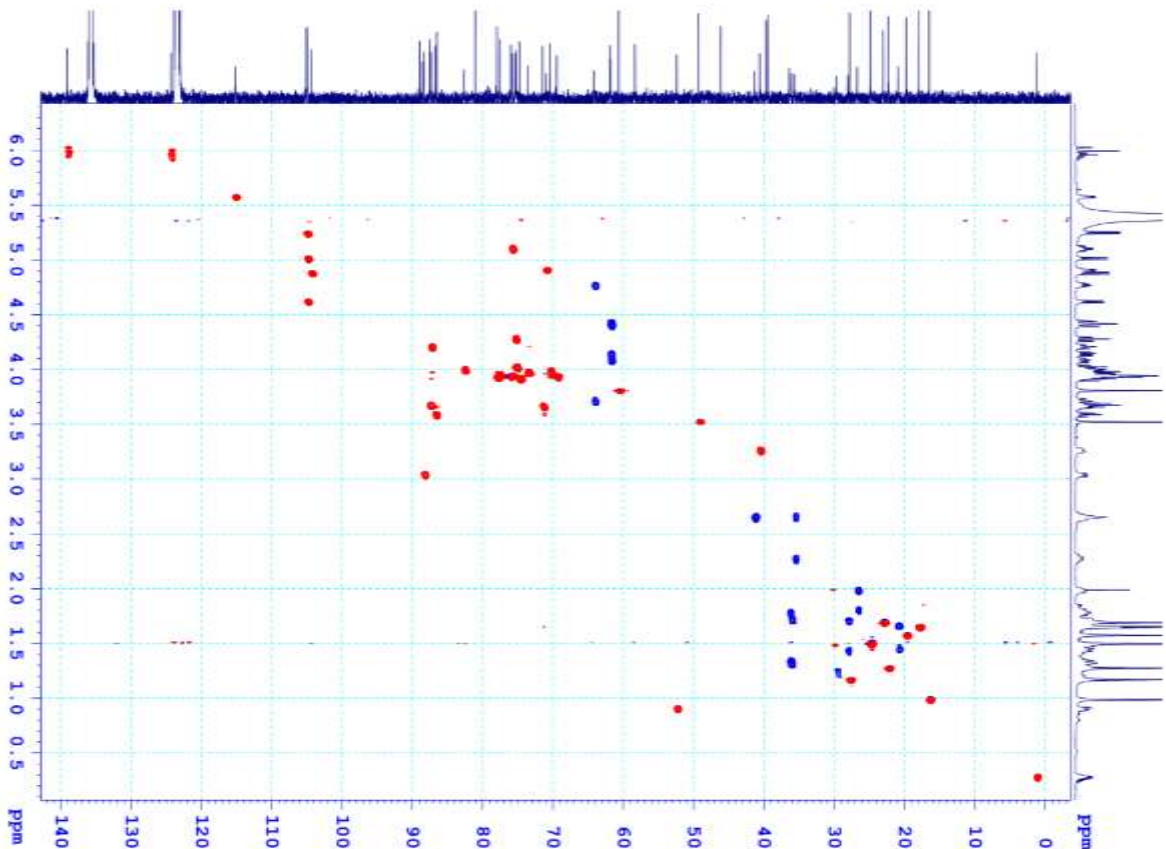




Hình 70. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của **HE1**.

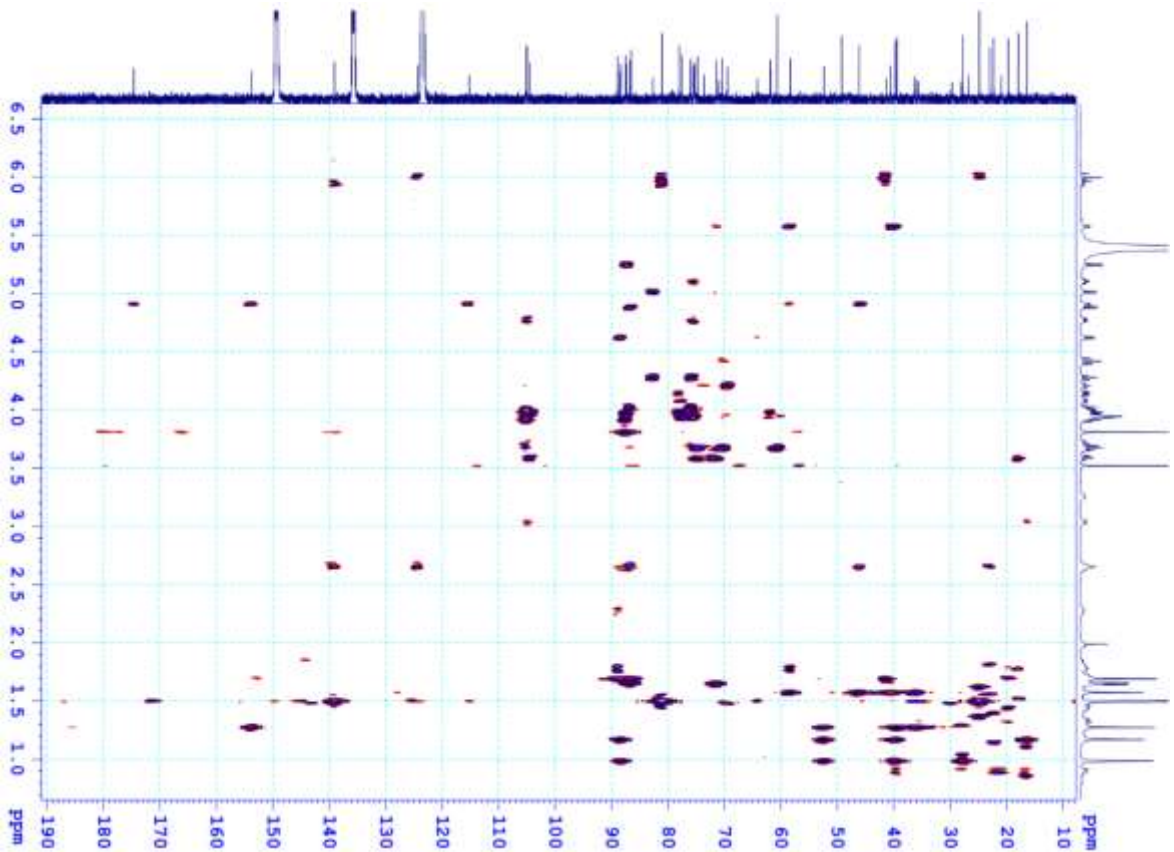


Hình 71. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **HE1**.

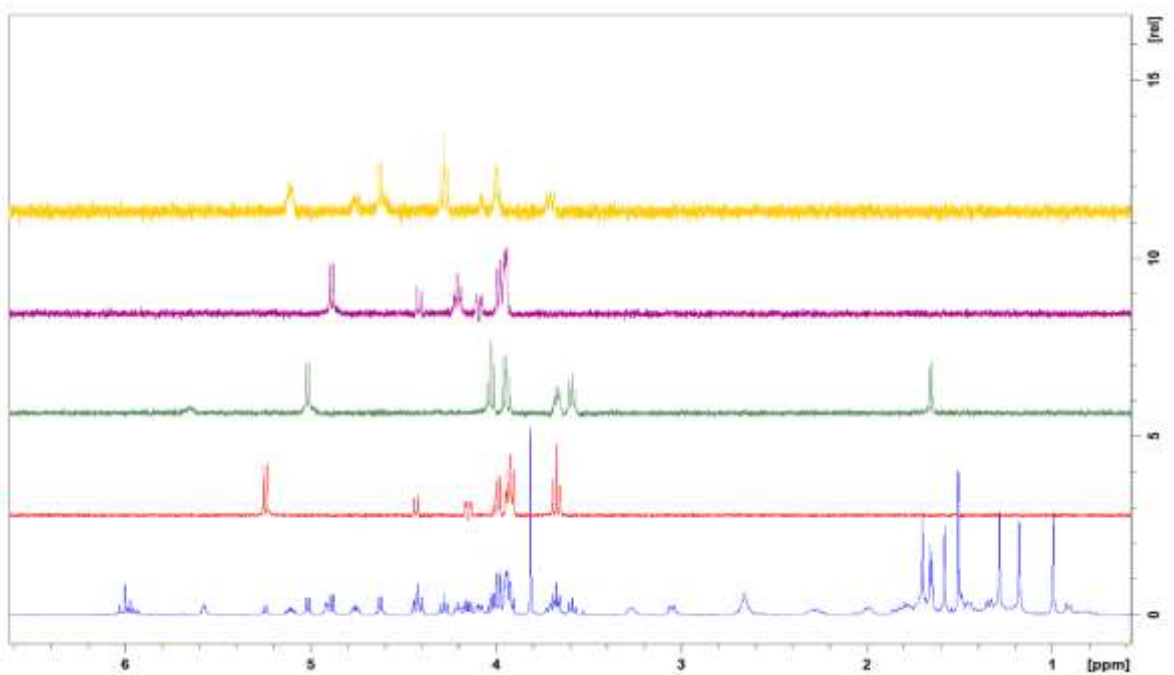


Hình 72. Phổ HSQC của **HE1**.

Các số liệu này tương tự như các số liệu của holothurin A<sub>2</sub> [130] và marmoroside C [131] cho phép dự đoán chuỗi đường là 3-*O*-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sodium sulfate- $\beta$ -D-xylopyranoside, một chuỗi đường rất phổ biến ở các loài hải sâm thuộc giống *Holothuria* [132]. Các tương tác HMBC của H-1''' với C-3'', H-1''' với C-4'' và H-1'' với C-2' cho phép xác định trình tự liên kết của các gốc đường. Ngoài ra, các số liệu phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR phần aglycone của **HE1** cũng tương tự như các số liệu của holothurin A<sub>2</sub> [130] ngoại trừ các thay đổi độ dịch chuyển hóa học liên quan đến phần mạch nhánh với sự xuất hiện của một nhóm methylene [ $\delta_C$  41,3 (C-22)/ $\delta_H$  2,64 (2H, m, H-22)], một liên kết đôi dạng *trans* bị thế hai vị trí [ $\delta_C$  124,4 (C-23)/ $\delta_H$  5,95 (1H, ddd,  $J = 6,5, 9,0, 15,5$  Hz, H-23) và  $\delta_C$  139,1 (C-24)/6,01 (1H, d,  $J = 15,5$  Hz, H-24)], một carbon bậc bốn mang oxy [ $\delta_C$  81,1 (C-25)] và hai nhóm *tert*-methyl [ $\delta_C$  24,8 (C-26 và C-27)/ $\delta_H$  1,49 (H<sub>3</sub>-26) và 1,50 (H<sub>3</sub>-27), mỗi tín hiệu 3H, s] ở **HE1**. Tín hiệu <sup>13</sup>C NMR tại vị trí C-25 bị dịch chuyển rất mạnh về phía vùng trường thấp ( $\delta_C$  81,1) khi so với tín hiệu tương ứng của leucospilotaside A ( $\delta_C$  69,0) [121] và holothurin B<sub>4</sub> ( $\delta_C$  69,5) [133], chứng minh cho sự có mặt của nhóm hydroperoxy tại C-25 [134]. Các tương tác 2D COSY của H-22/H-23/H-24 cùng với

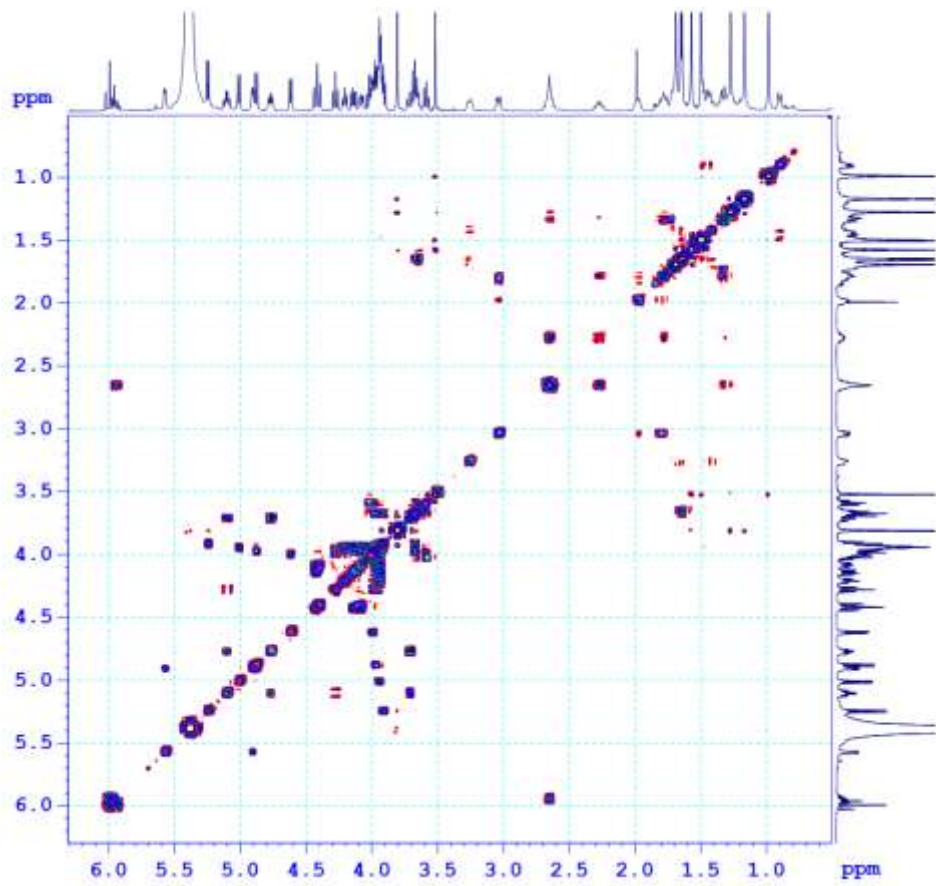
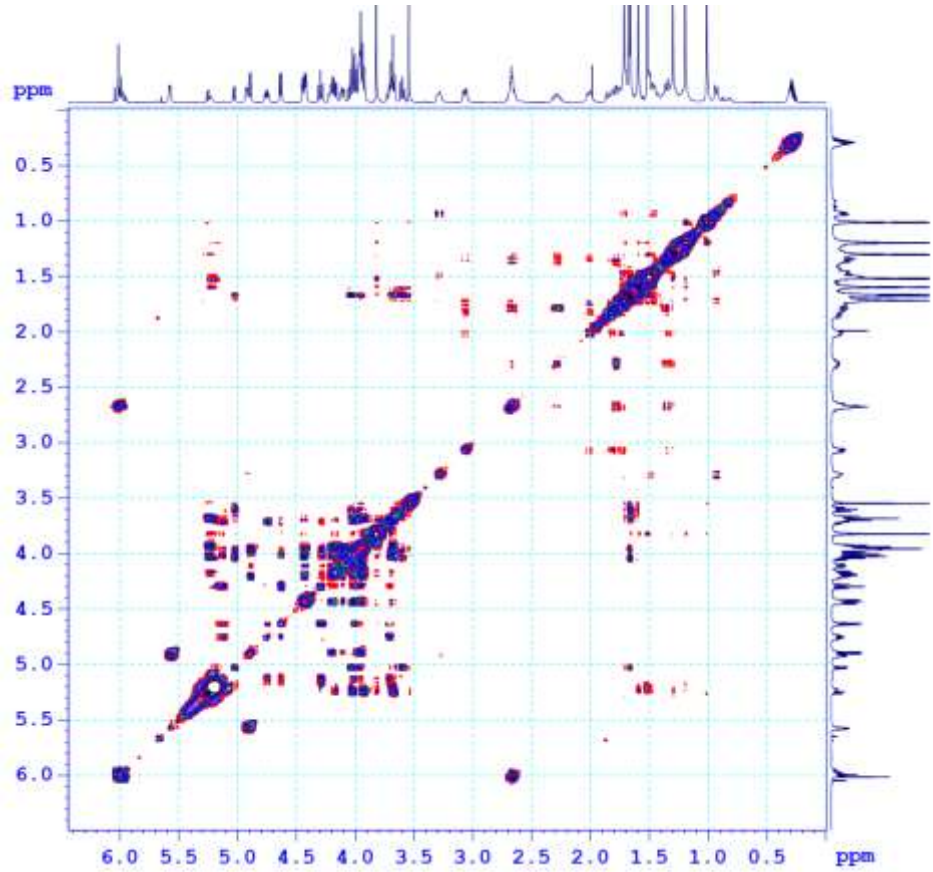


Hình 73. Phổ HMBC của **HE1**.

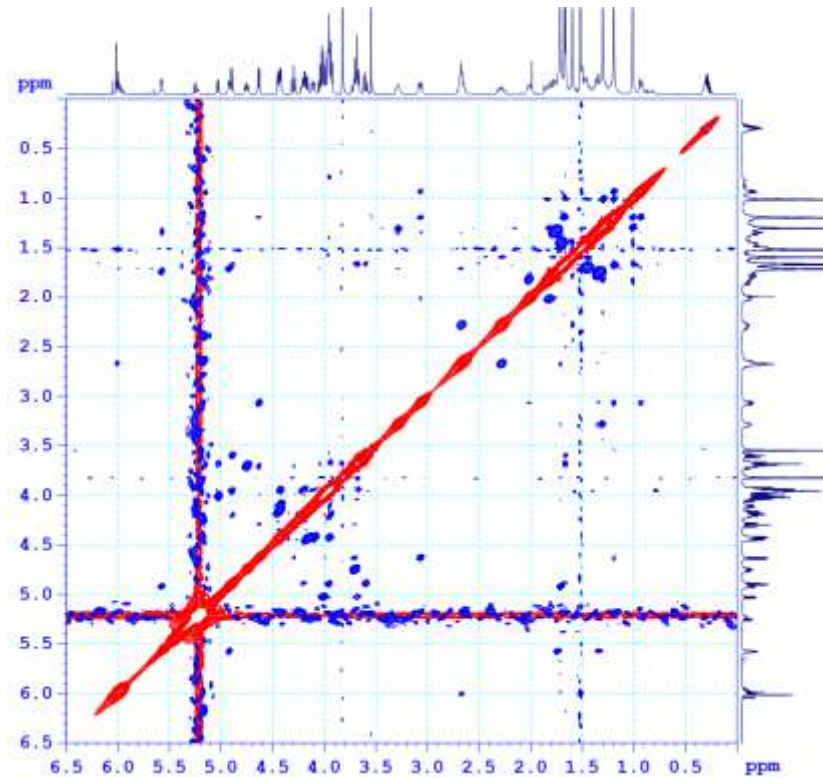


Hình 74. Phổ 1D TOCSY của **HE1**.

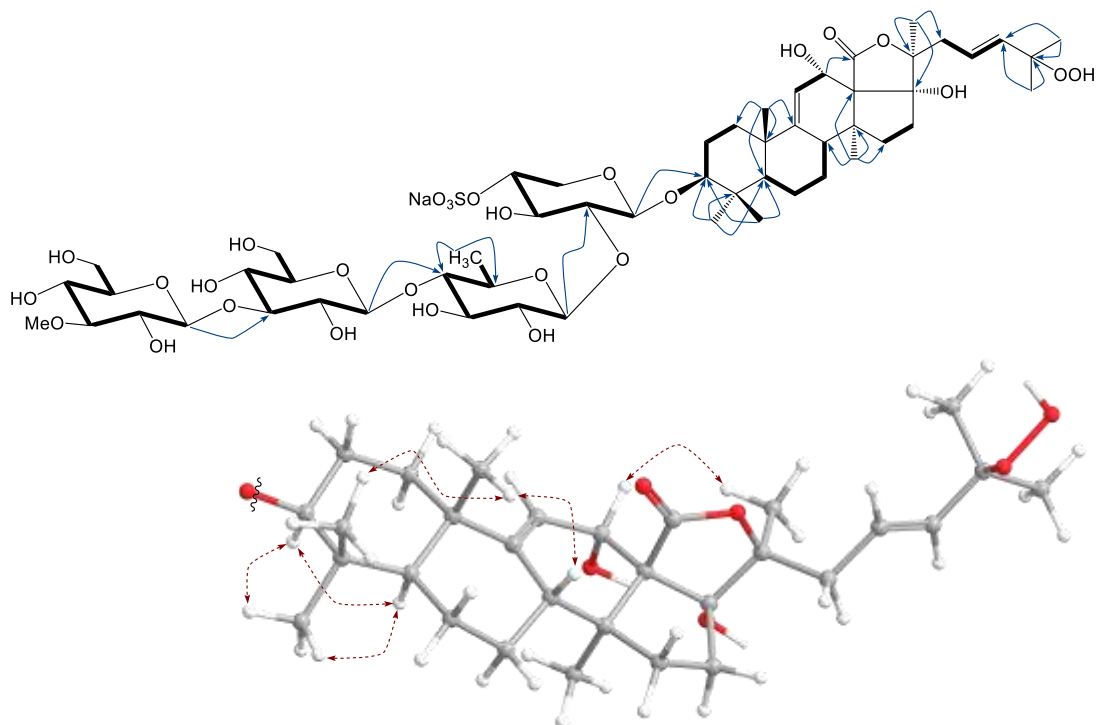
các tương tác HMBC của H<sub>3</sub>-21 với C-17, C-20 và C-22; H<sub>3</sub>-26 và H<sub>3</sub>-27 với C-24 và C-25 xác nhận chính xác cấu trúc mạch nhánh của **HE1**. Vị trí liên kết của chuỗi đường tại C-3 của aglycone được chứng minh bằng tương tác xa HMBC của  $\delta_{\text{H}}$  4,62 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1') với  $\delta_{\text{C}}$  88,4 (C-3).

Hình 75. Phổ COSY của **HE1**.Hình 76. Phổ 2D TOCSY của **HE1**





Hình 77. Phổ ROESY của **HE1**



Hình 78. Các tương tác COSY (—), HMBC (---) và ROESY (····) chính của **HE1**

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 2D ROESY (Hình 77-78). Tương tác giữa H-3 với H-5 và H<sub>3</sub>-31 và H-1' xác nhận cấu hình  $\alpha$  ở C-3. Ngoài ra, các tương tác giữa H<sub>3</sub>-19 với H<sub>3</sub>-30 cho phép phân định rõ ràng cùng phía và cấu hình  $\beta$  của các nhóm *tert*-methyl tại C-19 và C-30.

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

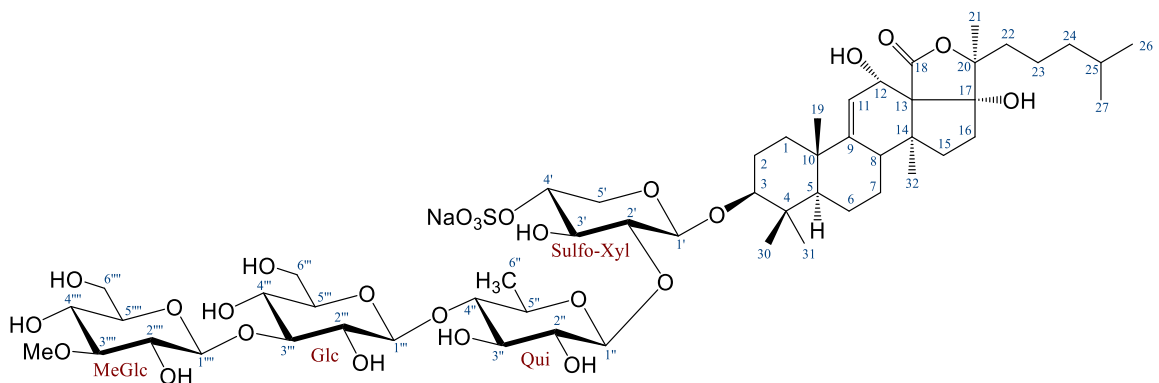
Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [131]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,5	36,1	1,30 m/1,71 m	
2	27,2	26,7	1,80 m/1,99 m	
3	88,8	88,4	3,04 dd (4,0, 11,5)	
4	40,1	39,7	-	
5	52,8	52,4	0,90 br d (11,0)	
6	21,3	20,9	1,45 m/1,66 m	
7	28,5	28,1	1,43 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)	
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''

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [131]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
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)	
OMe	61,0	60,7	3,81 s	3''''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của marmoroside C [131], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Như vậy, cấu trúc hóa học của hợp chất **HE1** được xác định là 3β-*O*-[3-*O*-methyl-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-quinovopyranosyl-(1→2)-4-*O*-sodiumsulfate-β-D-xylopyranosyl]-25-hydroperoxyholost-9(11), 23*E*-diene-12α,17α-diol. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là holothurin A<sub>5</sub> (Hình 68). 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.

#### 4.2.2. Hợp chất HE2: Holothurin A<sub>2</sub>



Hình 79. Cấu trúc hóa học của **HE2**.

Hợp chất **HE2** (chất dạng bột, màu trắng) được tinh chế bởi sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp. Kiểm tra các phổ 1D và 2D NMR của **HE2** (Hình S67-S71 trong phần Phụ lục) cho thấy các tín hiệu cộng hưởng của chuỗi đường từ C-1 đến C-23 trùng với các tín hiệu của chuỗi đường trong **HE1** và các tín hiệu đặc trưng

cho hai nhóm oxymethine [ $\delta_{H/C}$  3,05 (1H, dd,  $J = 3,5$  11,5 Hz, H-3)/88,4 (C-3) và 4,95 (1H, d,  $J = 5,0$  Hz, H-12)/71,1 (C-12)]. Tín hiệu proton của một nhóm oxymethine tại C-12 dựa trên tương quan với phổ HSQC tại  $\delta_H$  4,95 (1H, d,  $J = 5,0$  Hz, H-12), gợi ý cấu hình  $\alpha$  của nhóm hydroxy. Sự tương đồng từ C-1 đến C-21 trong phần aglycone của **HE2** và **HE1**, ngoại trừ có sự khác nhau lớn ở các tín hiệu của phần mạch nhánh (từ vị trí C-22 đến C-27). So sánh số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của **HE2** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 25), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D COSY, HMBC chứng minh hợp chất này là holothurin A<sub>2</sub> [130].

Bảng 25. Số liệu phổ NMR của **HE2** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_C$ [130]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,6	36,2	1,33 m/1,74 m	
2	27,1	26,8	1,82 m/2,00 m	
3	88,6	88,4	3,05 dd (3,5 11,5)	
4	40,0	39,5	-	
5	52,7	52,4	0,92 d (10,0)	
6	21,2	21,0	1,46 m/1,67 m	
7	28,0	28,1	1,47 m/1,73 m	
8	40,0	40,7	3,30 m	
9	153,9	153,8	-	
10	39,7	39,8	-	
11	115,5	115,4	5,59 br d (4,5)	
12	71,5	71,1	4,95 d (5,0)	18
13	58,6	58,5	-	
14	46,4	46,2	-	
15	38,9	36,5	1,36 m/1,82 m	
16	36,0	35,6	2,30 m/2,62 dd (10,0, 14,5)	
17	89,3	89,0	-	
18	174,8	174,8	-	
19	22,5	22,4	1,30 s	1, 5, 9, 10
20	87,2	87,1	-	
21	23,0	22,8	1,71 s	17, 20, 22
22	36,6	38,7	1,80 m	
23	22,2	22,1	1,45 m/1,56 m	
24	39,7	39,5	1,10 dd (7,5, 15,0)	
25	28,0	27,8	1,43 m	
26	22,6	22,5	0,80 d (6,5)	24, 25, 27
27	22,6	22,6	0,81 d (6,5)	24, 25, 26
30	16,7	16,5	1,00 s	3, 4, 5, 31
31	28,0	27,8	1,18 s	3, 4, 5, 30



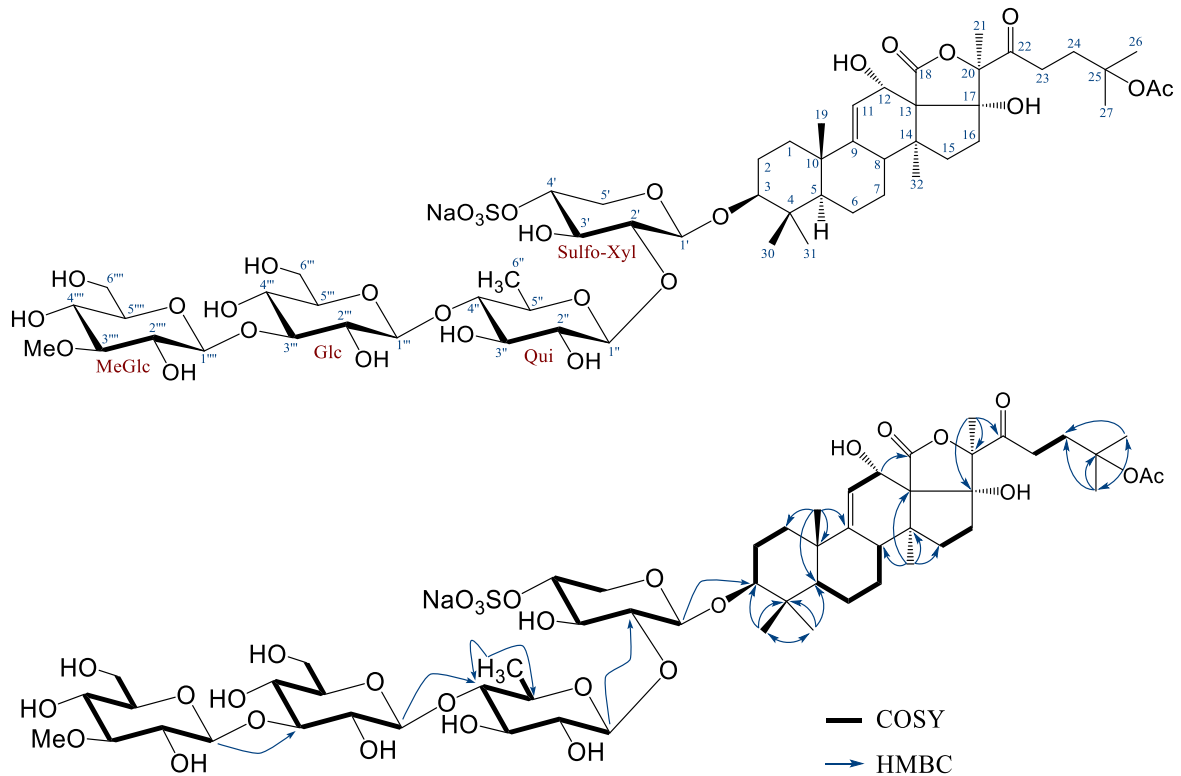
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [130]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
32	20,1	19,9	1,62 s	8, 13, 14, 15
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,1	105,0	4,63 d (7,5)	3
2'	83,0	82,8	3,98*	
3'	76,2	75,3	4,27 t (9,0)	
4'	75,4	75,8	5,10 m	
5'	63,9	64,1	3,70 dd (11,0, 11,5) 4,75 dd (5,0, 11,5)	
<i>Qui</i>				
1''	105,1	105,0	5,01 d (7,5)	2'
2''	76,2	76,0	3,94*	
3''	75,6	75,3	4,02*	
4''	87,0	86,8	3,59 t (9,0)	
5''	71,7	71,6	3,67*	
6''	18,1	18,0	1,66 d (6,0)	4'', 5''
<i>Glc</i>				
1'''	104,6	104,6	4,89 d (7,5)	4''
2'''	73,9	73,7	3,97*	
3'''	88,2	87,5	4,22 t (9,0)	
4'''	69,9	69,5	3,95*	
5'''	77,7	77,6	3,96*	
6'''	62,4	61,9	4,10 dd (5,5, 12,0) 4,42 br d (12,0)	
<i>OMe-Glc</i>				
1''''	105,4	105,2	5,26 d (8,0)	3'''
2''''	74,9	74,8	3,92*	
3''''	87,7	87,6	3,66*	
4''''	70,8	70,5	4,00*	
5''''	78,0	78,1	3,93*	
6''''	62,4	61,9	4,16 dd (5,5, 12,0) 4,44 dd (2,0, 12,0)	
3''''-OMe	60,4	60,6	3,81 s	3'''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của holothurin A<sub>2</sub> [130], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.2.3. Hợp chất HE3: Marmoroside C

Hợp chất **HE3** cũng được phân lập dưới dạng chất bột, màu trắng. Phân tích các phổ 1D và 2D NMR cho thấy phần tetracyclic triterpene của **HE3** (Hình S72-S76 trong phần Phụ lục) tương tự như của **HE1** và **HE2**, đặc biệt là độ dịch chuyển hóa học của carbon từ C-1 đến C-18. Tuy nhiên, sự khác biệt của các tín hiệu cộng hưởng NMR phần mạch nhánh aglycone của cấu trúc của **HE3** bao gồm δ<sub>C</sub> 207,8 (C-22), 81,2 (C-25), 170,4 (C=O) và 22,0 (-OAc). Những thông tin quan sát ở trên gợi ý sự

xuất hiện của một nhóm ketone tại C-22 và một nhóm acetyl tại C-25. Xác nhận các vị trí của phân mạch nhánh đầy đủ dựa trên phân tích các phổ 2D NMR (COSY, HSQC và HMBC). Cuối cùng, cẩn thận so sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **HE3** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 26), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ COSY, HMBC chứng minh hợp chất này là marmoroside C [131] (Hình 80).



Hình 80. Cấu trúc hóa học của **HE3** và các tương tác COSY, HMBC chính.

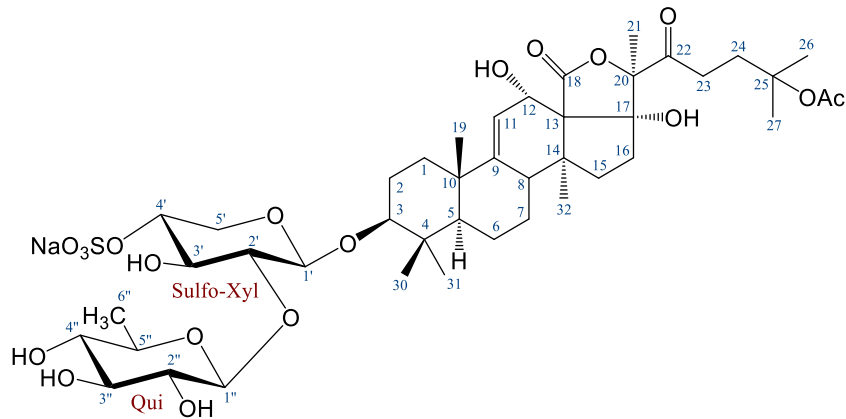
Bảng 26. Số liệu phổ NMR của **HE3** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_{\text{C}}$ [131]	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,5	36,1	1,30 m/1,73 m	
2	27,2	26,7	1,79 m/1,98 m	
3	88,8	88,3	3,03 dd (4,0, 12,0)	
4	40,1	39,7	-	
5	52,8	52,3	0,98 d (10,5)	
6	21,3	20,9	1,41 m/1,67 m	
7	28,5	28,1	1,41 m/1,67 m	
8	41,0	40,6	3,20 m	
9	154,4	153,9	-	
10	39,9	39,5	-	
11	115,4	114,9	5,58 br d (5,0)	
12	71,0	70,6	4,91 br d (5,0)	18
13	58,7	58,3	-	
14	46,4	46,0	-	
15	36,9	36,4	1,30 m/1,73 m	

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [131]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
16	39,2	38,7	2,09 dd (9,5, 14,5)/2,40 m	
17	87,5	87,0	-	
18	173,7	173,5	-	
19	22,7	22,3	1,26 s	1, 5, 9, 10
20	92,4	92,1	-	
21	21,5	21,1	1,86	17, 20, 22
22	208,0	207,8	-	
23	34,1	33,6	3,02 m/2,98 m	
24	34,7	34,2	2,25 m	
25	81,4	81,2	-	
26	26,2	25,8	1,46 s	24, 25, 27
27	26,1	25,7	1,44 s	24, 25, 26
30	28,2	27,8	1,16 s	3, 4, 5, 31
31	16,9	16,5	0,98 s	3, 4, 5, 30
32	20,0	19,6	1,55 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O	170,4	170,4	-	
Me	22,4	22,0	1,94 s	C=O
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,4	105,0	4,62 d (7,5)	3
2'	83,5	82,7	3,98*	
3'	75,4	75,3	4,27 t (9,0)	
4'	76,5	75,9	5,09 m	
5'	64,4	64,1	4,76 dd (5,0, 11,5) 3,71 dd (10,0, 11,5)	
<i>Qui</i>				
1"	105,6	105,0	5,00 d (7,5)	2'
2"	75,6	75,9	4,94*	
3"	75,9	75,2	4,02 t (9,0)	
4"	86,8	86,7	3,58 t (9,0)	
5"	72,1	71,5	3,65*	
6"	18,2	17,9	1,65 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*	
3'''	88,1	87,4	4,20 t (9,0)	
4'''	69,6	69,5	3,94*	
5'''	77,8	77,6	3,93*	
6'''	61,9	61,8	4,08 dd (5,0, 12,0) 4,40 br d (12,0)	
<i>OMe-Glc</i>				
1''''	106,0	105,1	5,24 d (8,0)	3'''
2''''	75,1	74,7	3,91*	
3''''	88,1	87,5	3,66*	
4''''	70,7	70,4	3,97*	
5''''	78,4	77,9	3,93*	
6''''	62,2	61,9	4,13 dd (6,0, 12,0) 4,42 dd (2,0, 12,0)	
3''''-OMe	61,0	60,6	3,80 s	3'''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của marmoroside C [131], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.2.4. Hợp chất HE4: Moebioside A



Hình 81. Cấu trúc hóa học của **HE4**.

Hợp chất **HE4** cũng được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên các phổ 1D và 2D NMR của **HE4** cho thấy tín hiệu của một nhóm ketone [ $\delta_C$  208,0 (C-22)], một nhóm carbonyl lactone [ $\delta_C$  173,5 (C-18)], một liên kết olefinic [ $\delta_C$  154,1 (C-9)/ $\delta_C$  115,0 (C-11)], bảy nhóm *tert*-methyl và một doublet của một nhóm oxymethine gợi ý phần aglycone của **HE4** có bộ khung cấu trúc holostane triterpene với 9(11)-en-12-ol. Ngoài tín hiệu chính của phần holostane aglycone, tín hiệu của hai anome thuộc hai gốc đường [ $\delta_H$  4,64 (1H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-1')/ $\delta_C$  104,8 (C-1') và 4,98 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1'')/ $\delta_C$  105,2 (C-1'')] cũng được quan sát trên các phổ NMR của **HE4**. Cấu hình 12 $\alpha$ -OH được xác nhận bởi tương tác  $\delta_H$  4,87 (H<sub>2</sub>-12) với 1,85 (H<sub>3</sub>-21) trong phổ 2D ROESY và hằng số tương tác  $J_{H-12/H-11} = 5,5$  Hz.

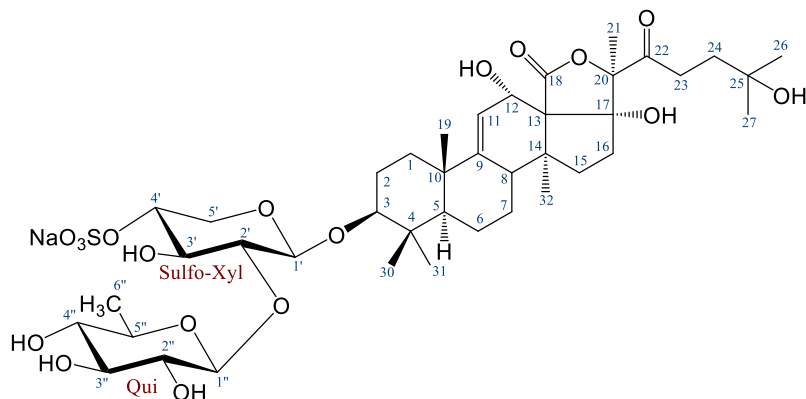
Các tín hiệu NMR liên quan với gốc aglycone được sử dụng các phổ thực nghiệm 2D COSY, HMQC và HMBC (Bảng 27). Những dữ liệu phổ này gần giống với những gì được quan sát thấy đối với **HE3**, ngoại trừ không còn xuất hiện các tín hiệu của hai gốc đường glucose. Cấu hình D-glycosidic của hai gốc đường tham khảo các glycoside thường gặp nhất trong các loài hải sâm. So sánh số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của **HE4** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 27), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC và COSY (Hình S80-S81 trong phần Phụ lục) chứng minh hợp chất này là moebioside A [135, 136] (Hình 81).

Bảng 27. Số liệu phổ NMR của **HE4** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [136]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,7	36,2	1,35 m/1,75 m	
2	27,4	26,7	1,80 m/1,98 m	
3	89,0	88,4	3,08 dd (4,5, 11,5)	
4	40,4	39,8	-	
5	53,0	52,6	0,92 br d (10,0)	
6	21,4	20,9	1,44 m/1,65 m	
7	28,7	28,1	1,44 m/1,69 m	
8	41,2	40,8	3,19 m	
9	154,6	154,1	-	
10	40,1	39,6	-	
11	115,6	115,0	5,57 dd (1,5, 5,5)	
12	71,3	70,8	4,87 dd (1,5, 5,5)	18
13	58,9	58,6	-	
14	46,6	46,1	-	
15	37,1	36,5	1,33 m/1,77 m	17
16	39,3	38,8	2,07 dd (10,0, 5,0)/2,38 m	
17	92,6	87,2	-	
18	173,9	173,5	-	
19	22,9	22,3	1,24 s	1, 5, 9, 10
20	87,7	92,1	-	
21	21,7	21,1	1,85 s	17, 20, 22
22	209,3	208,0	-	
23	34,3	33,7	2,87 m/2,96 m	
24	34,9	34,5	2,22 m	
25	81,6	81,5	-	
26	26,3	25,8	1,46 s	24, 25, 27
27	26,2	25,8	1,47 s	24, 25, 26
30	28,3	27,9	1,14 s	3, 4, 5, 31
31	17,1	16,5	1,01 s	3, 4, 5, 30
32	17,1	19,5	1,52 s	8, 13, 14, 15
<i>OAc</i>				
C=O	170,6	170,5	-	
Me	22,5	21,9	1,95 s	C=O
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,7	104,8	4,64 d (7,0)	3
2'	83,7	82,3	3,97*	
3'	76,0	75,1	4,24 t (9,0)	
4'	76,4	76,1	4,97 m	
5'	64,7	63,9	3,70 dd (9,5, 12,0)	
			4,64 dd (5,0, 12,0)	
<i>Qui</i>				
1"	106,3	105,2	4,98 d (8,0)	2'
2"	77,3	76,4	3,84 dd (8,0, 9,0)	
3"	78,1	77,1	3,96*	
4"	77,0	76,3	3,55 t (9,0)	
5"	73,8	72,9	3,62 m	
6"	19,0	18,1	1,52 d (7,0)	4", 5"

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của moebioside A [136], <sup>b</sup>đo trong pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.2.5. Hợp chất HE5: Leucospilotaside A



Hình 82. Cấu trúc hóa học của HE5.

Hợp chất **HE5** được tinh chế dưới dạng chất bột, màu trắng. Quan sát trên các phổ 1D NMR và được hỗ trợ bởi các phổ 2D NMR cho thấy **HE5** cũng có cấu trúc điển hình của các loài hải sâm holotane diglycoside (Hình S82-S86 trong phần Phụ lục). Cụ thể, trên phổ  $^{13}\text{C}$  NMR và HSQC xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 41 carbon bao gồm một nhóm ketone [ $\delta_{\text{C}}$  209,0 (C-22)], một nhóm carbonyl lactone [ $\delta_{\text{C}}$  173,5 (C-18)], một liên kết olefinic [ $\delta_{\text{C}}$  153,9 (C-9)/115,0 (C-11)], bảy nhóm *tert*-methyl và một doublet của một nhóm oxymethine.

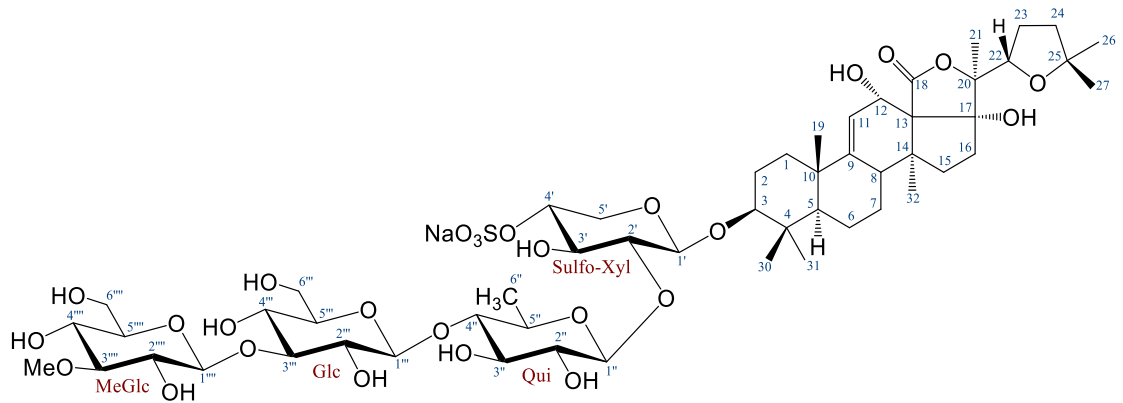
Chi tiết phân tích các phổ NMR của **HE5** gợi ý các số liệu NMR của **HE5** và **HE4**, tương tự nhau, điển hình là độ chuyển dịch hóa học ở các vị trí C-1–C-24 và C-30–C-32 và có cùng khung cấu trúc phổ biến 12 $\alpha$ -hydroxy-9(11)-en holotane diglycoside trong các loài hải sâm. Tuy nhiên, sự khác nhau giữa hai hợp chất trên được quan sát liên quan đến mạch nhánh của phần aglycone **HE5** [ $\delta_{\text{C}}$  68,7 (C-25), 29,3 (C-26) và 29,7 (C-27)] và **HE4** [ $\delta_{\text{C}}$  81,5 (C-25), 25,8 (C-26) và 25,8 (C-27)]. Sự khác nhau rõ nhất được quan sát bởi các tín hiệu cộng hưởng trên phổ  $^{13}\text{C}$  NMR từ vị trí C-25 đến C-27 và nhóm acetyl không còn xuất hiện trong cấu trúc của **HE5**. Những dữ kiện NMR được phân tích cho phép dự đoán cấu trúc phần aglycone của **HE5** dạng 9(11)-holostene-3 $\beta$ ,12 $\alpha$ ,25-triol. Sự vắng mặt của một nhóm acetyl liên kết ở vị trí C-25 trong cấu trúc của **HE5** đã được xác nhận trên cơ sở căn thận phân tích các phổ 2D HMBC và COSY (Hình S85-S86 trong phần Phụ lục). Kết hợp với so sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **HE5** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 28) và phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D COSY, HMBC và ROESY chứng minh được cấu trúc của hợp chất này đã được báo cáo trước đó và có tên là leucospilotaside A [121] (Hình 82).

Bảng 28. Số liệu phổ NMR của **HE5** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [121]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,5	36,1	1,30 m/1,70 m	
2	27,0	26,7	1,81 m/1,98 m	
3	88,7	88,4	3,05 dd (4,5, 12,0)	
4	40,1	39,8	-	
5	52,8	52,4	0,90 br d (10,5)	
6	21,2	20,9	1,45 m/1,63 m	
7	28,4	28,1	1,38 m/1,73 m	
8	40,9	40,6	3,19 dd (5,5, 10,5)	
9	154,3	153,9	-	
10	39,8	39,5	-	
11	115,3	115,0	5,56 br d (5,0)	
12	71,1	70,6	4,90 br d (5,0)	18
13	58,7	58,3	-	
14	46,3	46,0	-	
15	36,8	36,5	1,28 m/1,69 m	17
16	37,6	38,7	2,12 m/2,37 m	
17	92,4	87,1	-	
18	173,7	173,5	-	
19	22,6	22,3	1,27 s	1, 5, 9, 10
20	87,6	92,1	-	
21	21,5	21,2	1,85 s	17, 20, 22
22	209,2	209,0	-	
23	34,8	34,5	3,14 m/3,18 m	
24	39,5	37,2	2,04 m/2,12 m	
25	69,0	68,7	-	
26	30,0	29,3	1,36 s	24, 25, 27
27	29,7	29,7	1,37 s	24, 25, 26
30	16,8	27,8	1,19 s	3, 4, 5, 31
31	28,2	16,5	1,04 s	3, 4, 5, 30
32	18,6	19,6	1,54 s	8, 13, 14, 15
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,2	105,1	4,64 d (7,0)	3
2'	83,1	82,8	4,03 dd (7,0, 9,0)	
3'	75,5	75,3	4,29 t (9,0)	
4'	76,9	75,9	5,12 m	
5'	64,2	64,1	3,72 dd (9,5, 11,5) 4,76 dd (5,0, 11,5)	
<i>Qui</i>				
1''	105,8	105,6	5,06 d (8,0)	2'
2''	77,7	76,7	3,98 dd (8,0, 9,0)	
3''	76,7	77,2	4,08 t (9,0)	
4''	76,1	76,4	3,65*	
5''	73,4	73,1	3,67*	
6''	19,9	18,4	1,58 d (6,0)	4'', 5''

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của leucospilotaside A [121], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

#### 4.2.6. Hợp chất HE6: *Holothurin A*



Hình 83. Cấu trúc hóa học của **HE6**.

Bảng 29. Số liệu phổ NMR của **HE6** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_C$ [137]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,4	36,6	1,30 m/1,78 m	
2	27,1	26,7	1,80 m/1,98 m	
3	88,8	88,5	3,08 dd (4,0, 11,5)	
4	40,0	39,5	-	
5	52,8	52,6	0,93 dd (2,0, 11,5)	
6	21,2	21,0	1,46 m/1,66 m	
7	28,4	28,1	1,45 m/1,75 m	
8	41,0	40,8	3,25 m	
9	153,8	153,8	-	
10	39,7	39,8	-	
11	115,6	115,3	5,57 dd (2,0, 5,5)	
12	71,6	71,4	4,86 dd (1,5, 5,5)	18
13	58,9	58,9	-	
14	45,9	45,8	-	
15	36,9	36,3	1,38 m/1,76 m	17
16	35,6	35,3	2,30 m/2,89 dd (9,0, 15,0)	
17	89,8	89,5	-	
18	174,5	174,5	-	
19	22,5	22,3	1,27 s	1, 5, 9, 10
20	86,7	86,7	-	
21	18,9	18,7	1,67 s	17, 20, 22
22	80,7	80,5	4,28	
23	28,2	27,9	2,00 m	
24	38,5	38,3	1,65 m	
25	81,4	81,4	-	
26	28,7	28,4	1,22 s	24, 25, 27
27	27,5	27,2	1,18 s	24, 25, 26
30	16,7	16,5	0,99 s	3, 4, 5, 31



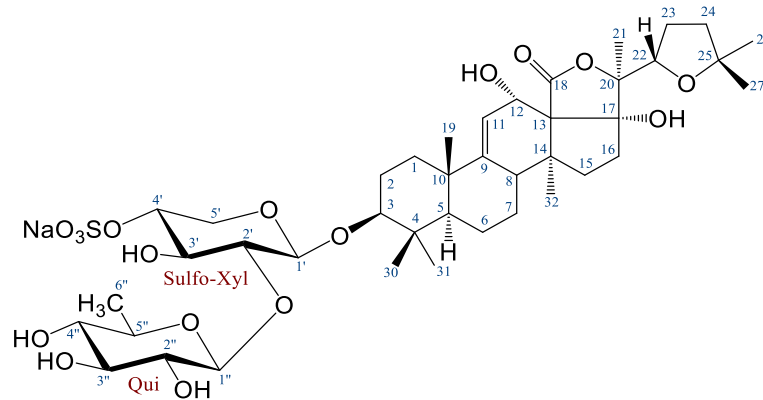
Vị trí	<sup>a</sup> δ <sub>C</sub> [137]	δ <sub>C</sub> <sup>b,c</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b,d</sup> dạng peak ( <i>J</i> = Hz)	HMBC
31	28,1	28,0	1,16 s	3, 4, 5, 30
32	20,3	19,9	1,55 s	8, 13, 14, 15
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	105,1	104,8	4,63 d (7,0)	3
2'	83,3	82,4	3,94*	
3'	75,2	75,1	4,22 t (9,0)	
4'	76,3	76,1	4,95 m	
5'	64,1	63,9	3,69 dd (9,0, 12,0)/4,63*	
<i>Qui</i>				
1"	105,4	104,8	4,94 d (8,0)	2'
2"	75,3	75,8	3,83*	
3"	75,9	75,3	3,94*	
4"	86,5	86,5	3,52 t (9,0)	
5"	72,0	71,5	3,63*	
6"	18,0	17,9	1,60 d (6,0)	4", 5"
<i>Glc</i>				
1'''	104,7	104,2	4,82 d (7,5)	
2'''	74,1	73,6	3,99*	
3'''	87,9	87,6	4,07*	
4'''	69,5	69,6	3,84*	
5'''	77,5	77,4	3,84*	
6'''	61,8	61,9	4,00*/4,28*	
<i>OMe-Glc</i>				
1''''	105,8	104,9	5,10 d (8,0)	
2''''	74,9	74,6	3,84*	
3''''	87,9	87,2	3,60*	
4''''	70,7	70,5	3,88*	
5''''	78,2	77,8	3,84*	
6''''	62,2	62,0	4,04*/4,32*	
3''''-OMe	60,7	60,3	3,77 s	

<sup>a</sup>δ<sub>C</sub> của holothurin A [137], <sup>b</sup>đo trong pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Hợp chất **HE6** cũng được phân lập dưới dạng bột, màu trắng. Các phổ NMR của **HE6** chứng minh đây là một triterpene saponin có chứa bốn gốc đường trong cấu trúc. Tham khảo số liệu phổ NMR của **HE6** với marmoroside C (**HE3**) nhận thấy cả hai hợp chất này có cùng chuỗi tetrasaccharide và khung holotane aglycone tương đồng cao, tuy nhiên có sự khác nhau về độ dịch chuyển hóa học liên quan đến phần mạch nhánh (xuất hiện cầu 22,25-epoxy). Các tín hiệu <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của phần aglycone trong **HE6** (Hình **S87-S88** trong phần Phụ lục) được xác định dựa vào các phổ 2D NMR, những thông tin này gợi ý sự xuất hiện dạng cấu trúc của 22,25-epoxy-

9(11)-holostene-3 $\beta$ ,12 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -triol. So sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **HE5** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 29), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC và COSY (Hình S90-S91 trong phần Phụ lục) chứng minh hợp chất này là holothurin A [58, 73, 137]. Hợp chất này cũng được phát hiện từ hai loài hải sâm *H. impatiens* và *H. whitmaei*.

#### 4.2.7. Hợp chất **HE7**: **Holothurin B**



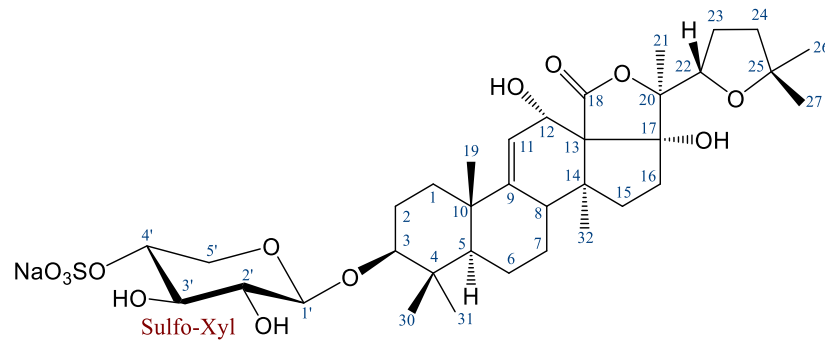
Hình 84. Cấu trúc hóa học của **HE7**.

Hợp chất **HE7** được tìm thấy dưới dạng bột, màu trắng. Các phổ 1D và 2D NMR của **HE7** (Hình S92-S95 trong phần Phụ lục) cho thấy hợp chất này là một triterpene saponin có chứa hai gốc đường [ $\delta_{\text{C/H}}$  105,0 (C-1')/4,73 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1') và 105,4 (C-1'')/5,13 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1'')]. Xem xét các tín hiệu cộng hưởng trên phổ  $^{13}\text{C}$  NMR và HSQC cho thấy phần aglycone có sự tương đồng với **HE6** liên quan đến một cầu 22,25-epoxy [ $\delta_{\text{C}}$  81,3 (C-25)/28,4 (C-26)], một carbonyl lactone [ $\delta_{\text{C}}$  174,5 (C-18)], một liên kết olefinic [ $\delta_{\text{C}}$  153,6 (C-9)/115,1 (C-11)], bảy nhóm *tert*-methyl và một doublet của một nhóm oxymethine. Rõ ràng các số liệu phổ NMR phần aglycone của **HE7** gần như trùng khớp với **HE6** (Bảng 30). Sự khác biệt thể hiện giữa hai hợp chất chỉ nằm ở các tín hiệu vùng đường với sự mất đi các tín hiệu của hai gốc đường glucose. Điều này cho phép dự đoán **HE7** có liên quan với holothurin B. So sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của **HE7** với các số liệu tương ứng đã được công bố là holothurin B [59, 73] cho thấy nhóm tác giả trước đó đã có sự nhầm lẫn việc gán tín hiệu của hai nhóm *tert*-methyl tại vị trí C-19 và C-32 (Bảng 30). Kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC cho phép khẳng định hợp chất này là holothurin B [59, 73]. Hợp chất này cũng được phân tách từ một số loài hải sâm như *H. impatiens*, *H. whitmaei* và giống *Actinopyga* và *Pearsonothuria*.

Bảng 30. Số liệu phổ NMR của **HE7** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	<sup>a</sup> $\delta_C$ [138]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,5	36,0	1,39 m/1,80 m	
2	27,0	26,7	1,90 m/2,06 m	
3	88,6	83,3	3,12 m	
4	40,0	39,7	-	
5	52,8	52,3	0,98 m	
6	21,3	20,9	1,53 m/1,74 m	
7	28,3	27,8	1,55 m/1,80 m	
8	40,9	40,6	3,34 m	
9	153,6	153,6	-	
10	39,8	39,4	-	
11	115,4	115,1	5,68 br d (4,0)	10, 12, 13, 14
12	71,6	71,1	4,40 br s	10, 11, 18
13	58,9	58,5	-	
14	46,0	45,5	-	
15	36,8	36,5	1,40 m/1,86 m	
16	35,6	35,1	2,42 m/2,98 m	
17	89,6	89,3	-	
18	174,1	174,5	-	
19	<b>20,3</b>	<b>22,2</b>	1,35 s	1, 5, 9, 10
20	86,5	86,6	-	
21	19,0	18,7	1,76 s	17, 20, 22
22	80,7	80,3	4,35 m	20, 24
23	28,3	28,0	2,06 m	
24	38,5	38,1	1,68 m	
25	81,3	81,3	-	
26	28,6	28,4	1,27 s	24, 25, 27
27	27,4	27,1	1,23 s	24, 25, 26
30	16,7	16,4	1,09 s	3, 4, 5, 31
31	28,1	27,8	1,26 s	3, 4, 5, 30
32	<b>22,5</b>	<b>19,9</b>	1,66 s	8, 13, 14, 15
<i>Xyl</i>				
1'	104,8	105,0	4,73 d (7,5)	3
2'	83,0	82,5	4,12 dd (7,5, 9,0)	
3'	76,5	75,3	4,37*	
4'	74,7	75,9	5,18 m	
5'	63,8	64,0	3,82*/4,87*	
<i>Qui</i>				
1''	105,2	105,4	5,13 d (7,5)	2'
2''	75,9	76,5	4,05 dd (7,5, 9,0)	
3''	77,5	76,2	3,74*	
4''	76,5	77,0	4,17*	
5''	73,3	72,9	3,76 m	
6''	18,4	18,2	1,65 d (7,0)	4'', 5''

<sup>a</sup> $\delta_C$  của holothurin B [138], <sup>b</sup>đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu chồng lấp.

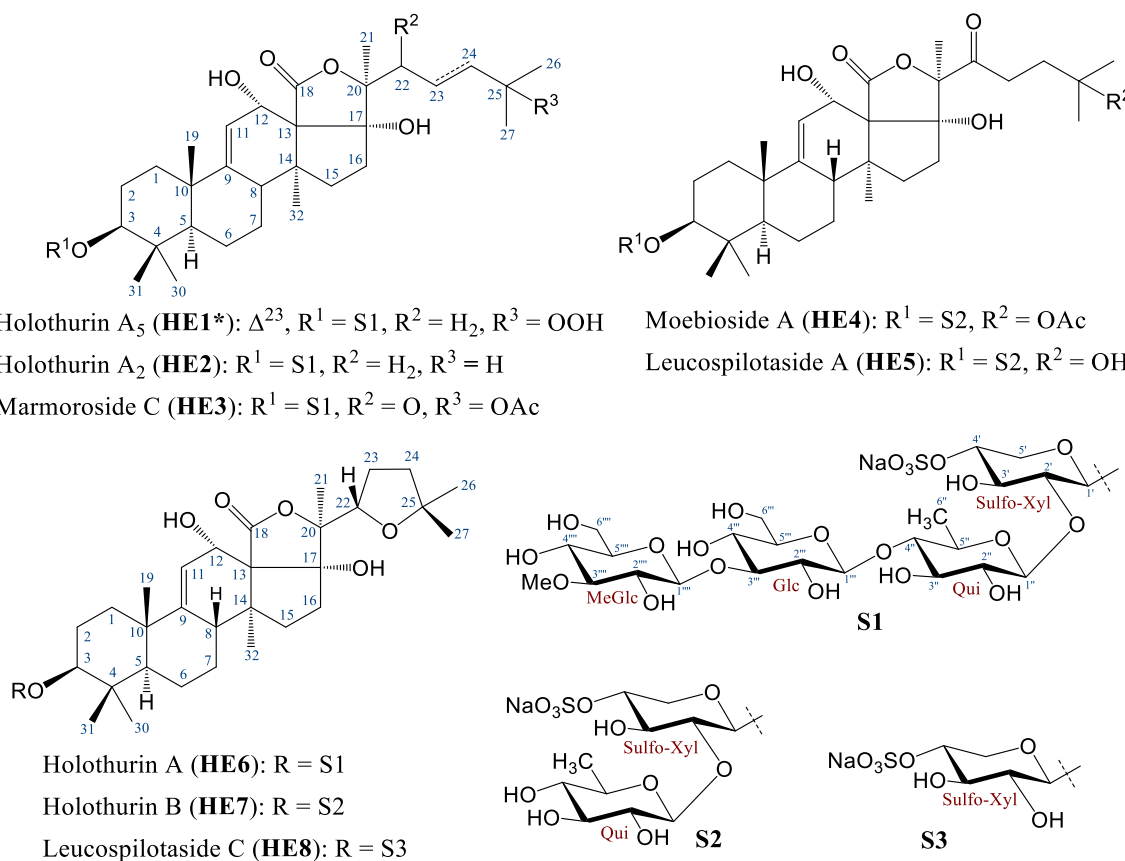
4.2.8. Hợp chất HE8: *Leucospilotaside C*Hình 85. Cấu trúc hóa học của **HE8**.Bảng 31. Số liệu phổ NMR của **HE8** và hợp chất tham khảo.

Vị trí	$^a\delta_C$ [121]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng peak ( $J = \text{Hz}$ )	HMBC
<i>Aglycone</i>				
1	36,5	36,6	1,34 m/1,78 m	
2	27,1	26,8	1,83 m/2,07 m	
3	88,6	88,3	3,17 dd (4,0, 11,5)	
4	40,0	39,5	-	
5	52,8	52,4	0,95 m	
6	21,3	20,9	1,44 m/1,63 m	
7	28,4	28,1	1,44 m/1,70 m	
8	41,0	40,7	3,26 m	
9	153,9	153,7	-	
10	39,8	39,7	-	
11	115,8	115,3	5,60 br d (4,0)	
12	71,7	71,2	4,92 d (5,0)	18
13	58,9	58,6	-	
14	46,0	45,7	-	
15	37,0	36,2	1,38 m/1,75 m	17
16	35,7	35,3	2,36 m/2,93 dd (4,0, 15,0)	
17	89,9	89,4	-	
18	174,7	174,5	-	
19	22,6	22,3	1,26 s	1, 5, 9, 10
20	86,8	86,6	-	
21	19,0	18,7	1,71 s	17, 20, 22
22	80,8	80,5	4,29*	
23	28,3	27,9	1,99 m	
24	38,6	38,2	1,59 m	
25	81,5	81,3	-	
26	27,1	28,0	1,22 s	24, 25, 27
27	28,8	27,2	1,15 s	24, 25, 26
30	16,9	16,8	0,96 s	3, 4, 5, 31
31	28,3	28,5	1,18 s	3, 4, 5, 30
32	20,5	20,1	1,61 s	8, 13, 14, 15
<i>Sulfo-Xyl</i>				
1'	107,3	106,9	4,69 d (8,0)	3

2'	77,0	75,1	4,00 dd (8,0, 9,0)
3'	76,8	76,3	4,29*
4'	76,4	76,3	5,20 m
5'	65,0	64,7	3,78 dd (10,5, 11,0)
			4,81 dd (5,0, 11,0)

<sup>a</sup> $\delta_C$  của leucospilotaside A [121], <sup>b</sup>đo trong dung môi pyridine-d<sub>5</sub>, <sup>c</sup>125 MHz và <sup>d</sup>500 MHz. \*Tín hiệu bị chồng lấp.

Các số liệu phổ NMR của hợp chất **HE8** tương tự như các phổ của **HE7**, ngoại trừ sự xuất hiện duy nhất một tín hiệu proton anome tại  $\delta_H$  4,69 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1') có tương tác HSQC với carbon anome tương ứng tại  $\delta_C$  106,9 (C-1') ở **HE7** chứng minh cho sự có mặt duy nhất một gốc đường. So sánh số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của **HE8** với các số liệu tương ứng đã được công bố (Bảng 31), kết hợp phân tích chi tiết các tương tác trên phổ 2D HMBC và COSY (Hình S96-S100 trong phần Phụ lục) cho phép khẳng định hợp chất này là leucospilotaside C [139].



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

Các hợp chất phân lập được từ loài hải sâm *Holothuria edulis* thuộc khung cấu trúc holostane triterpene glycoside đều có nhóm 18(20)-lactone và có liên kết olefinic  $\Delta^{9,11}$  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 cấu trúc hợp chất mới (**HE1**) cung cấp thông tin liên quan đến sự đa dạng của quá trình chuyển đổi sinh hóa bên phần mạch nhánh và trong chuỗi glycoside từ các loài hải sâm thuộc giống *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 holostane triterpene glycoside có liên kết olefinic  $\Delta^{9,11}$ , sự hiện diện của 18(20)-lactone và một nhóm oxy gần với liên kết đôi cùng với nhóm 17-OH có vai trò rất quan trọng như tác nhân trung gian cho hoạt tính sinh học.

### 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 ung thư (TBUT)

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 độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư 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 B<sub>1</sub> (**SH12**) và deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (**SH17**) từ loài hải sâm *S. horrens* có hoạt tính độc tế bào rất mạnh trên tất cả năm dòng tế bào ung thư nêu trên với giá trị IC<sub>50</sub> từ 0,10 đến 0,34  $\mu\text{M}$ , mạnh hơn cả chất đối chứng dương ellipticine với giá trị IC<sub>50</sub> từ 1,34 đến 1,95  $\mu\text{M}$ . 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 với giá trị IC<sub>50</sub> từ 0,75 đến 3,66  $\mu\text{M}$ . Ba hợp chất **SH3**, **SH9** và **SH11** có hoạt tính tốt với giá trị IC<sub>50</sub> từ 5,28 đến 11,62  $\mu\text{M}$ , trong khi các hợp chất **SH1**, **SH2**, **SH8**, **HE1**, **HE3** và **HE4** có hoạt tính trung bình hoặc yếu với IC<sub>50</sub> từ 33,48 đến 82,75  $\mu\text{M}$ . Hợp chất **HE5** chỉ có hoạt tính rất yếu trên ba dòng tế bào ung thư là MCF7 (IC<sub>50</sub> = 91,47  $\pm$  3,30  $\mu\text{M}$ ), KB (IC<sub>50</sub> = 91,27  $\pm$  5,41  $\mu\text{M}$ ) và HepG2 (IC<sub>50</sub> = 93,56  $\pm$  4,95  $\mu\text{M}$ ) còn các hợp chất **HE8** không thể hiện hoạt tính (IC<sub>50</sub> > 100  $\mu\text{M}$ ) 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 gây độc tế bào của các hợp chất này trên các dòng tế bào ung thư được thử nghiệm.

Bảng 32. Giá trị IC<sub>50</sub> của các chất triterpene saponin trên năm dòng tế bào.

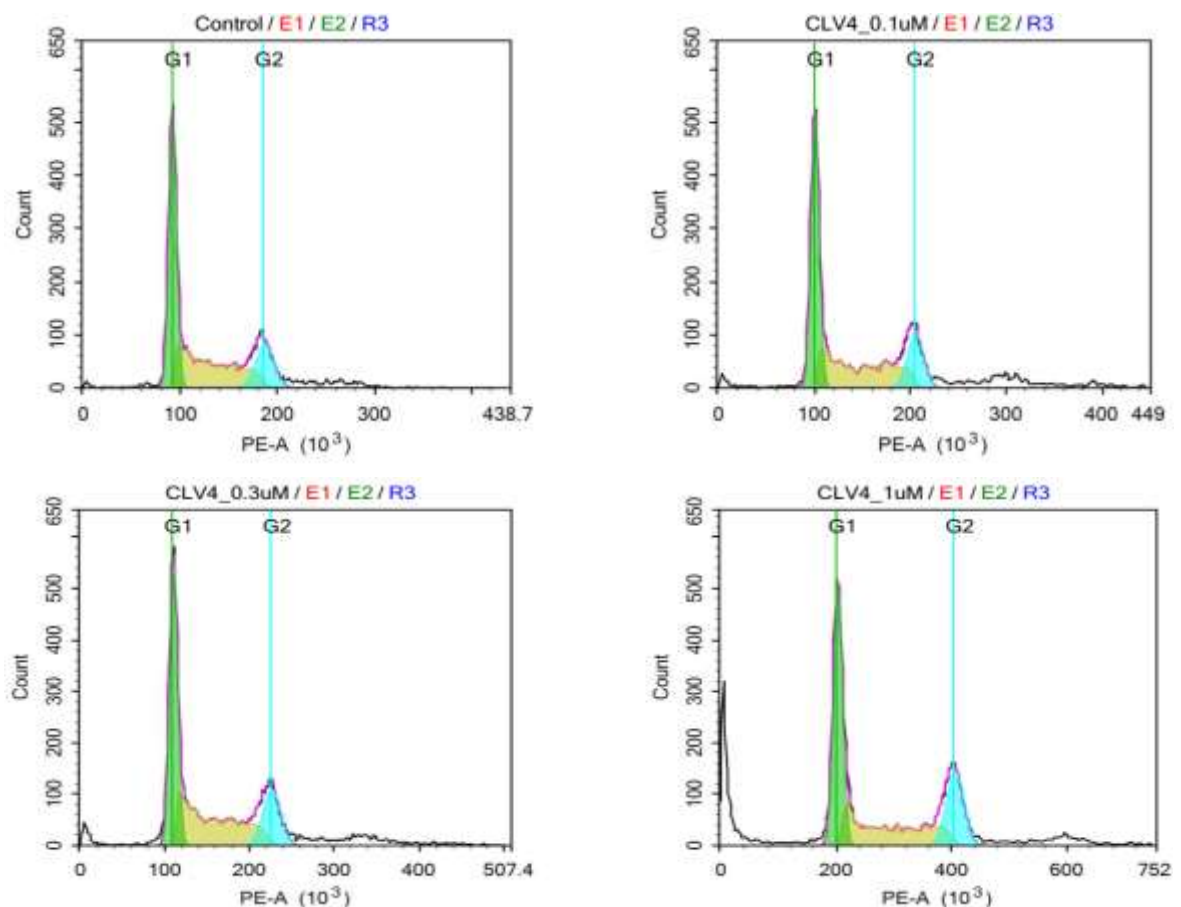
Hợp chất	Giá trị IC <sub>50</sub> (μM) trên năm dòng tế bào				
	LNCaP	MCF7	KB	HepG2	SK-Mel-2
SH1	51,56 ± 4,19	41,86 ± 4,21	33,48 ± 2,20	37,93 ± 4,55	43,53 ± 1,66
SH2	51,47 ± 1,45	59,52 ± 4,58	45,44 ± 2,00	55,28 ± 4,75	67,15 ± 4,70
SH3	10,06 ± 0,47	7,25 ± 0,78	11,00 ± 0,20	7,03 ± 0,88	10,82 ± 0,72
SH4	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	<b>0,18 ± 0,02</b>	<b>0,13 ± 0,01</b>	<b>0,14 ± 0,02</b>	<b>0,10 ± 0,01</b>	<b>0,14 ± 0,02</b>
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	<b>0,27 ± 0,01</b>	<b>0,24 ± 0,04</b>	<b>0,29 ± 0,04</b>	<b>0,34 ± 0,04</b>	<b>0,26 ± 0,06</b>
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
Elipticine <sup>a</sup>	1,95 ± 0,20	1,34 ± 0,16	1,79 ± 0,28	1,38 ± 0,28	1,91 ± 0,20

<sup>a</sup>Chất đối chứng dương.

### 4.3.2. Khả năng diệt tế bào ung thư của deacetylchloroside $C_1$ (SH17) theo cơ chế hoạt động trên các đích sinh học

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

Chu kỳ tế bào là quá trình phức tạp liên quan đến sự tăng trưởng và phát triển của tế bào, sự điều hòa sửa chữa của các DNA bị tổn thương, sự tăng trưởng của các mô bất thường do tổn thương và bệnh lý như ung thư. Chu kỳ tế bào được chia làm 4 pha: pha G<sub>1</sub>, pha S, pha G<sub>2</sub> và pha M. Ở pha G<sub>1</sub>, tế bào chuẩn bị cho quá trình sao chép ADN ở pha S. Pha G<sub>2</sub> là giai đoạn tế bào chuẩn bị cho quá trình nguyên phân ở pha M, tế bào mẹ ban đầu phân chia thành hai tế bào con. Để đảm bảo các ADN bị sai hỏng hay thiếu sót không được truyền lại cho các tế bào con cháu, một số điểm kiểm soát (checkpoint) luôn tồn tại trong chu kỳ tế bào. Nếu các điểm kiểm soát này phát hiện có sự bất thường, thì một hệ thống các phân tử truyền thông tin (signal transduction) sẽ điều khiển tế bào ngừng phân chia ngay. Chúng còn có thể giúp cho tế bào xác định được có thể sửa chữa được tổn thương hay không hay là sẽ khởi động quá trình tự chết của tế bào (apoptosis).



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



Bảng 33. Tỷ lệ (%) tế bào MCF7 trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M và apoptosis (sub-G<sub>1</sub>) sau 48 giờ cảm ứng với hợp chất **SH17** ở nồng độ 0,1, 0,3 và 1,0  $\mu$ M.

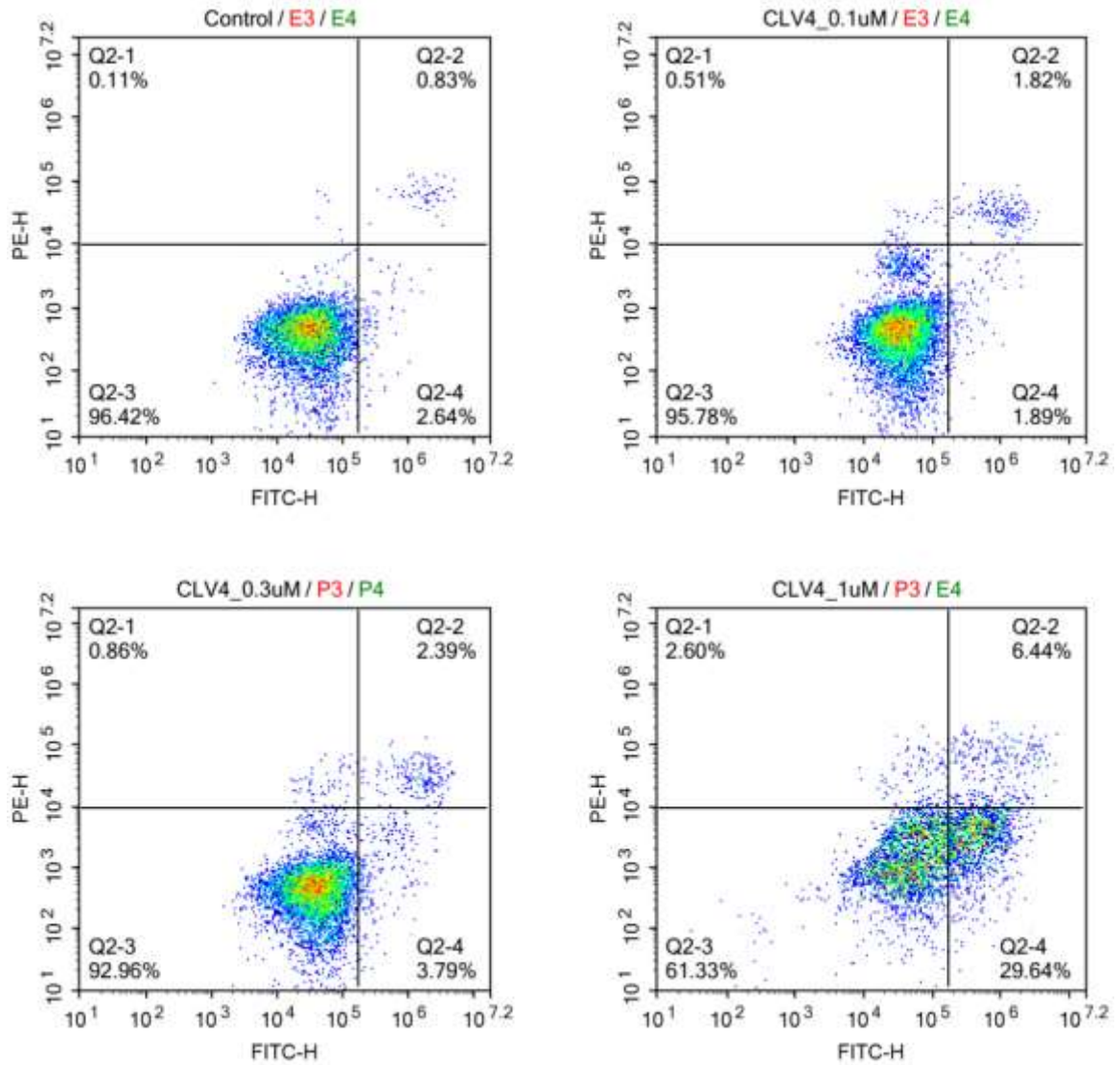
Mẫu	Tế bào ở các pha của chu trình phân bào (%)			
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	sub-G <sub>1</sub>
Control	40,33	34,96	15,86	1,23
<b>SH17</b> _0,1 $\mu$ M	37,29	31,18	14,82	2,86
<b>SH17</b> _0,3 $\mu$ M	35,84	30,64	16,09	3,79
<b>SH17</b> _1,0 $\mu$ M	32,52	24,82	18,05	16,88

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

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

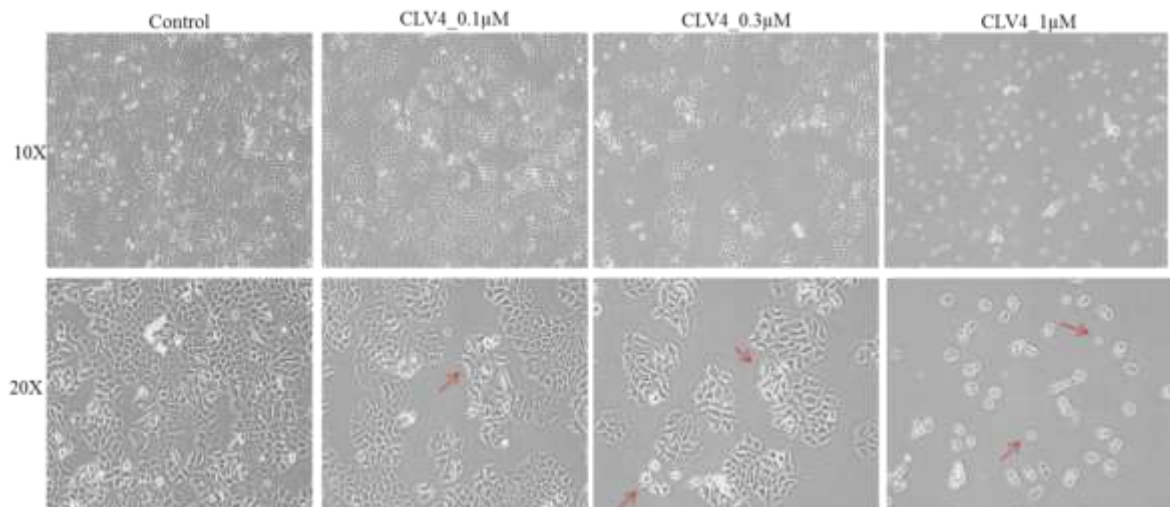
Apoptosis là quá trình tế bào tự chết theo chương trình. Khi tế bào trải qua quá trình apoptosis, đặc điểm hình thái của tế bào sẽ bị thay đổi: tế bào bị co rút lại, nhân tế bào bị phân chia thành từng mảnh nhỏ, các chất nhuộm sắc bị cô đặc tối đa, trở thành một khối dính vào lớp màng bao quanh nhân. Tế bào chết rụng phân rã thành các cấu trúc gọi là tiểu thể chết rụng và các tiểu thể này sẽ bị các thực bào xung quanh tiêu hóa trước khi các thành phần nội bào có thể tràn ra ngoài và gây hư hại cho các tế bào xung quanh. Có hai con đường dẫn đến quá trình apoptosis: con đường ngoại sinh (extrinsic pathway) và con đường nội sinh (intrinsic pathway). Con đường ngoại sinh được khởi động bởi các yếu tố kích thích ngoại bào, kích động sự gắn kết của các thụ thể chết xuyên màng. Con đường nội sinh thông qua ti thể để giải phóng các tác nhân tiền apoptosis như cytochrome c dẫn đến quá trình apoptosis.

Kết quả cho thấy tế bào sau khi xử lý với **SH17** ở nồng độ 1,0  $\mu$ M di chuyển sang giai đoạn apoptosis với tỷ 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 **SH17** đã gây ra sự tự chết tế bào MCF7.



Hình 88. Tác động của **SH17** lên quá trình tự chết của 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ . Có thể thấy rõ mật độ tế bào giảm dần theo sự gia tăng nồng độ của hợp chất này. Đặc biệt, các chất nhuộm sắc cô đặc tối đa trở thành một khối dính vào lớp màng bao quanh nhân tế bào ở nồng độ 1,0  $\mu\text{M}$  (Hình 89).

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. 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 loài hải sâm *Stichopus horrens* và 08 hợp chất triterpene glycoside từ loài hải sâm *Holothuria edulis*.

Áp dụng các phương pháp phổ hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (một chiều và hai chiều NMR) 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:  $3\beta$ -O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxystichlost-7-ene (**SH7**),  $3\beta$ -O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxystichlost-7-ene (**SH8**), deacetyl thelenotoside B (**SH11**) và deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (**SH17**).

2. Từ loài hải sâm *H. edulis*: một hợp chất mới được đặt tên là holothurin A<sub>5</sub> (**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 thể hiện hoạt tính trên tất cả các dòng tế bào ung thư được thử nghiệm. Trong đó hai hợp chất stichloroside B<sub>1</sub> (**SH12**) và deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (**SH17**) có hoạt tính gây độc rất mạnh trên tất cả năm dòng tế bào ung thư nêu trên với giá trị IC<sub>50</sub> từ 0,10 đến 0,34  $\mu$ M, mạnh hơn cả ellipticine (IC<sub>50</sub> từ 1,34 đến 1,95  $\mu$ M) chất được sử dụng như đối chứng dương.

2. Đã đánh giá khả năng diệt tế bào ung thư của hợp chất deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (**SH17**) 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-G<sub>1</sub> và gây ra sự tự chết tế bào MCF7.

## 2. 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 B<sub>1</sub> (SH12) và deacetylstichloroside C<sub>1</sub> (SH17) có 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  $3\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-acetoxystichorren-7-ene,  $3\beta$ -O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl]-23S-hydroxystichorren-7-ene, deacetyl stichorrenoside B, deacetylstichloroside C<sub>1</sub> và một hợp chất mới là holothurin A<sub>5</sub> 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- $\beta$ -D-glucopyranose ở hợp chất stichorrenoside B và nhóm -OOH tại vị trí C-25 ở hợp chất được holothurin A<sub>5</sub> 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 C<sub>1</sub> 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-G<sub>1</sub> và gây ra sự tự chết tế bào MCF7.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ 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.
-

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Richard C. Brusca, Gary J. Brusca. Invertebrates, second edition, "*Chapter 22: phylum Echinodermata*". Sinaure Associates, 2002, 801-830.
- [2] J.M. Kornprobst, *Echinoderms - Encyclopedia of marine natural products*, In Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- [3] Đ.H. Bích, Đ.Q. Chung, B.X. Chương, N.T. Dong, Đ.T. Đàm, P.V. Hiền, V.N. Lộ, P.D. Mai, P.K. Mãn, Đ.T. Nhu, N. Tập, T. Toàn. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2004, Hà Nội.
- [4] A.R. Gomes, A.C. Freitas, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte. *Bioactive compounds derived from echinoderms*. RSC Advances, 2014, 4(56), 29365-29382.
- [5] I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, T. Matsuno, H. Akutsu, Y. Kyogoku. *Marine natural products. VII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (1). Structure of holothurin B*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(7), 1942-1950.
- [6] I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, Y. Kyogoku. *Marine natural products. VIII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (2). Structure of holothurin A*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(7), 1951-1956.
- [7] S.A. Avilov, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskii. *Structure of four new triterpene glycosides from the holothurian *Cucumaria japonica**. Khim. Prir. Soedin., 1990, 787-793.
- [8] T. Miyamoto, K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori, T. Sasaki. *Constituents of holothuroidea, II. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata**. Liebigs Annalen der Chemie, 1990, 1990(5), 453-460.
- [9] J.A. Findlay, N. Yayli, L. Radics. *Novel sulfated oligosaccharides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa**. J. Nat. Prod., 1992, 55(1), 93-101.
- [10] O.A. Drozdova, S.A. Avilov, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik, Y.M. Mil'grom, Y.V. Rashkes. *New glycosides from the holothurian *Cucumaria japonica**. Chem. Nat. Comp., 1993, 29(2), 200-205.
- [11] O.A. Drozdova, S.A. Avilov, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik, Y.M. Mil'grom, Y.V. Rashkes. *Trisulfated glycosides from the holothurian *Cucumaria japonica**. Chem. Nat. Comp., 1993, 29(3), 309-313.
- [12] S.A. Avilov, A.S. Antonov, O.A. Drozdova, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik, R. Riguera, L.A. Lenis, C. Jiménez. *Triterpene glycosides from the Far-Eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. I. monosulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivatives*. J. Nat. Prod., 2000, 63(1), 65-71.
- [13] S.A. Avilov, A.S. Antonov, O.A. Drozdova, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskii, R. Riguera, L.A. Lenis, C. Jiménez. *Triterpene glycosides from the Far-Eastern sea*

- cucumber Pentamera calcigera II: disulfated glycosides*. J. Nat. Prod., 2000, 63(10), 1349-1355.
- [14] Y.H. Yi, Q.Z. Xu, L. Li, S.L. Zhang, H.M. Wu, J. Ding, Y.G. Tong, W.F. Tan, M.H. Li, F. Tian, J.H. Wu, C.C. Liaw, K.F. Bastow, K.H. Lee. *Philinopsides A and B, two new sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber Pentacta quadrangularis*. Helv. Chim. Acta, 2006, 89(1), 54-63.
- [15] J. Rodriguez, R. Riguera. *Lefevreiosides: four novel triterpenoid glycosides from the sea cucumber Cucumaria lefevrei*. J. Chem. Res. (S), 1989, 21(14), 342-343.
- [16] S.A. Avilov, A.S. Antonov, A.S. Silchenko, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, P.S. Dmitrenok, V.A. Stonik, R. Riguera, C. Jimenez. *Triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber Cucumaria conicospermium*. J. Nat. Prod., 2003, 66(7), 910-916.
- [17] S.A. Avilov, V.I. Kalinin, O.A. Prozdova, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik, E.N. Gudimova. *Triterpene glycosides from the holothurian Cucumaria frondosa*. Chem. Nat. Comp., 1993, 29(2), 216-218.
- [18] S.A. Avilov, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik. *New triterpene glycosides from the holothurian Neothyonidium magnum*. Khim. Prir. Soedin., 1990, 26, 42-45.
- [19] N. Yayli, J.A. Findlay. *A triterpenoid saponin from Cucumaria frondosa*. Phytochemistry, 1999, 50(1), 135-138.
- [20] M.S. Maier, A.J. Roccatagliata, A. Kuriss, H. Chludil, A.M. Seldes, C.A. Pujol, E.B. Damonte. *Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber Staurocucumis liouvillei*. J. Nat. Prod., 2001, 64(6), 732-736.
- [21] Z.R. Zou, Y.H. Yi, H.M. Wu, J.H. Wu, C.C. Liaw, K.H. Lee. *Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Mensamaria intercedens Lampert*. J. Nat. Prod., 2003, 66(8), 1055-1060.
- [22] I. Bonnard, K.L. Rinehart. *Thyonesides A and B, two new saponins isolated from the holothurian Thyone aurea*. Tetrahedron, 2004, 60(13), 2987-2992.
- [23] A.S. Silchenko, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, P.S. Dmitrenok, S.N. Fedorov, V.G. Stepanov, Z. Dong, V.A. Stonik. *Constituents of the sea cucumber Cucumaria okhotensis. Structures of okhotosides B1-B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species*. J. Nat. Prod., 2008, 71(3), 351-356.
- [24] A.S. Silchenko, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskiy, P.S. Dmitrenok, V.G. Stepanov. *Monosulfated triterpene glycosides from Cucumaria okhotensis Levin et Stepanov, a new species of sea cucumbers from sea of Okhotsk*. Russian J. Bioorg. Chem., 2007, 33(1), 73-82.
- [25] S.L. Zhang, L. Li, Y.H. Yi, P. Sun. *Philinopsides E and F, two new sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber Pentacta quadrangularis*. Nat. Prod. Res., 2006, 20(4), 399-407.



- [26] S.S. Afiyatullo, V.A. Stonik, G.B. Elyakov. *Glycosides of marine invertebrates. Cucumarioside G1 from the holothurian Cucumaria fraudatrix*. Khim. Prir. Soedin., 1983, 654-655.
- [27] S.S. Afiyatullo, L.Y. Tishenko, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskii, G.B. Elyakov. *Structure of cucumarioside G1, a novel triterpene glycoside from the holothurian Cucumaria fraudatrix*. Khim. Prir. Soedin., 1985, 244-248.
- [28] V.I. Kalinin, S.A. Avilov, E.Y. Kalinina, O.G. Korolkova, A.I. Kalinovskiy, V.A. Stonik, R. Riguera, C. Jiménez. *Structure of eximioside A, a novel triterpene glycoside from the Far-Eastern sea cucumber Psolus eximius*. J. Nat. Prod., 1997, 60(8), 817-819.
- [29] O.A. Drozdova, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, V.A. Stonik, R. Riguera, C. Jiménez. *Cytotoxic triterpene glycosides from Far-Eastern sea cucumbers belonging to the genus Cucumaria*. Liebigs Annalen, 1997, 1997(11), 2351-2356.
- [30] A.S. Antonov, S.A. Avilov, A.I. Kalinovskiy, S.D. Anastyuk, P.S. Dmitrenok, E.V. Evtushenko, V.I. Kalinin, A.V. Smirnov, S. Taboada, M. Ballesteros, C. Avila, V.A. Stonik. *Triterpene glycosides from Antarctic sea cucumbers. 1. Structure of liouvillosides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, and B<sub>2</sub> from the sea cucumber Staurocucumis liouvillei: new procedure for separation of highly polar glycoside fractions and taxonomic revision*. J. Nat. Prod., 2008, 71(10), 1677-1685.
- [31] A.S. Silchenko, S.A. Avilov, A.I. Kalinovskiy, P.S. Dmitrenok, V.I. Kalinin, J. Morre, M.L. Deinzer, C. Woodward, P.D. Collin. *Glycosides from the North Atlantic sea cucumber Cucumaria frondosa V - Structures of five new minor trisulfated triterpene oligoglycosides, frondosides A<sub>7-1</sub>, A<sub>7-2</sub>, A<sub>7-3</sub>, A<sub>7-4</sub>, and isofrondoside C*. Canadian J. Chem., 2007, 85(9), 626-636.
- [32] S.Y. Zhang, Y.H. Yi, H.F. Tang. *Cytotoxic sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber Pseudocolochirus violaceus*. Chem. Biodivers., 2006, 3(7), 807-817.
- [33] G. Moraes, P.T. Northcote, A.S. Silchenko, A.S. Antonov, A.I. Kalinovskiy, P.S. Dmitrenok, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, V.A. Stonik. *Mollisosides A, B<sub>1</sub>, and B<sub>2</sub>: minor triterpene glycosides from the New Zealand and South Australian sea cucumber Australostichopus mollis*. J. Nat. Prod., 2005, 68(6), 842-847.
- [34] I. Kitagawa, M. Kobayashi, T. Inamoto, T. Yasuzawa, Y. Kyogoku. *The structures of six antifungal oligoglycosides, stichlorosides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, and C<sub>2</sub>, from the sea cucumber Stichopus chloronotus (Brandt)*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(8), 2387-2391.
- [35] J. Wu, Y.H. Yi, H.F. Tang, H.M. Wu, Z.R. Zhou. *Hillasides A and B, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria hilla Lesson*. J. Asian Nat. Prod. Res., 2007, 9(6-8), 609-615.

- [36] Z. Zou, Y. Yi, H. Wu, X. Yao, L. Du, W. Jiuhong, C.C. Liaw, K.H. Lee. *Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Mensamaria intercedens Lampert*. J. Nat. Prod., 2005, 68(4), 540-546.
- [37] H. Han, Q.Z. Xu, Y.H. Yi, W. Gong, B.H. Jiao. *Two new cytotoxic disulfated holostane glycosides from the sea cucumber Pentacta quadrangularis*. Chem. Biodivers., 2010, 7(1), 158-167.
- [38] A.P. Murray, C. Muniaín, A.M. Seldes, M.S. Maier. *Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber Psolus patagonicus*. Tetrahedron, 2001, 57(47), 9563-9568.
- [39] B.S. Liu, Y.H. Yi, L. Li, S.L. Zhang, H. Han, Y.Y. Weng, M.X. Pan. *Arguside A: a new cytotoxic triterpene glycoside from the sea cucumber Bohadschia argus Jaeger*. Chem. Biodivers., 2007, 4(12), 2845-2851.
- [40] B.S. Liu, Y.H. Yi, L. Li, P. Sun, W.H. Yuan, G.Q. Sun, H. Han, M. Xue. *Argusides B and C, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia argus Jaeger*. Chem. Biodivers., 2008, 5(7), 1288-1297.
- [41] J. Rodriguez, R. Castro, R. Riguera. *Holothurinosides: New antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber Holothuria forskalii*. Tetrahedron, 1991, 47(26), 4753-4762.
- [42] W. Yuan, Y. Yi, H. Tang, M. Xue, Z. Wang, G. Sun, W. Zhang, B. Liu, L. Li, P. Sun. *Two new holostan-type triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia marmorata Jaeger*. Chem. Pharm. Bull., 2008, 56(8), 1207-1211.
- [43] B.S. Liu, Y.H. Yi, L. Li, P. Sun, H. Han, G.Q. Sun, X.H. Wang, Z.L. Wang. *Argusides D and E, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia argus Jaeger*. Chem. Biodivers., 2008, 5(7), 1425-1433.
- [44] P. Sun, B.S. Liu, Y.H. Yi, L. Li, M. Gui, H.F. Tang, D.Z. Zhang, S.L. Zhang. *A new cytotoxic lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber Holothuria impatiens*. Chem. Biodivers., 2007, 4(3), 450-457.
- [45] V.R. Hegde, T.M. Chan, H. Pu, V.P. Gullo, M.G. Patel, P. Das, N. Wagner, P.S. Parameswaran, C.G. Naik. *Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, Telenata ananas: inhibitors of chemokine receptor-5*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, 12(21), 3203-3205.
- [46] S.Y. Zhang, Y.H. Yi, H.F. Tang. *Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria fuscocinerea*. J. Nat. Prod., 2006, 69(10), 1492-1495.
- [47] H. Han, Y.H. Yi, B.S. Liu, X.H. Wang, M.X. Pan. *Leucopsilotaside C, a new sulfated triterpene glycoside from sea cucumber Holothuria leucopsilota*. Chin. Chem. Lett., 2008, 19, 1462-1464.
- [48] I. Kitagawa, M. Kobayashi, B.W. Son, S. Suzuki, Y. Kyogoku. *Marine natural products. XIX.: Pervicosides A, B, and C, lanostane-type triterpene-oligoglycoside*

- sulfates from the sea cucumber Holothuria pervicax*. Chem. Pharm. Bull., 1989, 37(5), 1230-1234.
- [49] R. Encarnacion, G. Carrasco, M. Espinoza, U. Anthoni, P.H. Nielsen, C. Christophersen. *Neothyoside A, proposed structure of a triterpenoid tetraglycoside from the Pacific sea cucumber, Neothyone gibbosa*. J. Nat. Prod., 1989, 52(2), 248-251.
- [50] I. Kitagawa, M. Kobayashi, T. Inamoto, M. Fuchida, Y. Kyogoku. *Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B, antifungal lanostane-oligosides from the sea cucumber Actinopyga echinites (Jaeger)*. Chem. Pharm. Bull., 1985, 33(12), 5214-5224.
- [51] V.I. Kalinin, V.A. Stonik. *Glycosides of marine invertebrates. Structure of holothurin A<sub>2</sub> from the holothurian Holothuria edulis*. Chem. Nat. Comp., 1982, 18(2), 196-200.
- [52] G.Q. Sun, L. Li, Y.H. Yi, W.H. Yuan, B.S. Liu, Y.Y. Weng, S.L. Zhang, P. Sun, Z.L. Wang. *Two new cytotoxic nonsulfated pentasaccharide holostane (=20-hydroxy lanostan-18-oic acid  $\gamma$ -lactone) glycosides from the sea cucumber Holothuria grisea*. Helv. Chim. Acta, 2008, 91(8), 1453-1460.
- [53] S. Bhatnagar, B. Dudouet, A. Ahond, C. Poupat, O. Thoison, A. Clastres, D. Laurent, P. Potier. *Invertébrés marins du lagon neocalédonien. IV. Saponines et sapogénines d'une holothurie Actinopyga flammea*. Bull. Soc. Chim. Fr., 1985, 124-129.
- [54] I. Kitagawa, M. Kobayashi, Y. Kyogoku. *Marine natural products. IX. Structural elucidation of triterpenoidal oligoglycosides from the Bahamean sea cucumber Actinopyga agassizi Selenka*. Chem. Pharm. Bull., 1982, 30(6), 2045-2050.
- [55] P.S. Parameswaran, C.G. Naik, B. Das, S.Y. Kamat. *Echinoside-B from the Lakshadweep sea cucumber Actinopyga mauritiana (Quoy and Gaimard)*. Indian J. Chem., 1991, 30B, 375-376.
- [56] M. Kobayashi, M. Hori, K. Kan, T. Yasuzawa, M. Matsui, S. Suzuki, I. Kitagawa. *Marine natural products. XXVII. Distribution of lanostane-type triterpene oligoglycosides in ten kinds of Okinawan sea cucumbers*. Chem. Pharm. Bull., 1991, 39(9), 2282-2287.
- [57] I. Kitagawa, T. Nishino, Y. Kyogoku. *Structure of holothurin A a biologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber Holothuria leucospilota Brandt*. Tetrahedron Lett., 1979, 20(16), 1419-1422.
- [58] I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, Y. Kyogoku. *Marine natural products. VIII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber Holothuria leucospilota Brandt (2). Structure of holothurin A*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(7), 1951-1956.
- [59] I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, T. Matsuno, H. Akutsu, Y. Kyogoku. *Marine natural products. VII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber*

- Holothuria leucospilota* Brandt (1). Structure of holothurin B. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(7), 1942-1950.
- [60] A.S. Silchenko, V.A. Stonik, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, A.M. Zaharenko, A.V. Smirnov, E. Mollo, G. Cimino. *Holothurins B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, and B<sub>4</sub>, new triterpene glycosides from Mediterranean sea cucumbers of the genus Holothuria*. J. Nat. Prod., 2005, 68(4), 564-567.
- [61] J. Wu, Y.H. Yi, H.F. Tang, Z.R. Zou, H.M. Wu. *Structure and cytotoxicity of a new lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber Holothuria hilla*. Chem. Biodivers., 2006, 3(11), 1249-1254.
- [62] I. Kitagawa, H. Yamanaka, M. Kobayashi, T. Nishino, I. Yosioka, T. Sugawara. *Saponin and sapogenol. XXVII. Revised structures of holotoxin A and holotoxin B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber Stichopus japonicus Selenka*. Chem. Pharm. Bull., 1978, 26(12), 3722-3731.
- [63] F.X. Garneau, J.L. Simard, O. Harvey, J.W. Apsimon, M. Girard. *Marine organic chemistry. VI. The structure of psolothurin A, the major triterpene glycoside of the sea cucumber Psolus fabrici*. Can. J. Chem., 1983, 61, 1465-1471.
- [64] M.B. Zurita, A. Ahond, C. Poupat, P. Potier, J.L. Menou. *Invertébrés marins du lagon Néo-Calédonien, VII. Étude structurale d'un nouveau saponoside sulfaté extrait de l'Holothurie, Neothyonidium magnum*. J. Nat. Prod., 1986, 49(5), 809-813.
- [65] V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskii, V.I. Stonik. *Structure of psolusoside A: the major triterpene glycoside of the holothurian Psolus fabrici*. Khim. Prir. Soedin., 1985, 212-217.
- [66] T. Miyamoto, K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori, T. Sasaki. *Structures of four new triterpenoid oligoglycosides: DS-penaustrosides A, B, C, and D from the sea cucumber Pentacta australis*. J. Nat. Prod., 1992, 55(7), 940-946.
- [67] H.D. Chludil, C.C. Muniain, A.M. Seldes, M.S. Maier. *Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber Hemoiedema spectabilis*. J. Nat. Prod., 2002, 65(6), 860-865.
- [68] A.M. Iñiguez-Martinez, G. Guerra-Rivas, T. Rios, L. Quijano. *Triterpenoid oligoglycosides from the sea cucumber Stichopus parvimensis*. J. Nat. Prod., 2005, 68(11), 1669-1673.
- [69] S.A. Avilov, V.I. Kalinin, T.N. Makarieva, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskiy, Y.W. Rashkes, Y.M. Milgrom. *Structure of cucumarioside G<sub>2</sub>, a novel nonholostane glycoside from the sea cucumber Eupentacta fraudatrix*. J. Nat. Prod., 1994, 57(8), 1166-1171.
- [70] V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskii, V.A. Stonik, P.S. Dmitrenok, Y.N. El'kin. *Structure of psolusoside B, a non-holostane triterpene glycoside from the holothurian genus Psolus*. Khim. Prir. Soedin., 1989, 361-368.

- [71] S.A. Avilov, A.S. Antonov, O.A. Drozdova, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, V.A. Stonik, R. Riguera, L.A. Lenis, C. Jiménez. *Triterpene glycosides from the Far-Eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. I. Monosulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivatives*. J. Nat. Prod., 2000, 63(1), 65-71.
- [72] C.V. Minh, N.H. Dang, N.X. Cuong, P.V. Kiem, H.T. Huong. *Bioactive constituents from marine organisms inhabiting in Vietnam sea*. Vietnam J. Sci. Tech., 2007, 45(6(ĐB)), 1-18.
- [73] N.V. Thanh, N.H. Dang, P.V. Kiem, N.X. Cuong, H.T. Huong, C.V. Minh. *A new triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria scabra* collected in Vietnam*. Asean J. Sci. Tech. Develop. 2006, 23(4), 253-259.
- [74] N.H. Dang, N.V. Thanh, P.V. Kiem, M. Huong le, C.V. Minh, Y.H. Kim. *Two new triterpene glycosides from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra**. Arch. Pharm. Res., 2007, 30(11), 1387-1391.
- [75] N.P. Thao, B.T.T. Luyen, L.T. Vien, B.H. Tai, L.D. Dat, N.X. Cuong, N.H. Nam, P.V. Kiem, C.V. Minh, Y.H. Kim. *Triterpene saponins from the sea cucumber *Stichopus chloronotus**. Nat. Prod. Commun., 2014, 9(5), 615-618.
- [76] V.A. Tu, N.T. Ngoc, L.D. Dat, N.P. Thao, N.X. Cuong, N.H. Nam. *Echinocide B and holothurin B, two triterpene saponins from *Holothuria atra**. Vietnam J. Sci. Tech., 2014, 52(2D), 33-38.
- [77] N.X. Cuong, L.T. Vien, T.T.H. Hanh, N.P. Thao, D.T. Thao, N.V. Thanh, N.H. Nam, D.C. Thung, P.V. Kiem, C.V. Minh. *Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps**. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2015, 25(16), 3151-3156.
- [78] V.I. Kalinin, M.M. Anisimov, N.G. Prokofieva, S.A. Avilov, S.S. Afiyatulloev, V.A. Stonik. *Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroids (*Echinodermata*)*, In Echinoderm studies, Taylor & Francis, 1996.
- [79] T. Miyamoto, K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori, T. Sasaki. *Structures of four new triterpenoid oligoglycosides: DS-penaustrosides A, B, C, and D from the sea cucumber *Pentacta australis**. J. Nat. Prod., 1992, 55(7), 940-946.
- [80] V.I. Kalinin, D.L. Aminin, S.A. Avilov, A.S. Silchenko, V.A. Stonik. *Triterpene glycosides from sea cucumbers (*Holothurioidea*, *Echinodermata*). Biological activities and functions*, In Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier, 2008.
- [81] Z. Zou, Y. Yi, H. Wu, X. Yao, L. Du, W. Jiuhong, C.C. Liaw, K.H. Lee. *Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert*. J. Nat. Prod. 2005, 68(4), 540-546.
- [82] H. Han, Q.Z. Xu, H.F. Tang, Y.H. Yi, W. Gong. *Cytotoxic holostane-type triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis**. Planta Med., 2010, 76(16), 1900-1904.
- [83] H. Han, Q.Z. Xu, Y.H. Yi, W. Gong, B.H. Jiao. *Two new cytotoxic disulfated holostane glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis**. Chem. Biodivers., 2010, 7(1), 158-167.

- [84] H. Han, W. Zhang, Y.H. Yi, B.S. Liu, M.X. Pan, X.H. Wang. *A novel sulfated holostane glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota**. Chem. Biodivers., 2010, 7(7), 1764-1769.
- [85] Q. Zhao, Z.D. Liu, Y. Xue, J.F. Wang, H. Li, Q.J. Tang, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue. *DS-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions*. J. Zhejiang Uni. Sci. B, 2011, 12(7), 534-544.
- [86] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjaschenko, P.S. Dmitrenok, E. Yurchenko, V.I. Kalinin. *Structure of cucumariosides H5, H6, H7 and H8, Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* and unprecedented aglycone with 16,22-epoxy-group*. Nat. Prod. Commun., 2011, 6(8), 1075-1082.
- [87] A.S. Silchenko, A. I. Kalinovsky, S. A. Avilov, P. V. Andryjaschenko, P. S. Dmitrenok, E. A. Martyyas, V. I. Kalinin. *Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological action of cucumariosides A1, A3, A4, A5, A6, A12 and A15, seven new minor non-sulfated tetraosides and unprecedented 25-keto, 27-norholostane aglycone*. Nat. Prod. Commun., 2012, 7(4), 517-525.
- [88] A.S. Silchenko, A. I. Kalinovsky, S. A. Avilov, P. V. Andryjaschenko, P. S. Dmitrenok, E. Martyyas, V. I. Kalinin. *Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and cytotoxic action of cucumariosides A2, A7, A9, A10, A11, A13 and A14, seven new minor non-sulfated tetraosides and an aglycone with an uncommon 18-hydroxy group*. Nat. Prod. Commun., 2012, 7(7), 845-852.
- [89] A.S. Silchenko, A. I. Kalinovsky, S. A. Avilov, P. V. Andryjaschenko, P. S. Dmitrenok, E. A. Martyyas, V. I. Kalinin. *Triterpene Glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological activity of cucumariosides B1 and B2, two new minor non-sulfated unprecedented triosides*. Nat. Prod. Commun., 2012, 7(9) 1157-1162.
- [90] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjashchenko, P.S. Dmitrenok, V.I. Kalinin, V.A. Stonik. *3 $\beta$ -O-glycosylated 16 $\beta$ -acetoxy-9 $\beta$ -H-lanosta-7,24-diene-3 $\beta$ ,18,20 $\beta$ -triol, an intermediate metabolite from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* and its biosynthetic significance*. Biochem. Syst. Ecol., 2012, 44(0), 53-60.
- [91] H. Han, L. Li, Y.H. Yi, X.H. Wang, M.X. Pan. *Triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra* with cytotoxic activity*. Chinese Herb. Med., 2012, 4(3), 183-188.
- [92] V.P. Careaga, C. Bueno, C. Muniain, L. Alche, M.S. Maier. *Pseudocnoside A, a new cytotoxic and antiproliferative triterpene glycoside from the sea cucumber *Pseudocnus dubiosus leoninus**. Nat. Prod. Res., 2014, 28(4), 213-220.

- [93] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjaschenko, P.S. Dmitrenok, E.S. Menchinskaya, D.L. Aminin, V.I. Kalinin. *Structure of cucumarioside I2 from the sea cucumber Eupentacta fraudatrix (Djakonov et Baranova) and cytotoxic and immunostimulatory activities of this saponin and relative compounds*. Nat. Prod. Res., 2013, 27(19), 1776-1783.
- [94] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjaschenko, P.S. Dmitrenok, E.A. Martyyas, V.I. Kalinin. *Triterpene glycosides from the sea cucumber Eupentacta fraudatrix. Structure and biological action of cucumariosides II, I3, I4, three new minor disulfated pentaosides*. Nat. Prod. Commun., 2013, 8(8), 1053-1058.
- [95] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjaschenko, P.S. Dmitrenok, E.A. Martyyas, V.I. Kalinin, P. Jayasandhya, G.C. Rajan, K.P. Padmakumar. *Structures and biological activities of typicosides A1, A2, B1, C1 and C2, triterpene glycosides from the sea cucumber Actinocucumis typica*. Nat. Prod. Commun., 2013, 8(3), 301-310.
- [96] A.S. Silchenko, A.I. Kalinovsky, S.A. Avilov, P.V. Andryjaschenko, P.S. Dmitrenok, E.A. Yurchenko, I.Y. Dolmatov, V.I. Kalinin, V.A. Stonik. *Structure and biological action of cladolosides B1, B2, C, C1, C2 and D, six new triterpene glycosides from the sea cucumber Cladolabes schmeltzii*. Nat. Prod. Commun., 2013, 8(11), 1527-1534.
- [97] M. Li, Z.H. Miao, Z. Chen, Q. Chen, M. Gui, L.P. Lin, P. Sun, Y.H. Yi, J. Ding. *Echinoside A, a new marine-derived anticancer saponin, targets topoisomerase2 $\alpha$  by unique interference with its DNA binding and catalytic cycle*. Ann. Oncol., 2010, 21(3), 597-607.
- [98] S. Van Dyck, P. Gerbaux, P. Flammang. *Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean*. Mar. Drugs, 2010, 8(1), 173-189.
- [99] Y. Tong, X. Zhang, F. Tian, Y. Yi, Q. Xu, L. Li, L. Tong, L. Lin, J. Ding. *Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects*. Int. J. Cancer, 2005, 114(6), 843-853.
- [100] F. Tian, X. Zhang, Y. Tong, Y. Yi, S. Zhang, L. Li, P. Sun, L. Lin, J. Ding. *PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo*. Cancer Biol. Ther., 2005, 4(8), 874-882.
- [101] F. Tian, C.H. Zhu, X.W. Zhang, X. Xie, X.L. Xin, Y.H. Yi, L.P. Lin, M.Y. Geng, J. Ding. *Philinopside E, a new sulfated saponin from sea cucumber, blocks the interaction between kinase insert domain-containing receptor (KDR) and alphavbeta3 integrin via binding to the extracellular domain of KDR*. Mol. Pharmacol., 2007, 72(3), 545-552.

- [102] V.P. Careaga, C. Bueno, C. Muniain, L. Alché, M.S. Maier. *Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a triterpene glycoside from Psolus patagonicus and its desulfated analog*. *Chemotherapy*, 2009, 55(1), 60-68.
- [103] J. Wang, H. Han, X. Chen, Y. Yi, H. Sun. *Cytotoxic and apoptosis-inducing activity of triterpene glycosides from Holothuria scabra and Cucumaria frondosa against HepG2 cells*. *Mar. Drugs*, 2014, 12(8), 4274-4290.
- [104] Q. Zhao, Z.D. Liu, Y. Xue, J.F. Wang, H. Li, Q.J. Tang, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue. *DS-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF-kappaB-dependent MMP-9 and VEGF expressions*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2011, 12(7), 534-544.
- [105] Q. Zhao, Y. Xue, Z.D. Liu, H. Li, J.F. Wang, Z.J. Li, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue. *Differential effects of sulfated triterpene glycosides, holothurin A1, and 24-dehydroechinoside A, on antimetastatic activity via regulation of the MMP-9 signal pathway*. *J. Food Sci.*, 2010, 75(9), 280-288.
- [106] Y. Zhang, Y. Yi. *Studies on antitumor activities of triterpene glycoside colochiroside A from sea cucumber Colochirus anceps*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36, 504-507.
- [107] X. Ma, N. Kundu, P.D. Collin, O. Goloubeva, A.M. Fulton. *Frondoside A inhibits breast cancer metastasis and antagonizes prostaglandin E receptors EP4 and EP2*. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 132(3), 1001-1008.
- [108] S. Attoub, K. Arafat, T. Khalaf, S. Sulaiman, R. Iratni. *Frondoside a enhances the anti-cancer effects of oxaliplatin and 5-fluorouracil on colon cancer cells*. *Nutrients*, 2018, 10(5), 560.
- [109] V.I. Kalinin, V.A. Stonik, S.A. Avilov, G.B. Elyakov. *Glycosides from Holothuria edulis*. *Khim. Prir. Soedin.*, 1981, 3, 403-404.
- [110] W.A. Wijesinghe, Y.J. Jeon, P. Ramasamy, M.E. Wahid, C.S. Vairappan. *Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 leukaemia cells by edible sea cucumber (Holothuria edulis) extract*. *Food Chem.*, 2013, 139(1-4), 326-331.
- [111] O.Y. Althunibat, B.H. Ridzwan, M. Taher, J.M. Daud, S. Jauhari Arief Ichwan, H. Qaralleh. *Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, Holothuria edulis Lesson and Stichopus horrens Selenka*. *Acta Biol. Hung*, 2013, 64(1), 10-20.
- [112] V.A. Stonik, I.I. Mal'tsev, A.I. Kalinovskii, G.B. Elyakov. *Glycosides of marine invertebrates. XII. Structure of a new triterpene oligoglycoside from holothurians of the Stichopodidae family*. *Khim. Prir. Soedin.*, 1982, 2, 200-204.
- [113] X.H. Wang, Z.R. Zou, Y.H. Yi, H. Han, L. Li, M.X. Pan. *Variiegatusides: new non-sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber Stichopus variegates Semper*. *Mar. Drugs*, 2014, 12(4), 2004-2018.
- [114] V.I. Kalinin, S.A. Avilov, A.S. Silchenko, V.A. Stonik. *Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) as taxonomic markers*. *Nat. Prod. Commun.*, 2015, 10(1), 21-26.



- [115] 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.
- [116] T. Mosmann. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods, 1983, 65(1-2), 55-63.
- [117] F.C. Wong, C.C. Woo, A. Hsu, B.K. Tan. *The anti-cancer activities of Vernonia amygdalina extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways*. PLoS One, 2013, 8(10), e78021.
- [118] C. Nathan. *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. Faseb J., 1992, 6(12), 3051-3064.
- [119] S. Hatziieremia, A.I. Gray, V.A. Ferro, A. Paul, R. Plevin. *The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NF- $\kappa$ B signalling pathways in monocytes/macrophages*. British J. Pharmacol., 2006, 149(2), 188-198.
- [120] A.I. Kalinovsky, I.I. Maltsev, A.S. Antonov, V.A. Stonik.  *$^{13}$ C NMR studies on the chemical structure of holothurian glycosides*. Bioorg. Khim., 1984, 10(12), 1655-1663.
- [121] H. Han, Y.H. Yi, L. Li, X.H. Wang, B.S. Liu, P. Sun, M.X. Pan. *A new triterpene glycoside from sea cucumber Holothuria leucospilota*. Chin. Chem. Lett., 2007, 18(2), 161-164.
- [122] J. Shitamoto, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda. *Tricalysionoside A, a megastigmane gentiobioside, sulfatricalysines A-F, and tricalysiosides X-Z, ent-kaurane glucosides, from the leaves of Tricalysia dubia*. Chem. Pharm. Bull., 2011, 59(1), 72-77.
- [123] A.S. Silchenko, S.A. Avilov, A.A. Antonov, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovsky, A.V. Smirnov, R. Riguera, C. Jimenez. *Triterpene glycosides from the deep-water North-Pacific sea cucumber Synallactes nozawai Mitsukuri*. J. Nat. Prod., 2002, 65(12), 1802-1808.
- [124] D. Gülcemal, Ö. Alankuş-Çalışkan, A. Perrone, F. Özgökçe, S. Piacente, E. Bedir. *Cycloartane glycosides from Astragalus aureus*. Phytochemistry, 2011, 72(8), 761-768.
- [125] I.I. Maltsev, V.A. Stonik, A.I. Kalinovsky. *Stichoposide E - a new triterpene glycoside from holothurians of the family Stichopodidae*. Chem. Nat. Comp., 1983, 19(3), 292-295.
- [126] V.F. Sharypov, A.D. Chumak, V.A. Stonik, G.B. Elyakov. *Glycosides of marine invertebrates. X. The structure of stichoposides A and B from the holothurian Stichopus cloronotus*. Chem. Nat. Comp., 1981, 17(2), 139-142.
- [127] V.A. Stonik, I.I. Maltsev, G.B. Elyakov. *The structure of thelenosides A and B from the holothurian Thelenota ananas*. Chem. Nat. Comp., 1982, 18(5), 590-593.

- [128] I. Kitagawa, M. Kobayashi, T. Inamoto, T. Yasuzawa, Y. Kyogoku. *The structures of six antifungal oligoglycosides, stichlorosides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, and C<sub>2</sub>, from the sea cucumber Stichopus Chloronotus (Brandt)*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(8), 2387-2391.
- [129] M.J. Graniel-Sabido, G. Mirón-López, L.V. León-Deniz, R.E. Moo-Puc, C.J. Quintal-Novelo, L. Quijano, G.J. Mena-Rejón. *Total NMR assignment of a new antiproliferative triterpene oligoglycoside from the sea cucumber Astichopus multifidus*. Tetrahedron Lett., 2016, 57(39), 4375-4378.
- [130] G.K. Oleinikova, T.A. Kuznetsova, N.V. Rovnykh, A.I. Kalinovskii, G.B. Elyakov. *Glycosides of marine invertebrates. XVIII. Holothurin A<sub>2</sub> from the Caribbean holothurian Holothuria floridana*. Chem. Nat. Comp., 1982, 18(4), 501-502.
- [131] W.H. Yuan, Y.H. Yi, L. Li, B.S. Liu, H.W. Zhang, P. Sun. *Two triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia marmorata Jaeger*. Chin. Chem. Lett., 2008, 19(4), 457-460.
- [132] M. Honey-Escandon, R. Arreguin-Espinosa, F.A. Solis-Marin, Y. Samyn. *Biological and taxonomic perspective of triterpenoid glycosides of sea cucumbers of the family Holothuriidae (Echinodermata, Holothuroidea)*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 2015, 180, 16-39.
- [133] A.S. Silchenko, V.A. Stonik, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskiy, A.M. Zaharenko, A.V. Smirnov, E. Mollo, G. Cimino. *Holothurins B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, and B<sub>4</sub>, new triterpene glycosides from Mediterranean sea cucumbers of the genus Holothuria*. J. Nat. Prod., 2005, 68(4), 564-567.
- [134] S. Nakamura, S. Sugimoto, H. Matsuda, M. Yoshikawa. *Medicinal flowers. XVII. New dammarane-type triterpene glycosides from flower buds of American ginseng, Panax quinquefolium L*. Chem. Pharm. Bull., 2007, 55(9), 1342-1348.
- [135] Z. Zhang, S. Yu, L. Chen, X. Lian. *Moebioside A as well as preparation and application thereof*. CN 104151392A, 2014.
- [136] S. Yu, X. Ye, H. Huang, R. Peng, Z. Su, X.Y. Lian, Z. Zhang. *Bioactive sulfated saponins from sea cucumber Holothuria moebii*. Planta Med., 2015, 81(2), 152-159.
- [137] S.Y. Zhang, Y.H. Yi, H.F. Tang. *Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria fuscocinerea*. J. Nat. Prod., 2006, 69(10), 1492-1495.
- [138] P. Radhika, V. Anjaneyulu, P.V.S. Rao, T.N. Makarieva, A.I. Kalinovskiy. *Chemical examination of the echinoderms of Indian Ocean: The triterpene glycosides of the sea cucumbers: Holothuria nobilis, Bohadschia aff. tenuissima and Actinopyga mauritana from Lakshadweep, Andaman and Nicobar islands*. Indian J. Chem., 2002, 41B, 1276-1282.
- [139] H. Han, Y.H. Yi, B.S. Liu, X.H. Wang, M.X. Pan. *Leucospilotaside C, a new sulfated triterpene glycoside from sea cucumber Holothuria leucospilota*. Chin. Chem. Lett., 2008, 19(12), 1462-1464.

## PHỤ LỤC PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT ĐÃ BIẾT

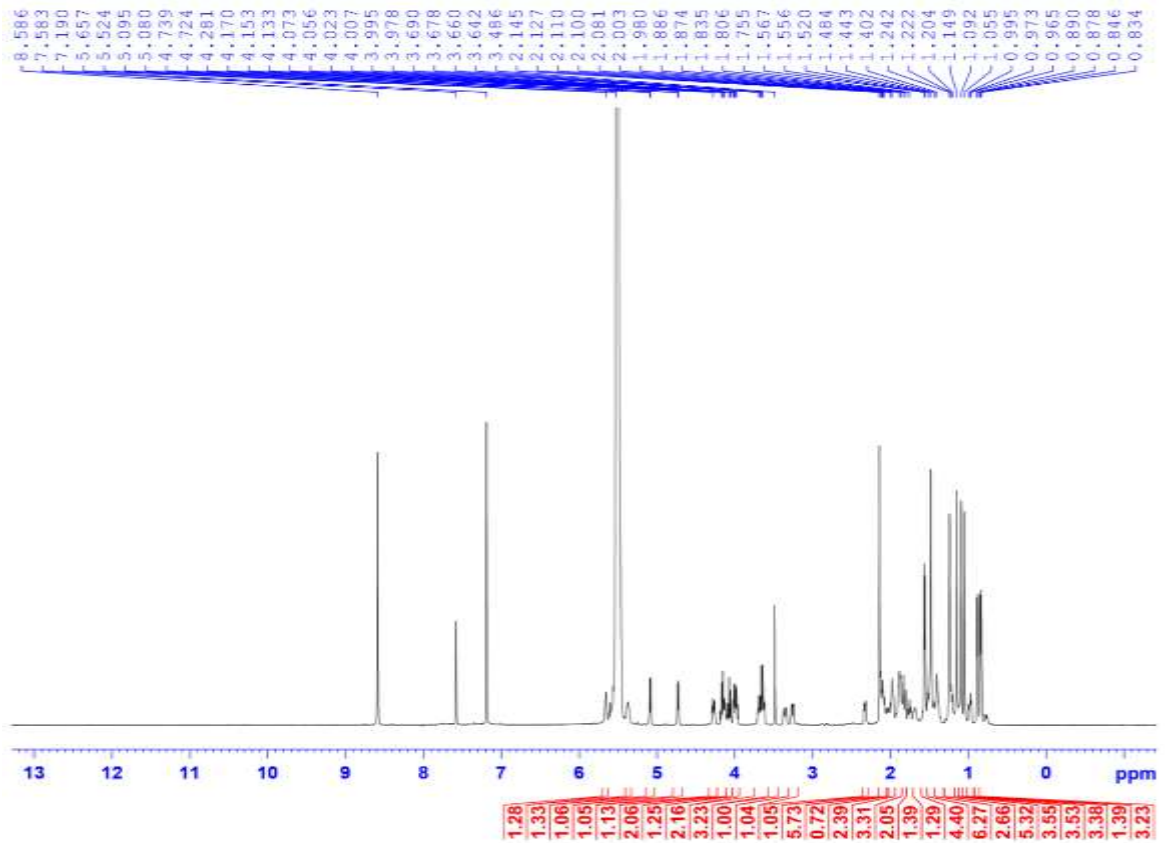
<b>PHỤ LỤC 1. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH5 .....</b>	<b>1</b>
Hình S1. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH5</b> . ....	1
Hình S2. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH5</b> . ....	1
Hình S3. Phổ HSQC của <b>SH5</b> . ....	2
Hình S4. Phổ HMBC của <b>SH5</b> . ....	2
<b>PHỤ LỤC 2. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH6 .....</b>	<b>3</b>
Hình S5. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH6</b> . ....	3
Hình S6. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH6</b> . ....	3
Hình S7. Phổ HSQC của <b>SH6</b> . ....	4
Hình S8. Phổ HMBC của <b>SH6</b> . ....	4
Hình S9. Phổ COSY của <b>SH6</b> . ....	5
<b>PHỤ LỤC 3. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH7 .....</b>	<b>6</b>
Hình S10. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH7</b> . ....	6
Hình S11. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH7</b> . ....	6
Hình S12. Phổ HSQC của <b>SH7</b> . ....	7
Hình S13. Phổ HMBC của <b>SH7</b> . ....	7
<b>PHỤ LỤC 4. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH8 .....</b>	<b>8</b>
Hình S14. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH8</b> . ....	8
Hình S15. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH8</b> . ....	8
Hình S16. Phổ HSQC của <b>SH8</b> . ....	9
Hình S17. Phổ HMBC của <b>SH8</b> . ....	9
Hình S18. Phổ COSY của <b>SH8</b> . ....	10
Hình S19. Phổ ROESY của <b>SH8</b> . ....	10
<b>PHỤ LỤC 5. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH10 .....</b>	<b>11</b>
Hình S20. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>SH10</b> . ....	11
Hình S21. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>SH10</b> . ....	11
Hình S22. Phổ HSQC của <b>SH10</b> . ....	12
Hình S23. Phổ HMBC của <b>SH10</b> . ....	12
Hình S24. Phổ COSY của <b>SH10</b> . ....	13
Hình S25. Phổ ROESY của <b>SH10</b> . ....	13

<b>PHỤ LỤC 6. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH11 .....</b>	<b>14</b>
Hình S26. Phổ $^1\text{H}$ NMR của SH11. ....	14
Hình S27. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của SH11. ....	14
Hình S28. Phổ HSQC của SH11. ....	15
Hình S29. Phổ HMBC của SH11. ....	15
Hình S30. Phổ COSY của SH11. ....	16
Hình S31. Phổ ROESY của SH11. ....	16
<b>PHỤ LỤC 7. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH12 .....</b>	<b>17</b>
Hình S32. Phổ $^1\text{H}$ NMR của SH12. ....	17
Hình S33. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của SH12. ....	17
Hình S34. Phổ HSQC của SH12. ....	18
Hình S35. Phổ HMBC của SH12. ....	18
Hình S36. Phổ COSY của SH12. ....	19
Hình S37. Phổ ROESY của SH12. ....	19
<b>PHỤ LỤC 8. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH13 .....</b>	<b>20</b>
Hình S38. Phổ $^1\text{H}$ NMR của SH13. ....	20
Hình S39. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của SH13. ....	20
Hình S40. Phổ HSQC của SH13. ....	21
Hình S41. Phổ HMBC của SH13. ....	21
Hình S42. Phổ COSY của SH13. ....	22
Hình S43. Phổ ROESY của SH13. ....	22
<b>PHỤ LỤC 9. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH14 .....</b>	<b>23</b>
Hình S44. Phổ $^1\text{H}$ NMR của SH14. ....	23
Hình S45. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của SH14. ....	23
Hình S46. Phổ HSQC của SH14. ....	24
Hình S47. Phổ HMBC của SH14. ....	24
Hình S48. Phổ COSY của SH14. ....	25
Hình S49. Phổ ROESY của SH14. ....	25
<b>PHỤ LỤC 10. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH15 .....</b>	<b>26</b>
Hình S50. Phổ $^1\text{H}$ NMR của SH15. ....	26
Hình S51. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của SH15. ....	26
Hình S52. Phổ HSQC của SH15. ....	27

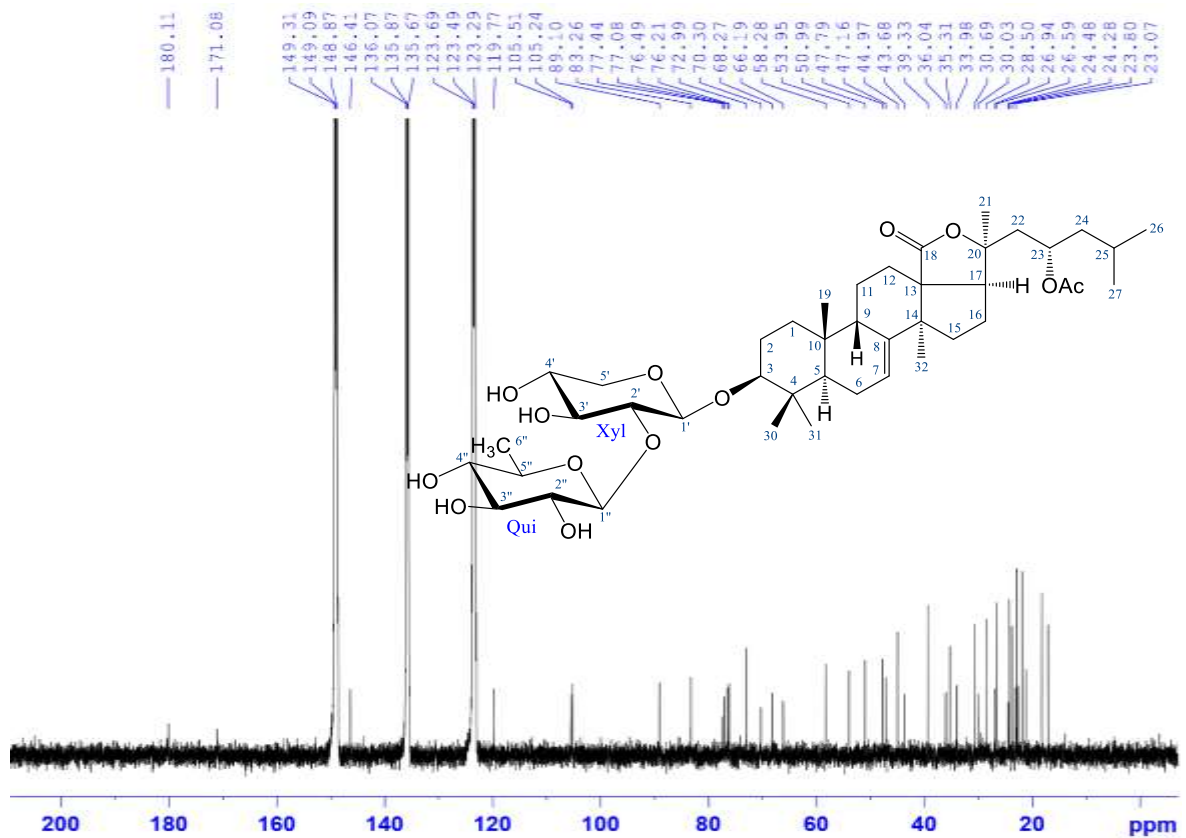
Hình S53. Phổ HMBC của <b>SH15</b> .....	27
Hình S54. Phổ COSY của <b>SH15</b> .....	28
<b>PHỤ LỤC 11. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH16 .....</b>	<b>29</b>
Hình S55. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>SH16</b> .....	29
Hình S56. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>SH16</b> .....	29
Hình S57. Phổ HSQC của <b>SH16</b> .....	30
Hình S58. Phổ HMBC của <b>SH16</b> .....	30
Hình S59. Phổ COSY của <b>SH16</b> .....	31
Hình S60. Phổ ROESY của <b>SH16</b> .....	31
<b>PHỤ LỤC 12. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH17 .....</b>	<b>32</b>
Hình S61. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>SH17</b> .....	32
Hình S62. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>SH17</b> .....	32
Hình S63. Phổ HSQC của <b>SH17</b> .....	33
Hình S64. Phổ HMBC của <b>SH17</b> .....	33
Hình S65. Phổ COSY của <b>SH17</b> .....	34
Hình S66. Phổ ROESY của <b>SH17</b> .....	34
<b>PHỤ LỤC 13. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE2.....</b>	<b>35</b>
Hình S67. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>HE2</b> .....	35
Hình S68. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>HE2</b> .....	35
Hình S69. Phổ HSQC của <b>HE2</b> .....	36
Hình S70. Phổ HMBC của <b>HE2</b> .....	36
Hình S71. Phổ COSY của <b>HE2</b> .....	37
<b>PHỤ LỤC 14. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE3.....</b>	<b>38</b>
Hình S72. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>HE3</b> .....	38
Hình S73. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>HE3</b> .....	38
Hình S74. Phổ HSQC của <b>HE3</b> .....	39
Hình S75. Phổ HMBC của <b>HE3</b> .....	39
Hình S76. Phổ COSY của <b>HE3</b> .....	40
<b>PHỤ LỤC 15. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE4.....</b>	<b>41</b>
Hình S77. Phổ <sup>1</sup> H NMR của <b>HE4</b> .....	41
Hình S78. Phổ <sup>13</sup> C NMR của <b>HE4</b> .....	41
Hình S79. Phổ HSQC của <b>HE4</b> .....	42

Hình S80. Phổ HMBC của <b>HE4</b> .	42
Hình S81. Phổ COSY của <b>HE4</b> .	43
<b>PHỤ LỤC 16. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE5</b>	<b>44</b>
Hình S82. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>HE5</b> .	44
Hình S83. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>HE5</b> .	44
Hình S84. Phổ HSQC của <b>HE5</b> .	45
Hình S85. Phổ HMBC của <b>HE5</b> .	45
Hình S86. Phổ COSY của <b>HE5</b> .	46
<b>PHỤ LỤC 17. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE6</b>	<b>47</b>
Hình S87. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>HE6</b> .	47
Hình S88. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>HE6</b> .	47
Hình S89. Phổ HSQC của <b>HE6</b> .	48
Hình S90. Phổ HMBC của <b>HE6</b> .	48
Hình S91. Phổ COSY của <b>HE6</b> .	49
<b>PHỤ LỤC 18. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE7</b>	<b>50</b>
Hình S92. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>HE7</b> .	50
Hình S93. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>HE7</b> .	50
Hình S94. Phổ HSQC của <b>HE7</b> .	51
Hình S95. Phổ HMBC của <b>HE7</b> .	51
<b>PHỤ LỤC 19. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE8</b>	<b>52</b>
Hình S96. Phổ $^1\text{H}$ NMR của <b>HE8</b> .	52
Hình S97. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của <b>HE8</b> .	52
Hình S98. Phổ HSQC của <b>HE8</b> .	53
Hình S99. Phổ HMBC của <b>HE8</b> .	53
Hình S100. Phổ COSY của <b>HE8</b> .	54

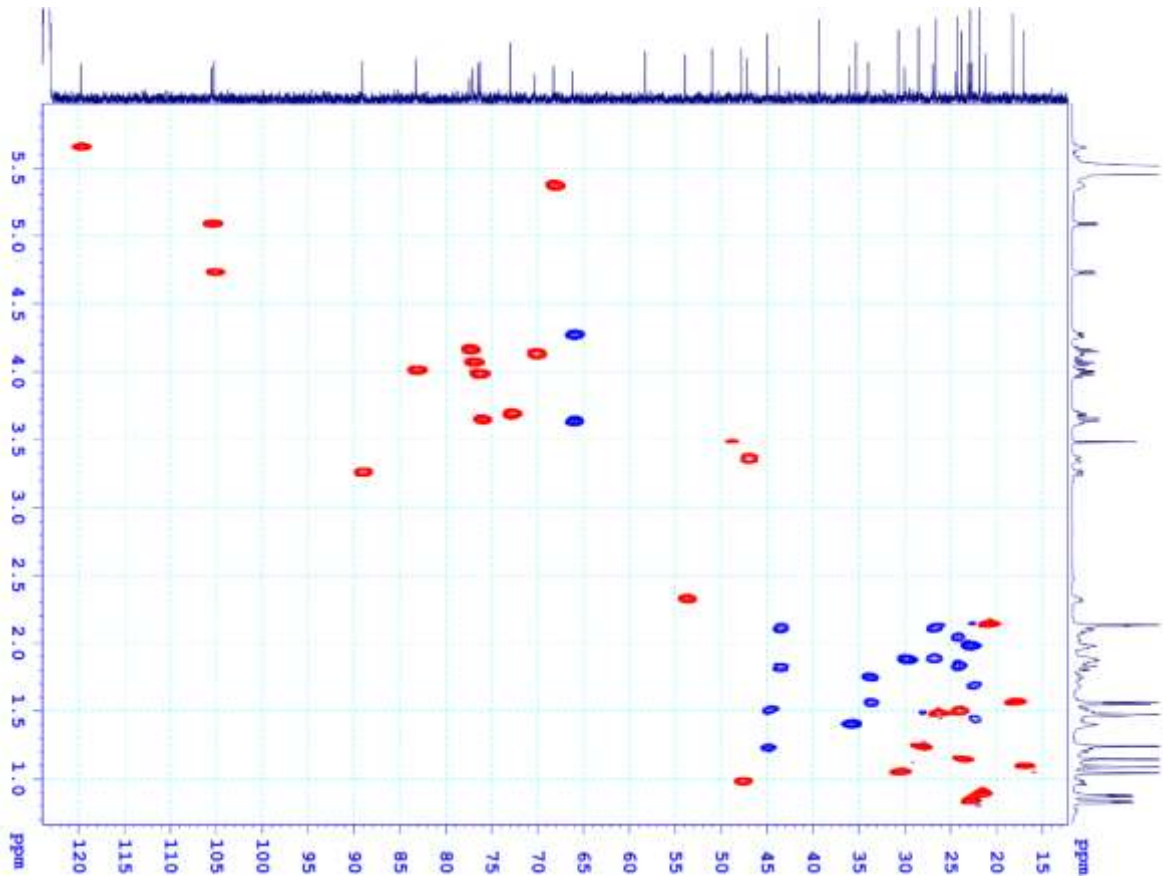
## PHỤ LỤC 1. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH5



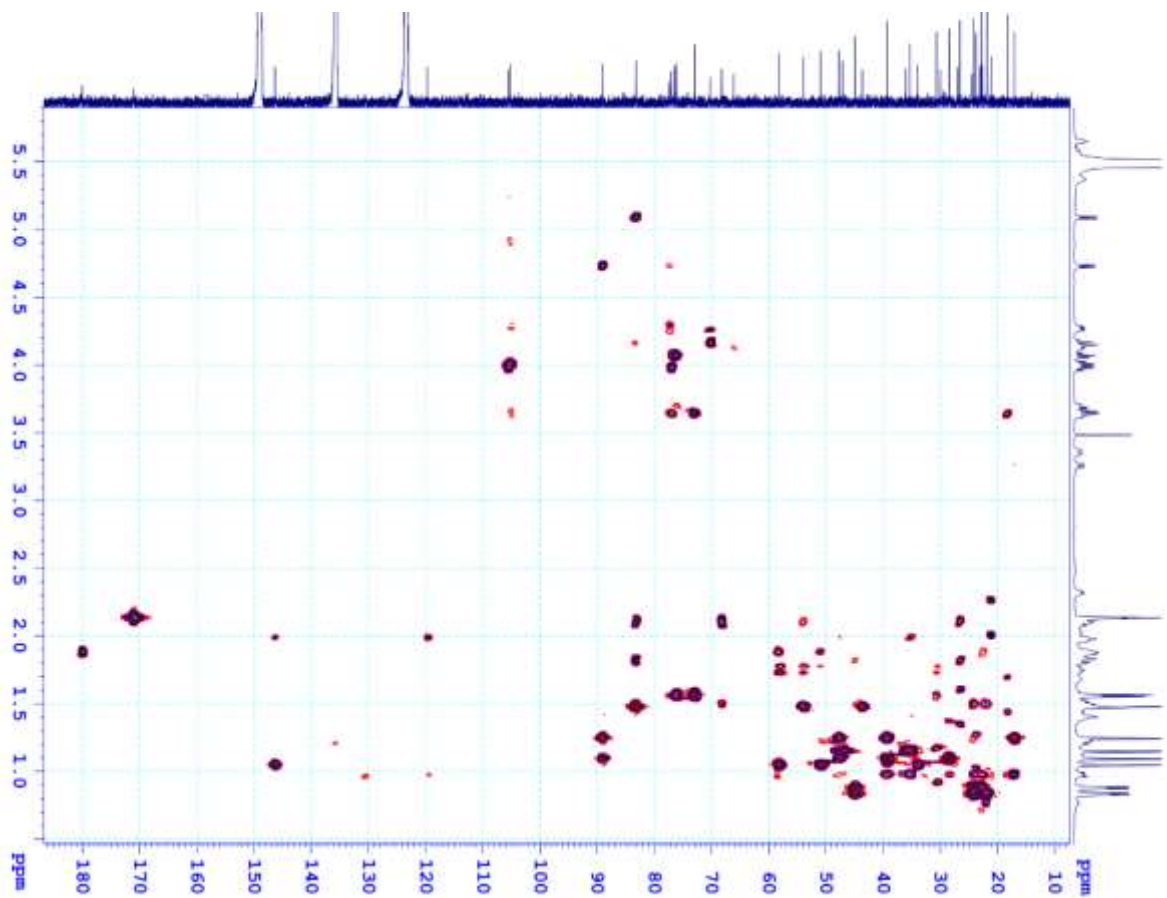
Hình S1. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH5.



Hình S2. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH5.



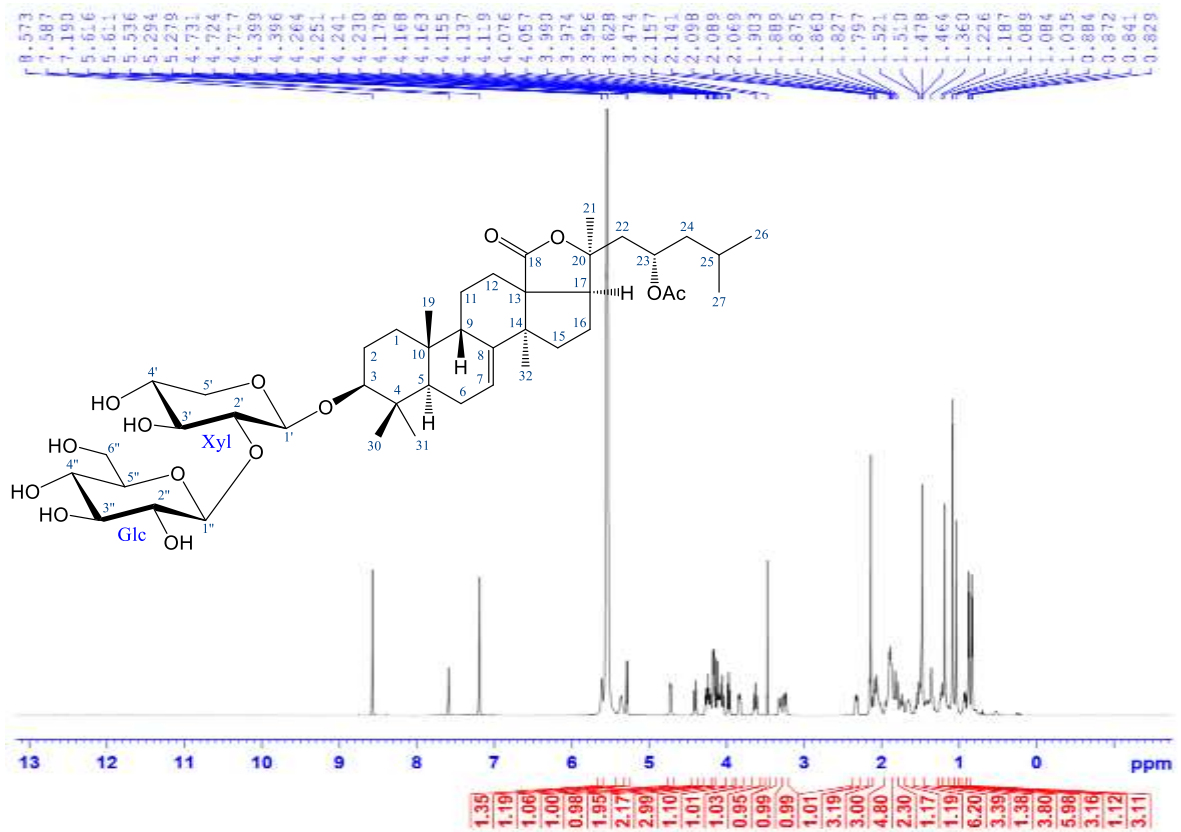
Hình S3. Phổ HSQC của SH5.



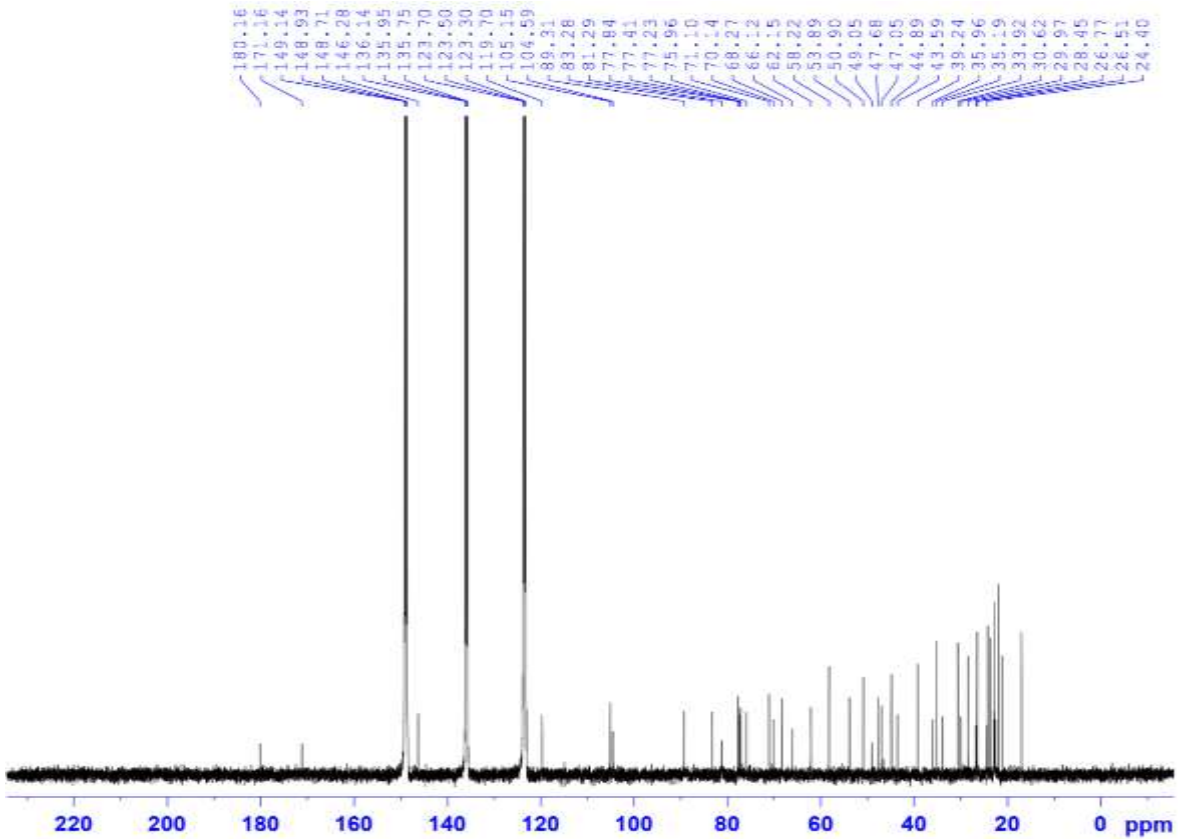
Hình S4. Phổ HMBC của SH5.



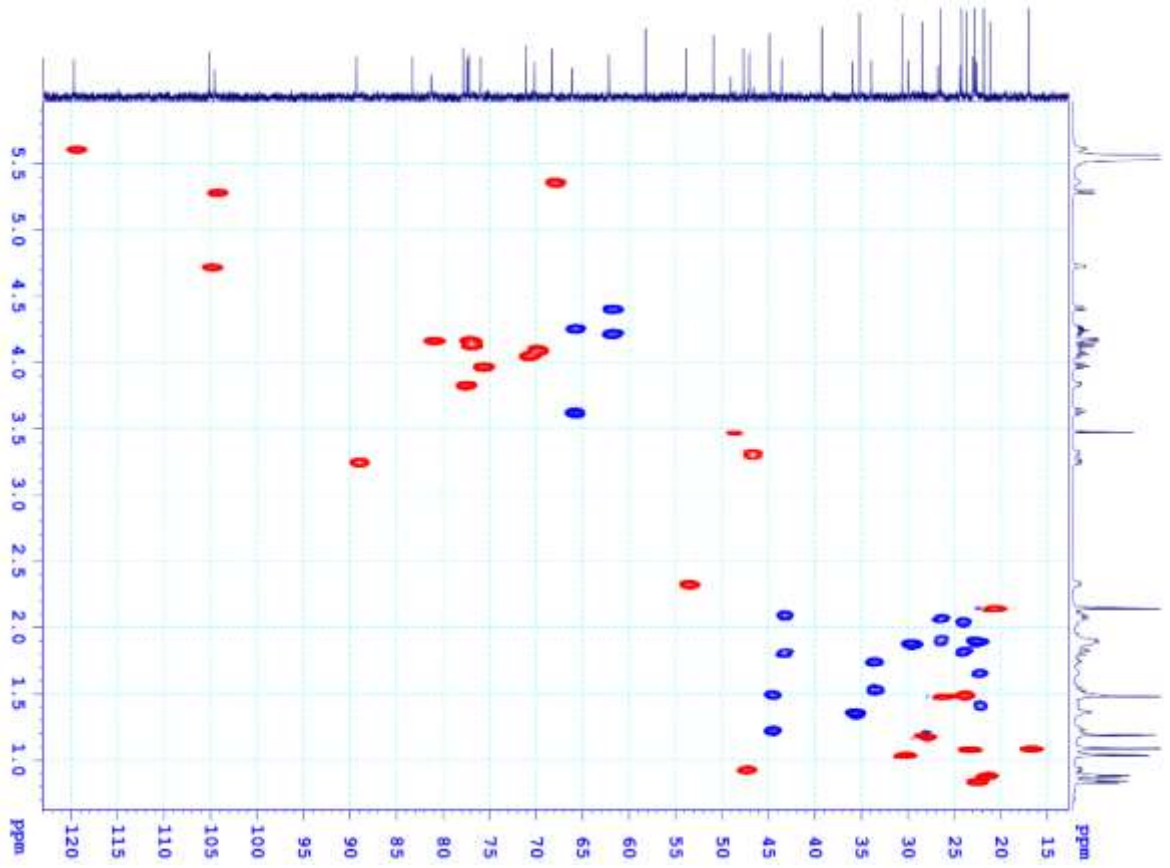
## PHỤ LỤC 2. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH6



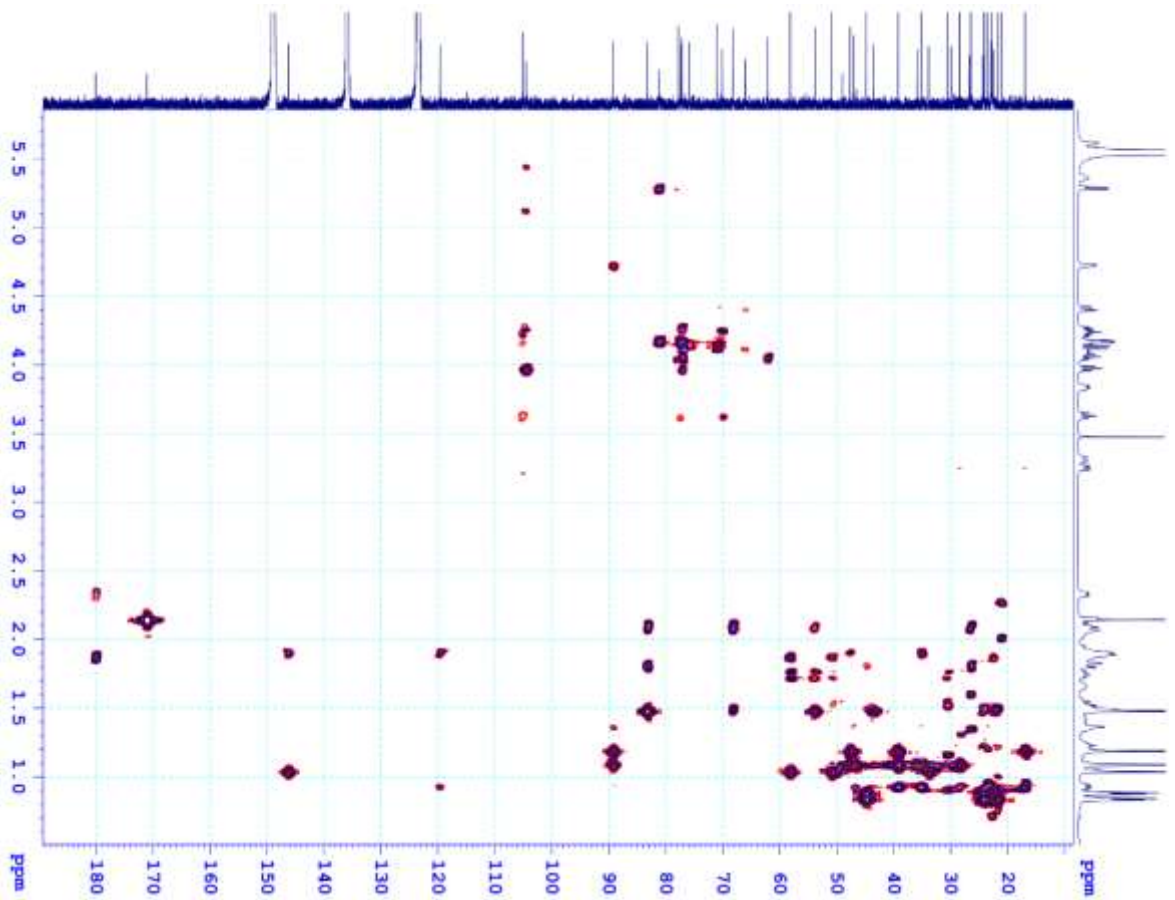
Hình S5. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH6.



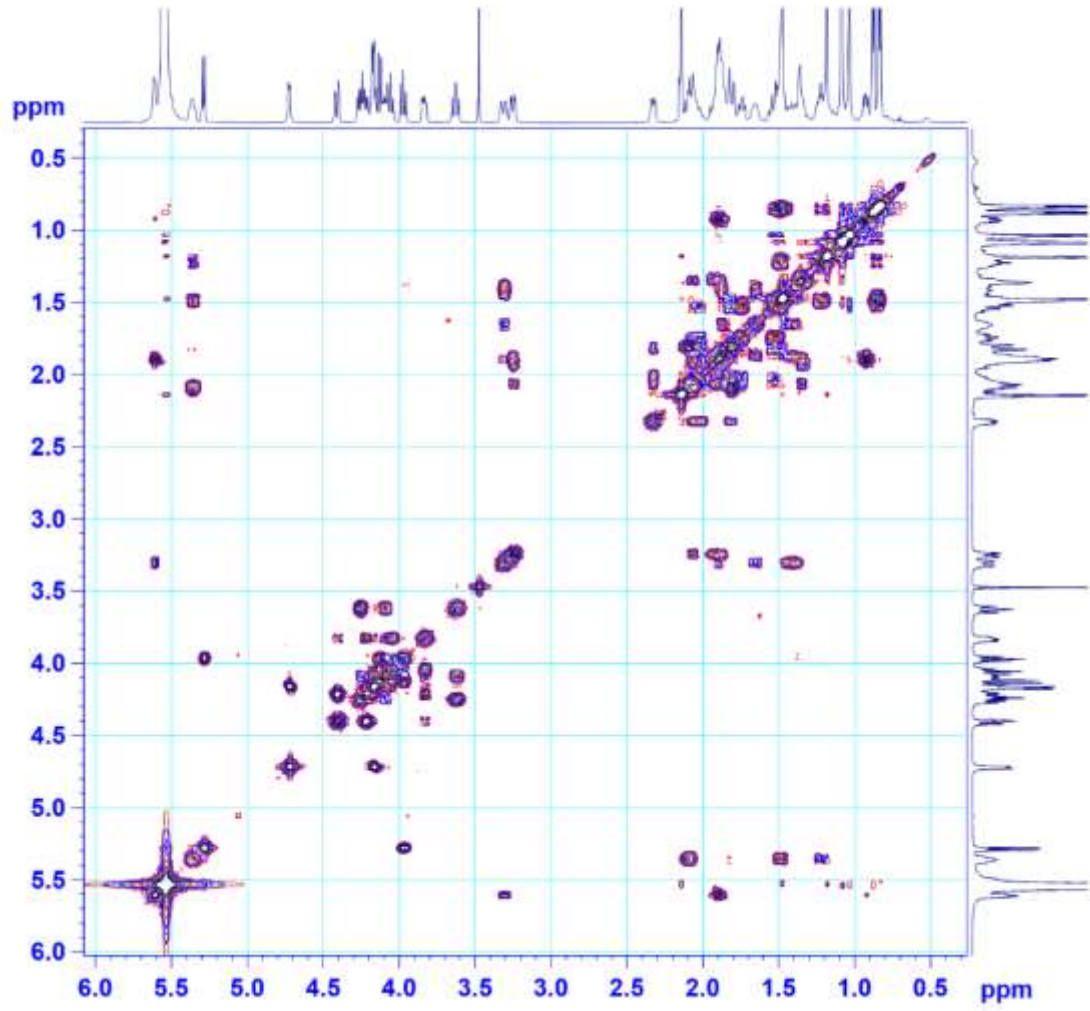
Hình S6. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH6.



Hình S7. Phổ HSQC của SH6.

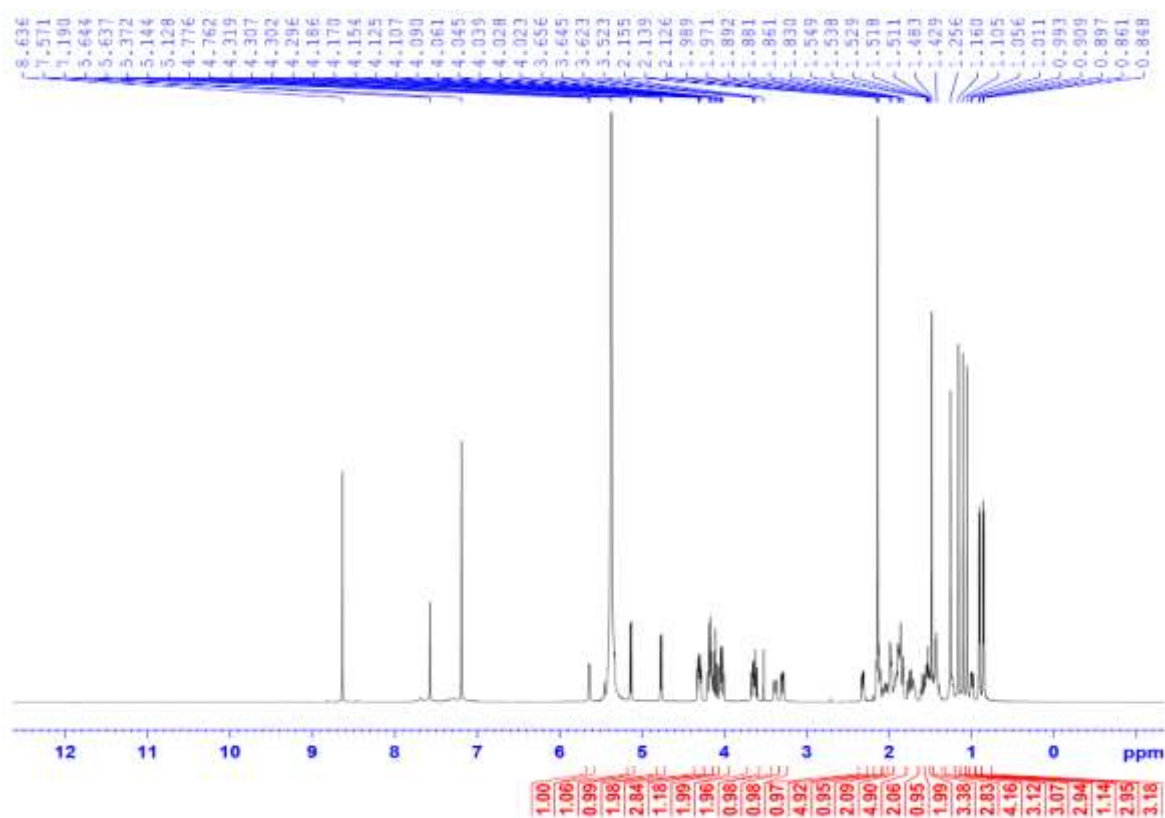


Hình S8. Phổ HMBC của SH6.

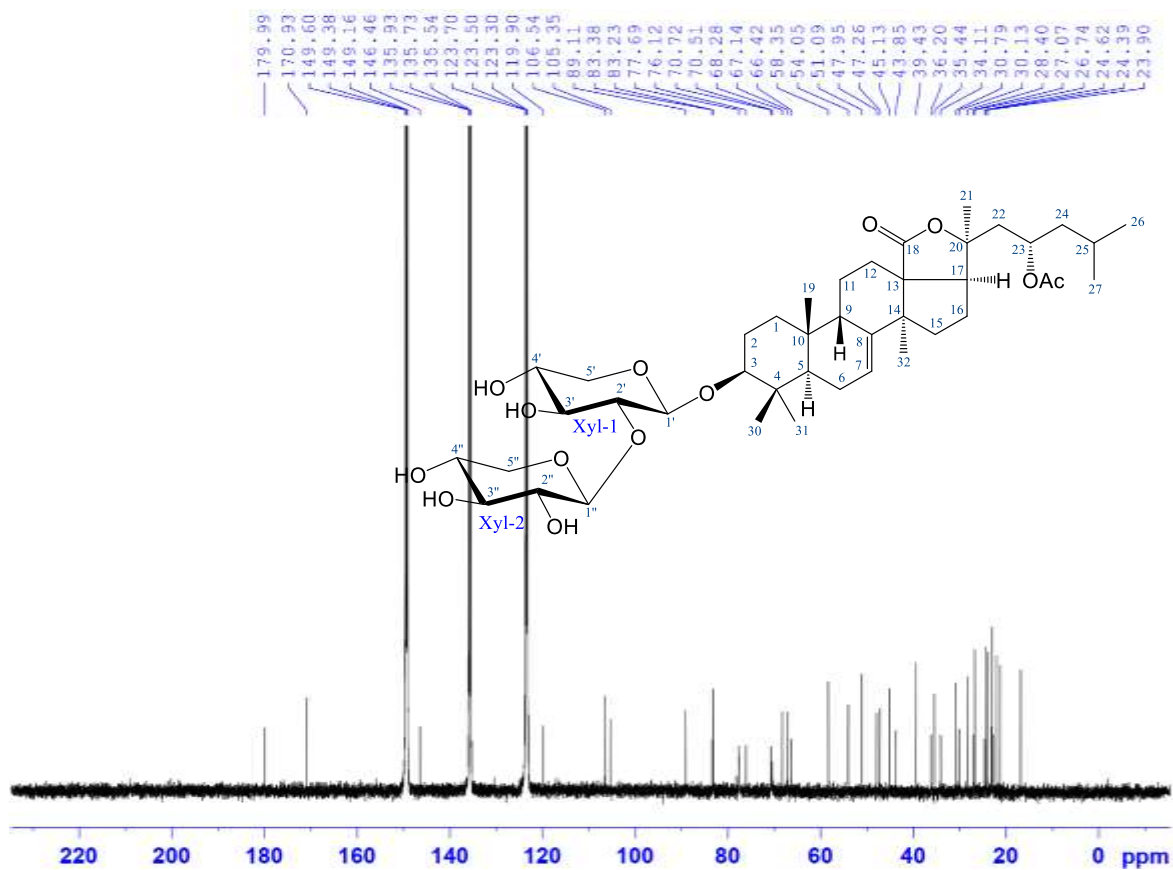


Hình S9. Phổ COSY của **SH6**.

### PHỤ LỤC 3. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH7

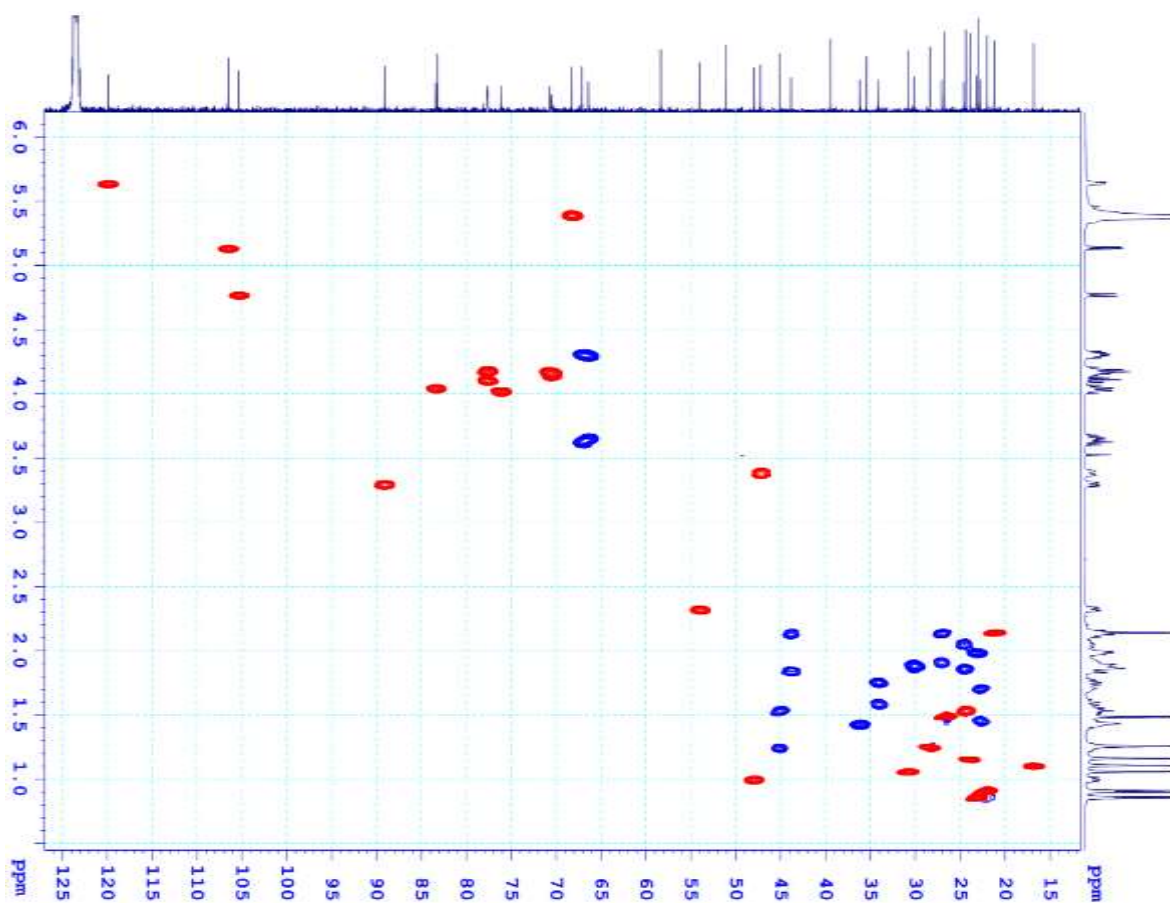


Hình S10. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH7.

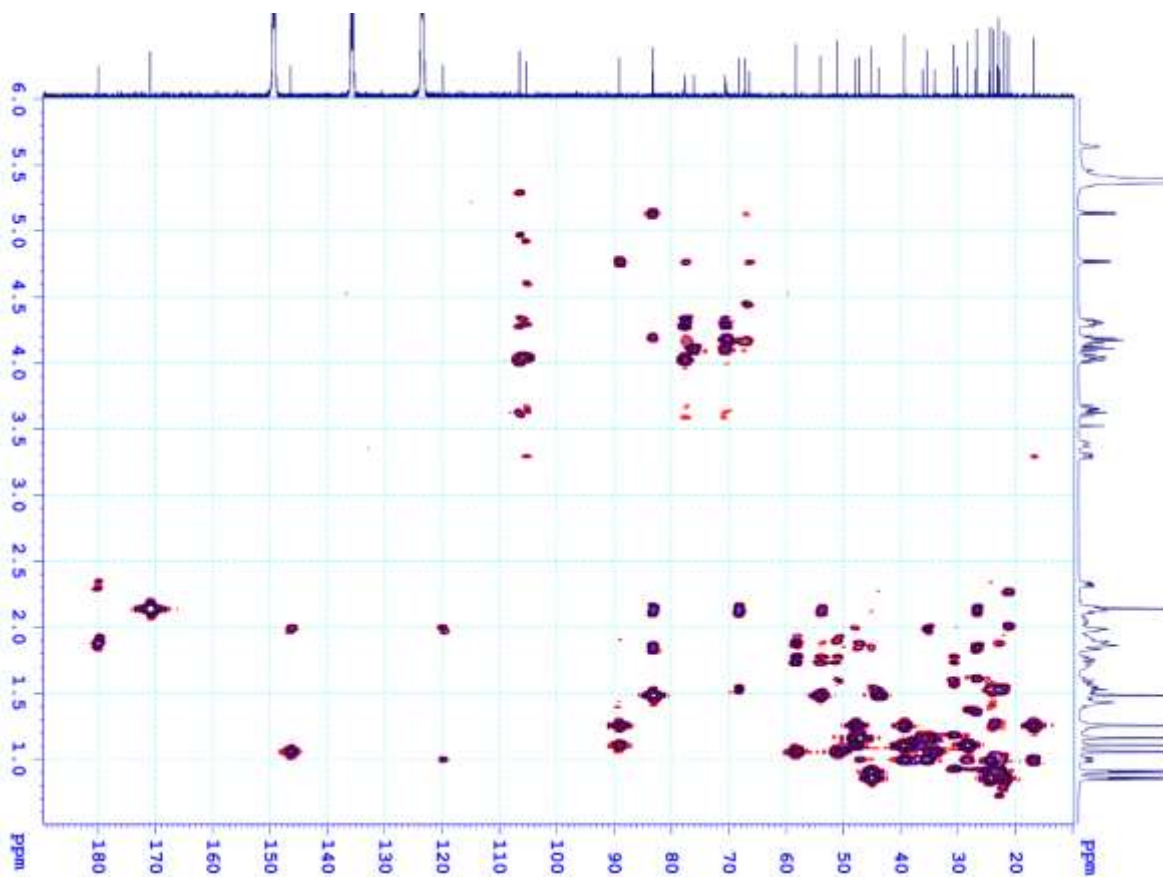


Hình S11. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH7.



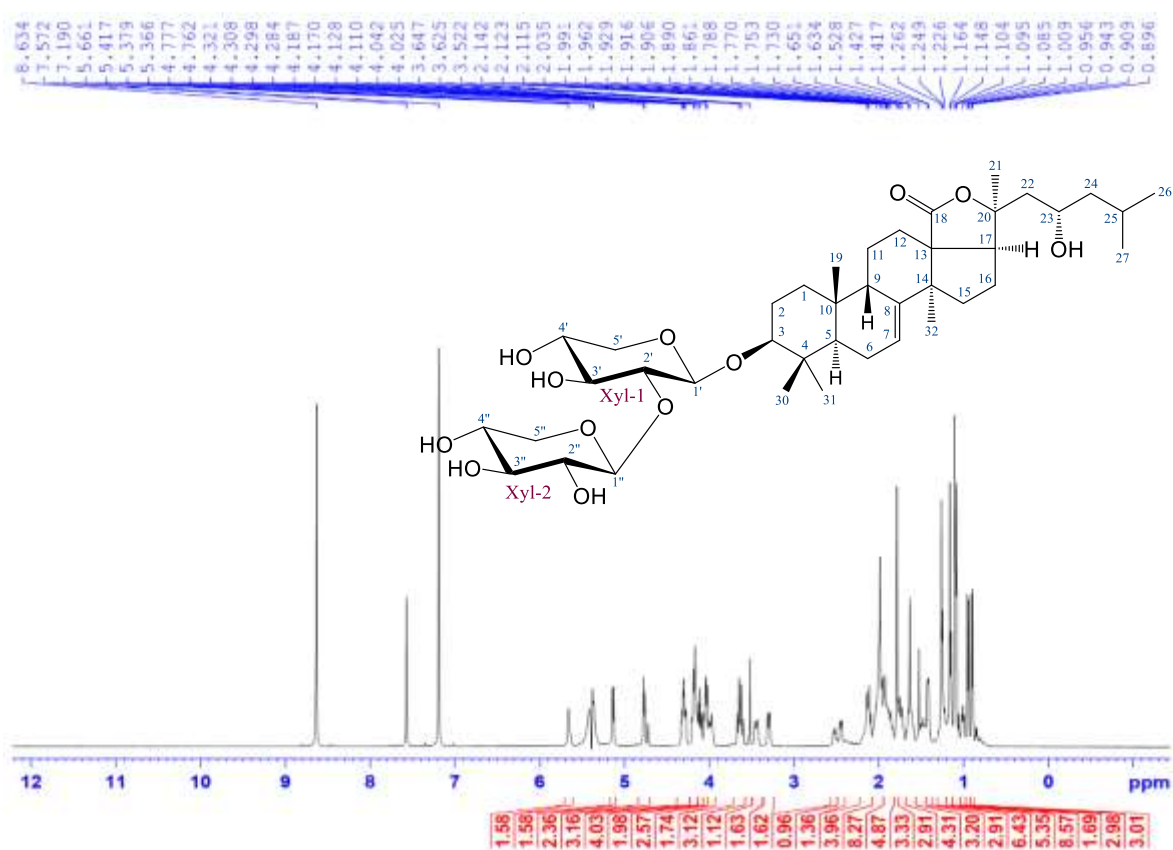
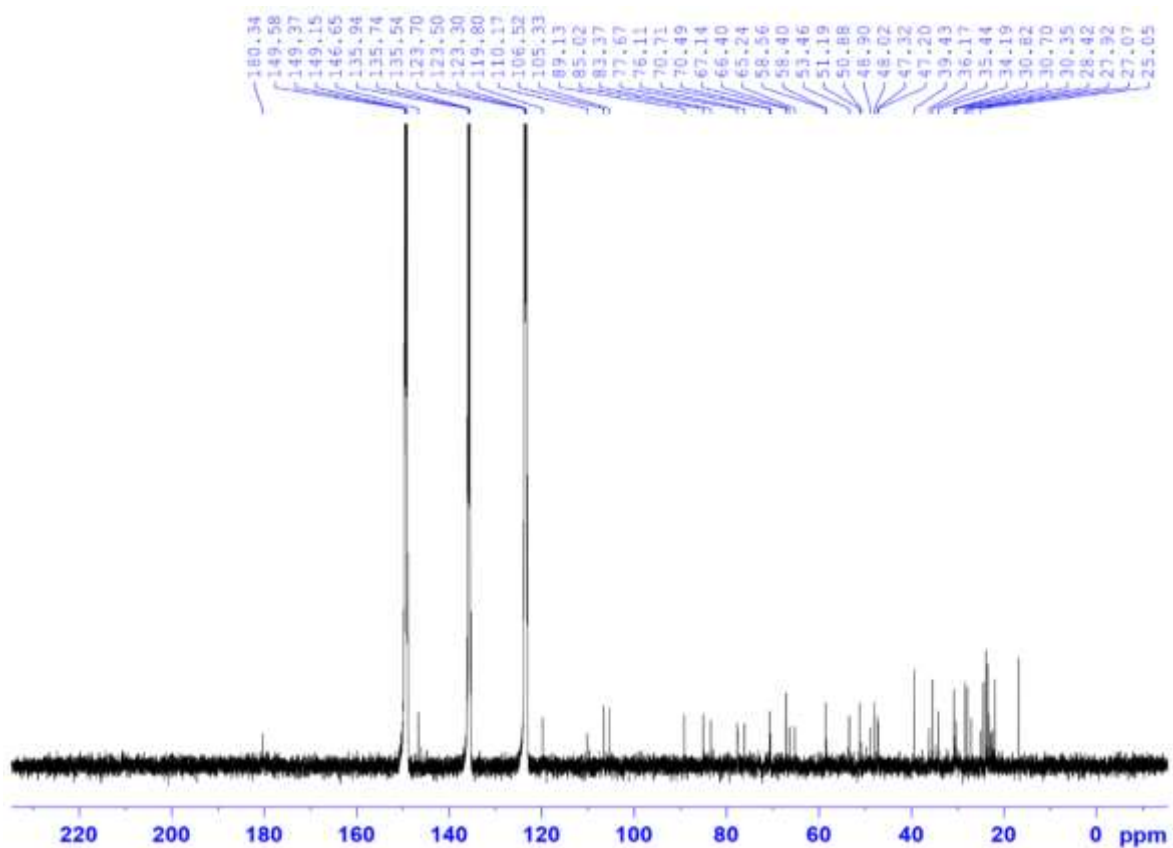


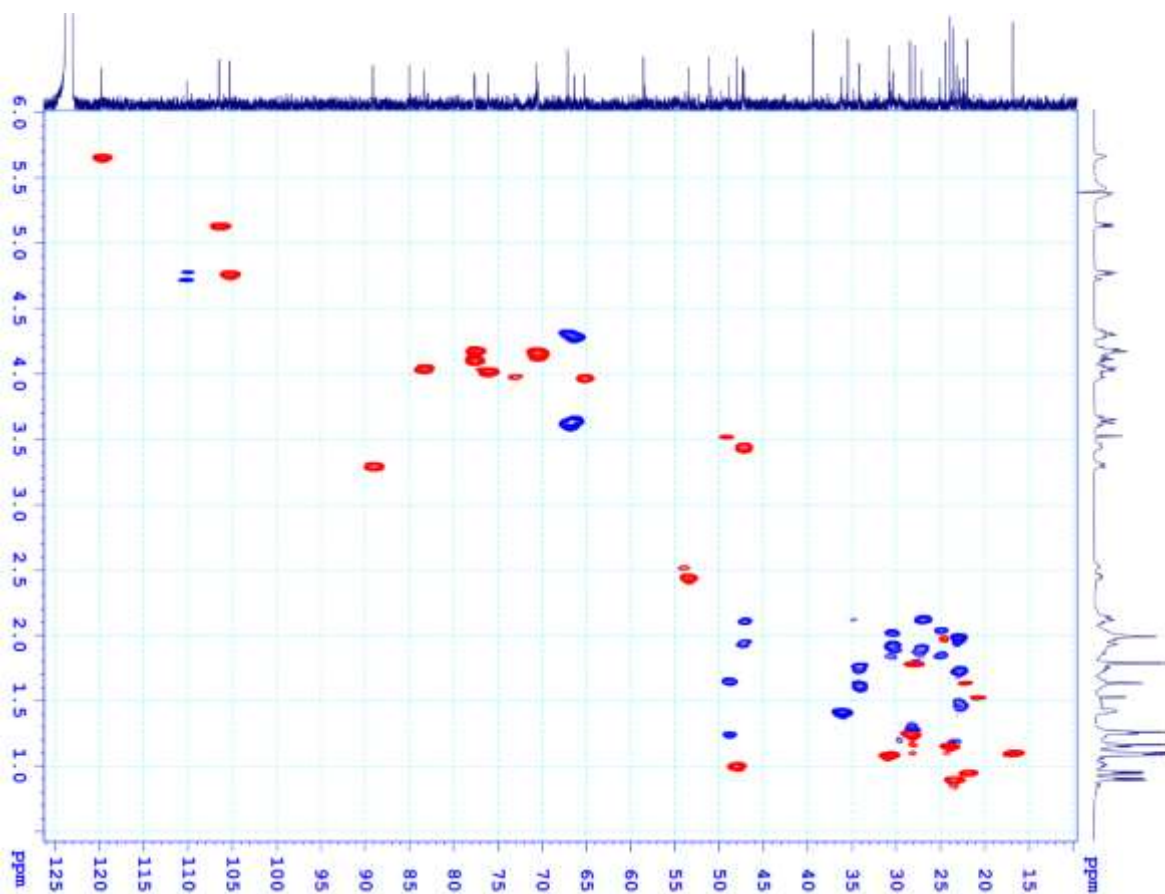
Hình S12. Phổ HSQC của SH7.



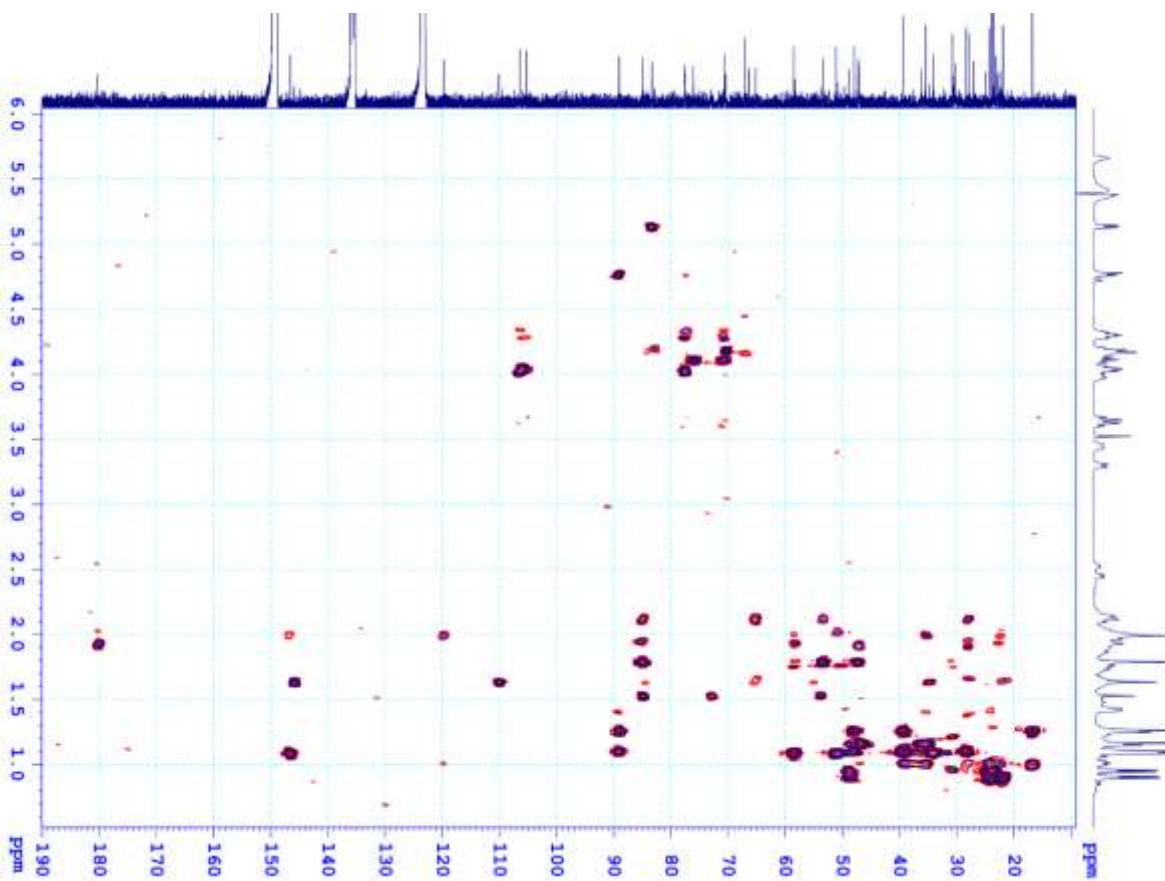
Hình S13. Phổ HMBC của SH7.

## PHỤ LỤC 4. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH8

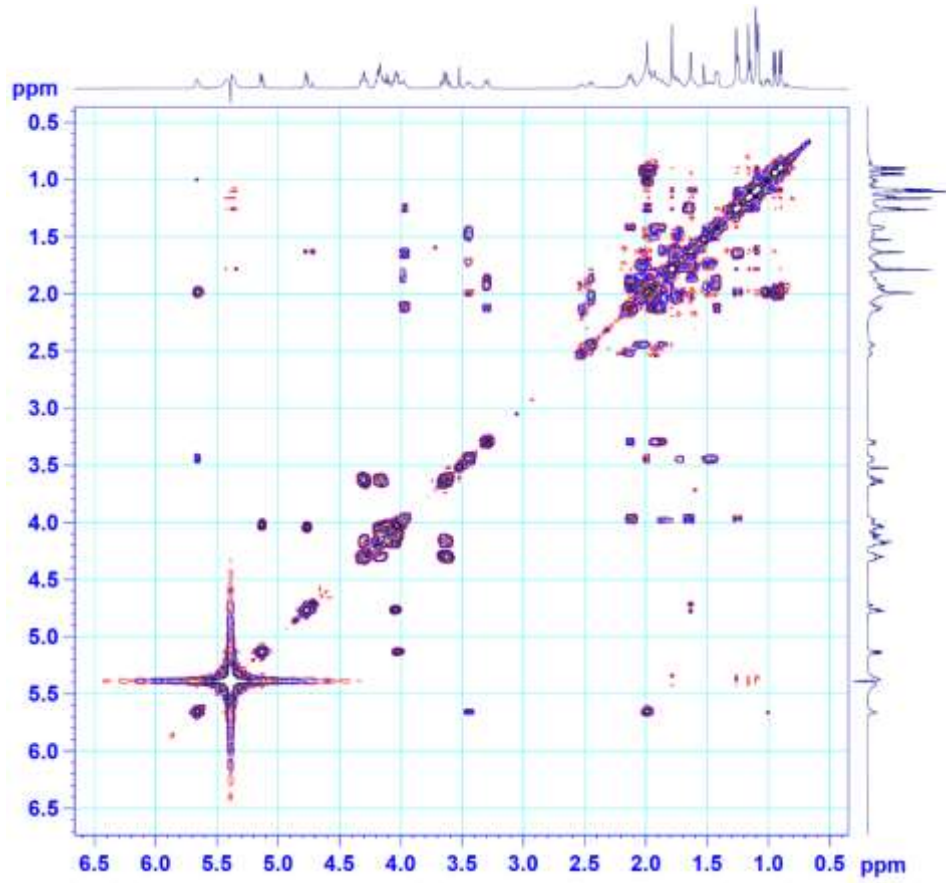
Hình S14. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH8.Hình S15. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH8.



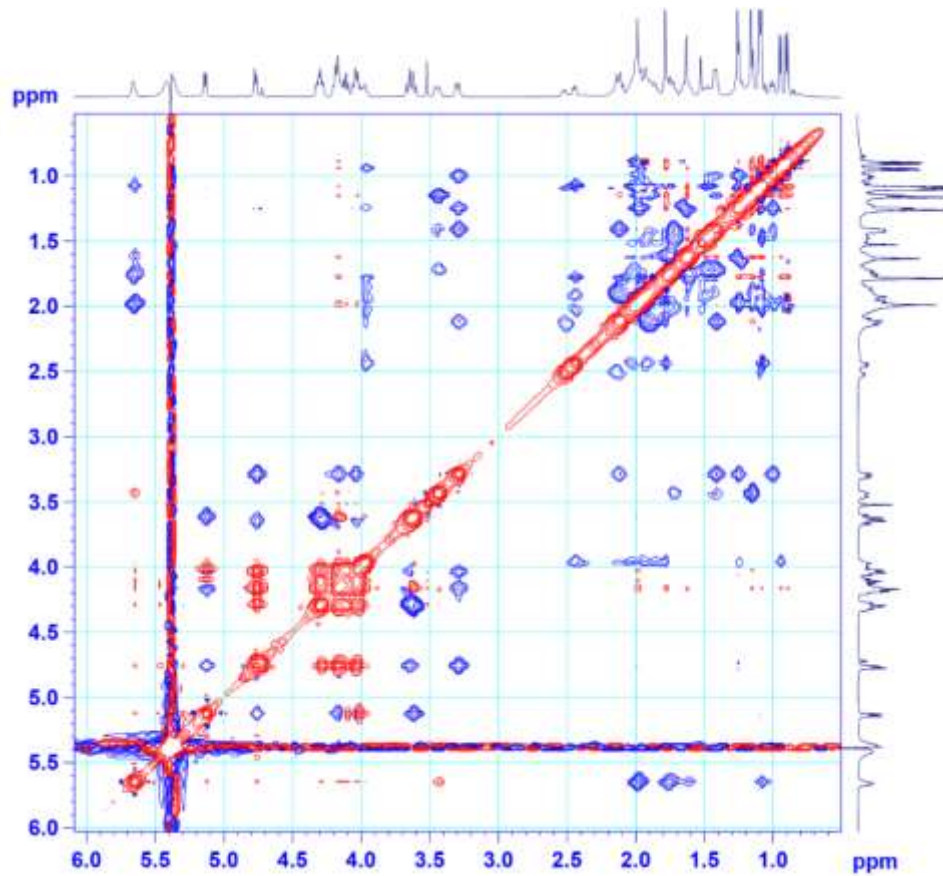
Hình S16. Phổ HSQC của SH8.



Hình S17. Phổ HMBC của SH8.



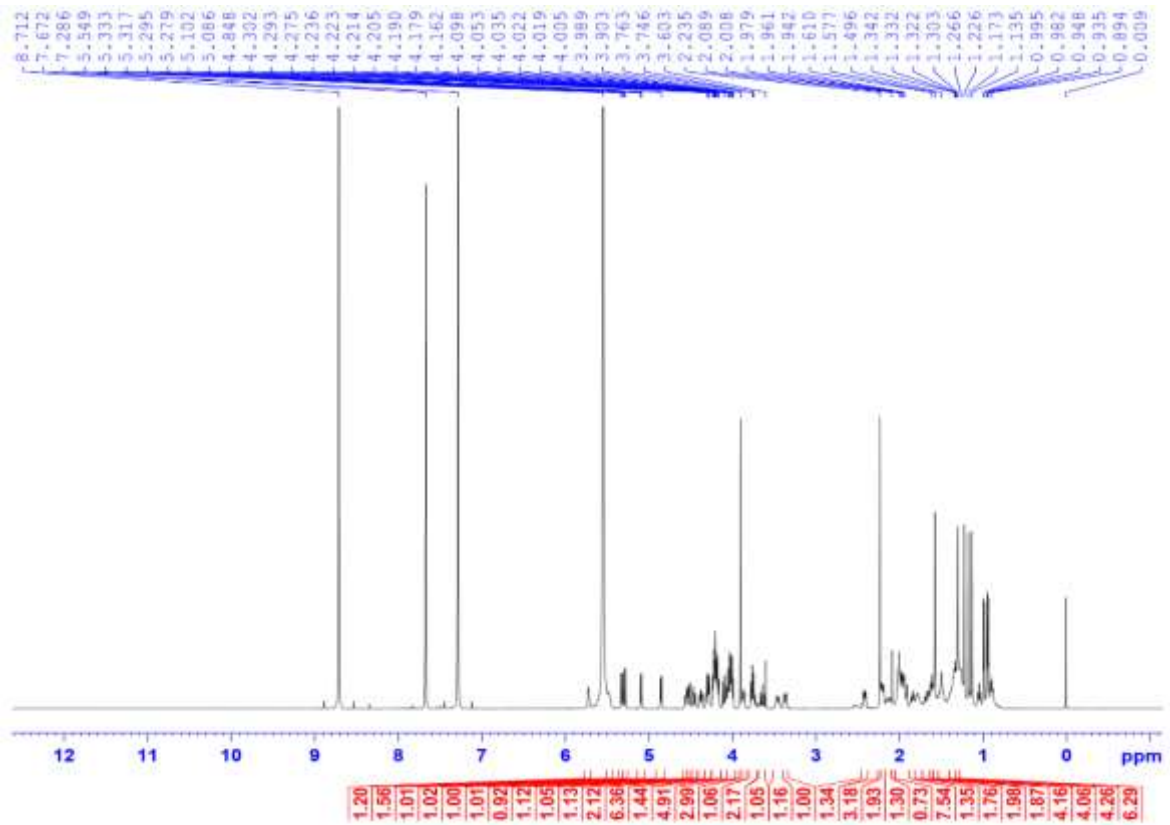
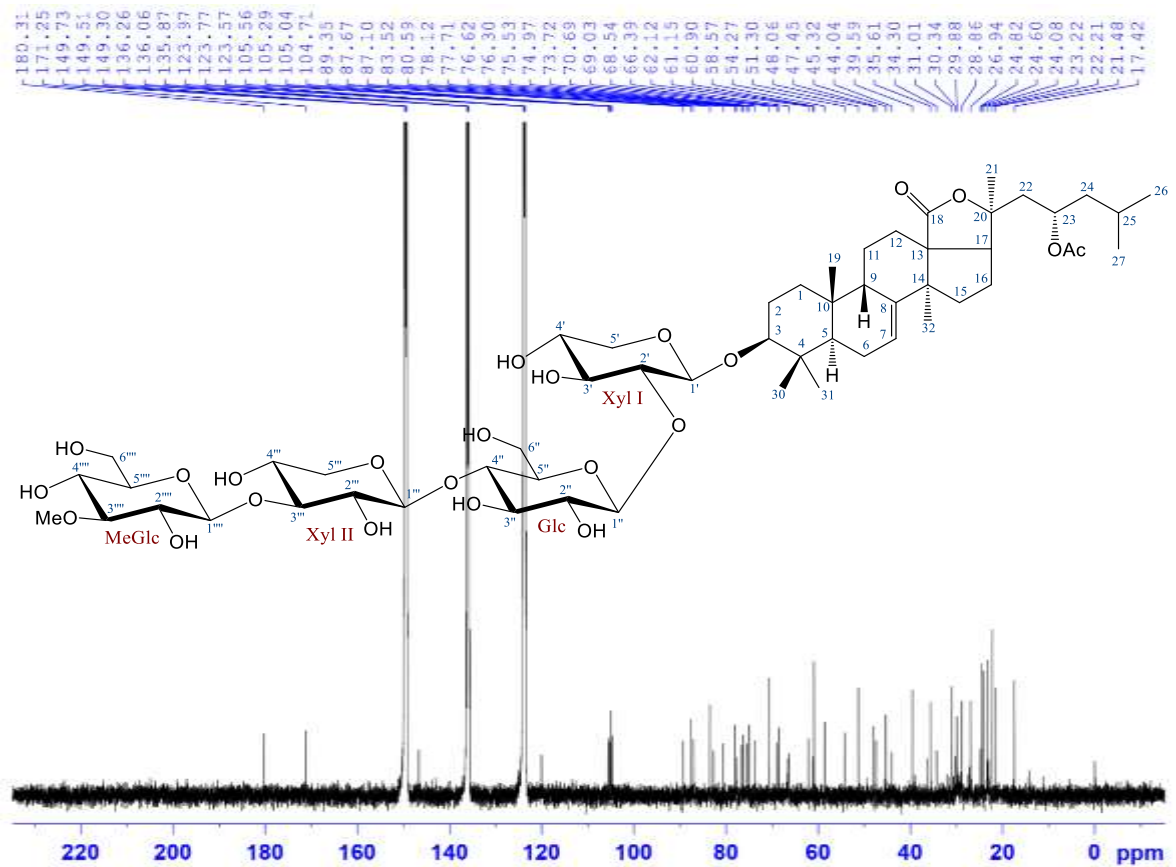
Hình S18. Phổ COSY của SH8.

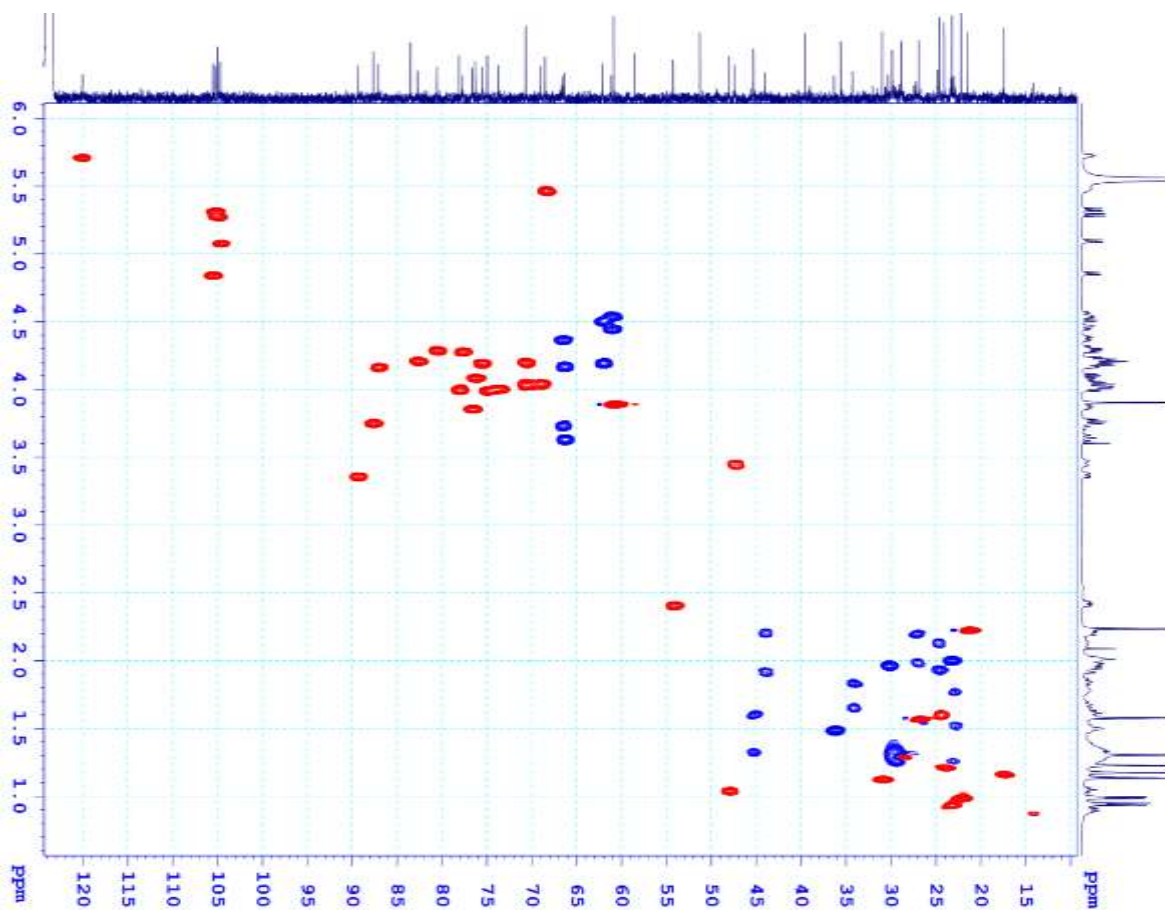


Hình S19. Phổ ROESY của SH8.

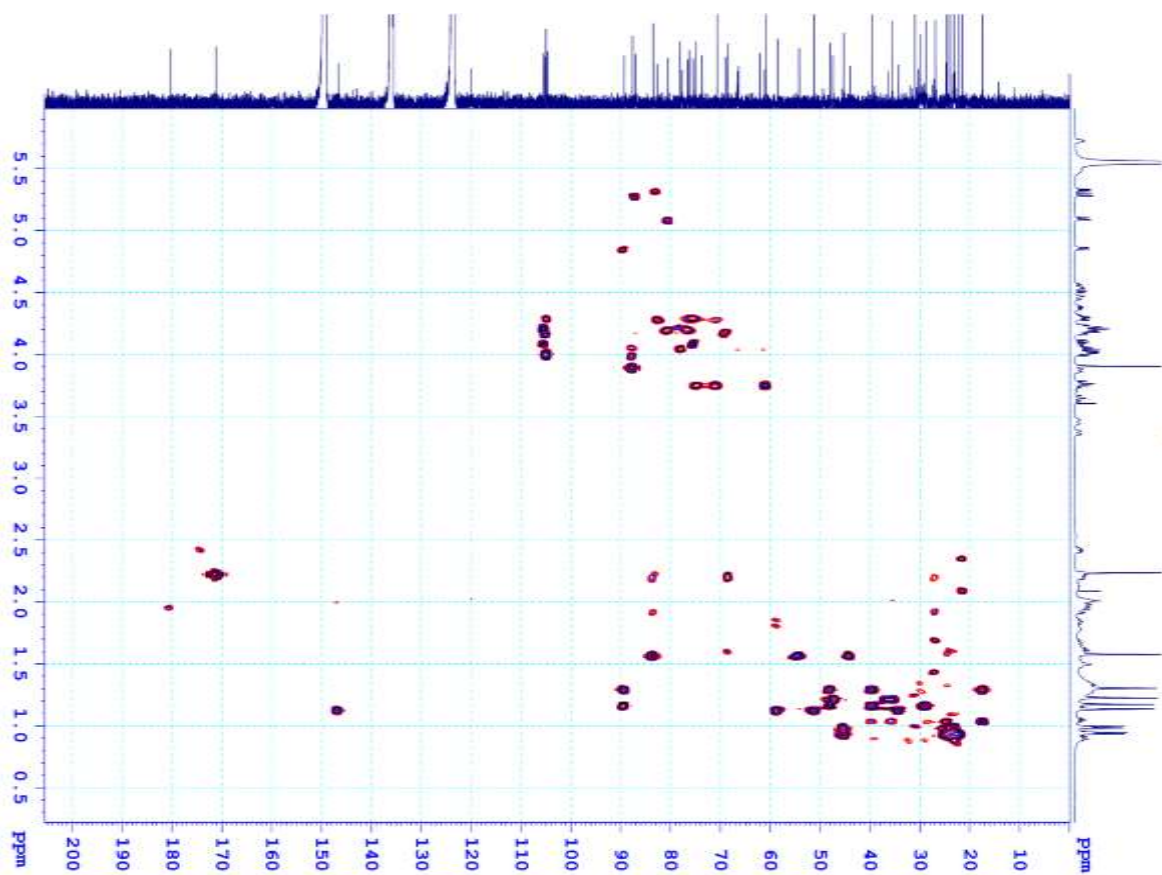


## PHỤ LỤC 5. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH10

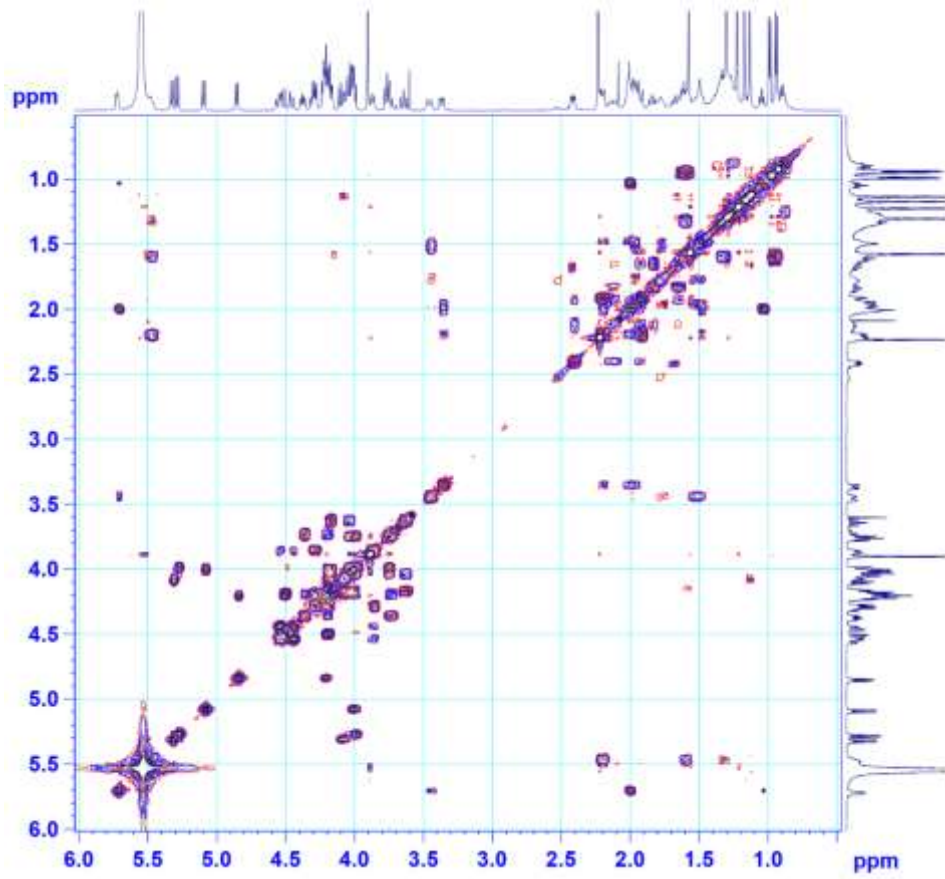
Hình S20. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH10.Hình S21. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH10.



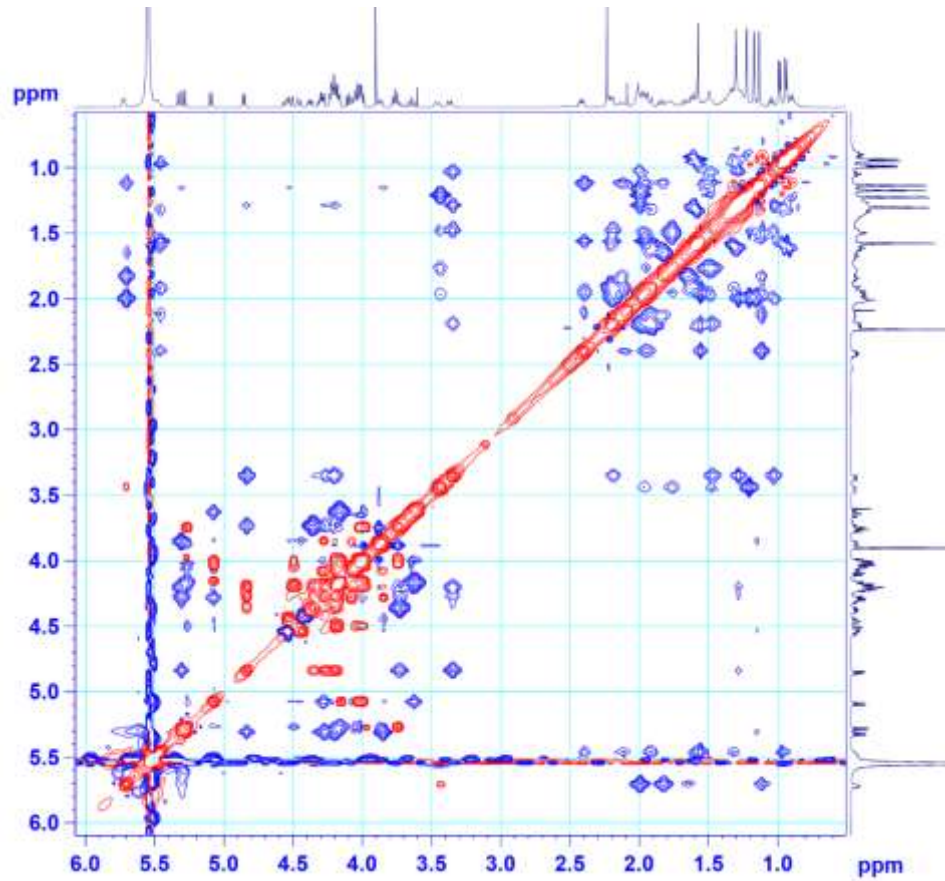
Hình S22. Phổ HSQC của SH10.



Hình S23. Phổ HMBC của SH10.

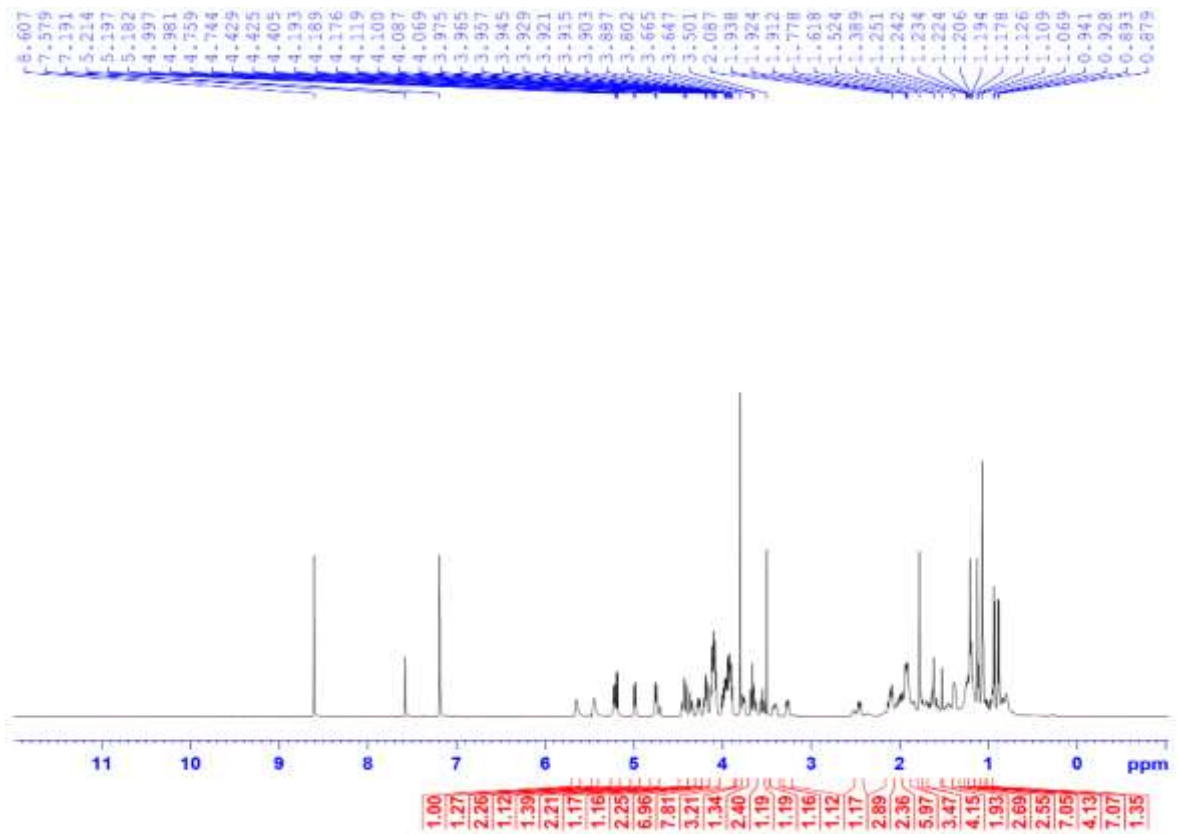
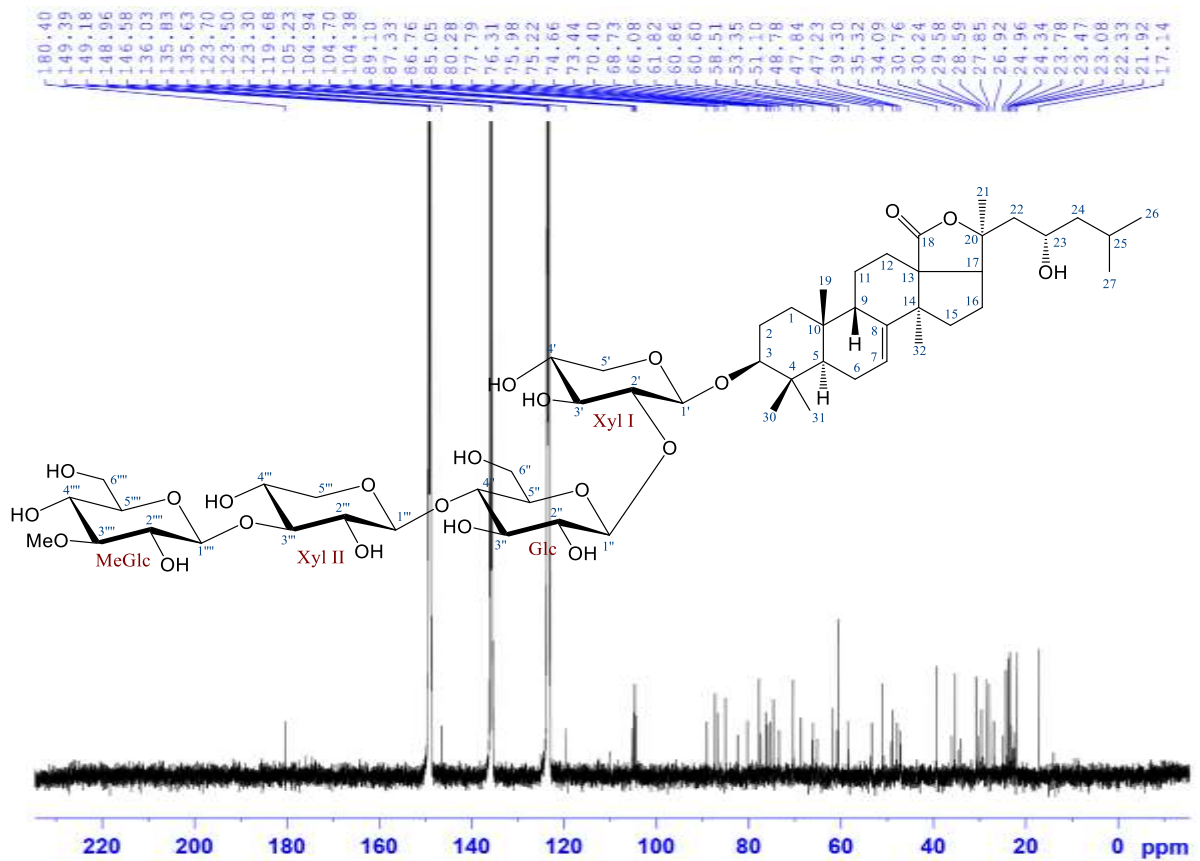


Hình S24. Phổ COSY của SH10.

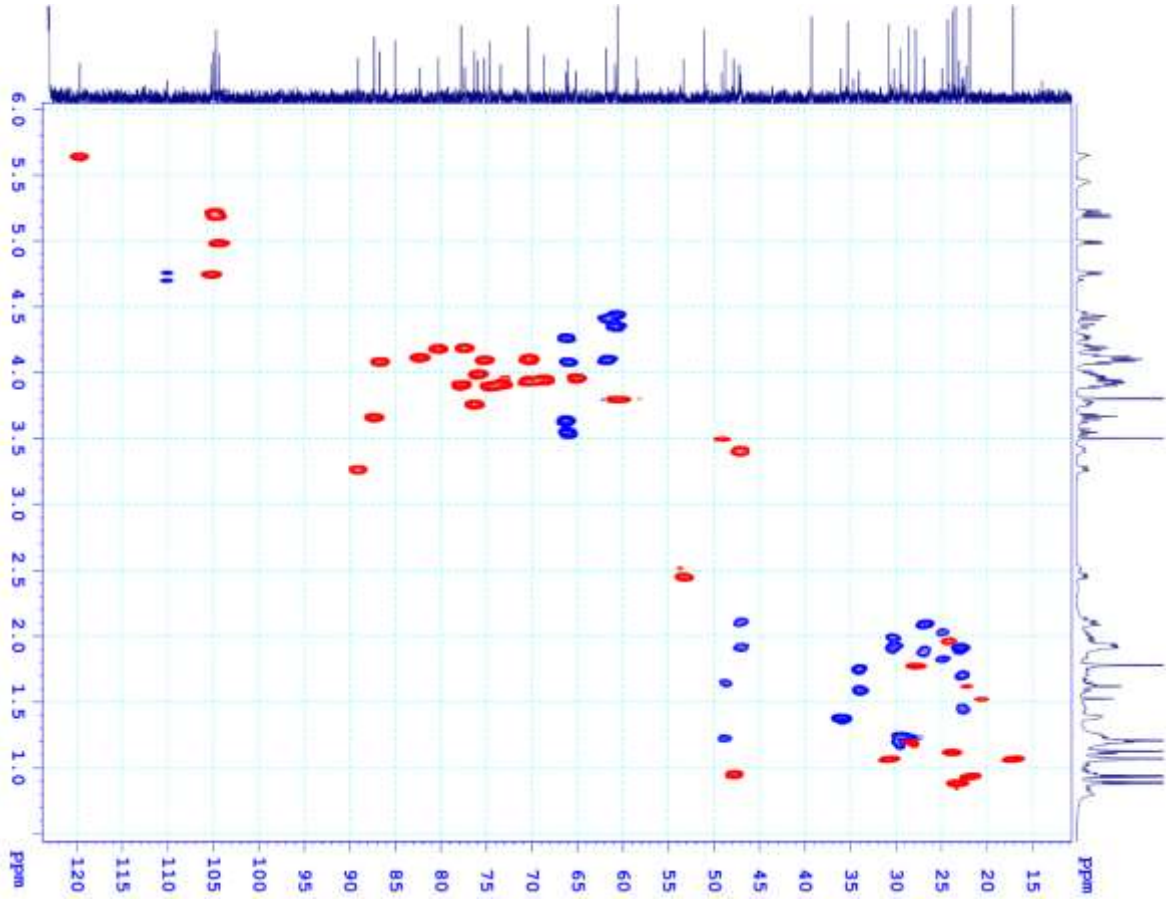


Hình S25. Phổ ROESY của SH10.

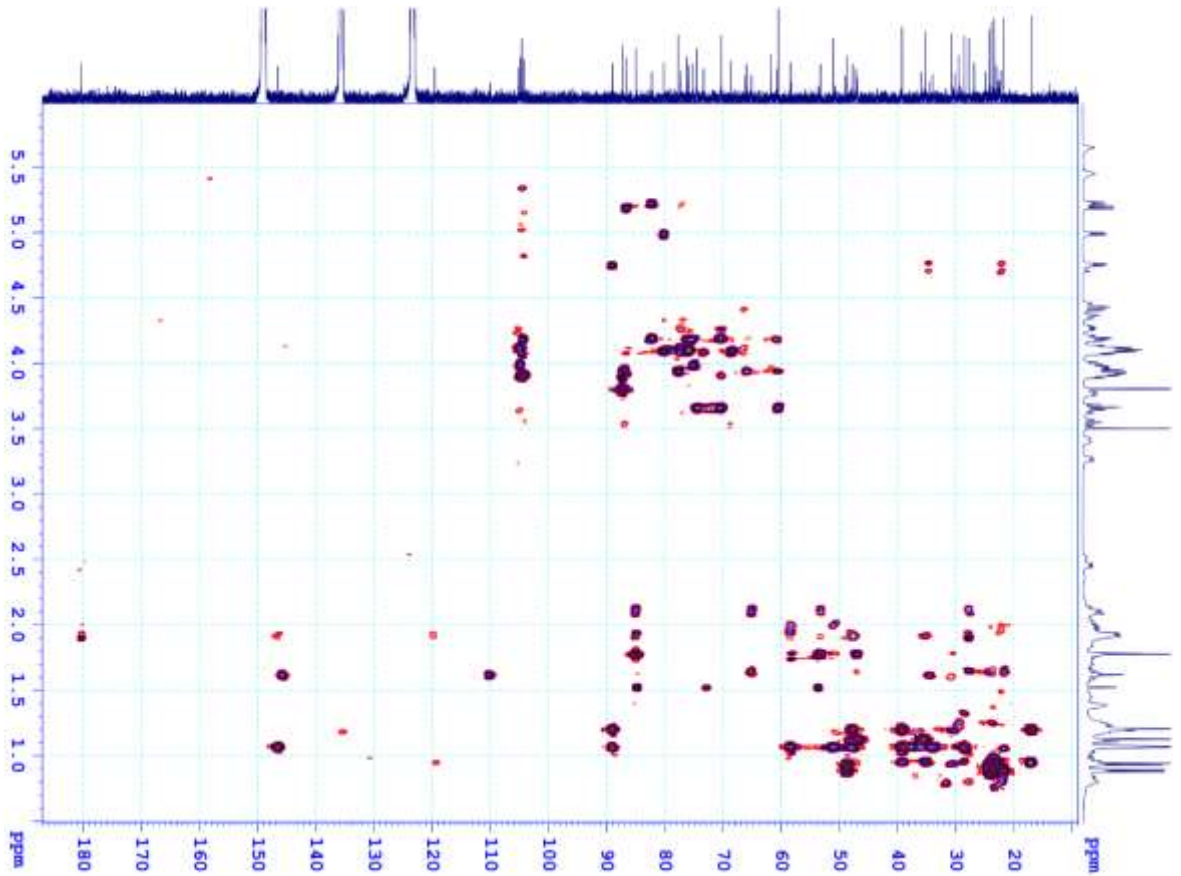
## PHỤ LỤC 6. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH11

Hình S26. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH11.Hình S27. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH11.

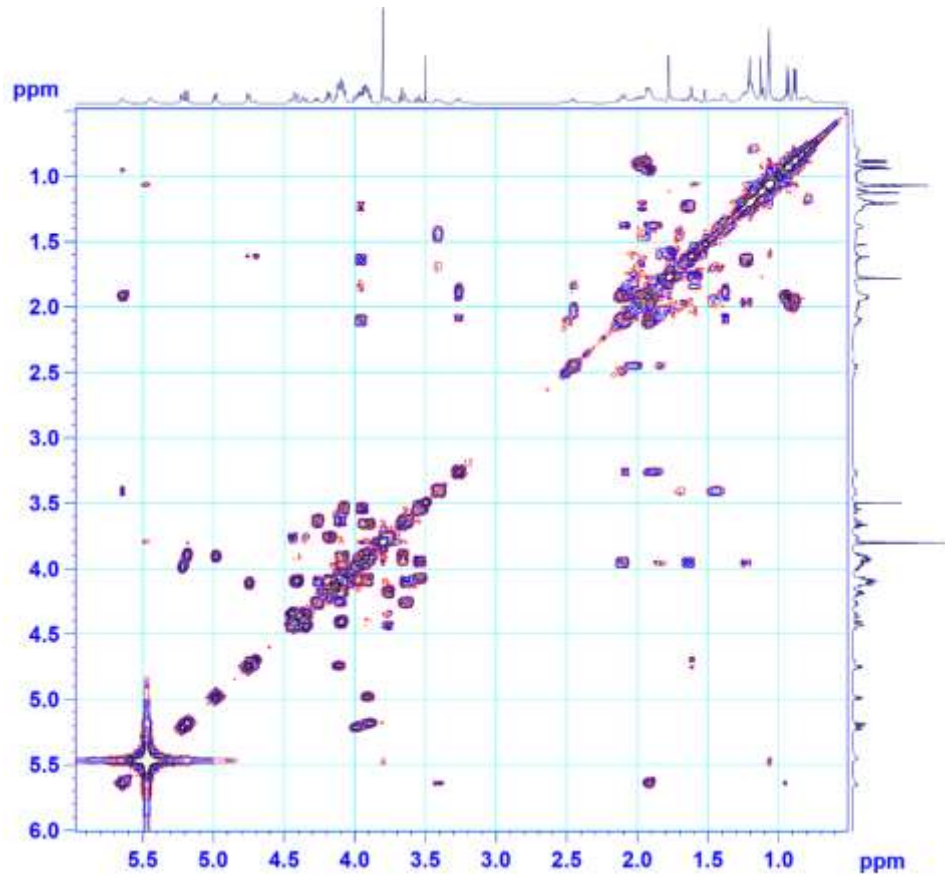




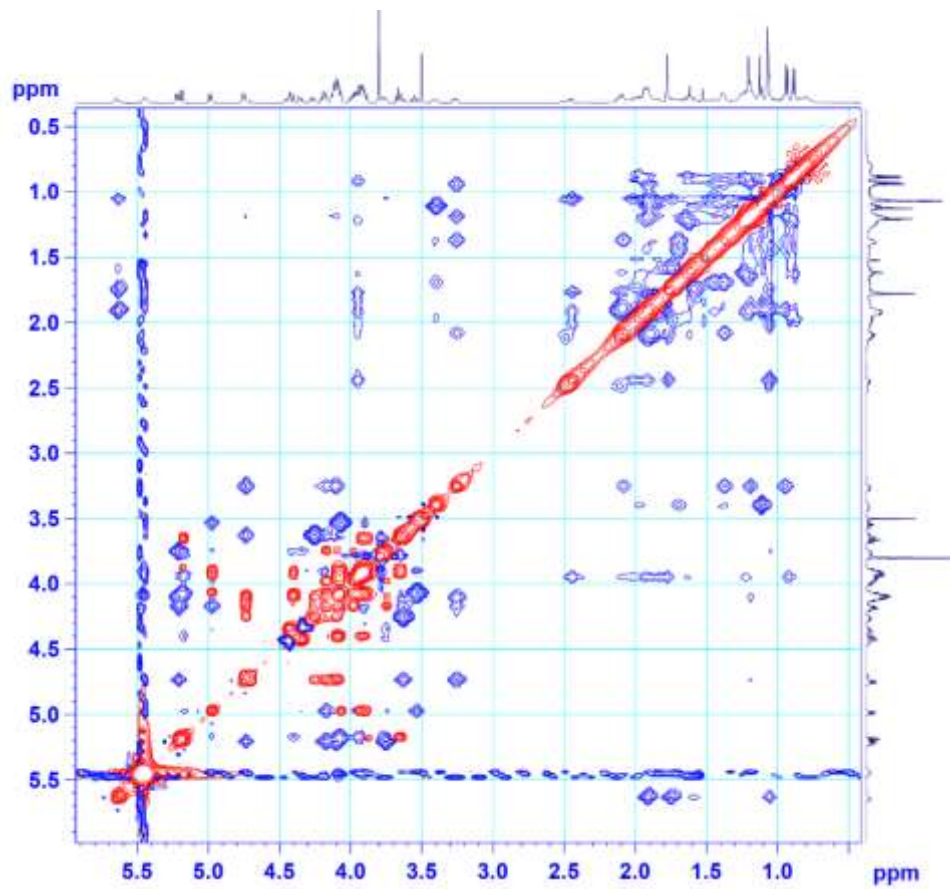
Hình S28. Phổ HSQC của SH11.



Hình S29. Phổ HMBC của SH11.

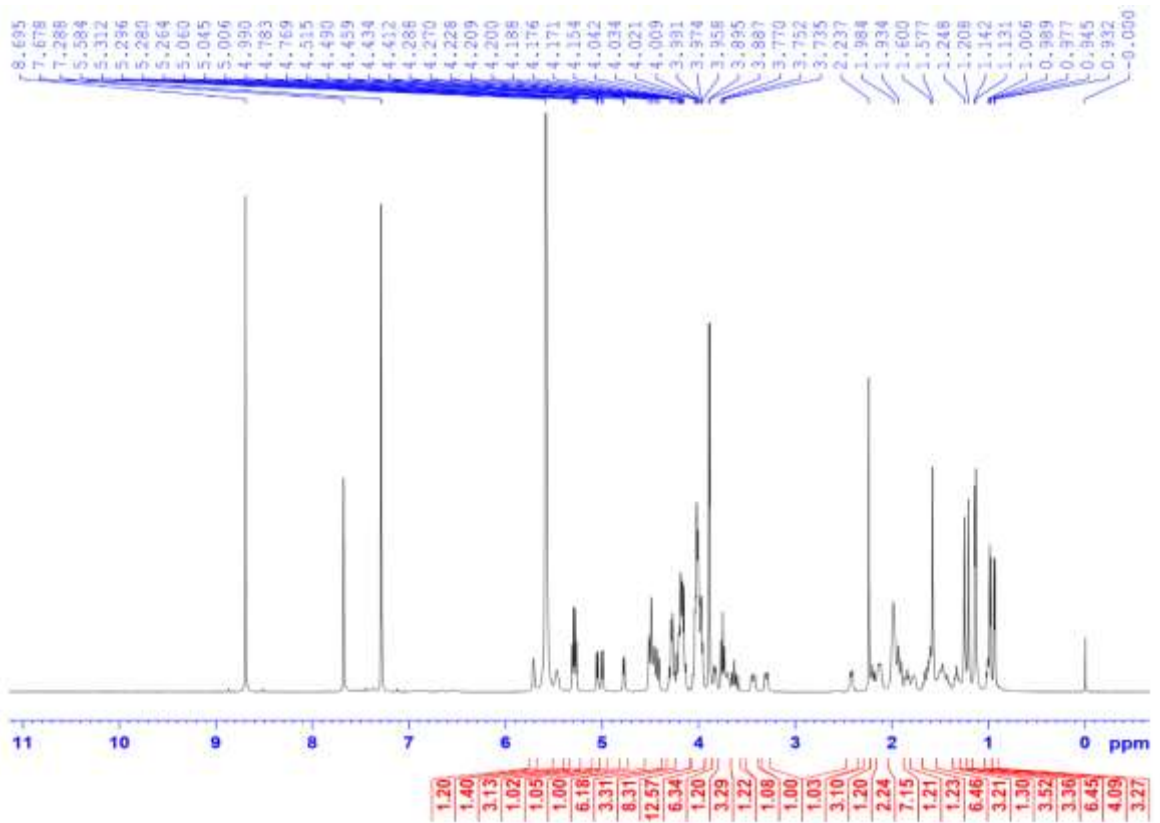


Hình S30. Phổ COSY của SH11.

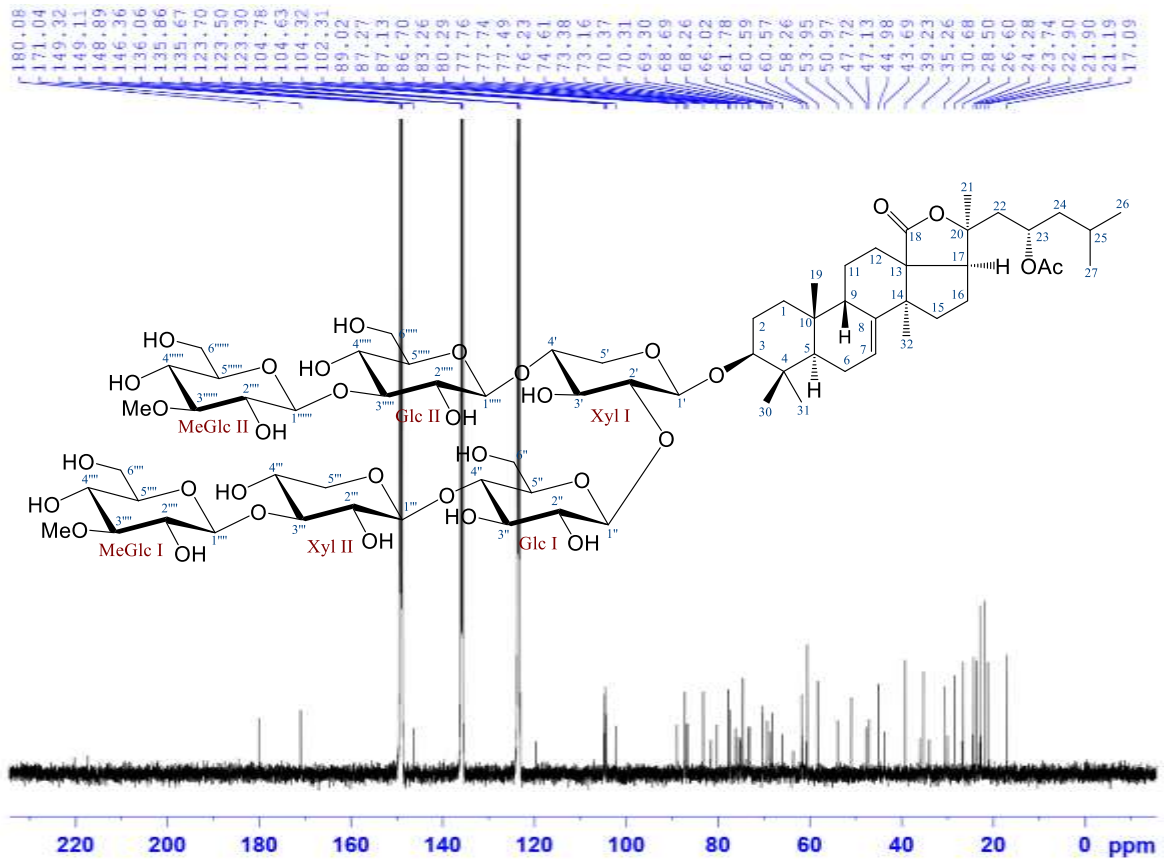


Hình S31. Phổ ROESY của SH11.

## PHỤ LỤC 7. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH12

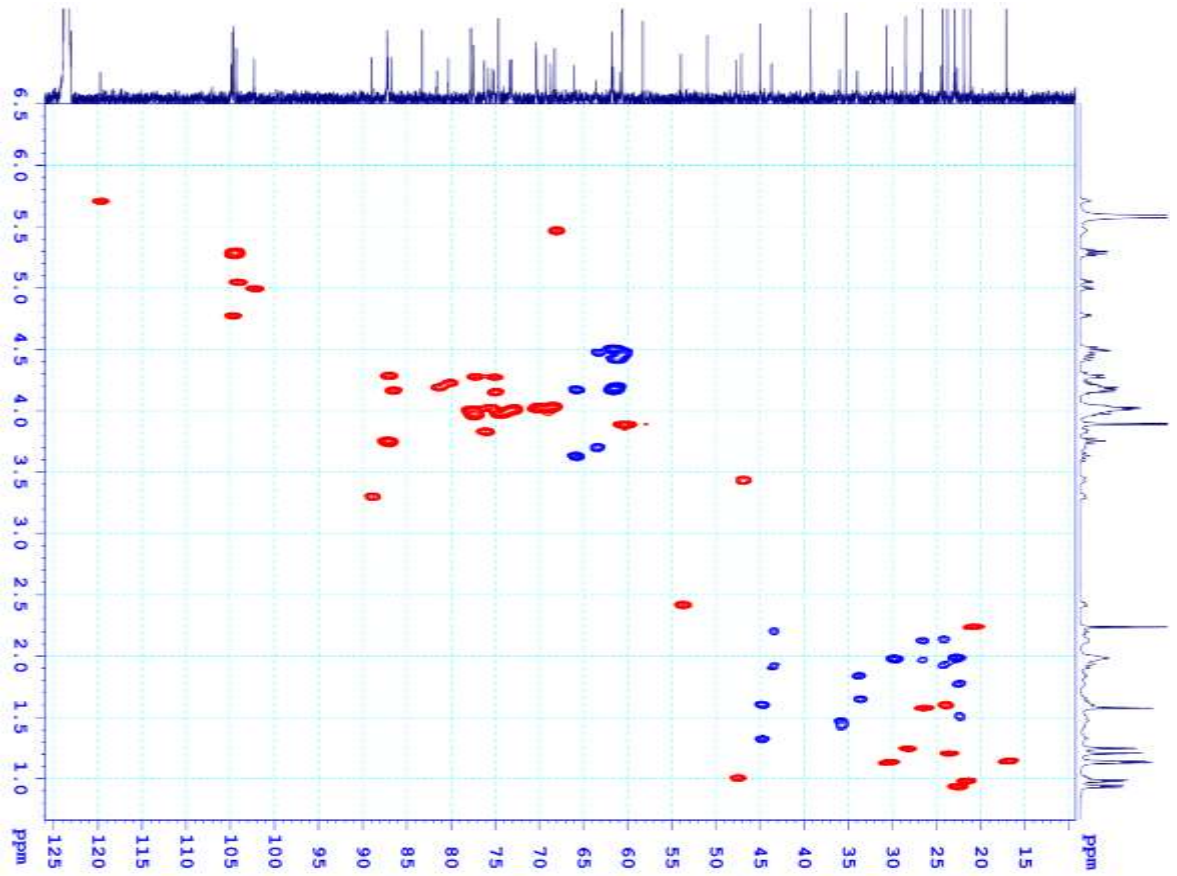


Hình S32. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH12.

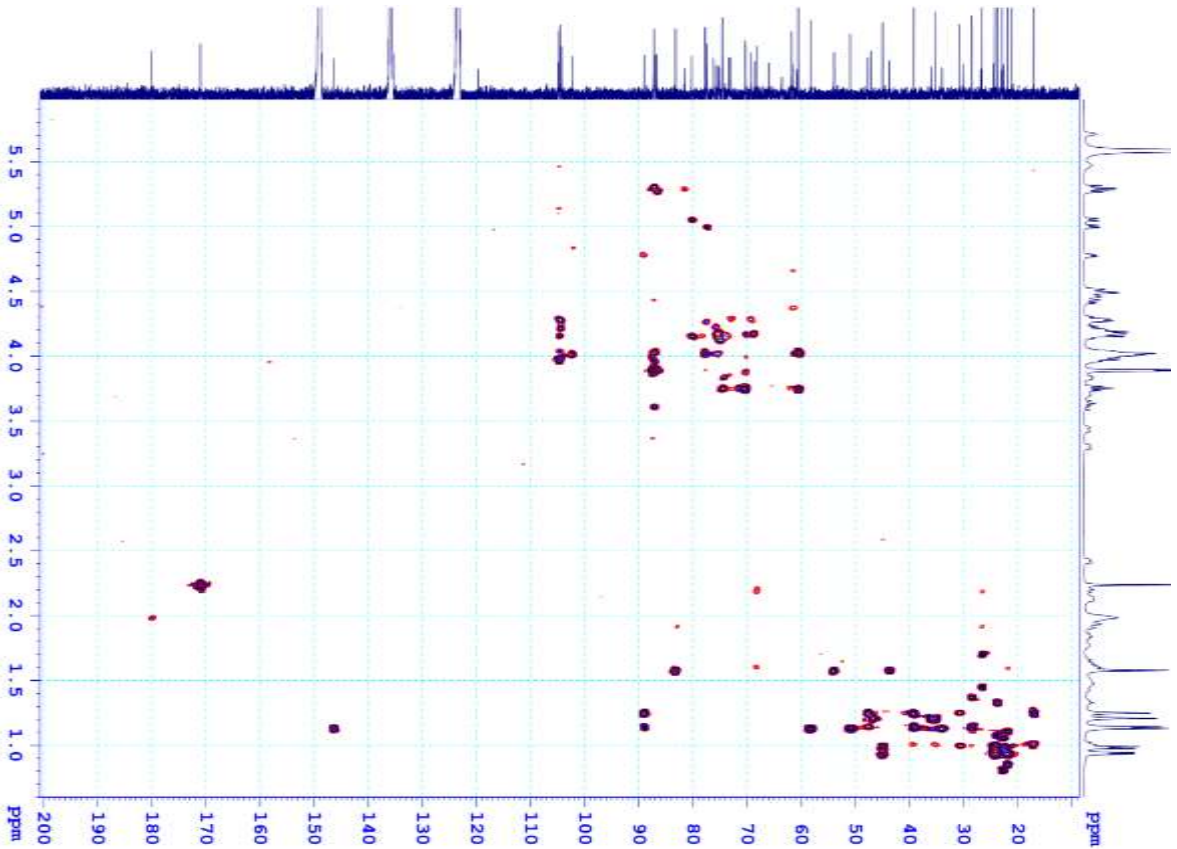


Hình S33. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH12.



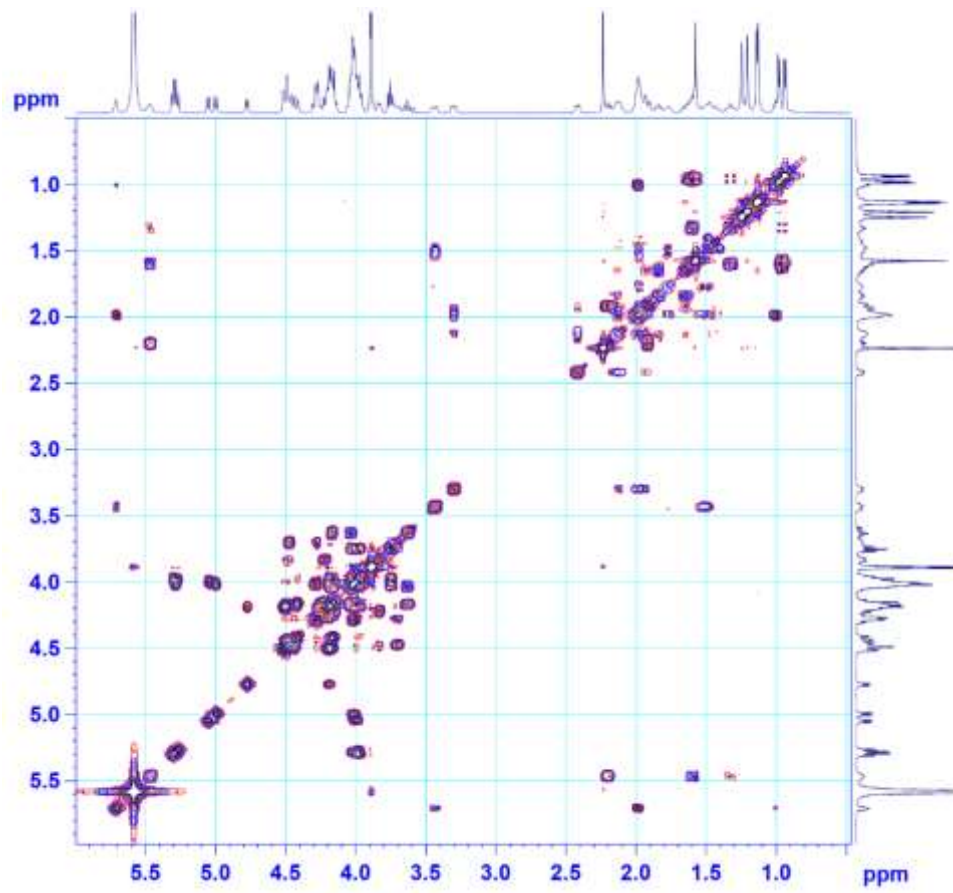


Hình S34. Phổ HSQC của SH12.

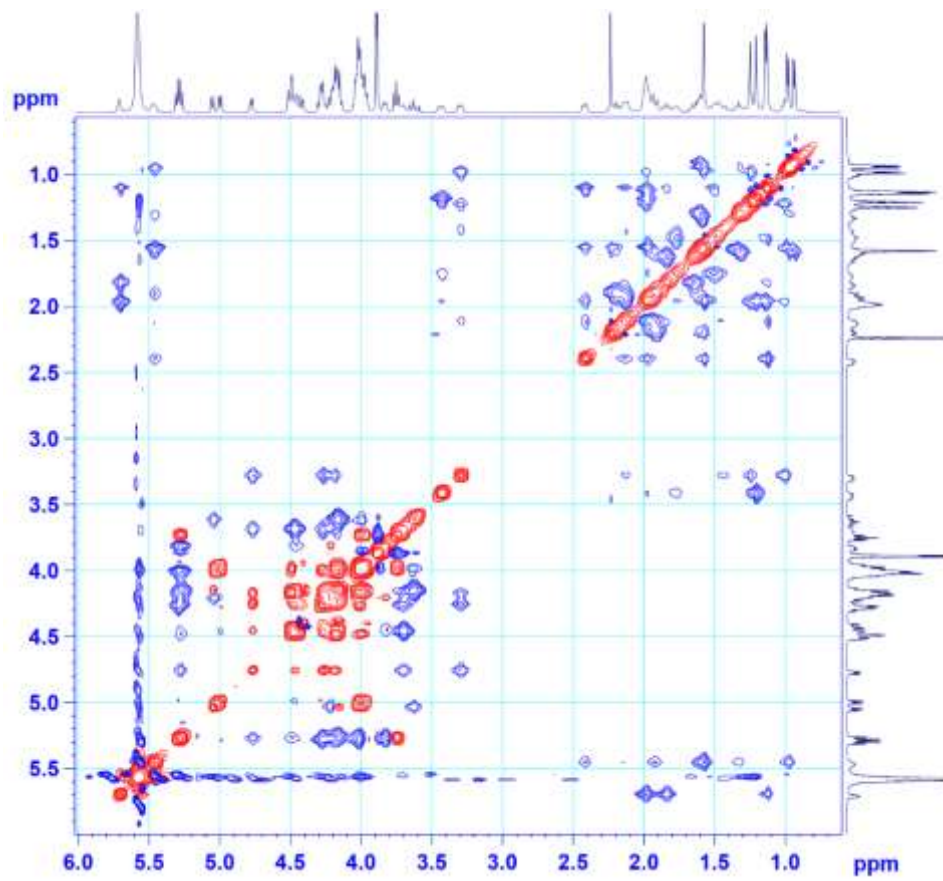


Hình S35. Phổ HMBC của SH12.



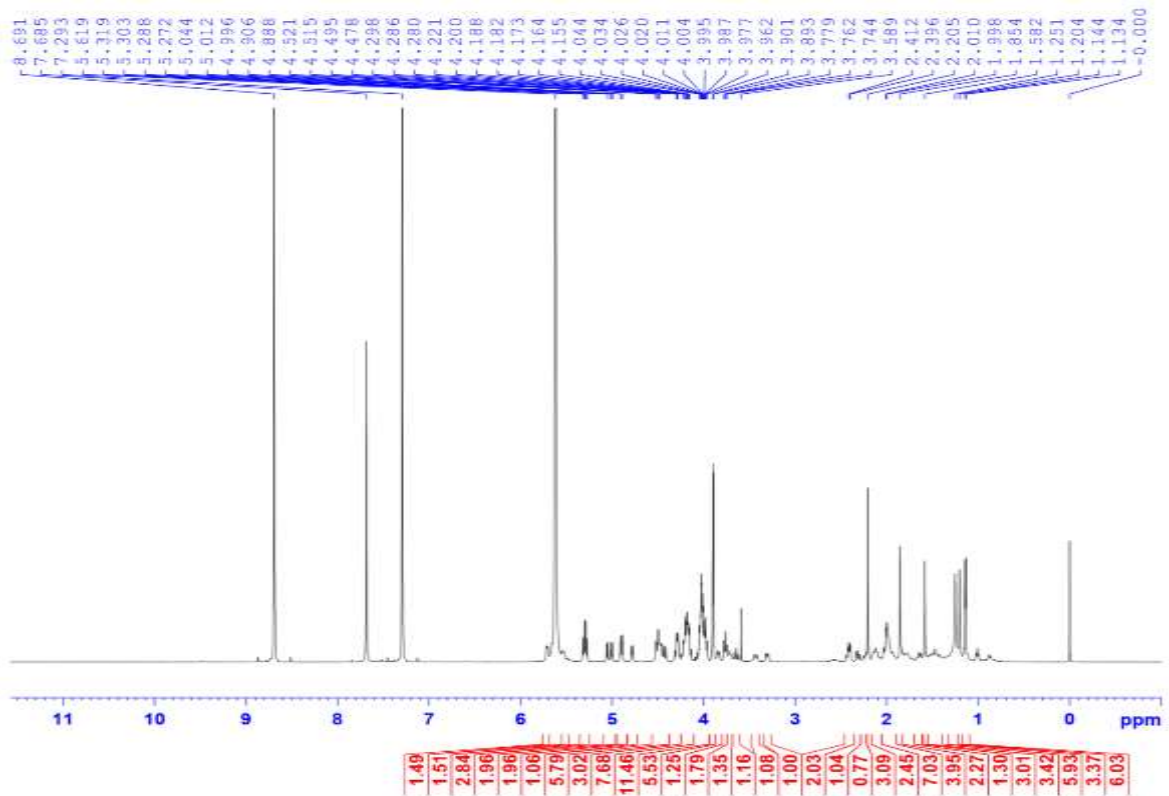


Hình S36. Phổ COSY của SH12.

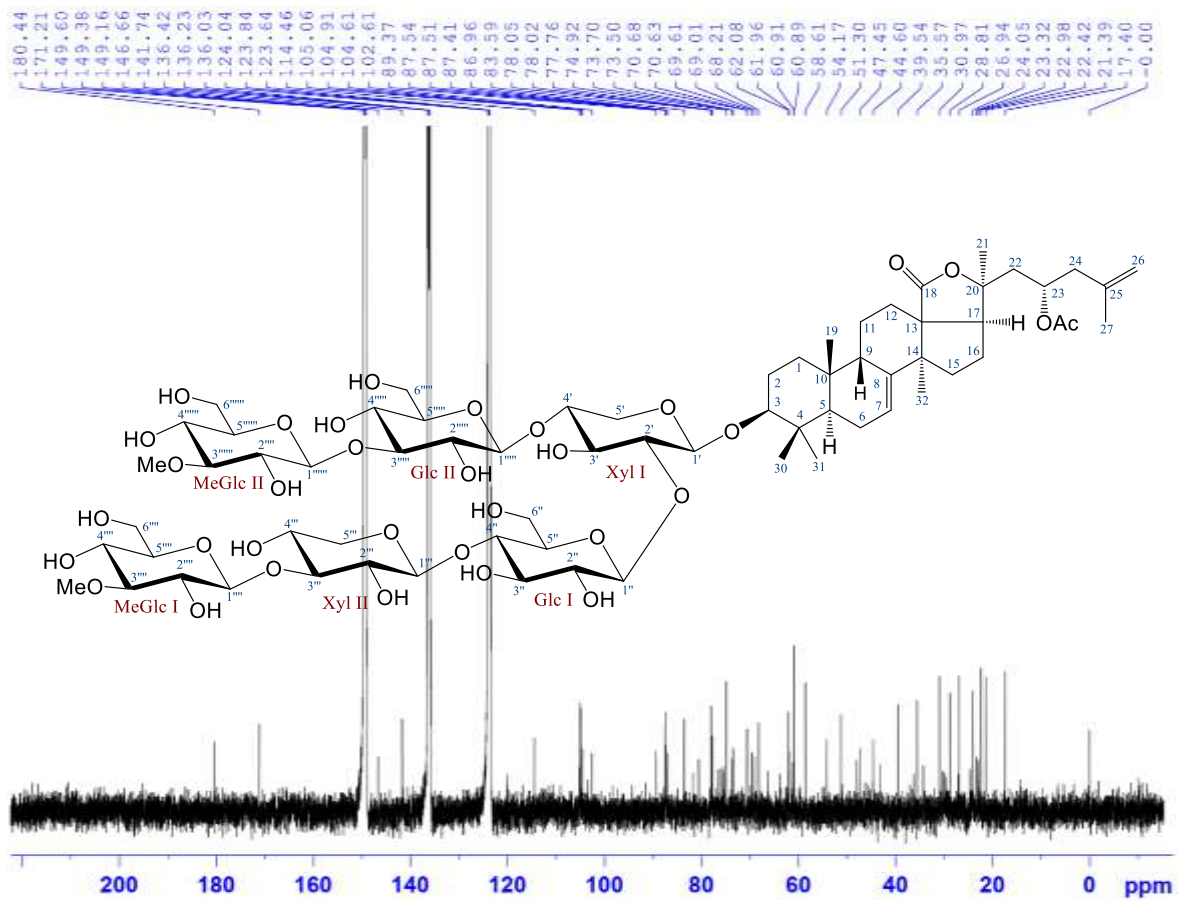


Hình S37. Phổ ROESY của SH12.

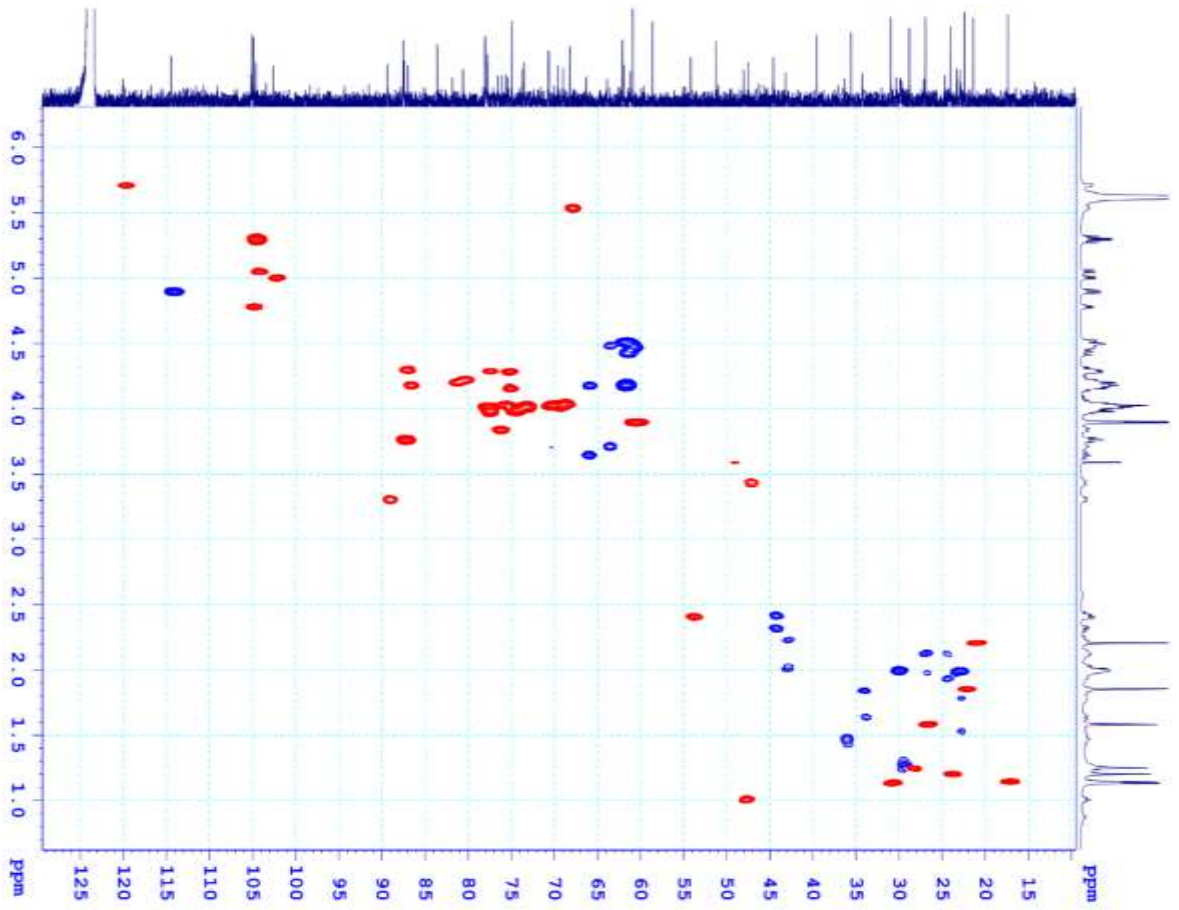
## PHỤ LỤC 8. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH13



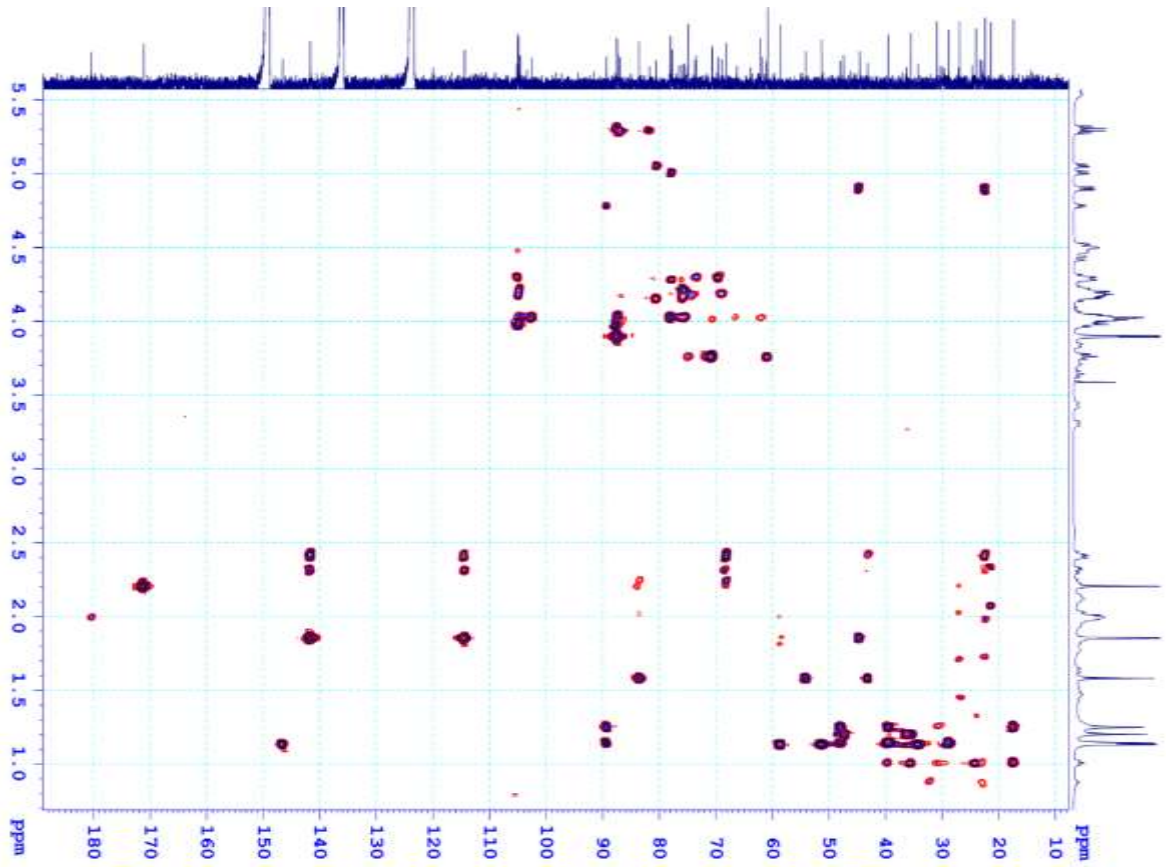
Hình S38. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH13.



Hình S39. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH13.

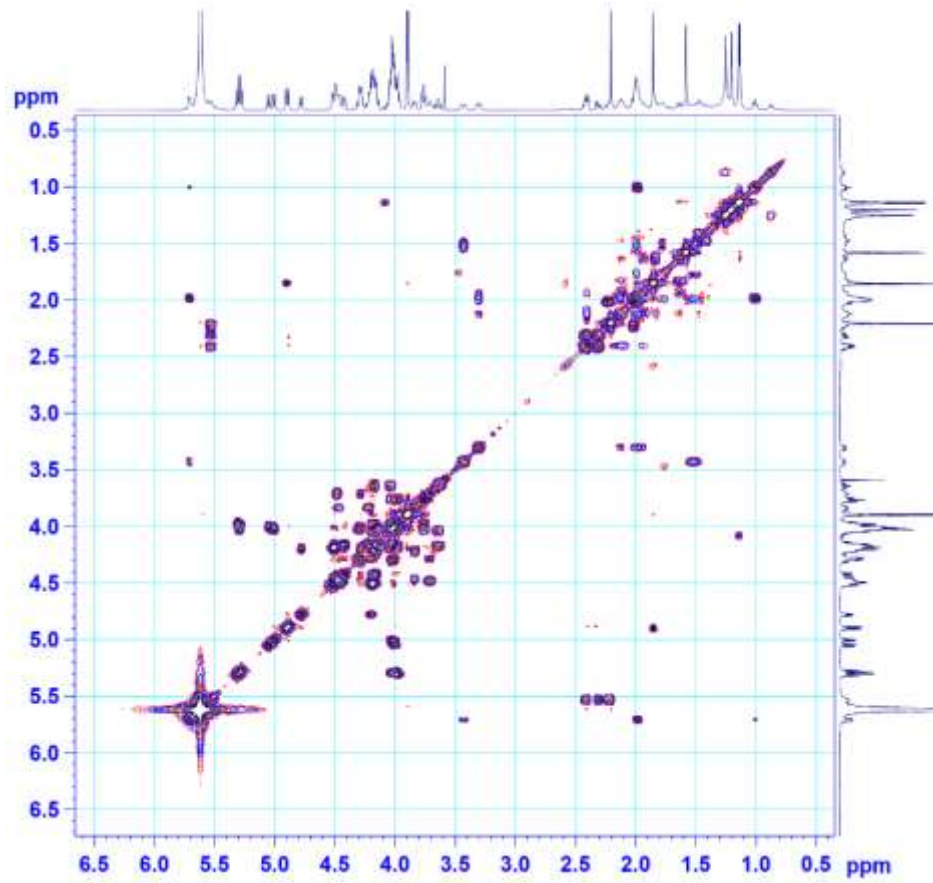


Hình S40. Phổ HSQC của SH13.

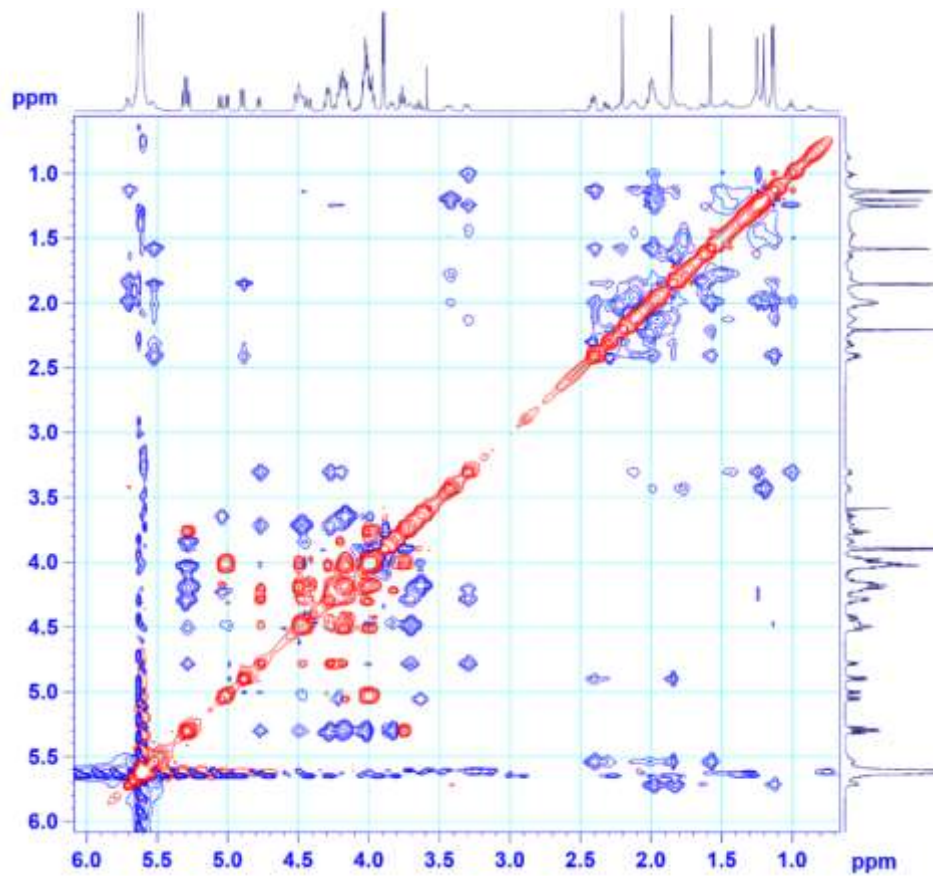


Hình S41. Phổ HMBC của SH13.



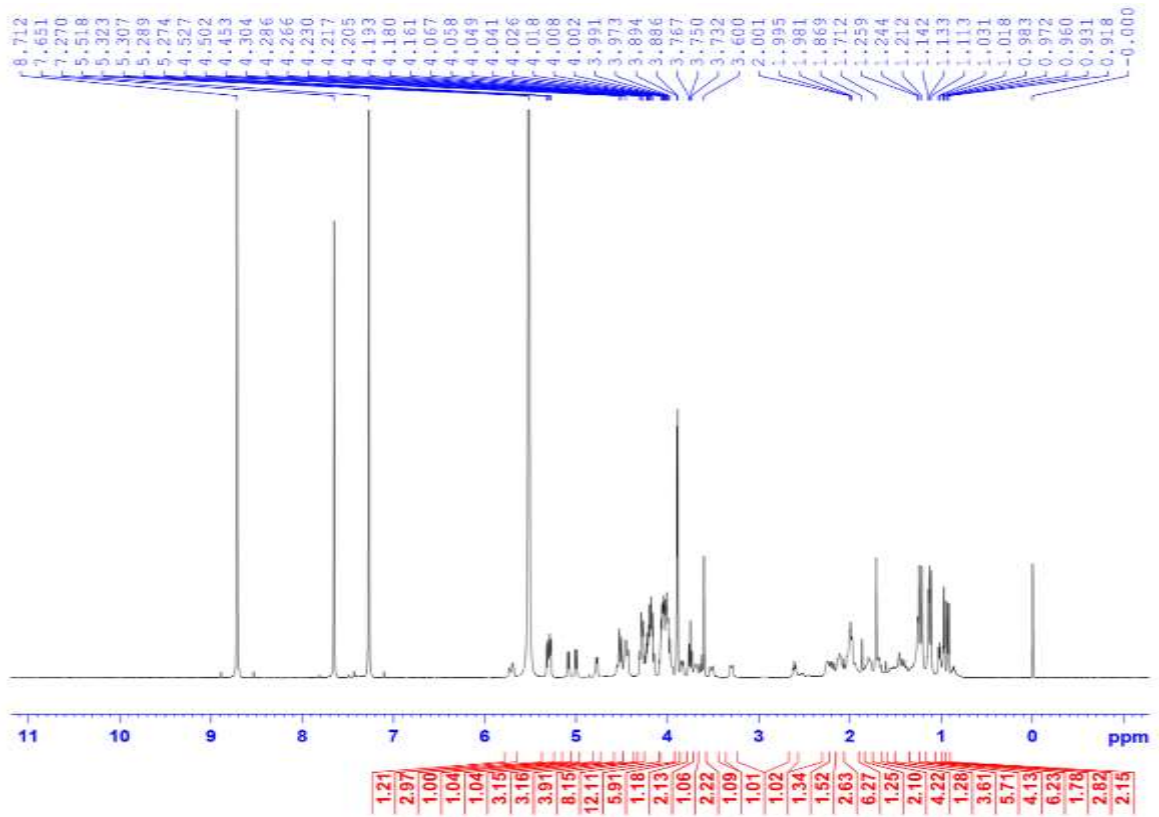


Hình S42. Phổ COSY của SH13.

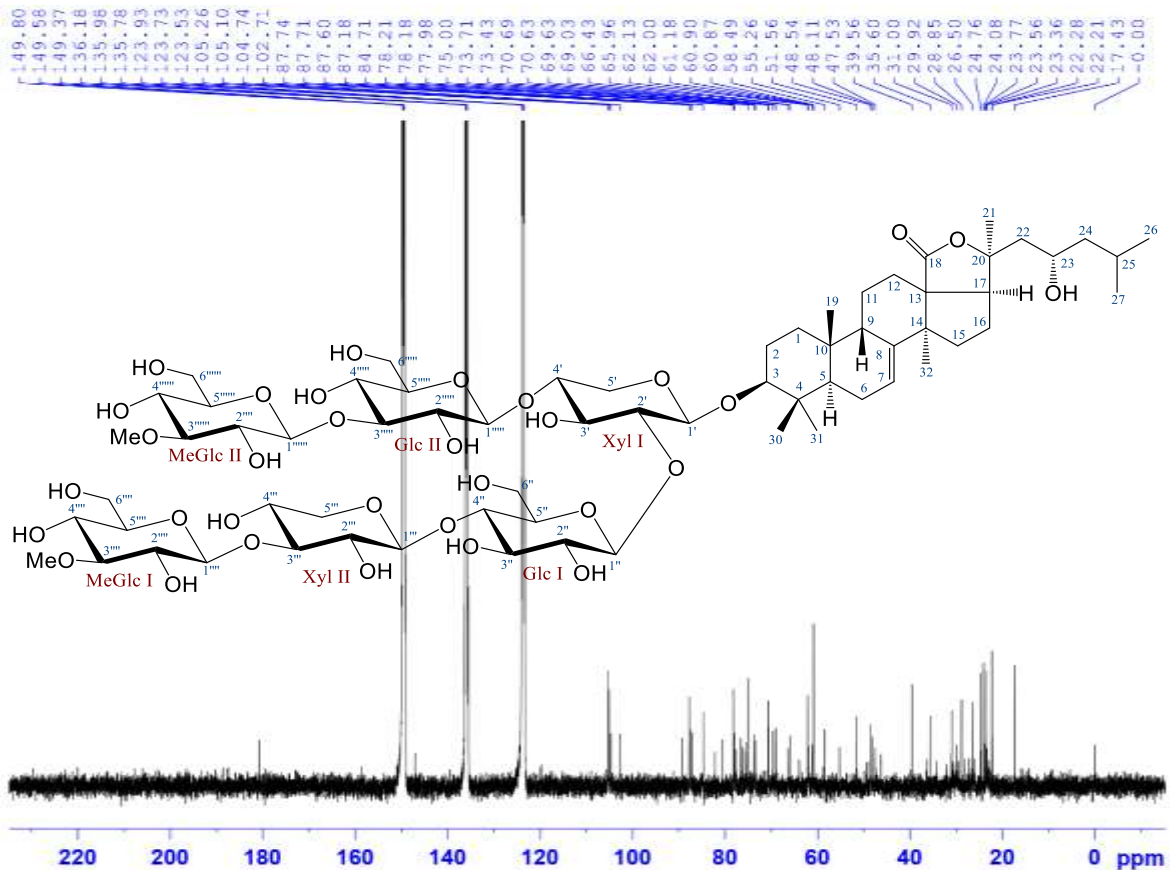


Hình S43. Phổ ROESY của SH13.

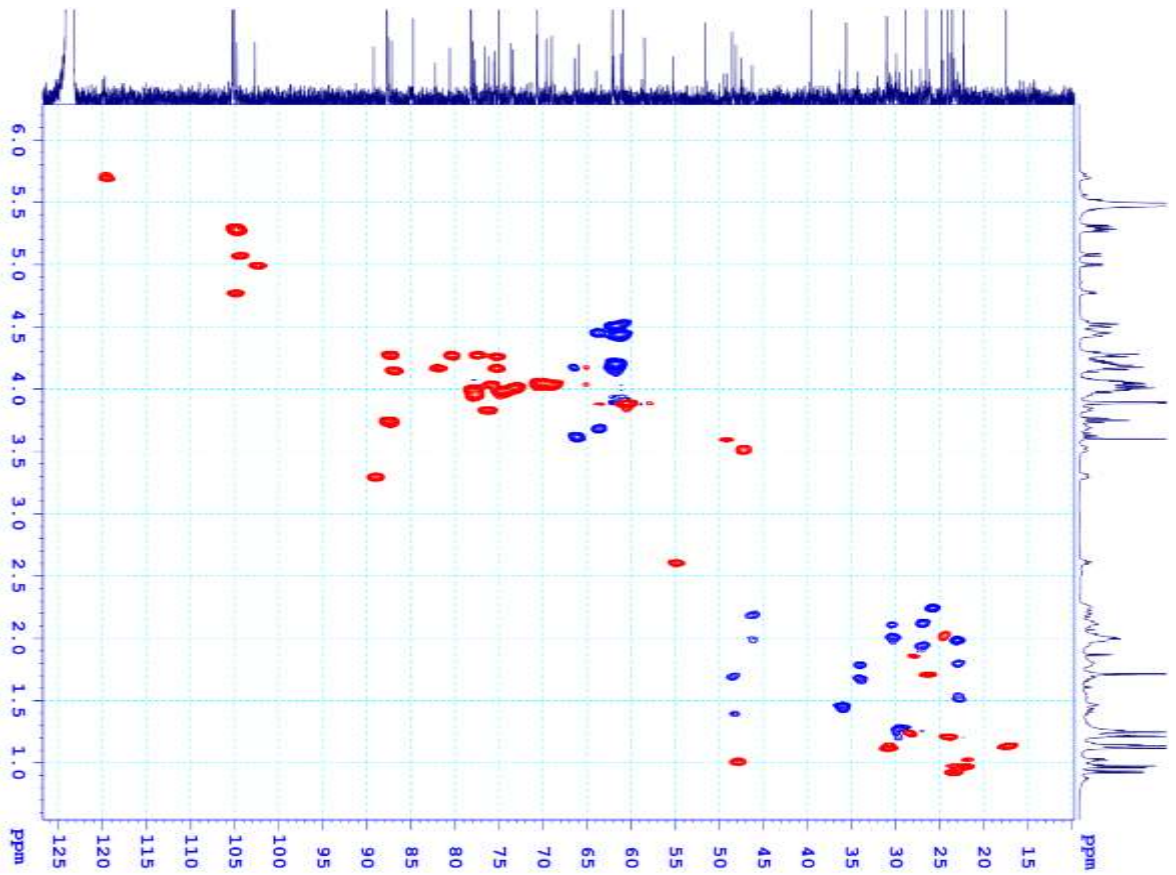
## PHỤ LỤC 9. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH14



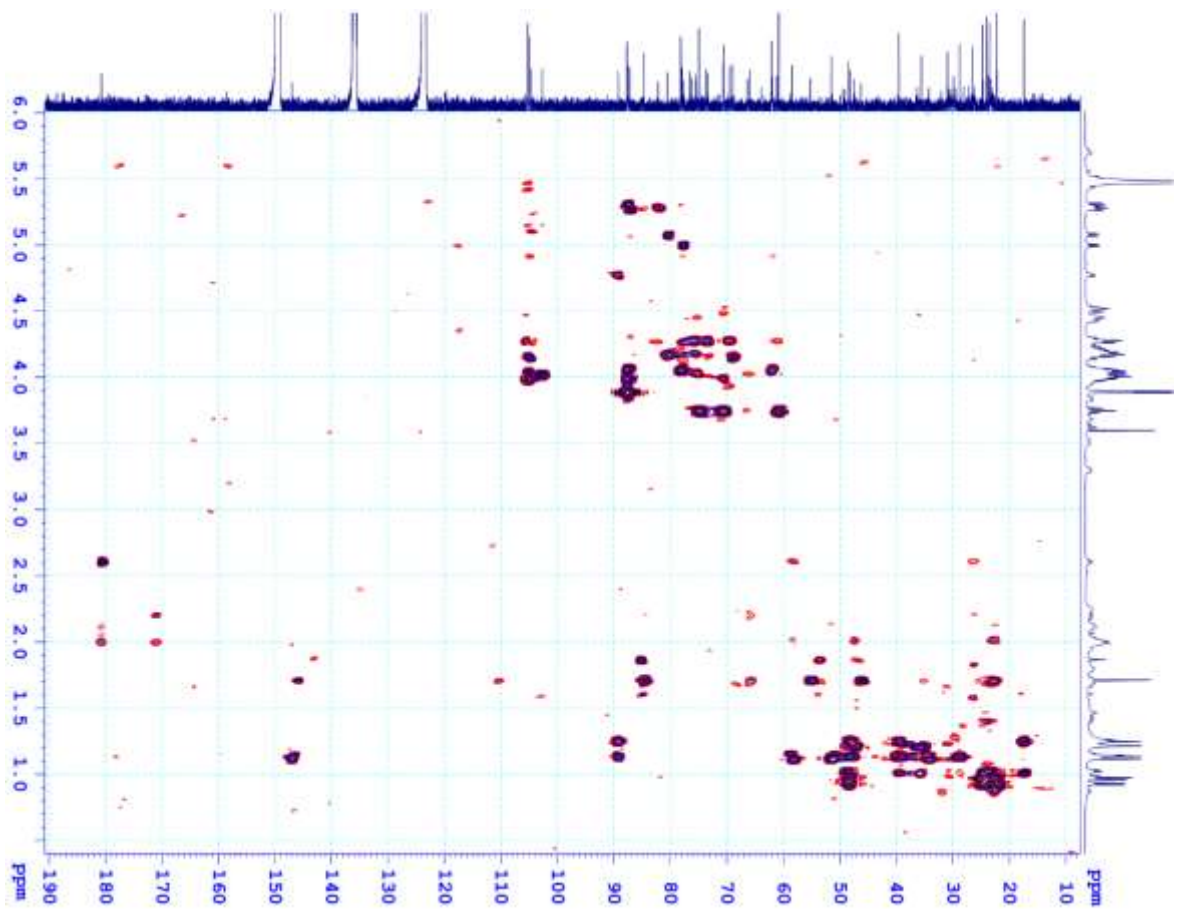
Hình S44. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH14.



Hình S45. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH14.

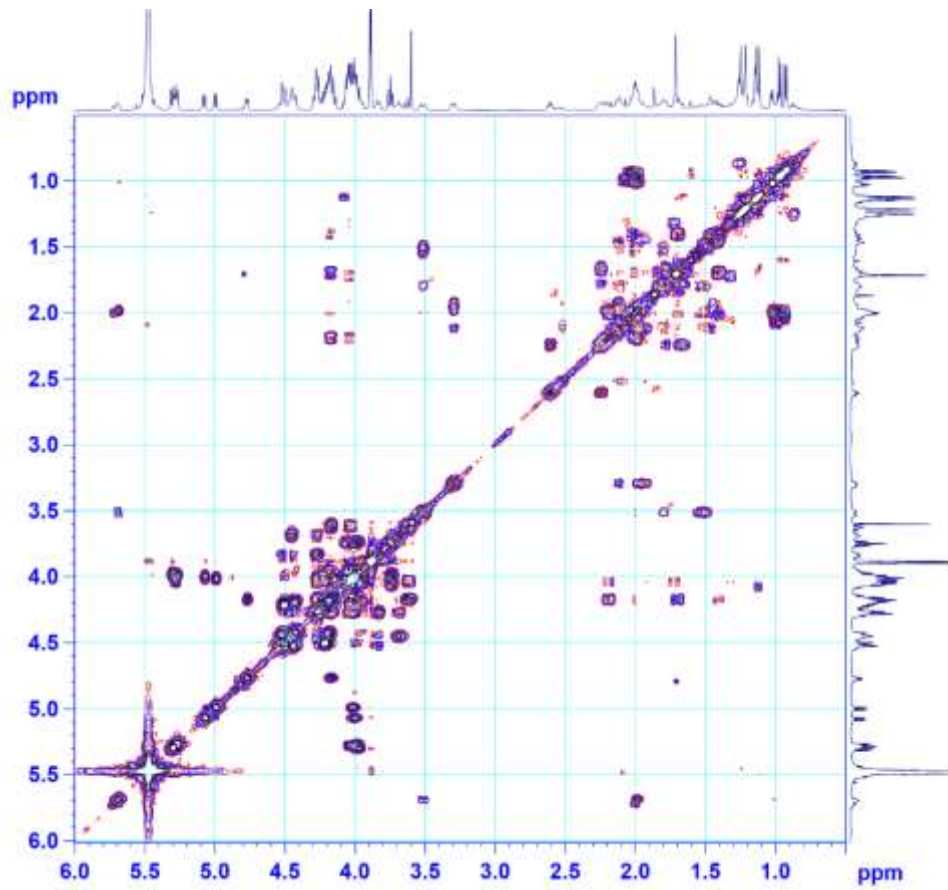


Hình S46. Phổ HSQC của SH14.

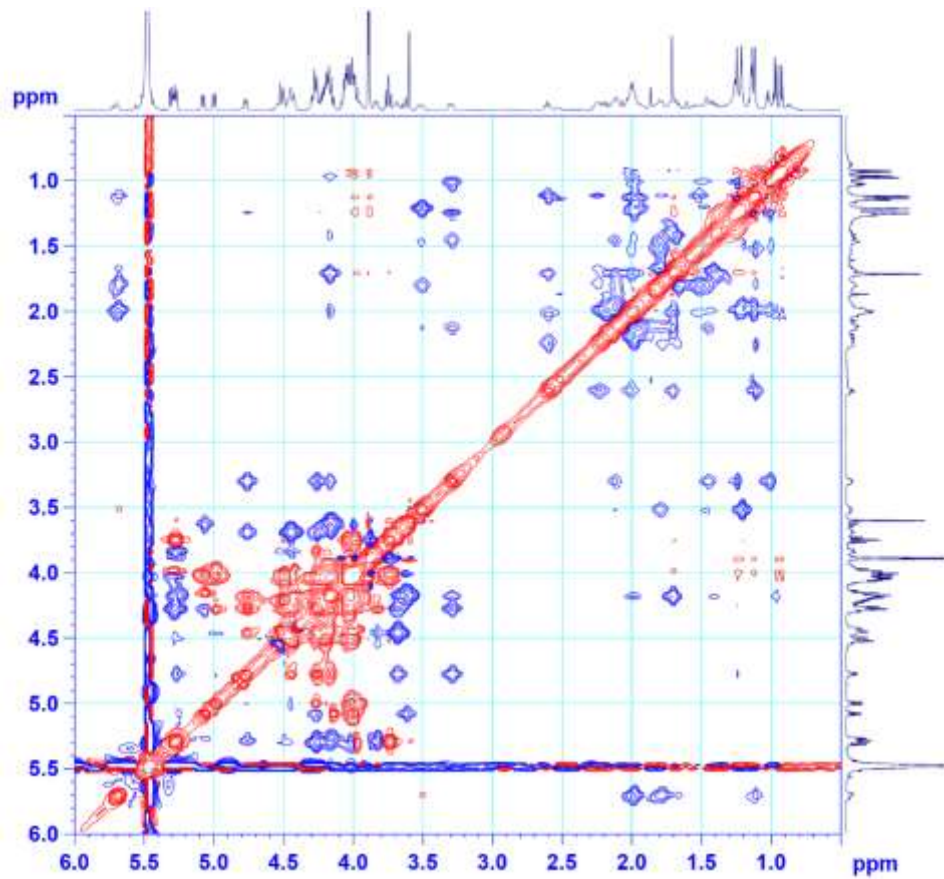


Hình S47. Phổ HMBC của SH14.



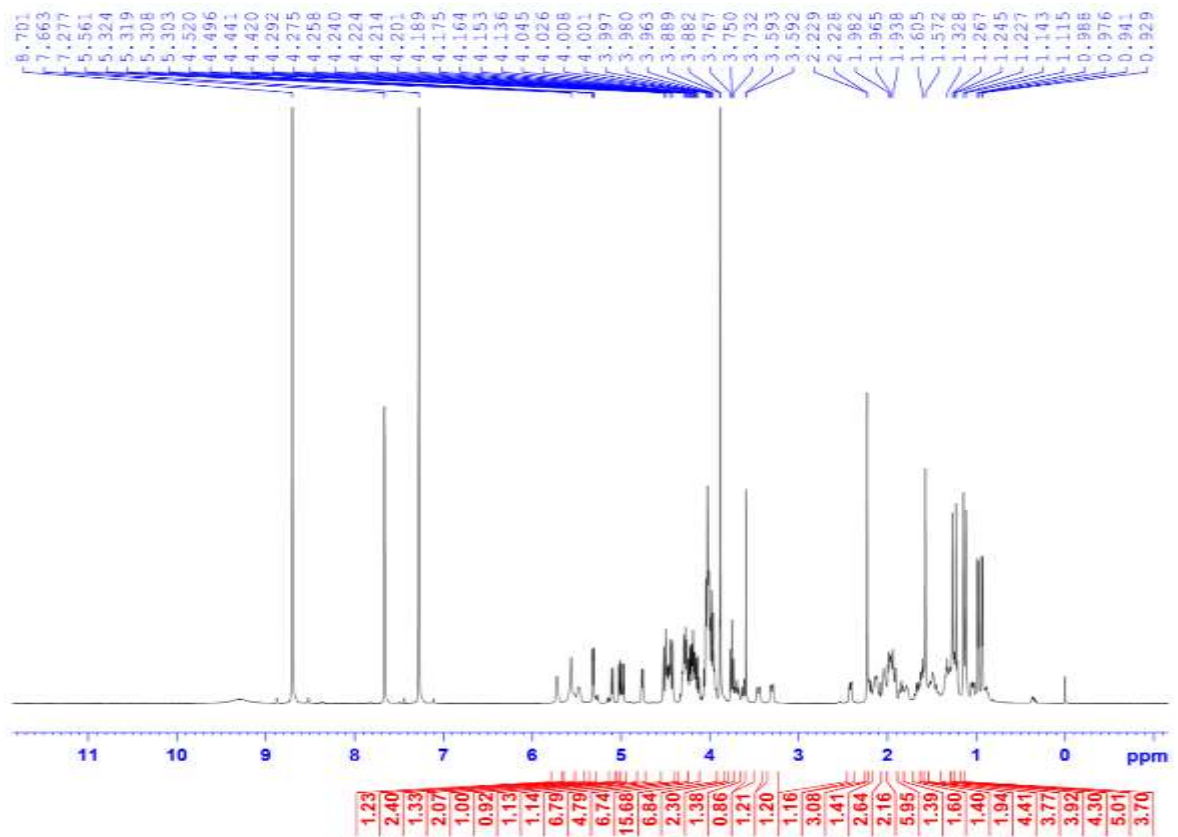


Hình S48. Phổ COSY của SH14.

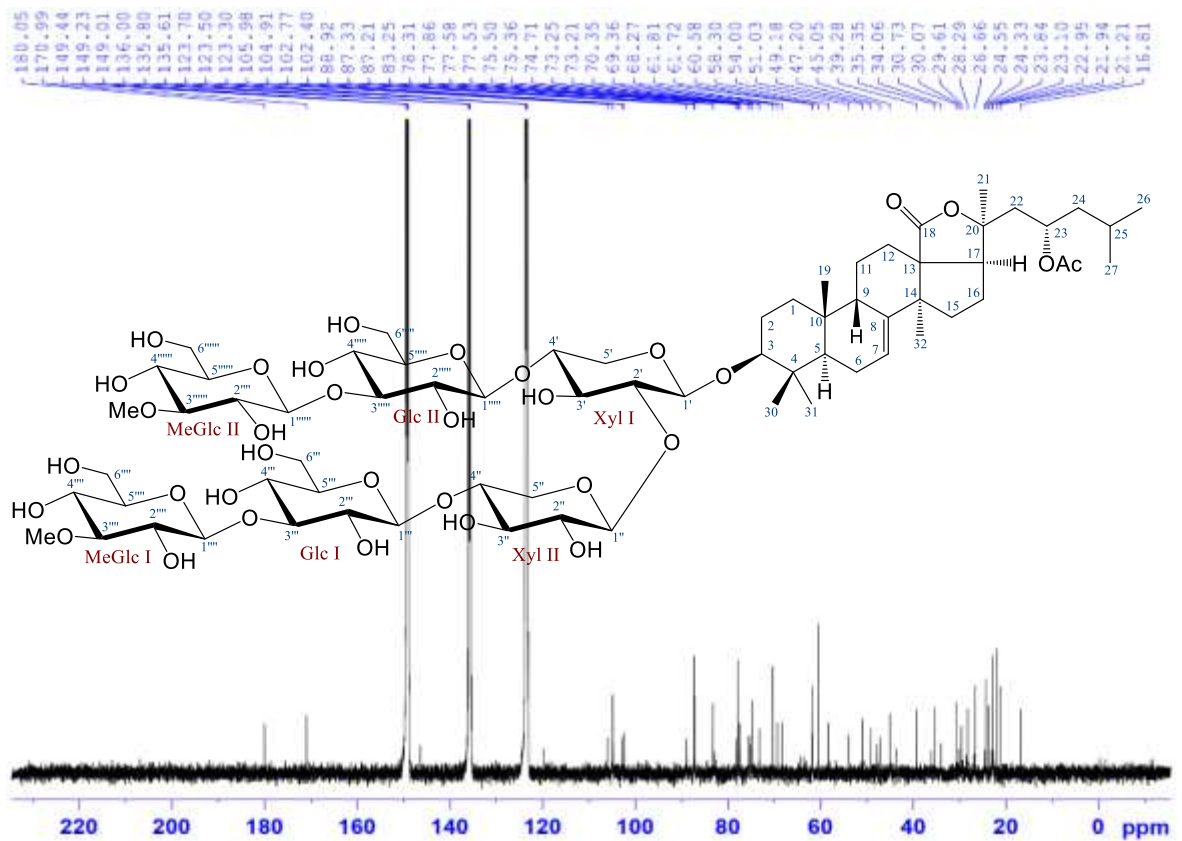


Hình S49. Phổ ROESY của SH14.

## PHỤ LỤC 10. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH15

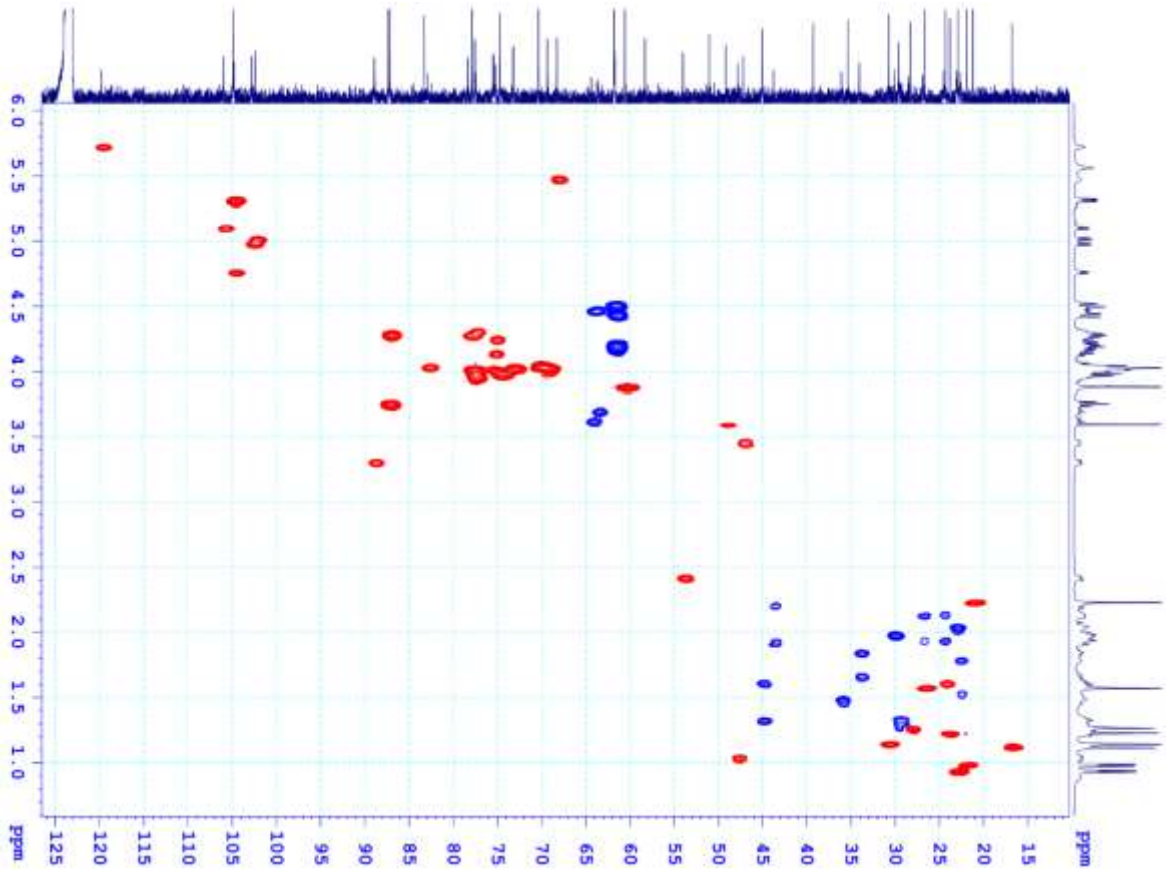


Hình S50. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH15.

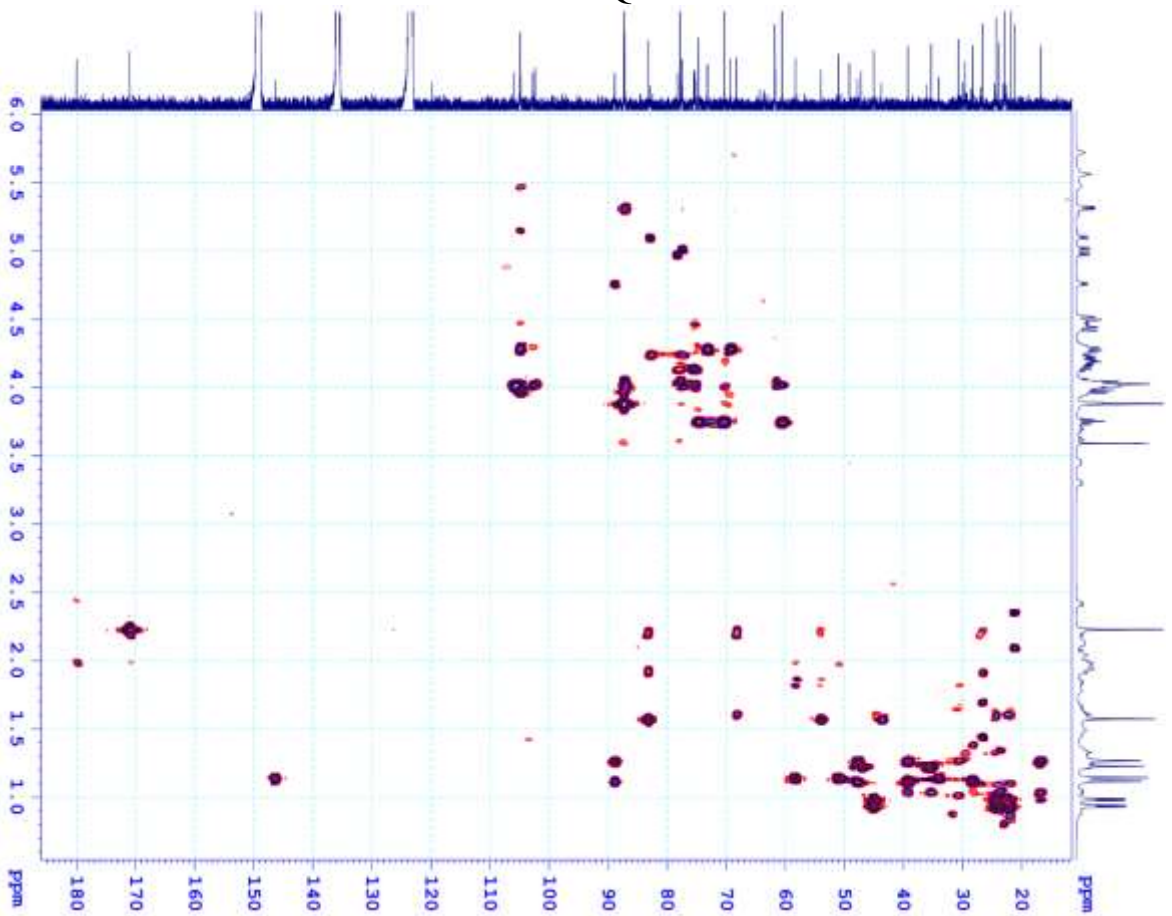


Hình S51. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH15.

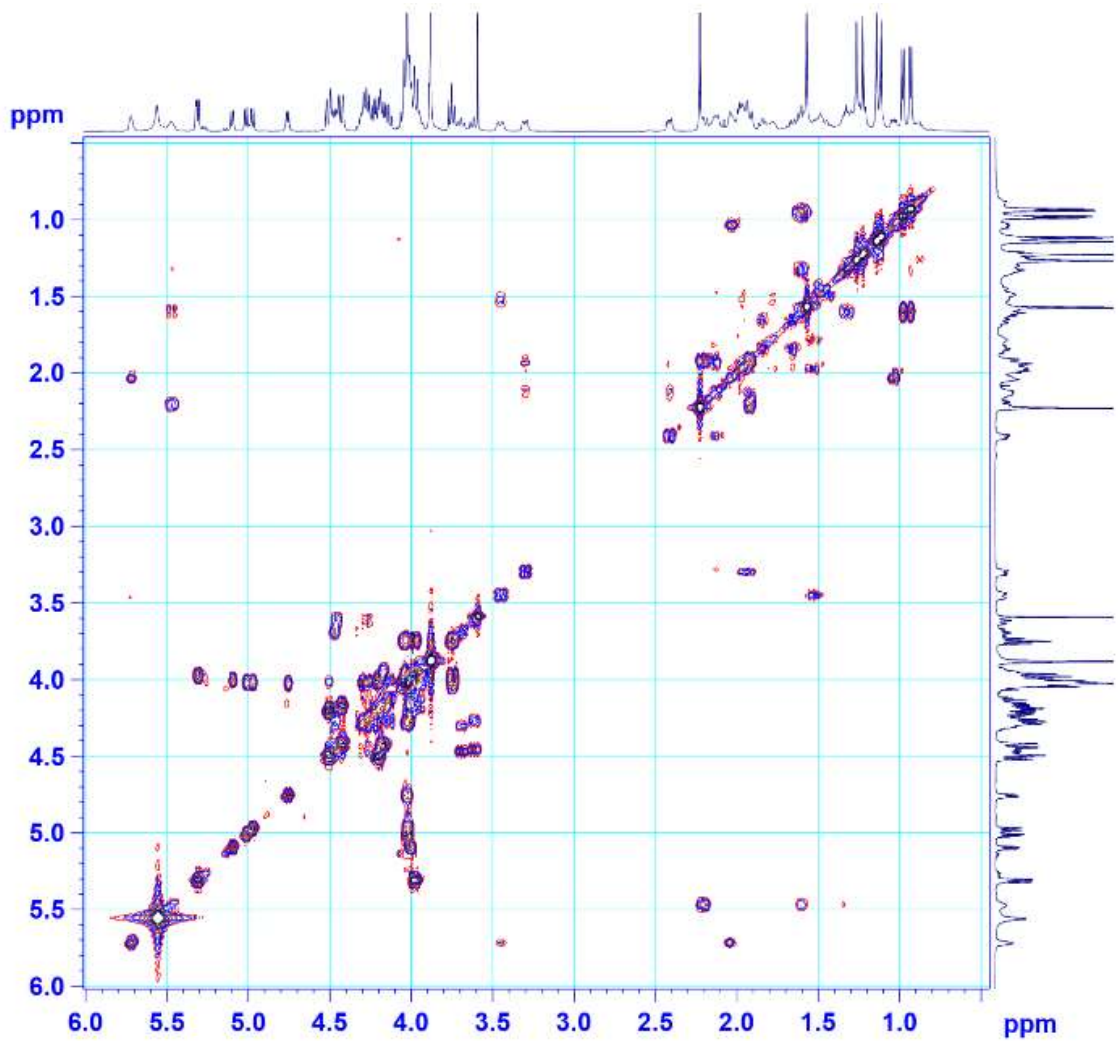




Hình S52. Phổ HSQC của SH15.

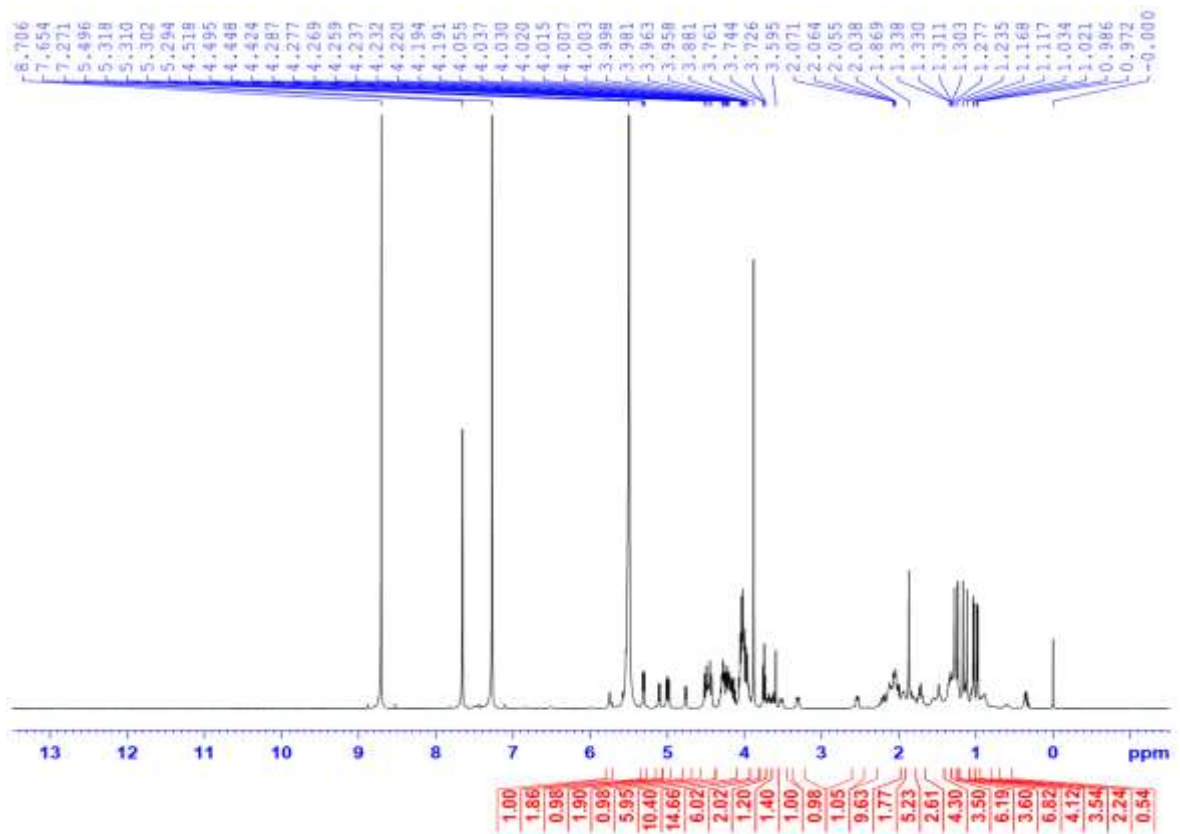


Hình S53. Phổ HMBC của SH15.

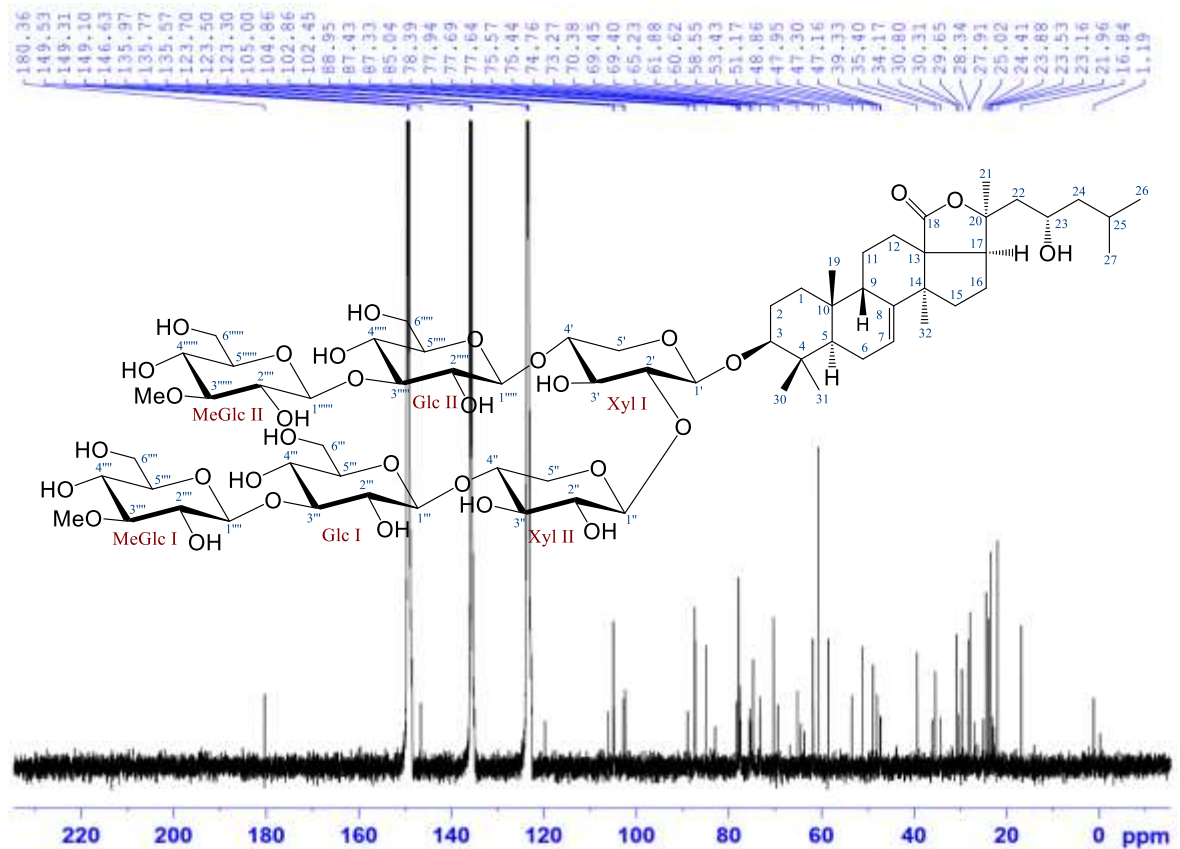


Hình S54. Phổ COSY của **SH15**.

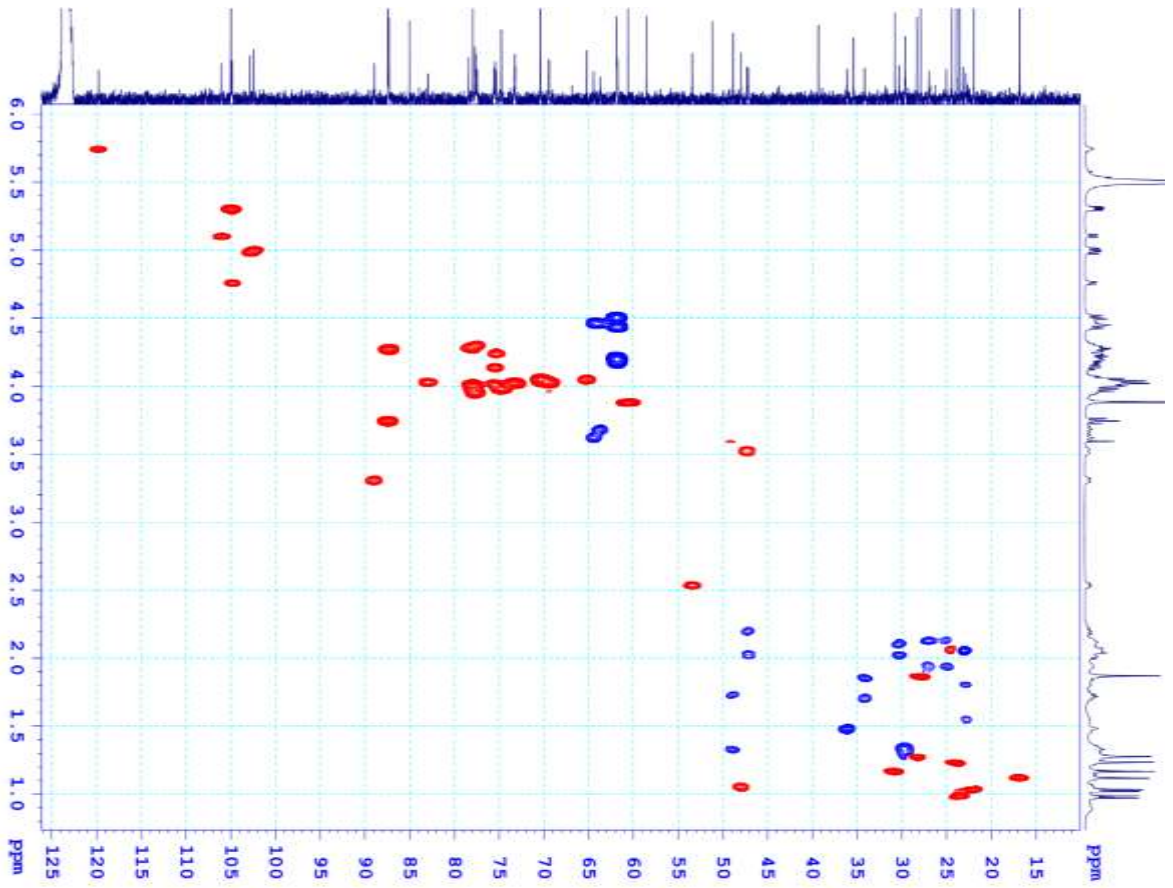
## PHỤ LỤC 11. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH16



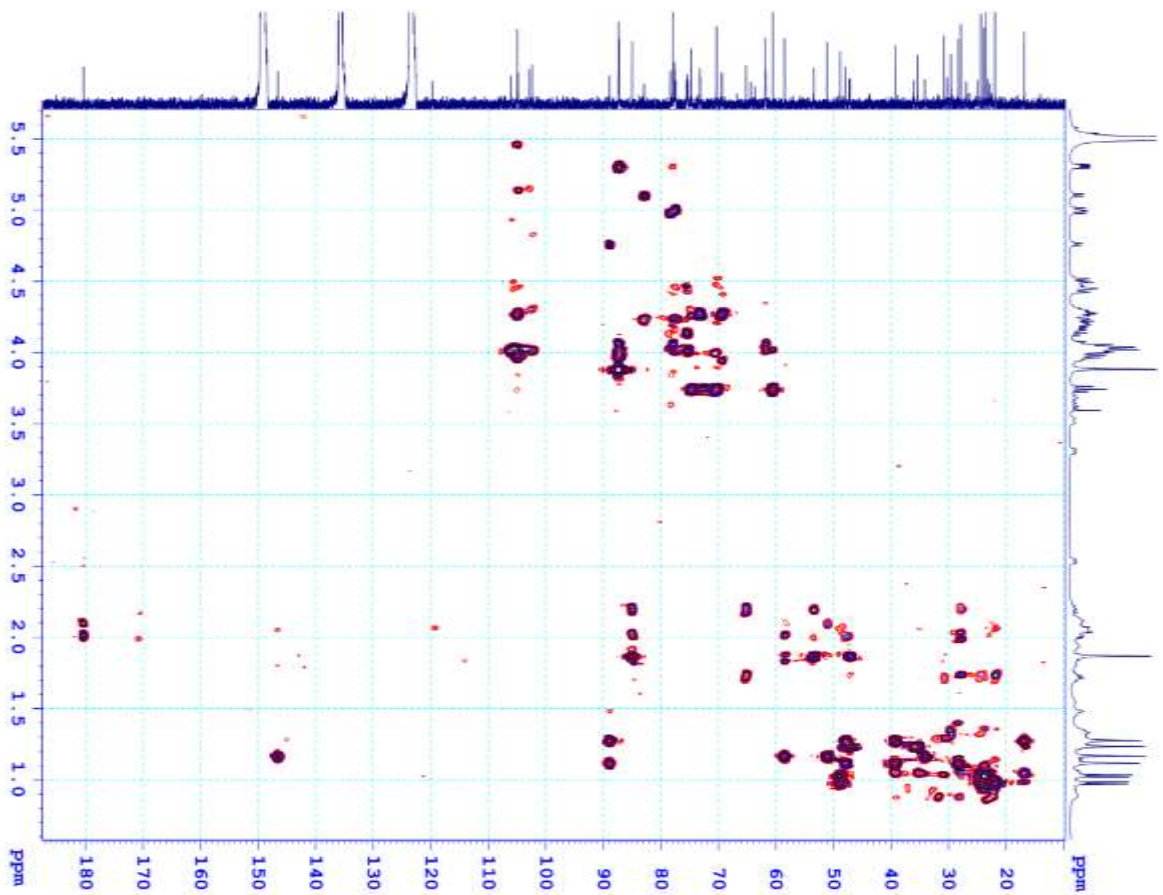
Hình S55. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH16.



Hình S56. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH16.

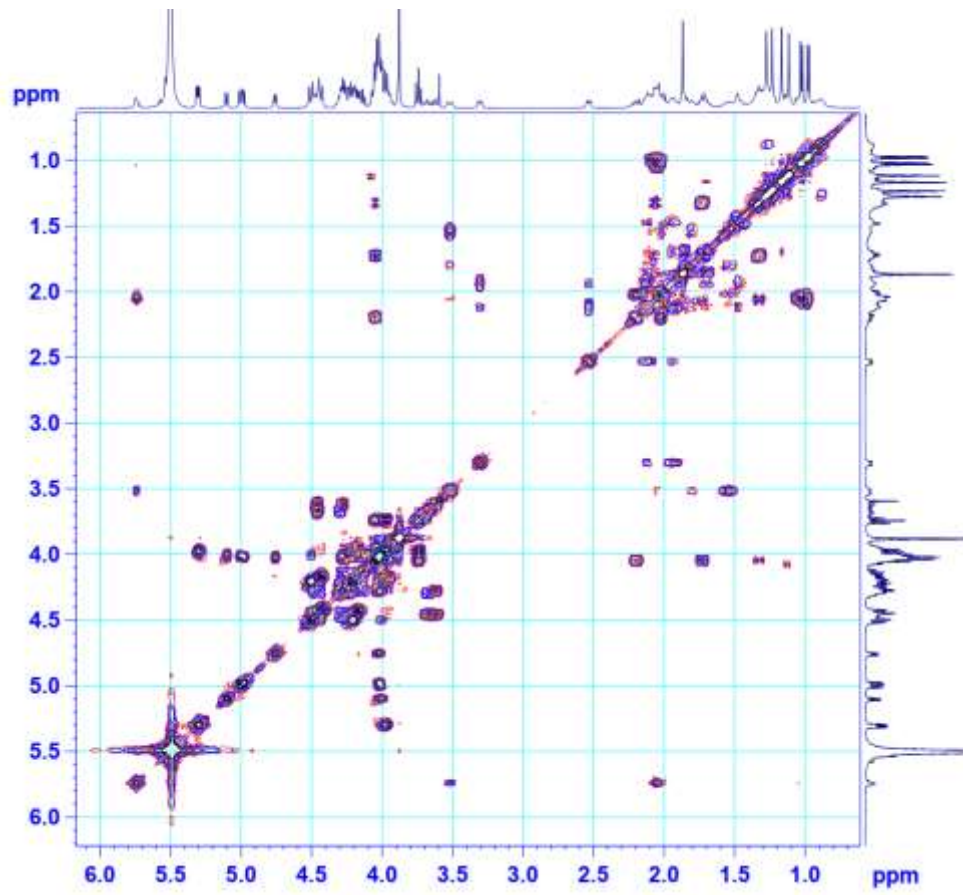


Hình S57. Phổ HSQC của SH16.

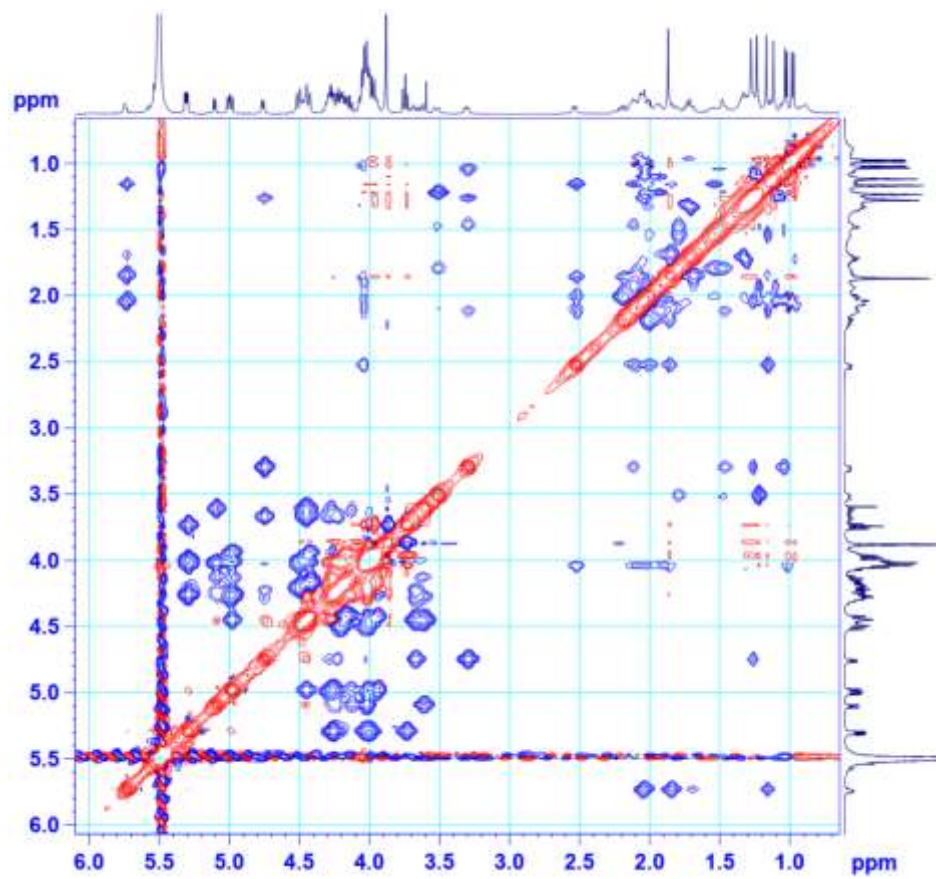


Hình S58. Phổ HMBC của SH16.



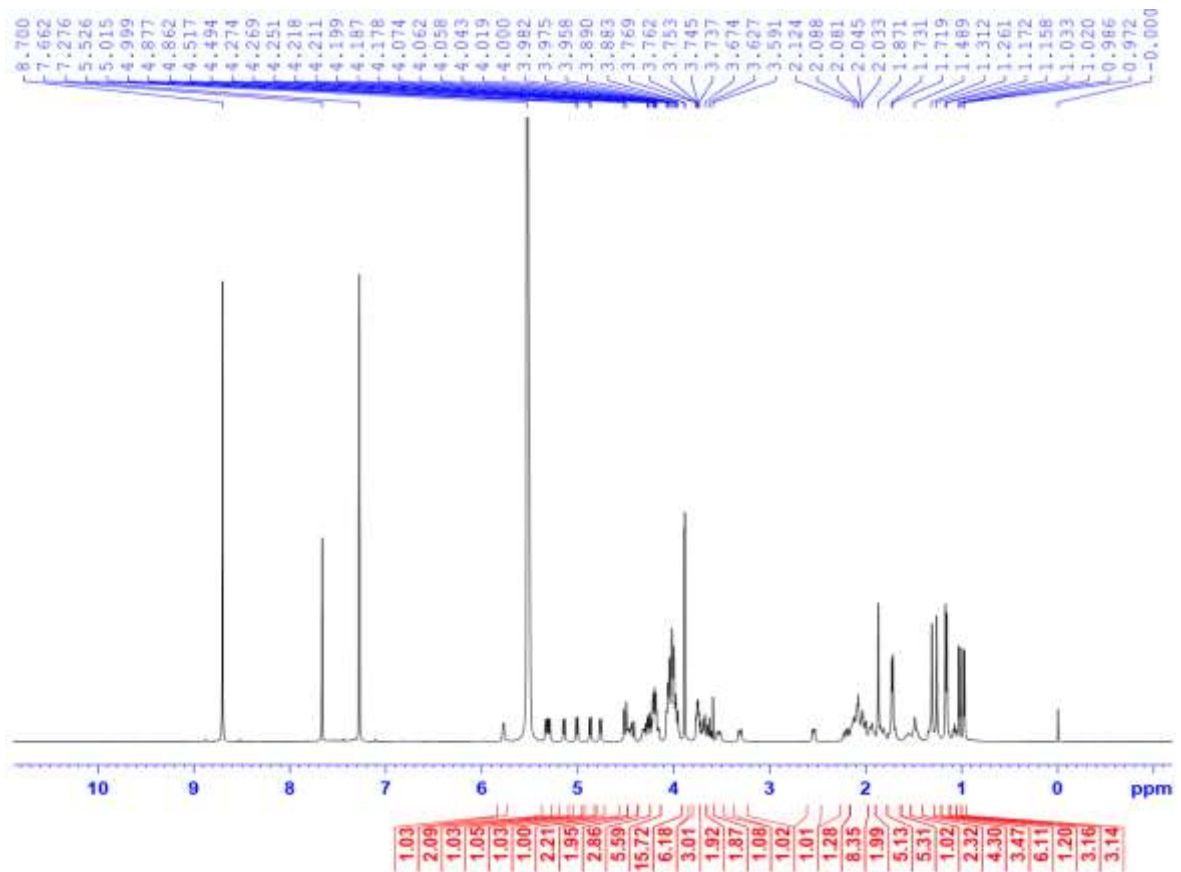
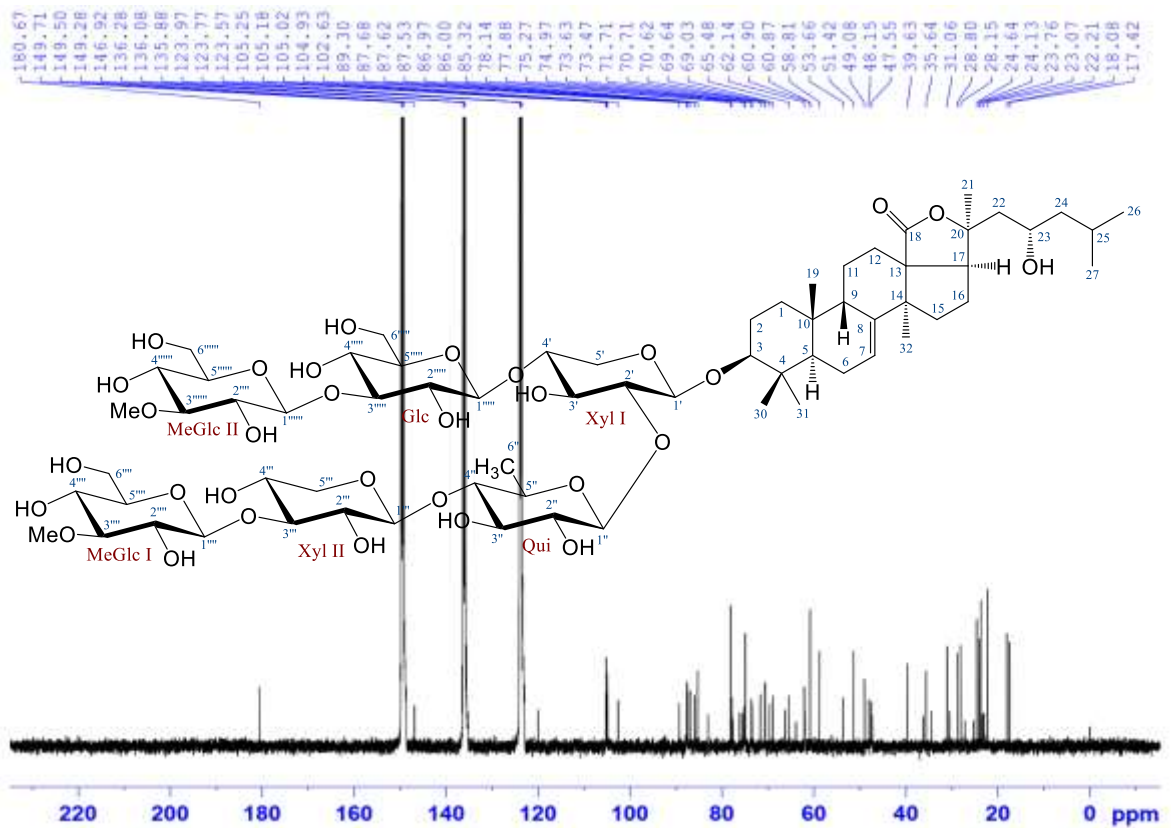


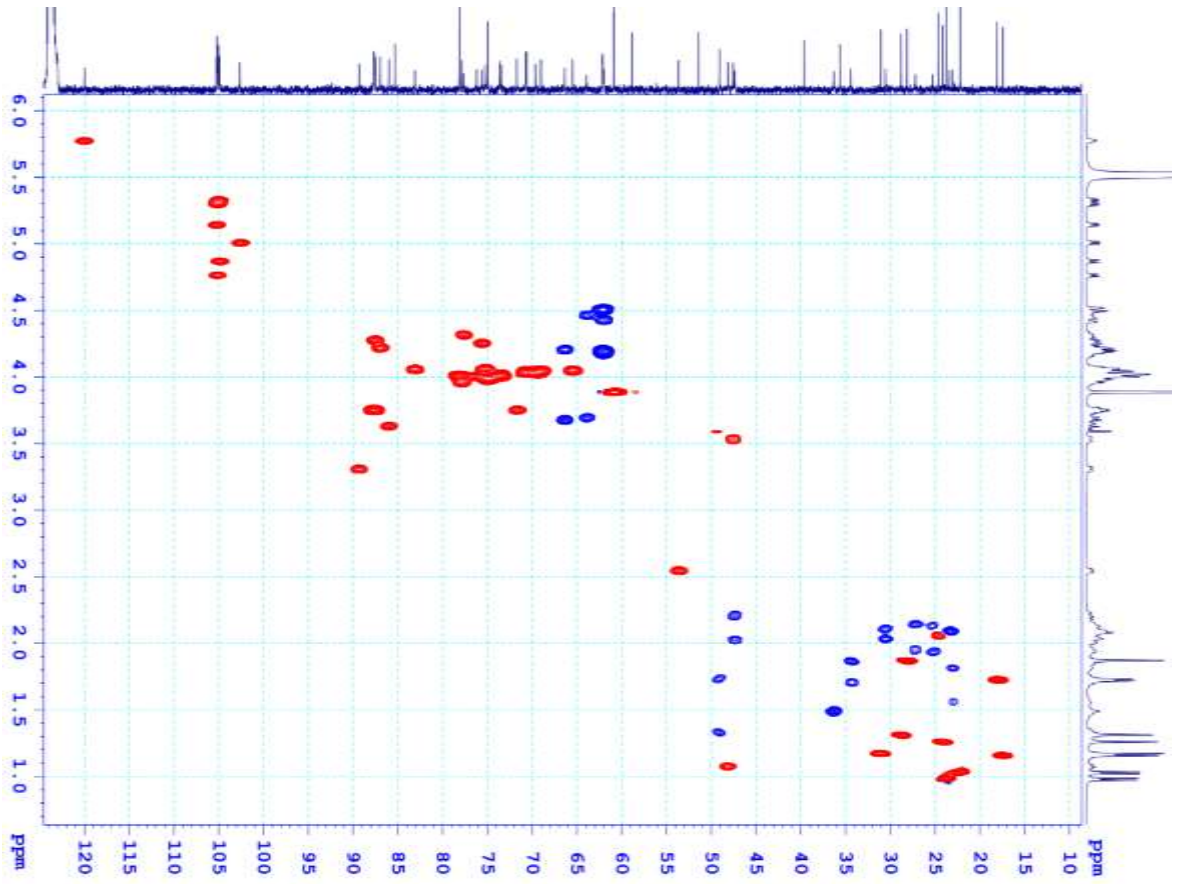
Hình S59. Phổ COSY của SH16.



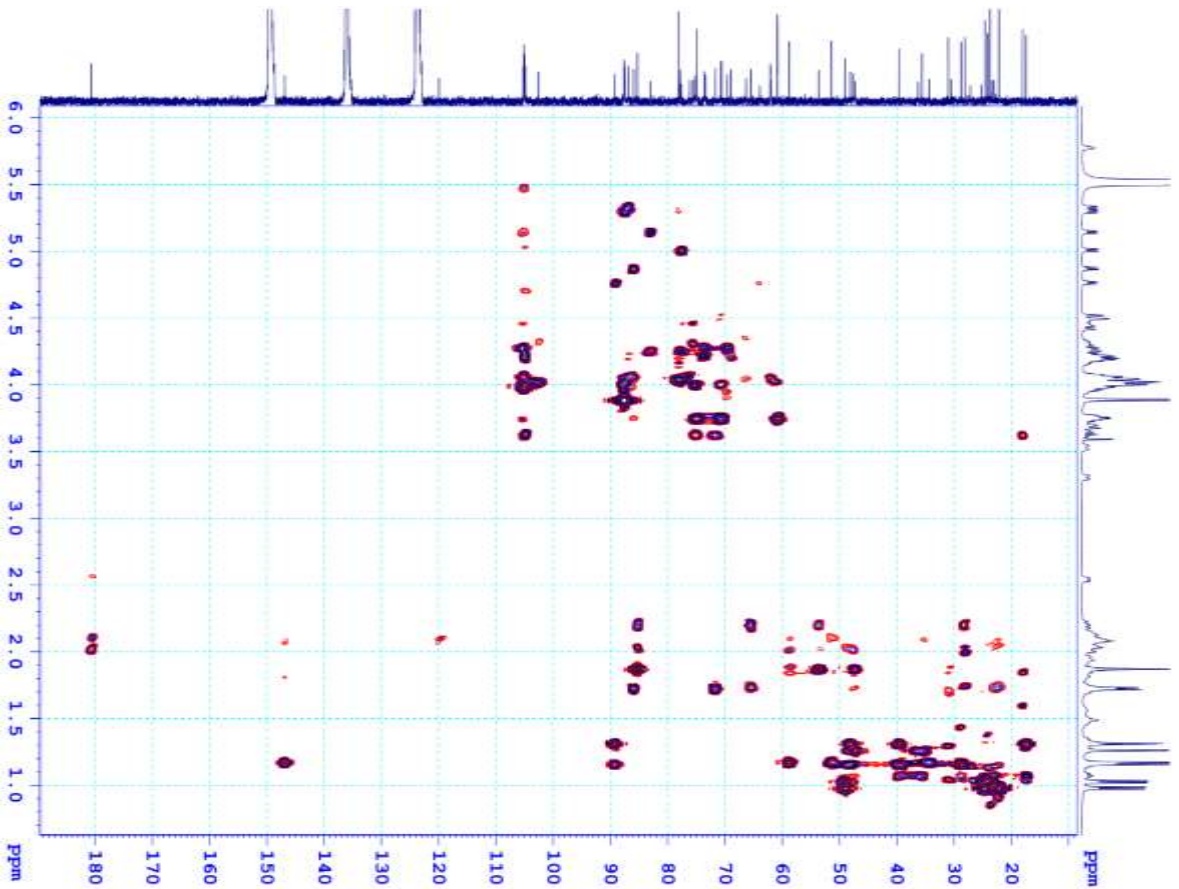
Hình S60. Phổ ROESY của SH16.

## PHỤ LỤC 12. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT SH17

Hình S61. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của SH17.Hình S62. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của SH17.

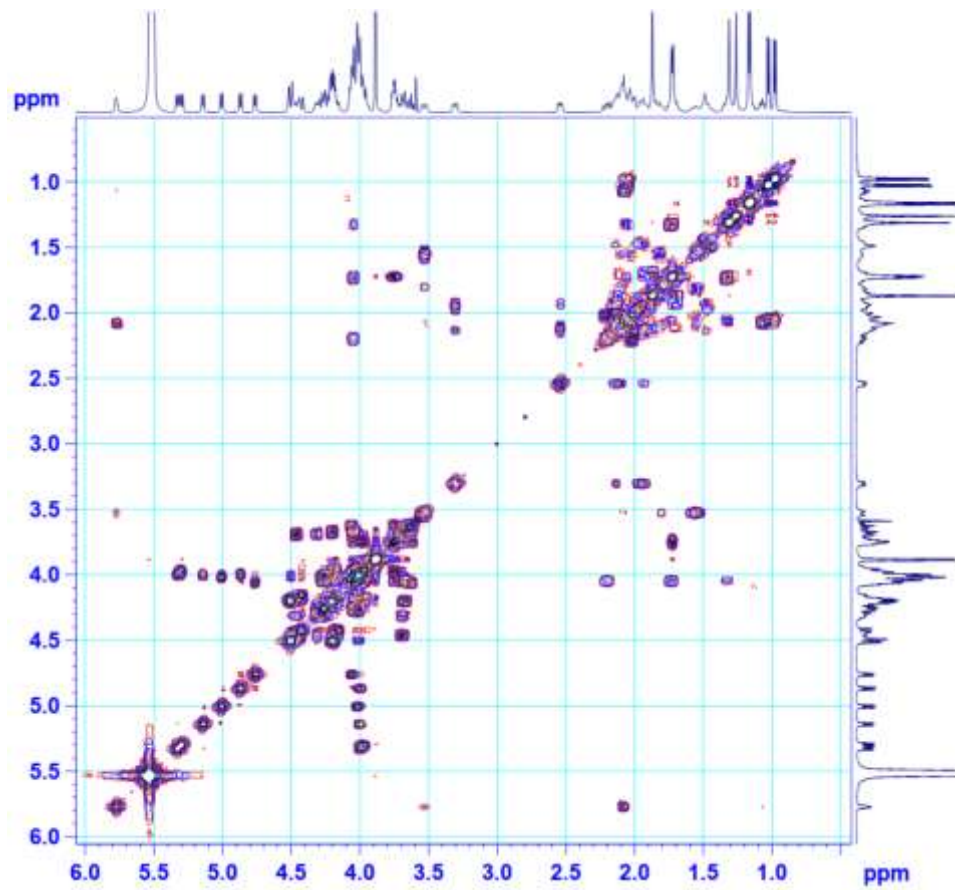


Hình S63. Phổ HSQC của SH17.

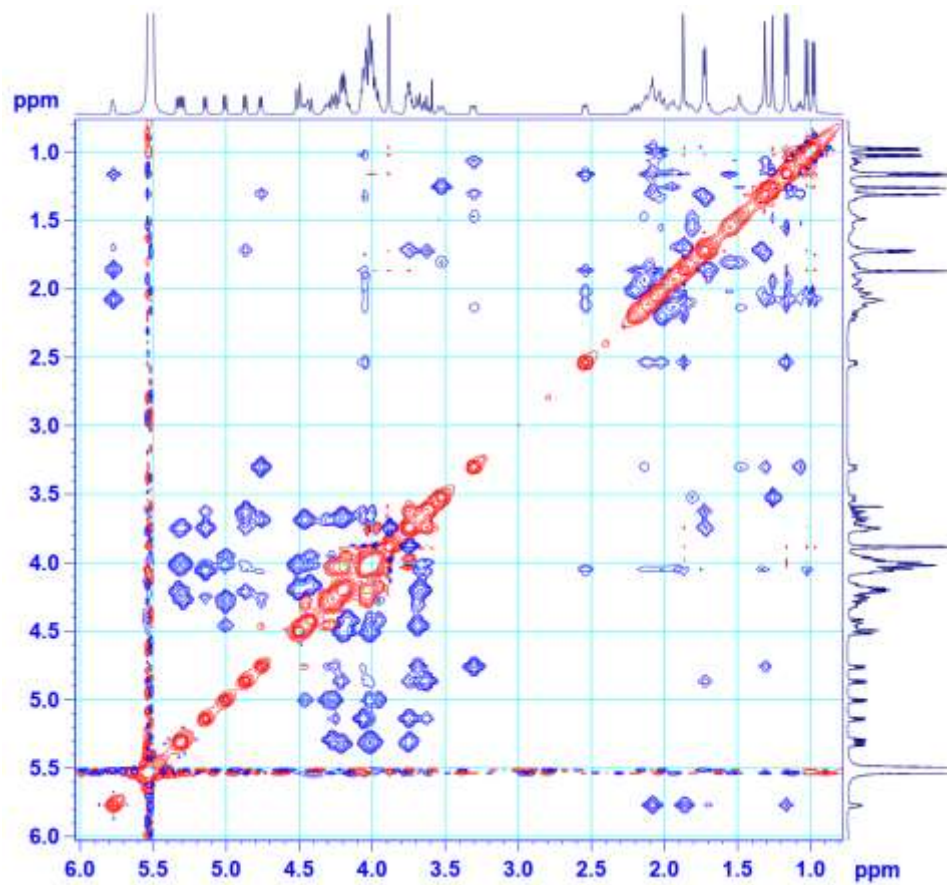


Hình S64. Phổ HMBC của SH17.





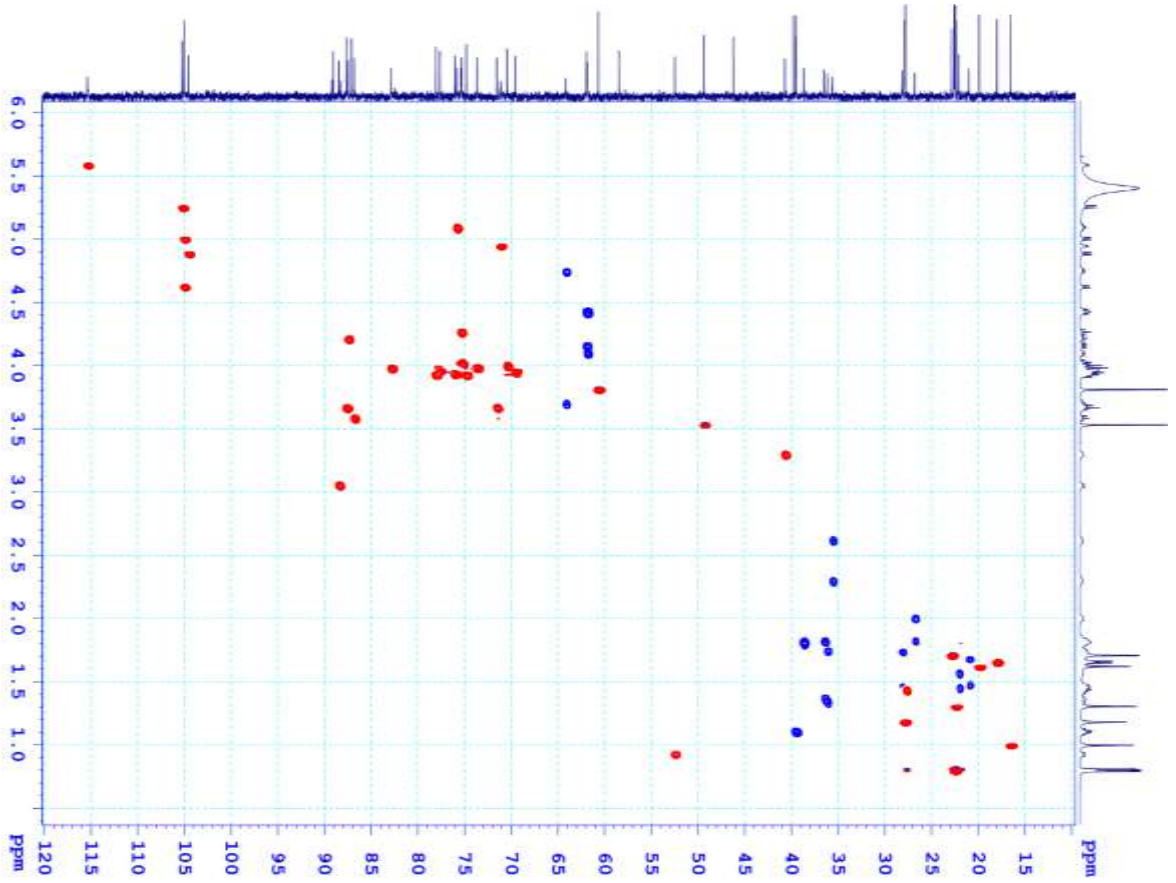
Hình S65. Phổ COSY của SH17.



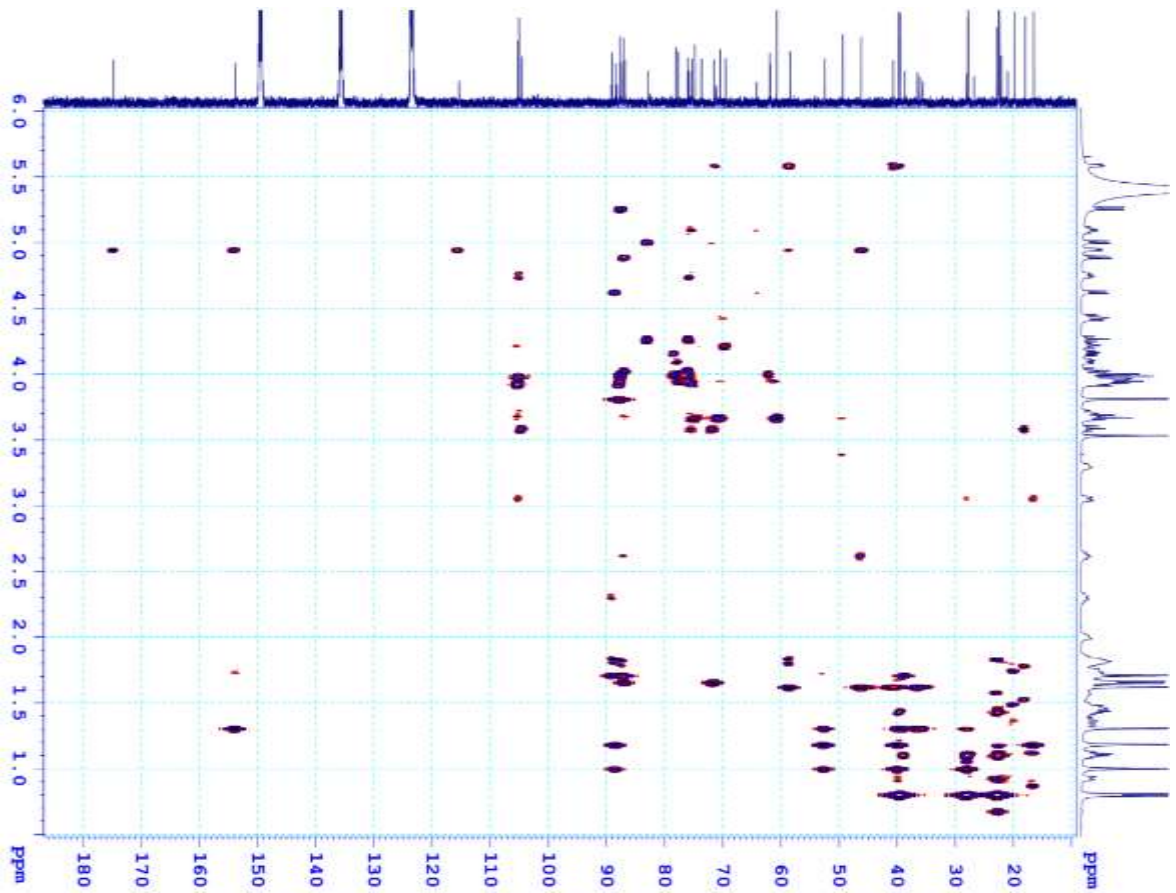
Hình S66. Phổ ROESY của SH17.



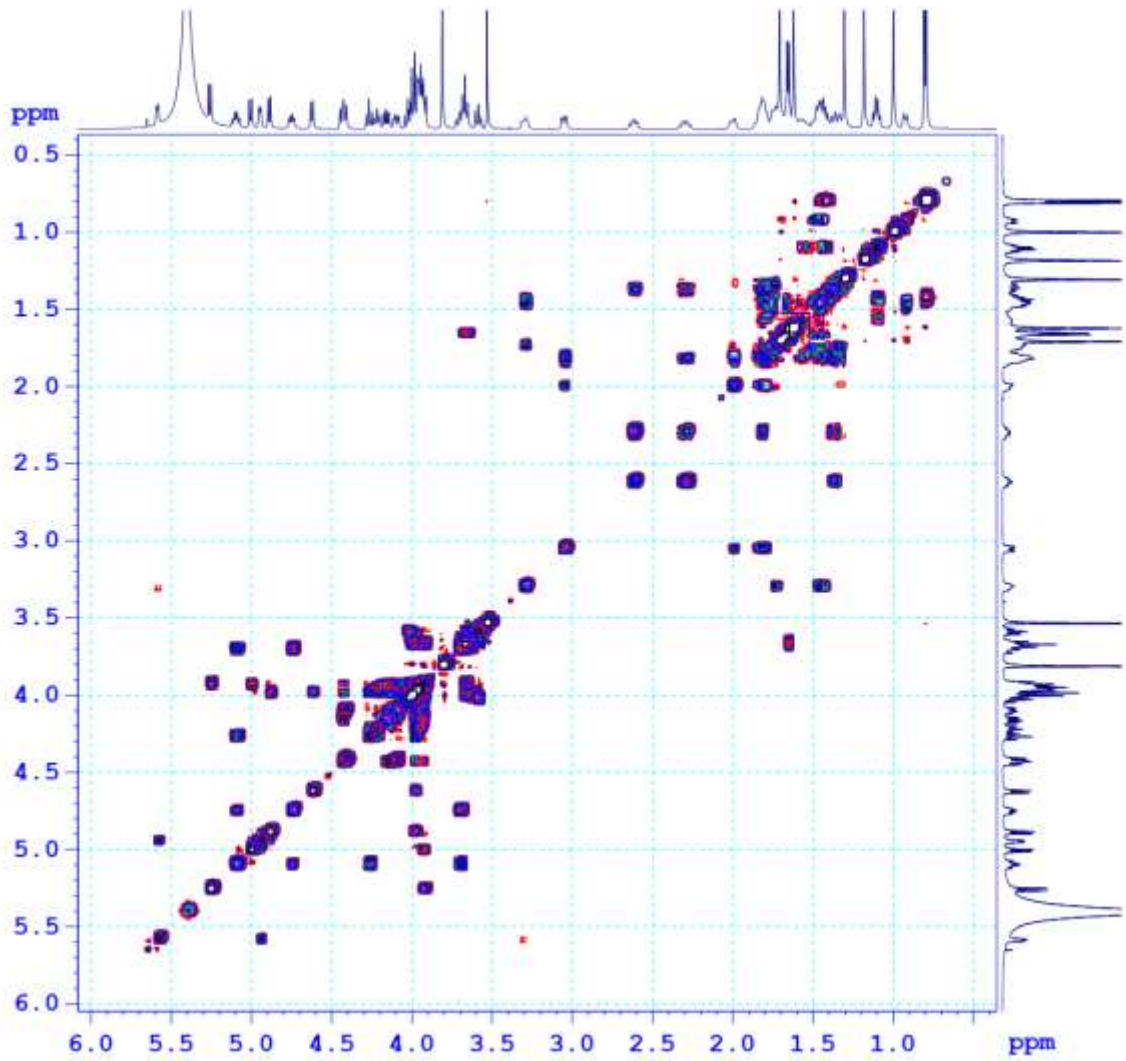




Hình S69. Phổ HSQC của HE2.

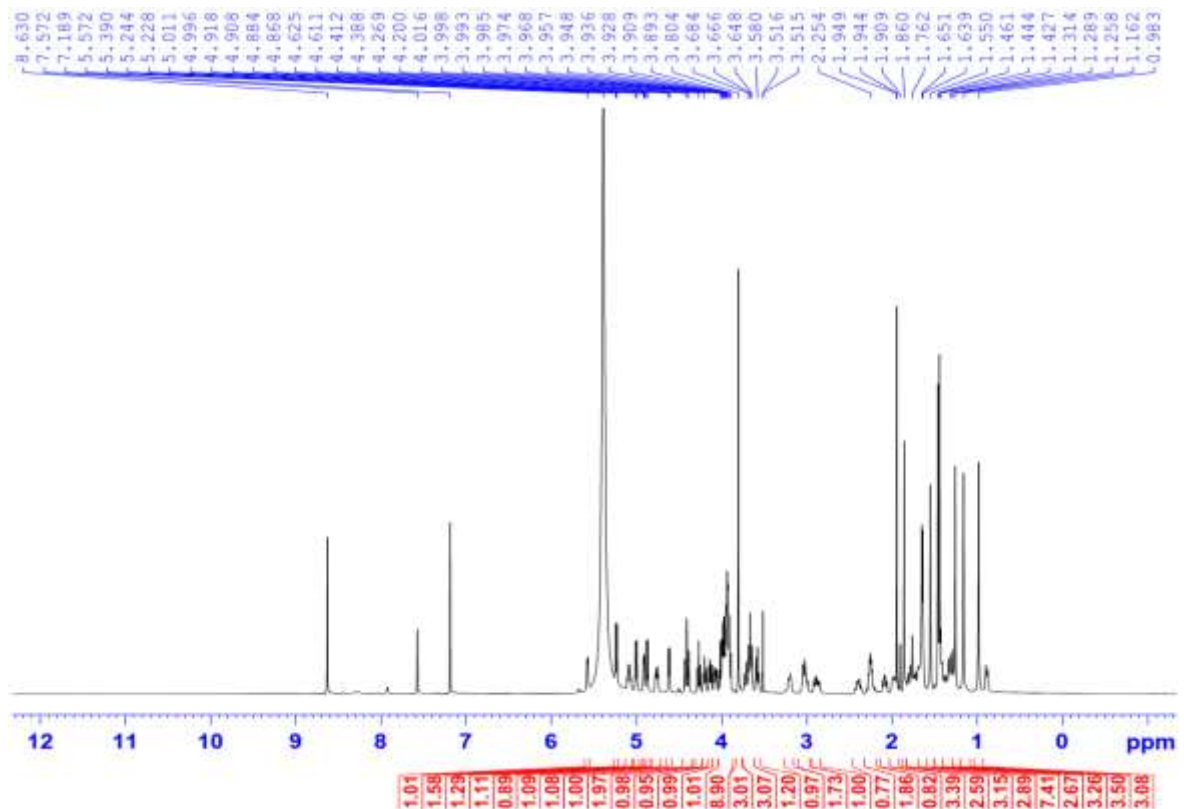
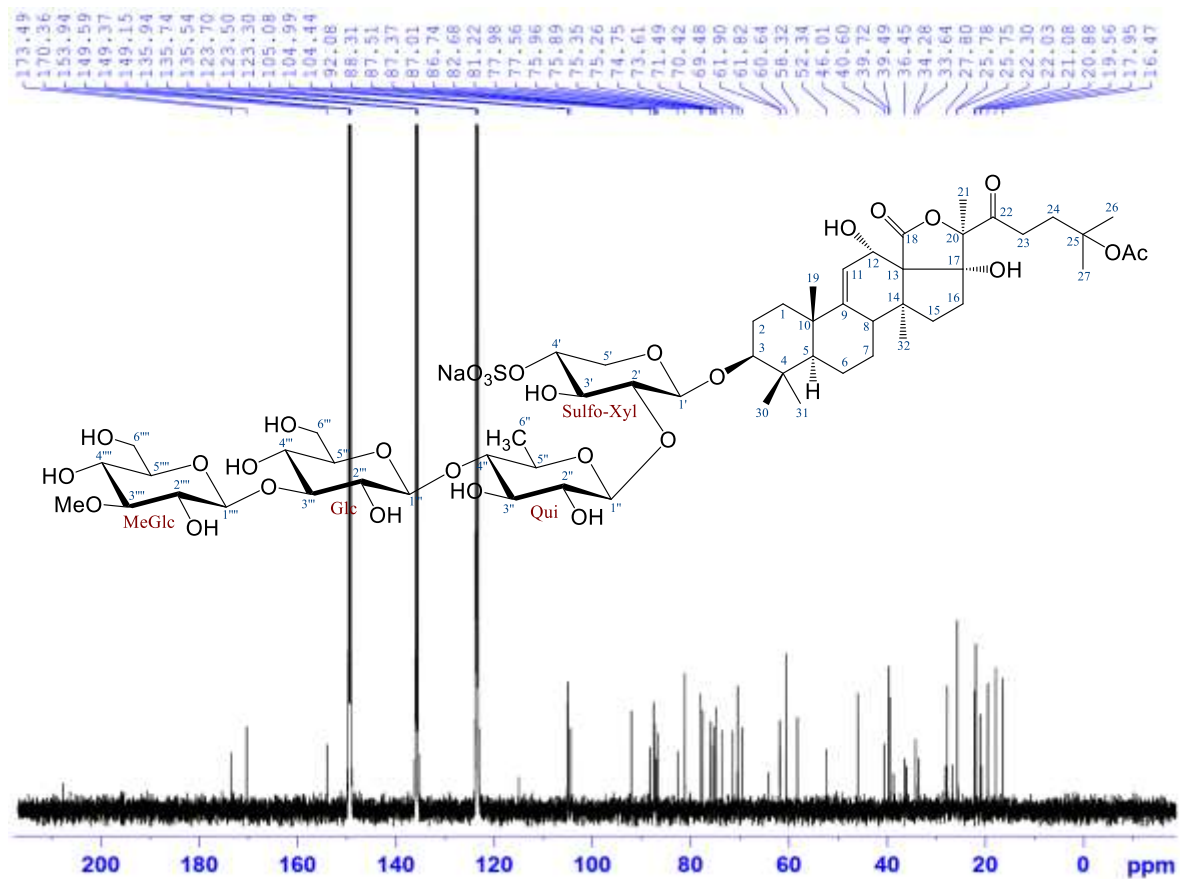


Hình S70. Phổ HMBC của HE2.

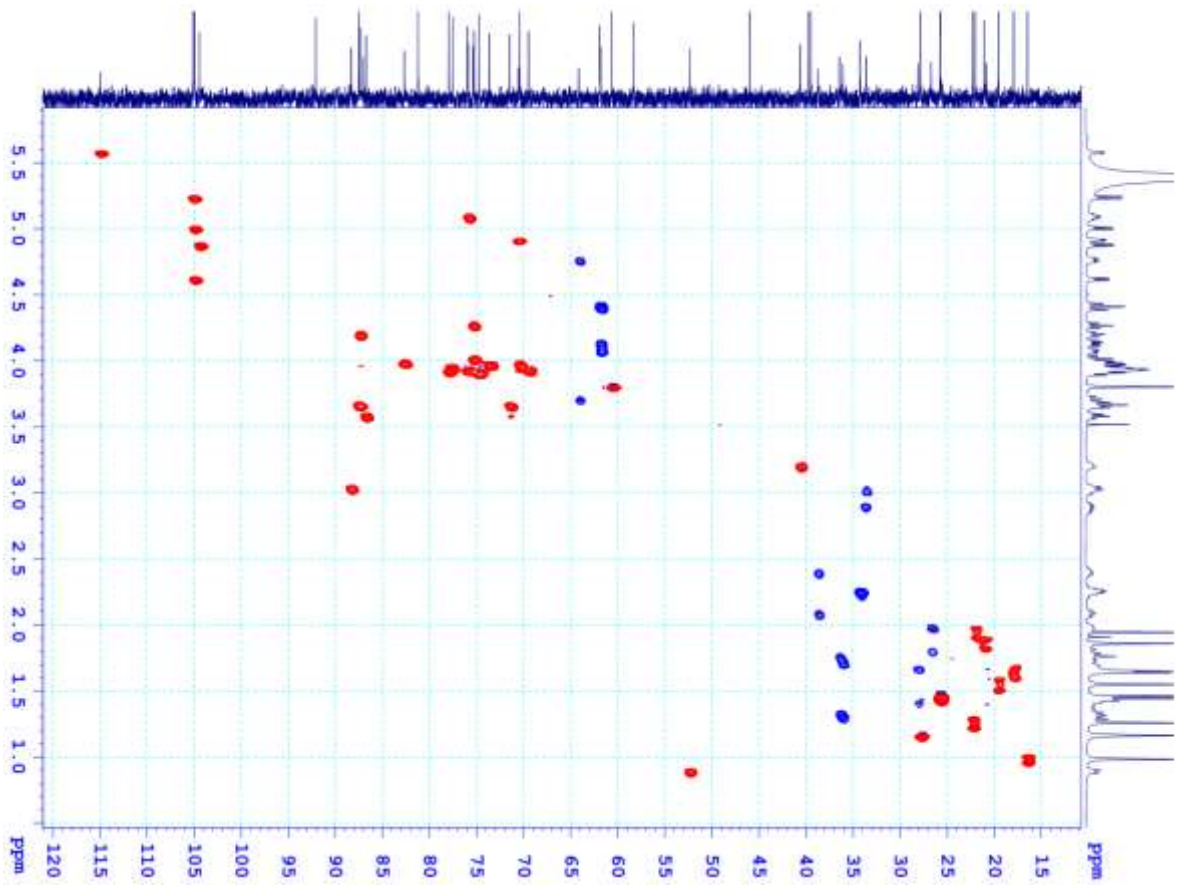


Hình S71. Phổ COSY của HE2.

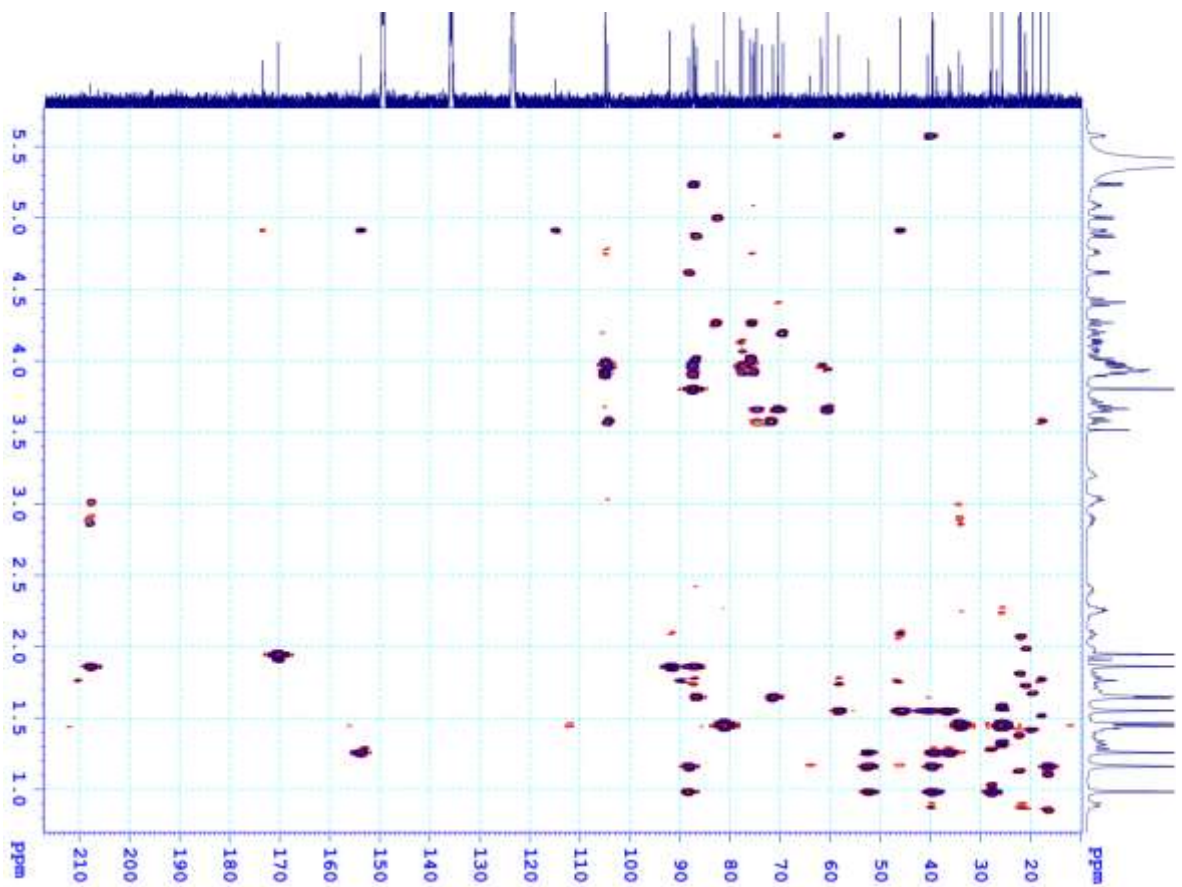
## PHỤ LỤC 14. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE3

Hình S72. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của HE3.Hình S73. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của HE3.

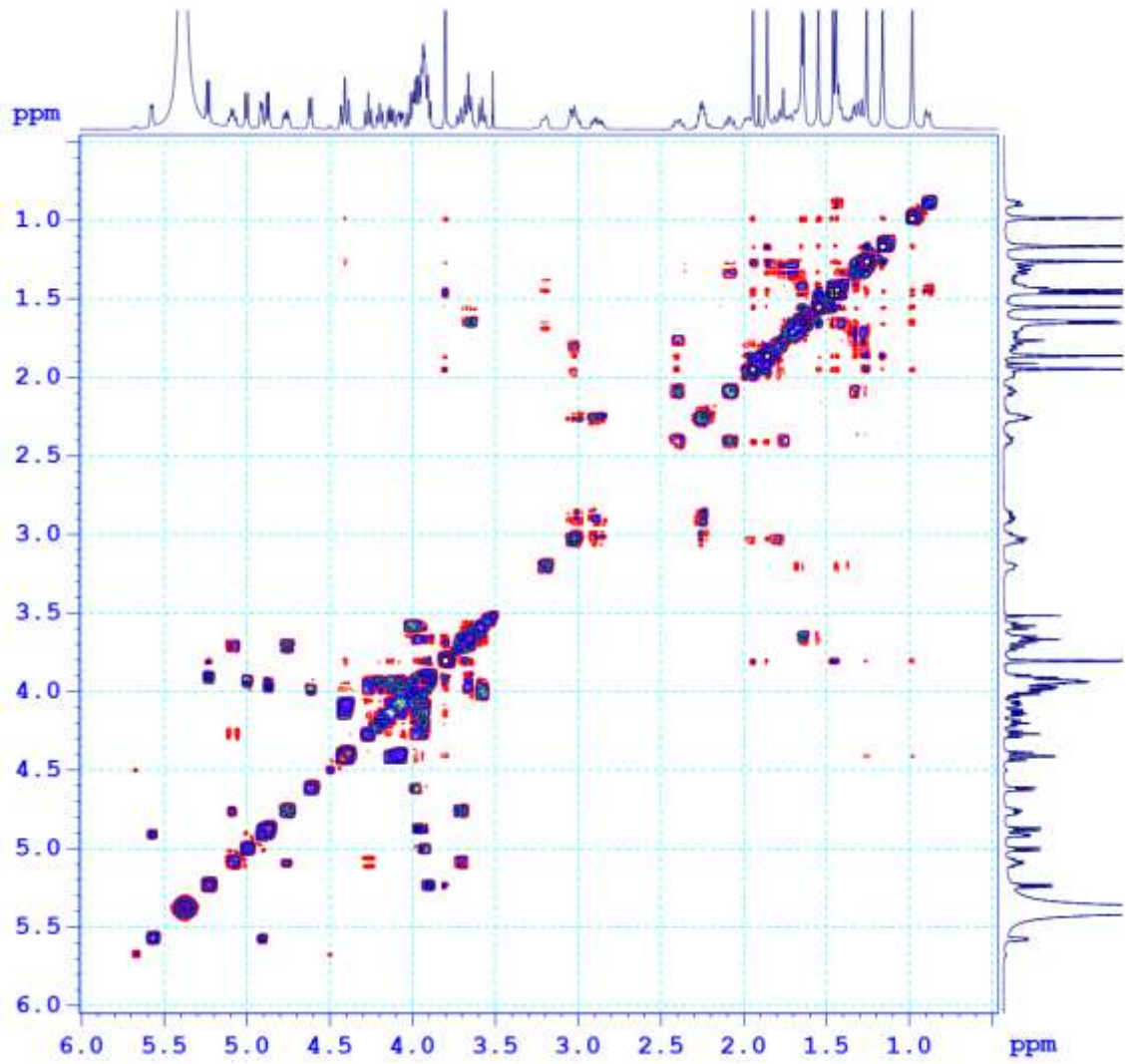




Hình S74. Phổ HSQC của HE3.

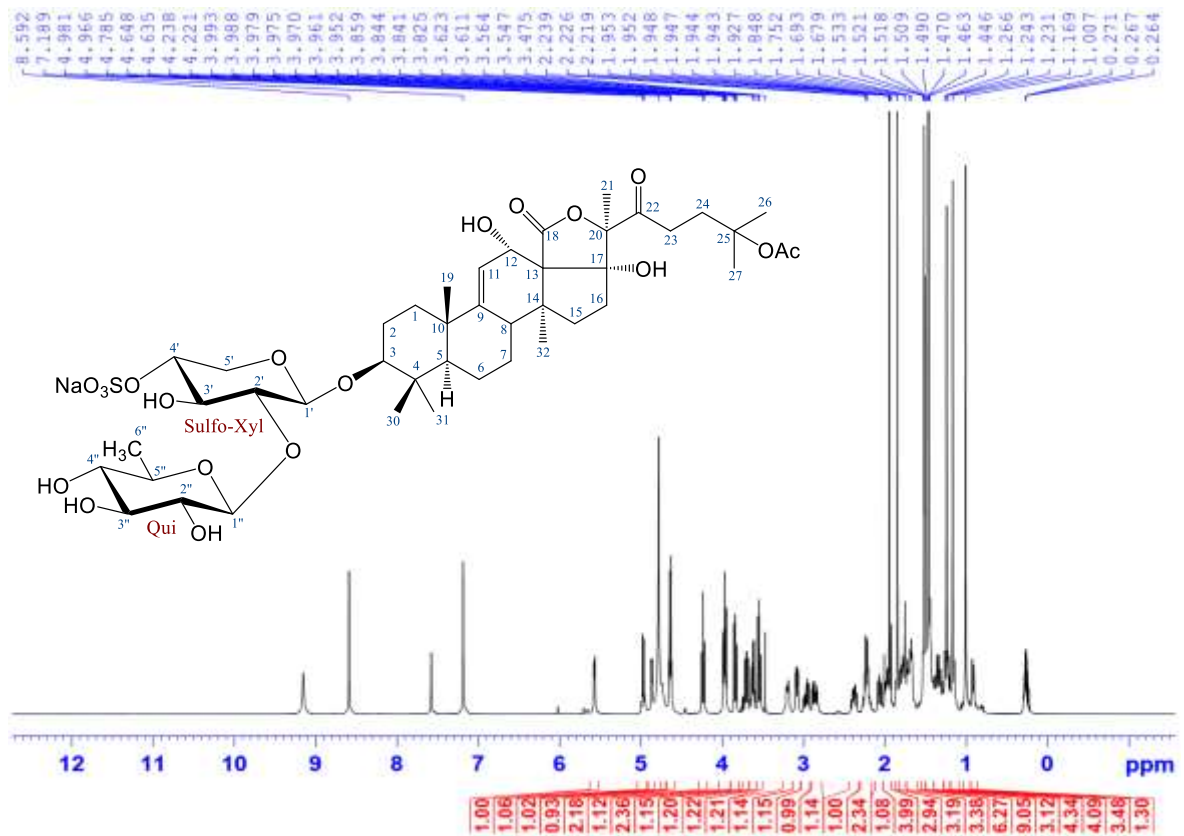
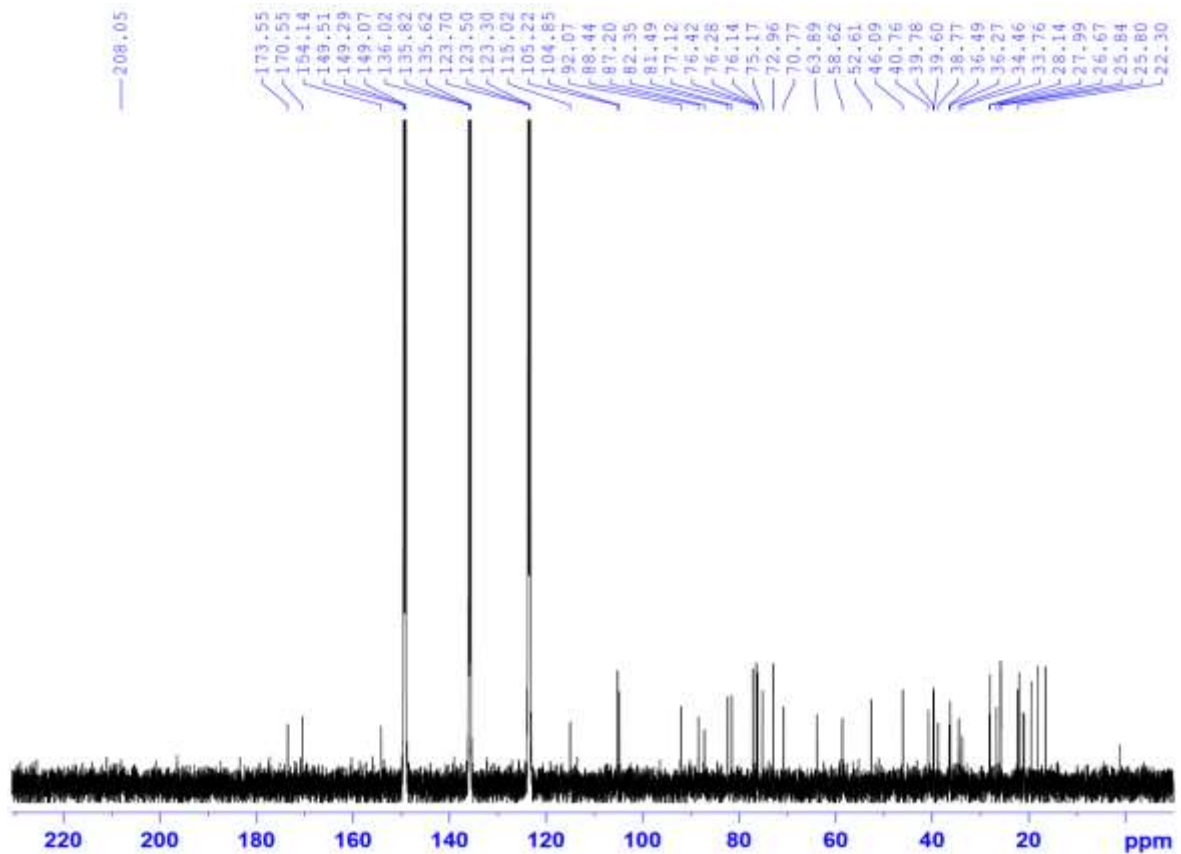


Hình S75. Phổ HMBC của HE3.

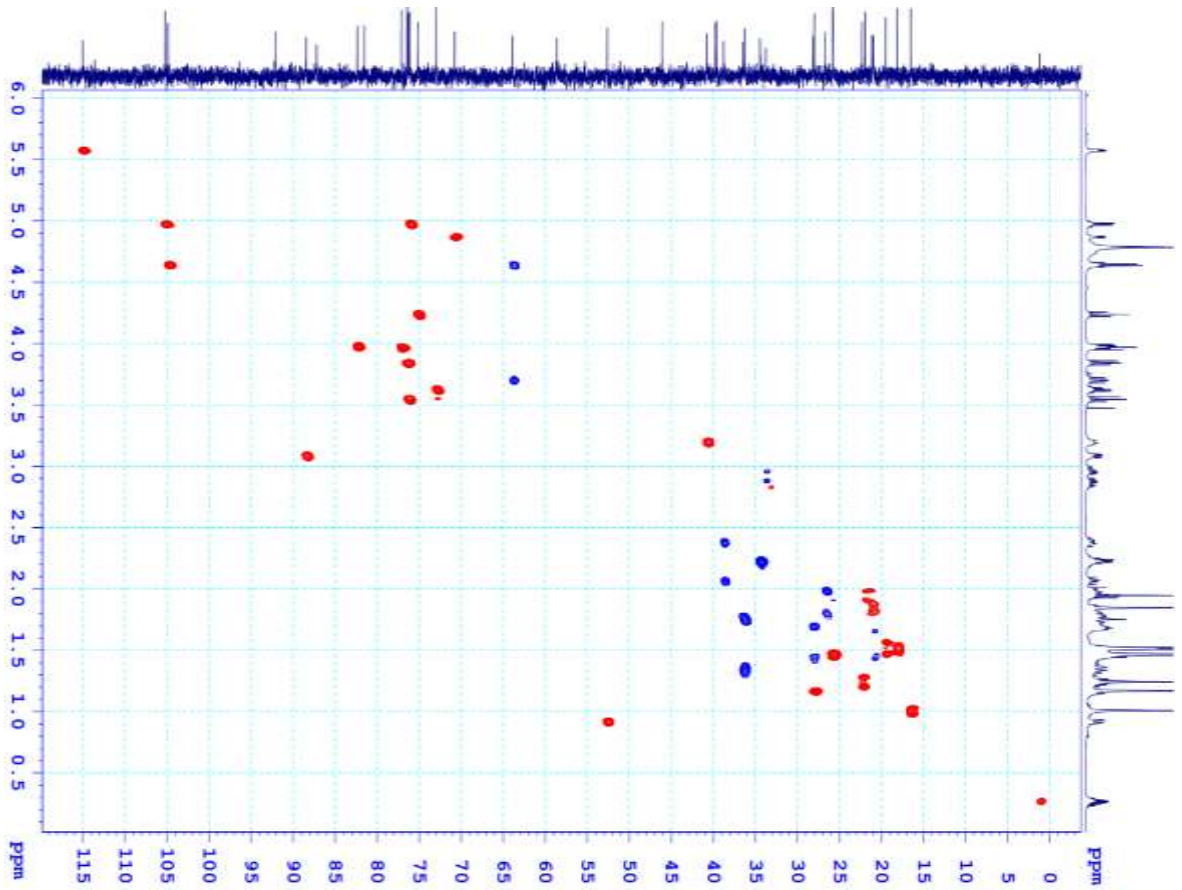


Hình S76. Phổ COSY của HE3.

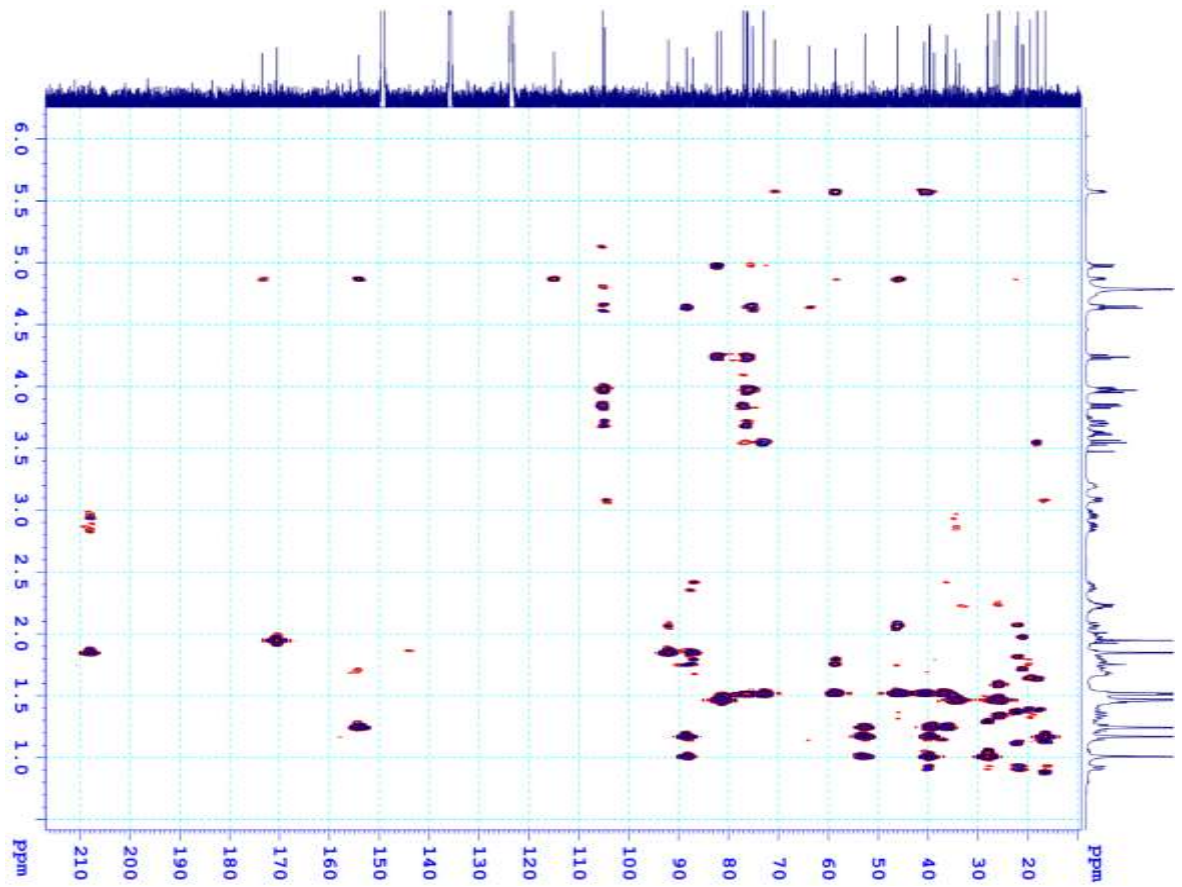
## PHỤ LỤC 15. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE4

Hình S77. Phổ <sup>1</sup>H NMR của HE4.Hình S78. Phổ <sup>13</sup>C NMR của HE4.

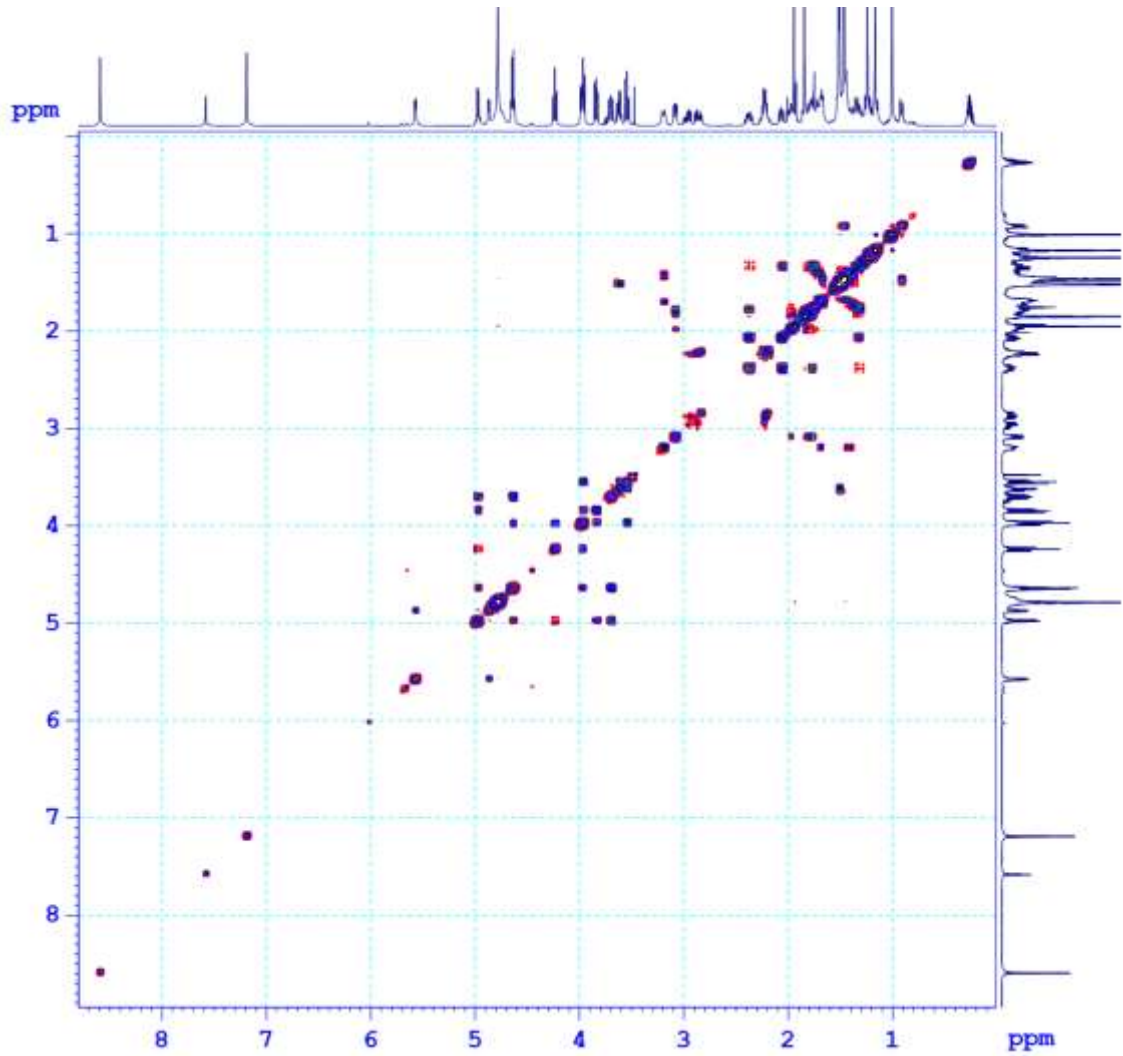




Hình S79. Phổ HSQC của HE4.

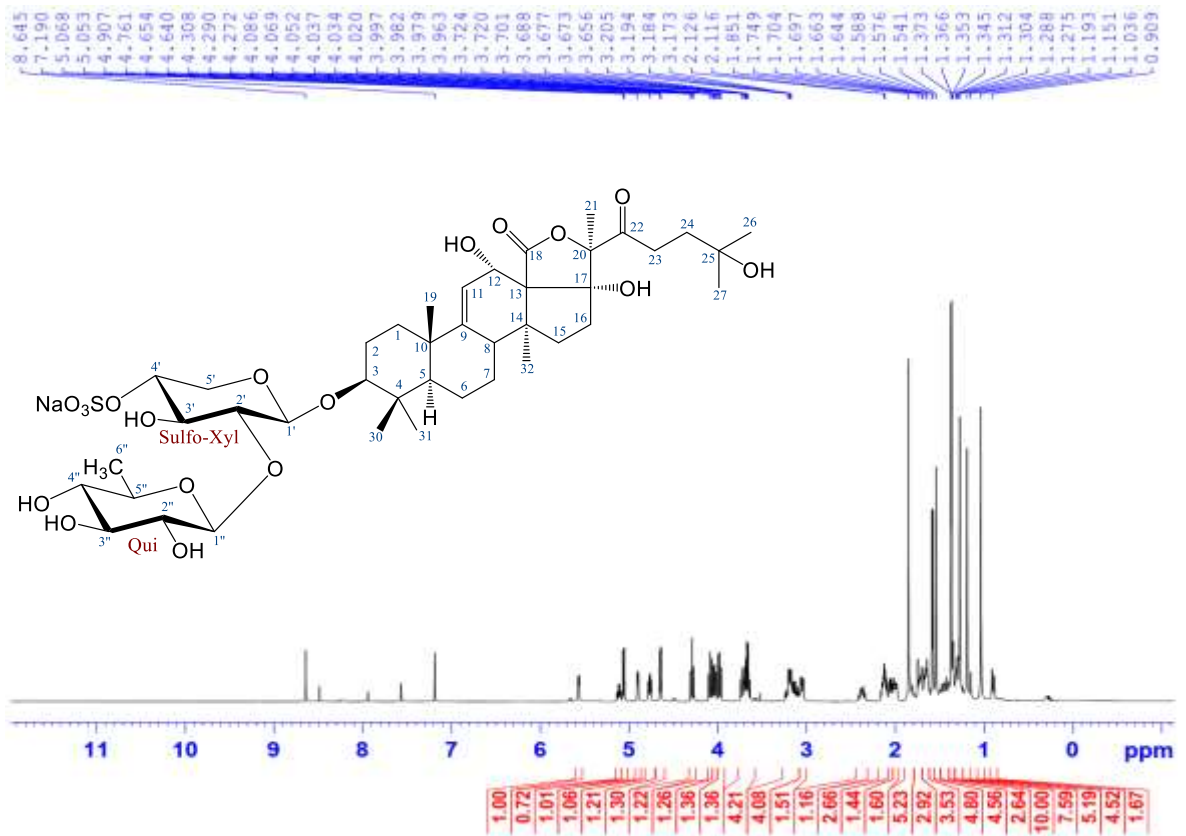


Hình S80. Phổ HMBC của HE4.

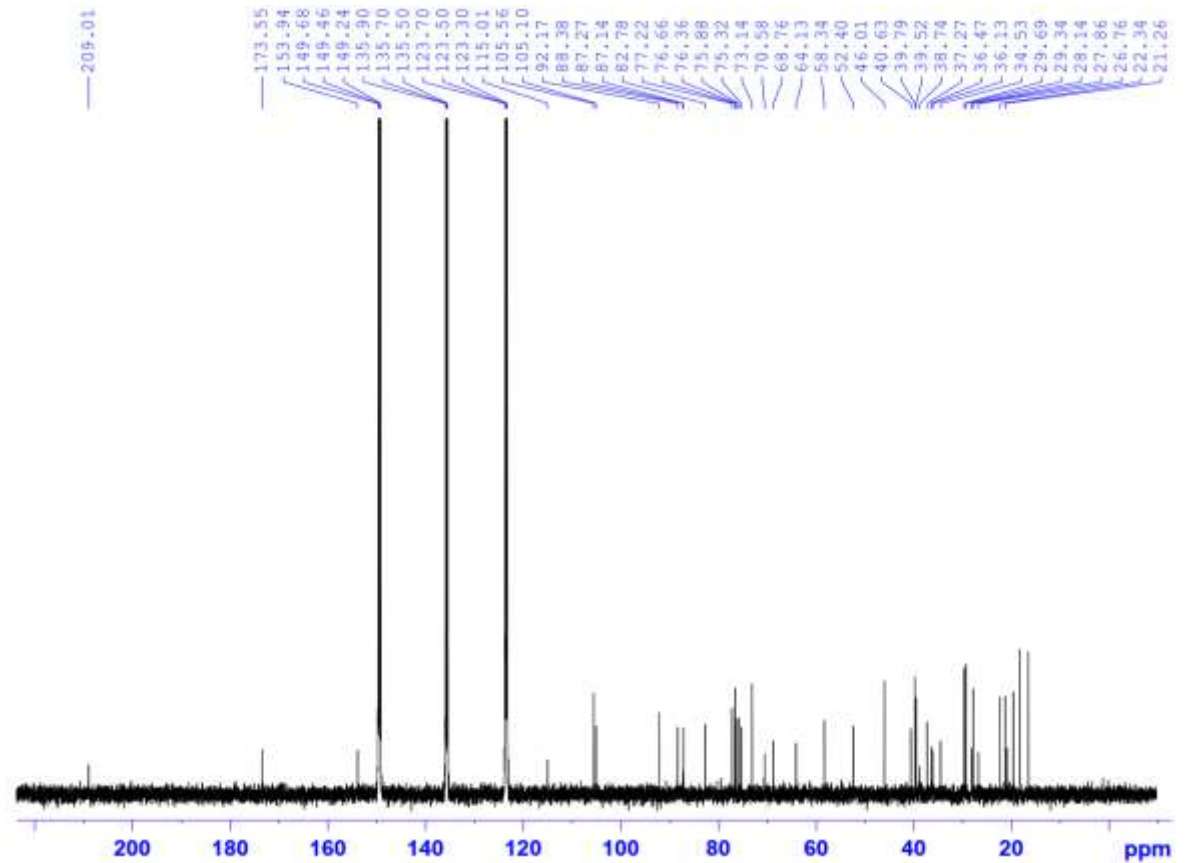


Hình S81. Phổ COSY của HE4.

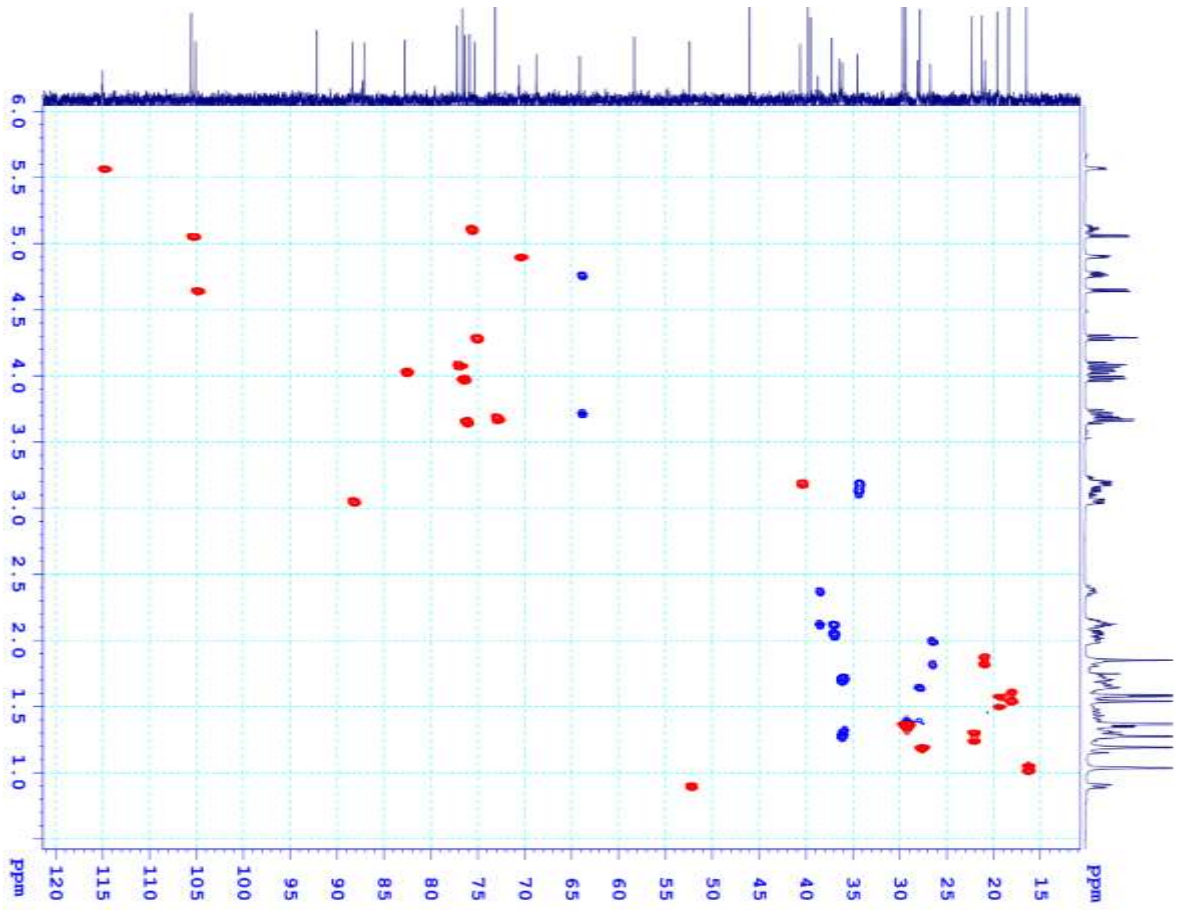
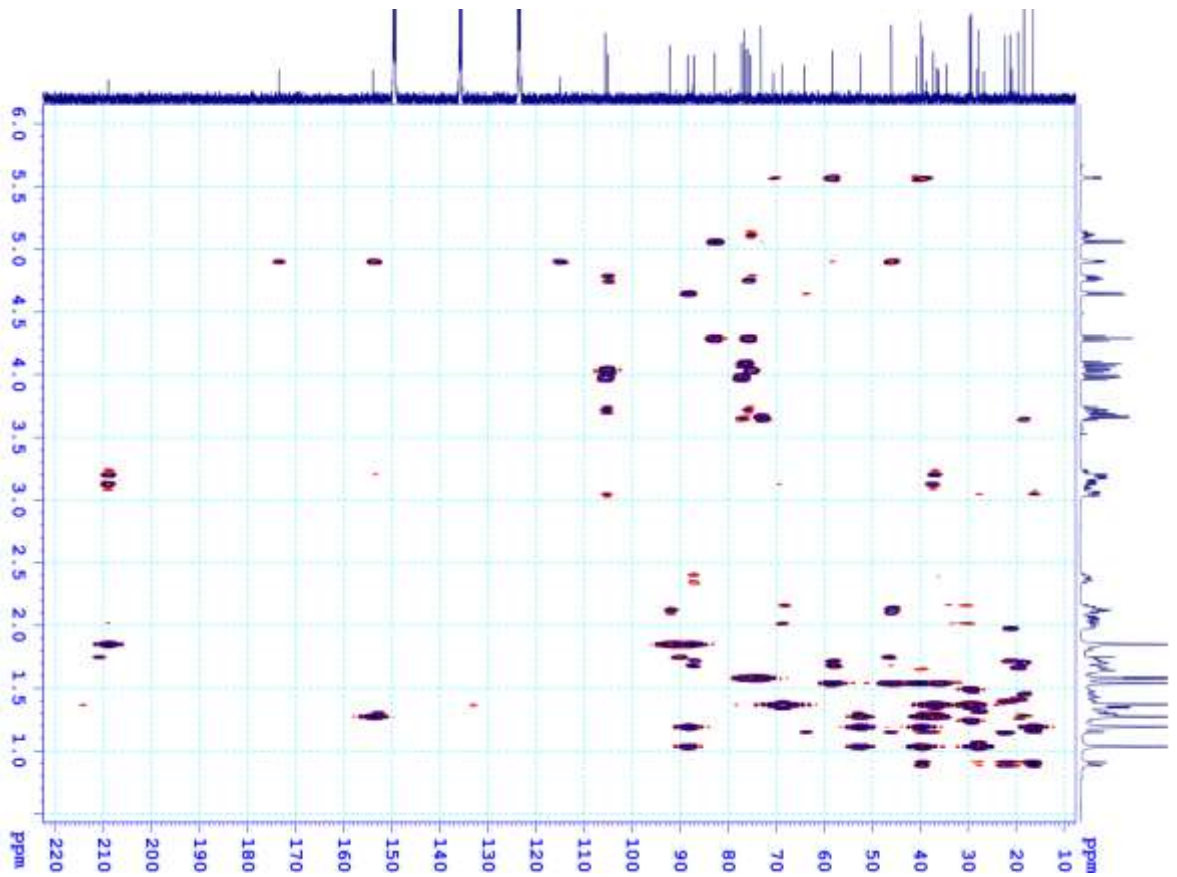
## PHỤ LỤC 16. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE5



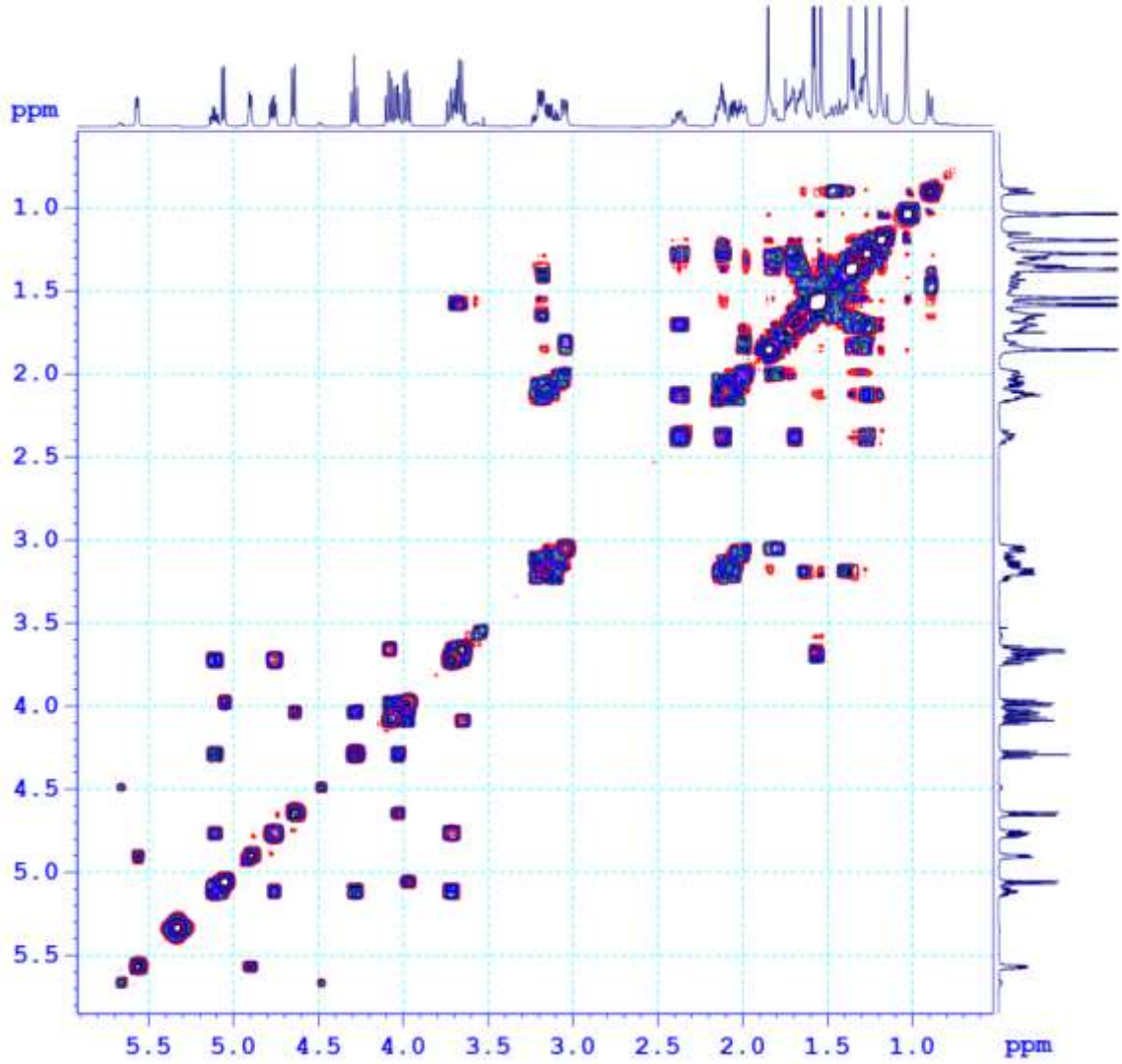
Hình S82. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của HE5.



Hình S83. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của HE5.

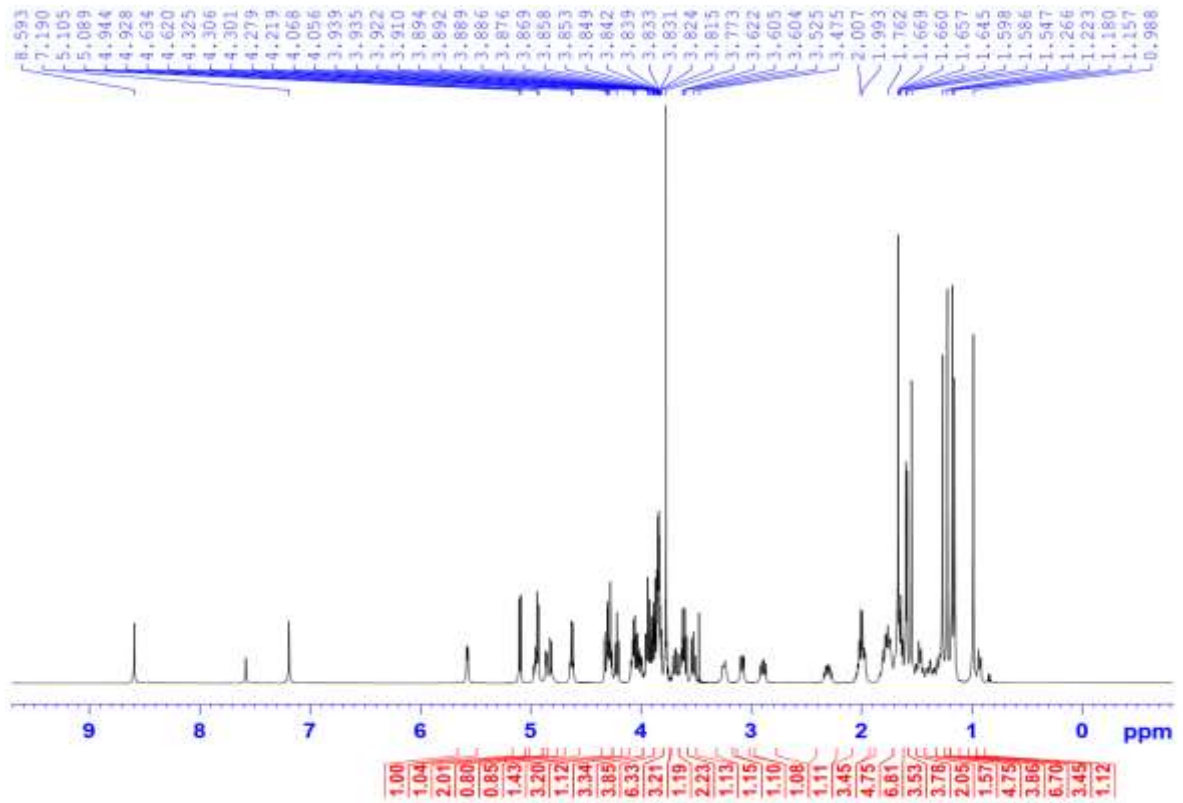
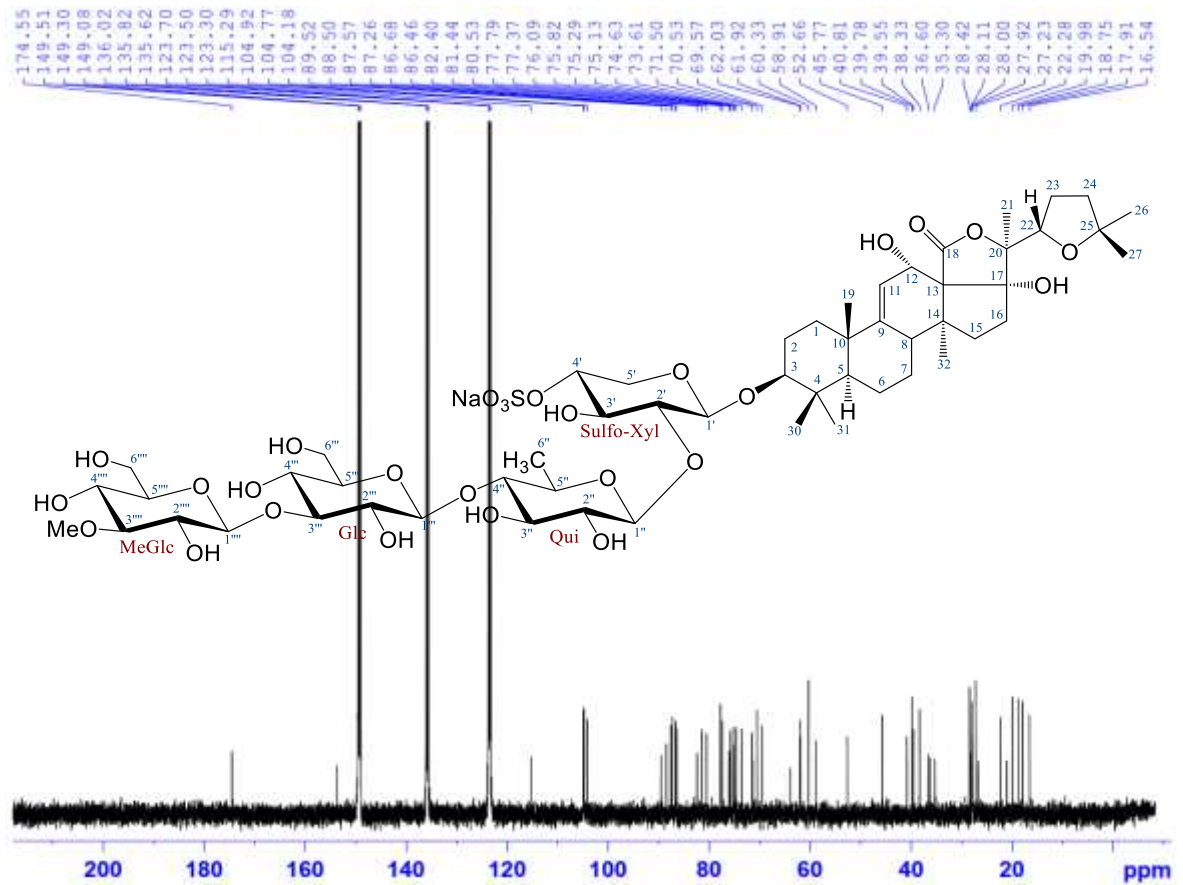
Hình S84. Phổ HSQC của **HE5**.Hình S85. Phổ HMBC của **HE5**.

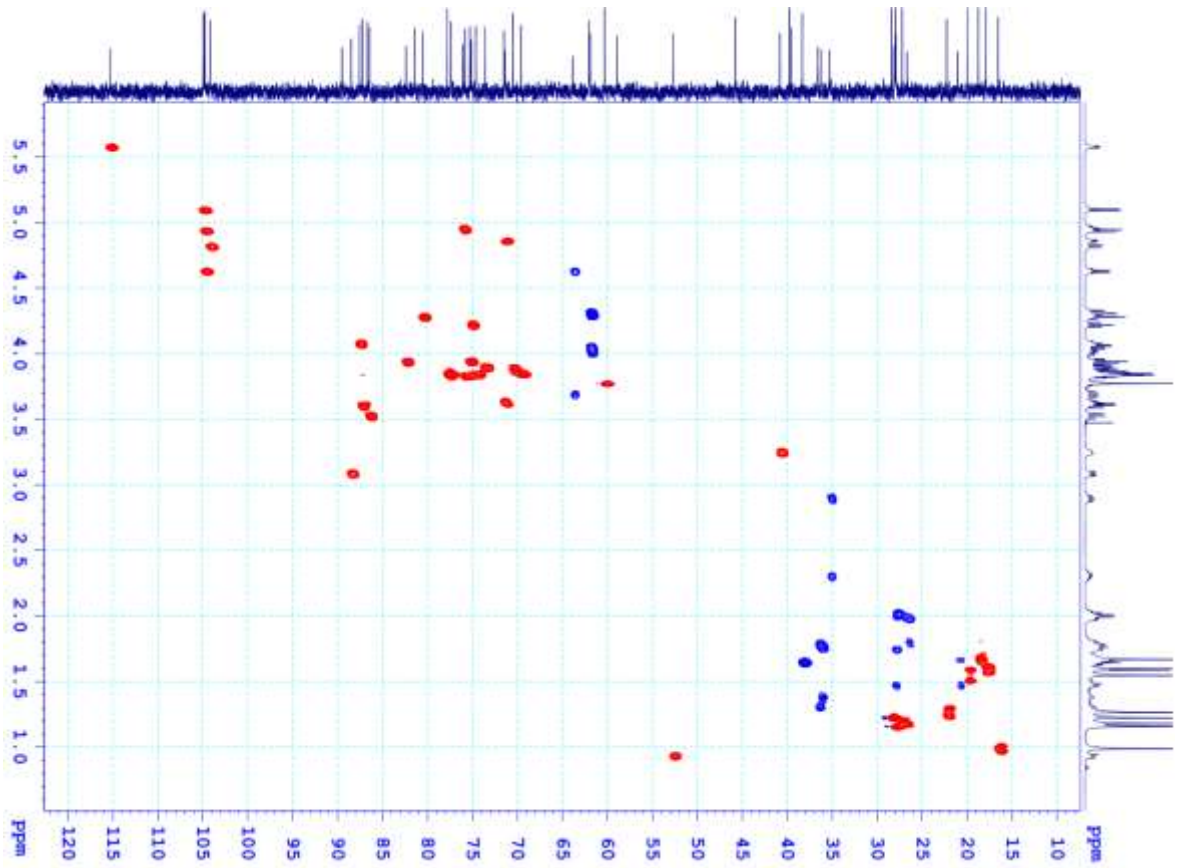




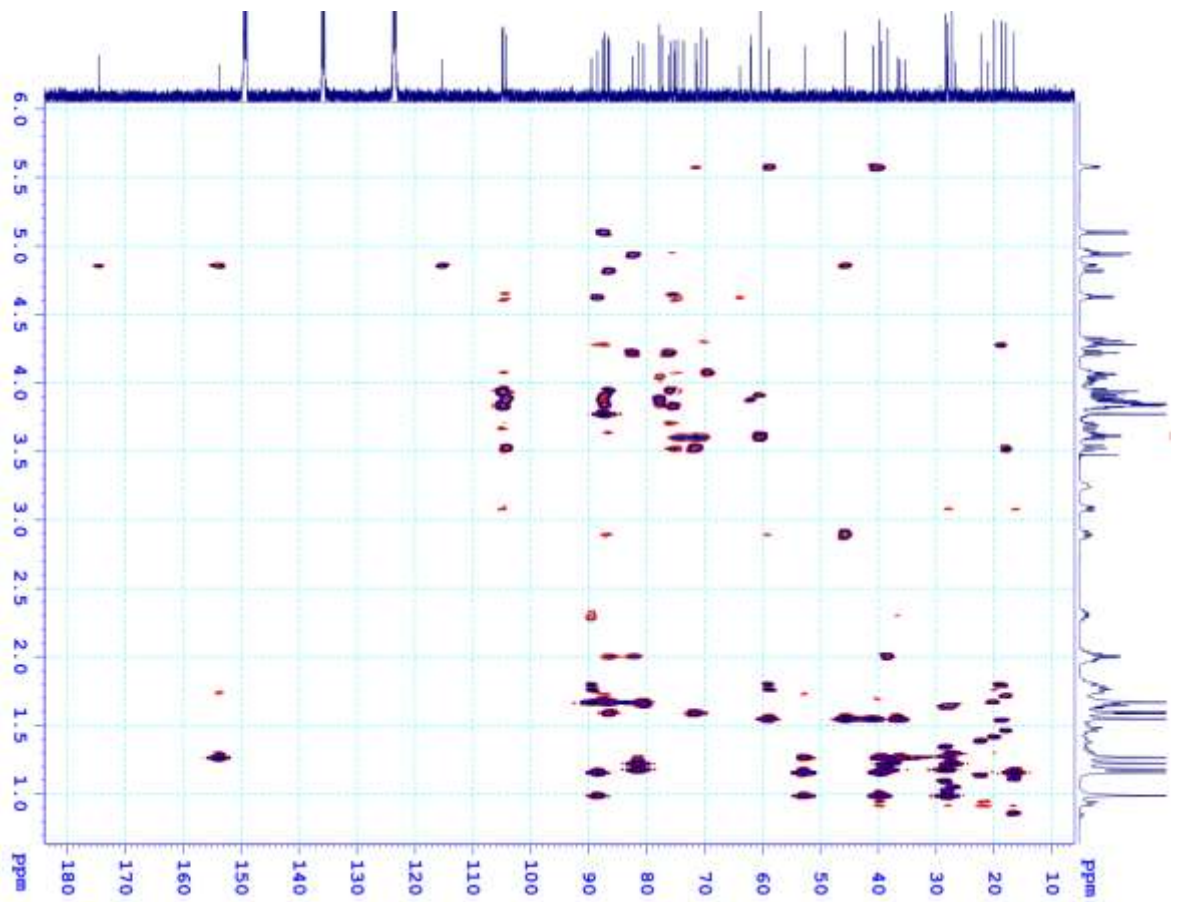
Hình S86. Phổ COSY của HE5.

## PHỤ LỤC 17. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE6

Hình S87. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của HE6.Hình S88. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của HE6.

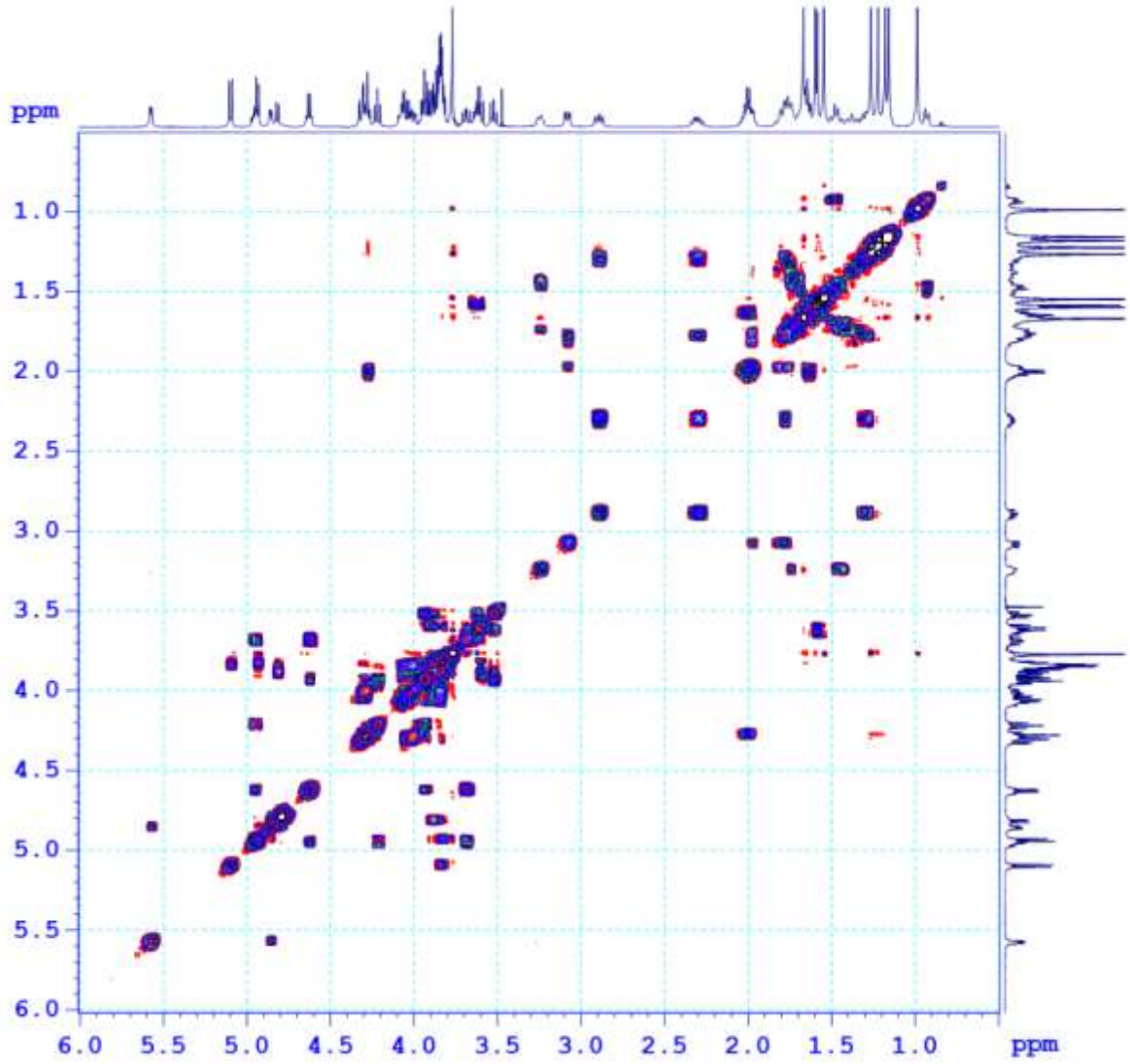


Hình S89. Phổ HSQC của HE6.



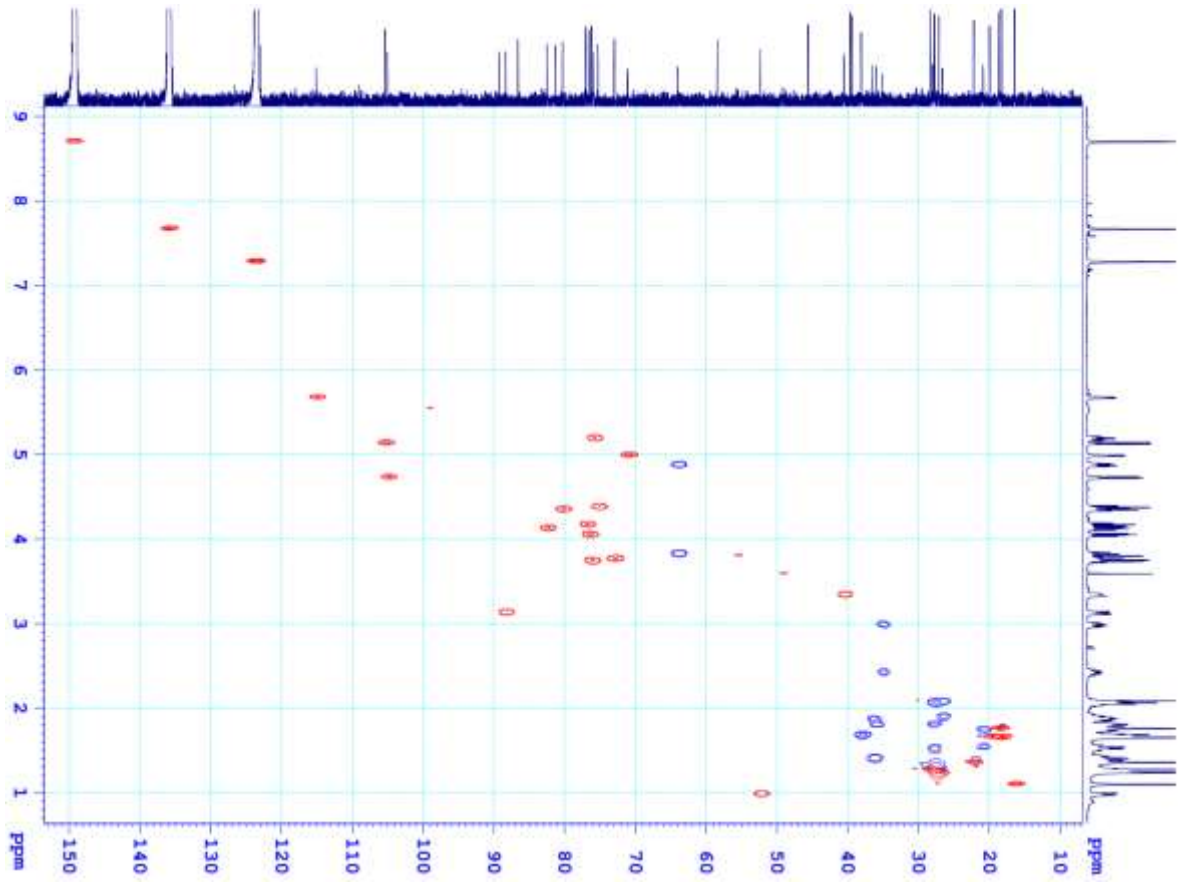
Hình S90. Phổ HMBC của HE6.



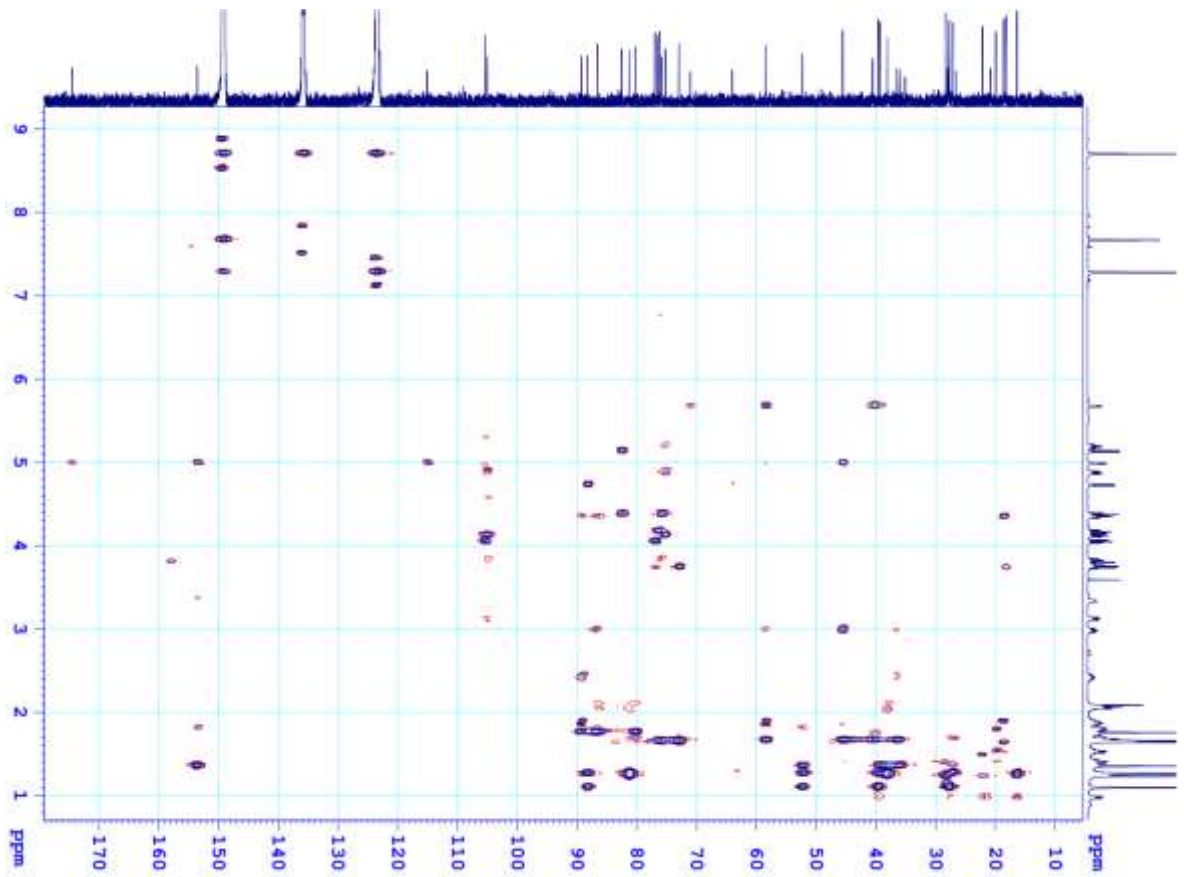


Hình S91. Phổ COSY của HE6.



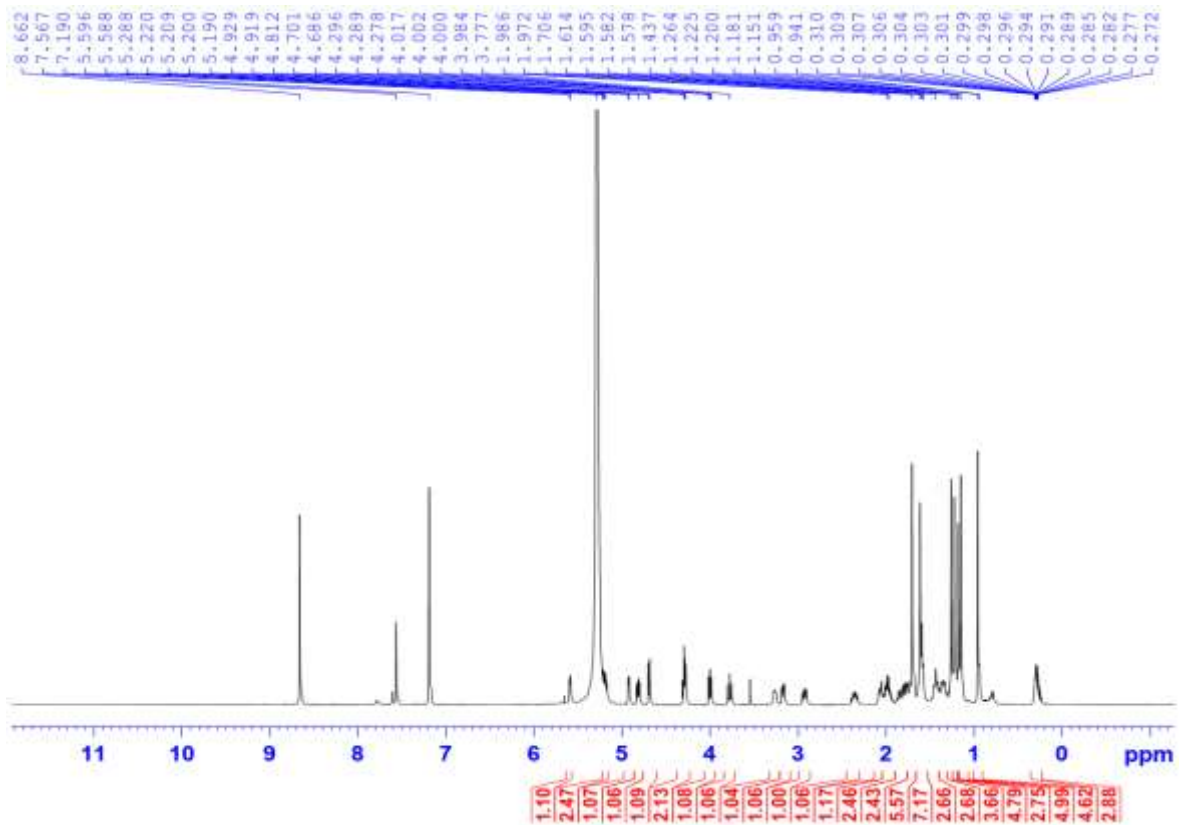
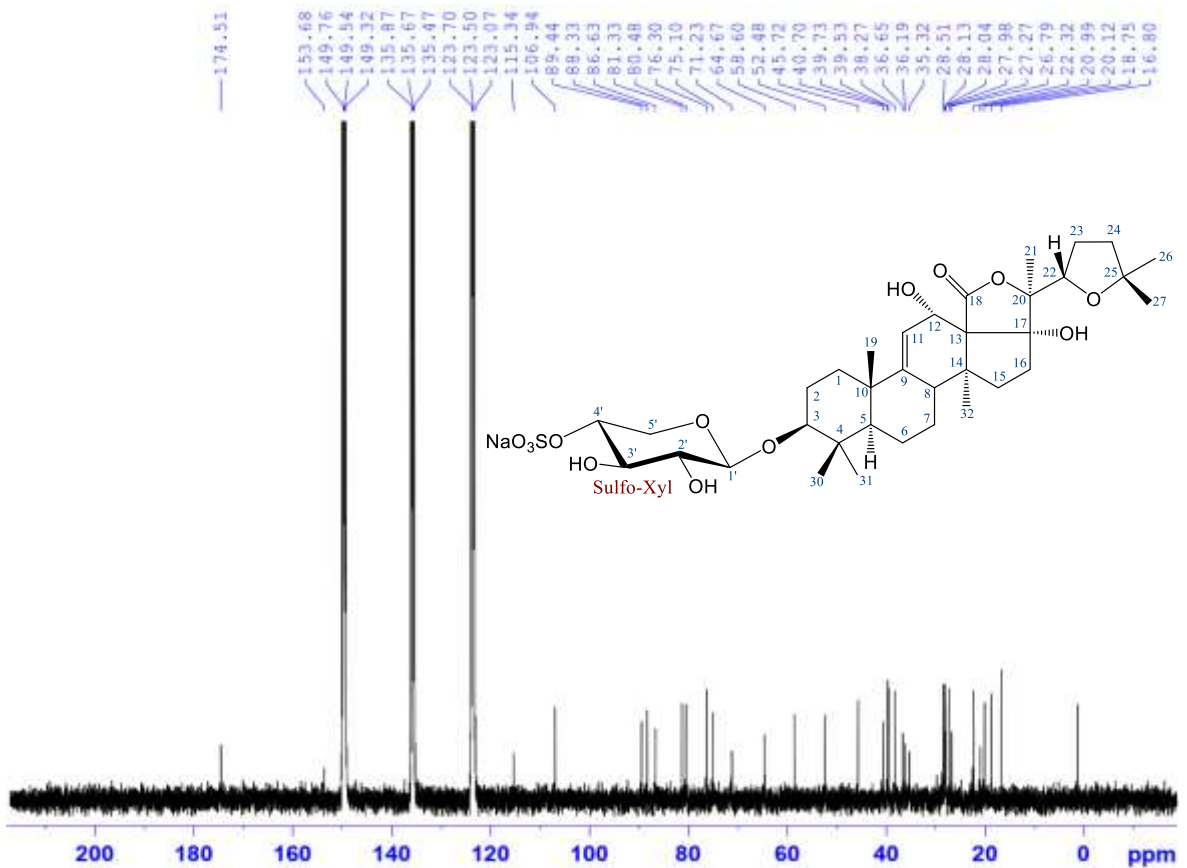


Hình S94. Phổ HSQC của HE7.

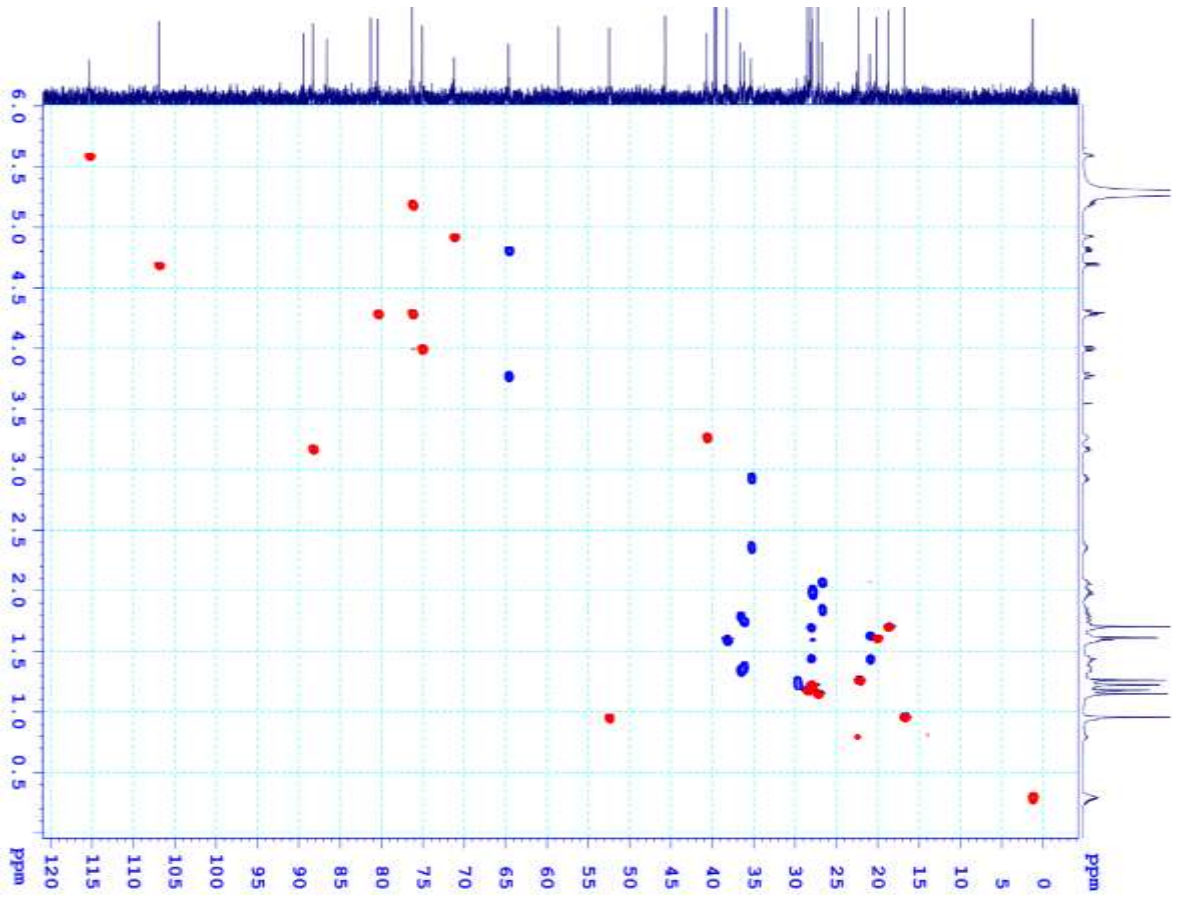


Hình S95. Phổ HMBC của HE7.

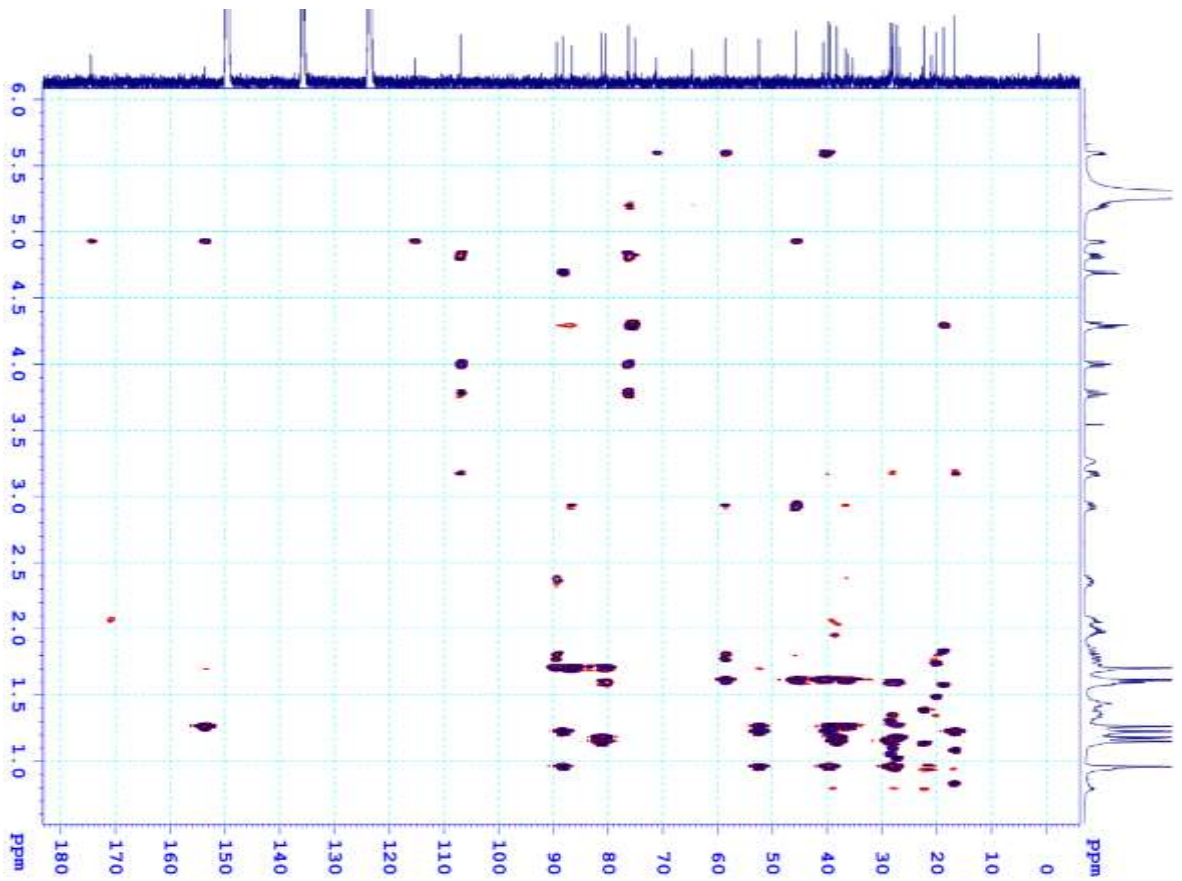
## PHỤ LỤC 19. CÁC PHỔ CỦA HỢP CHẤT HE8

Hình S96. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của HE8.Hình S97. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của HE8.

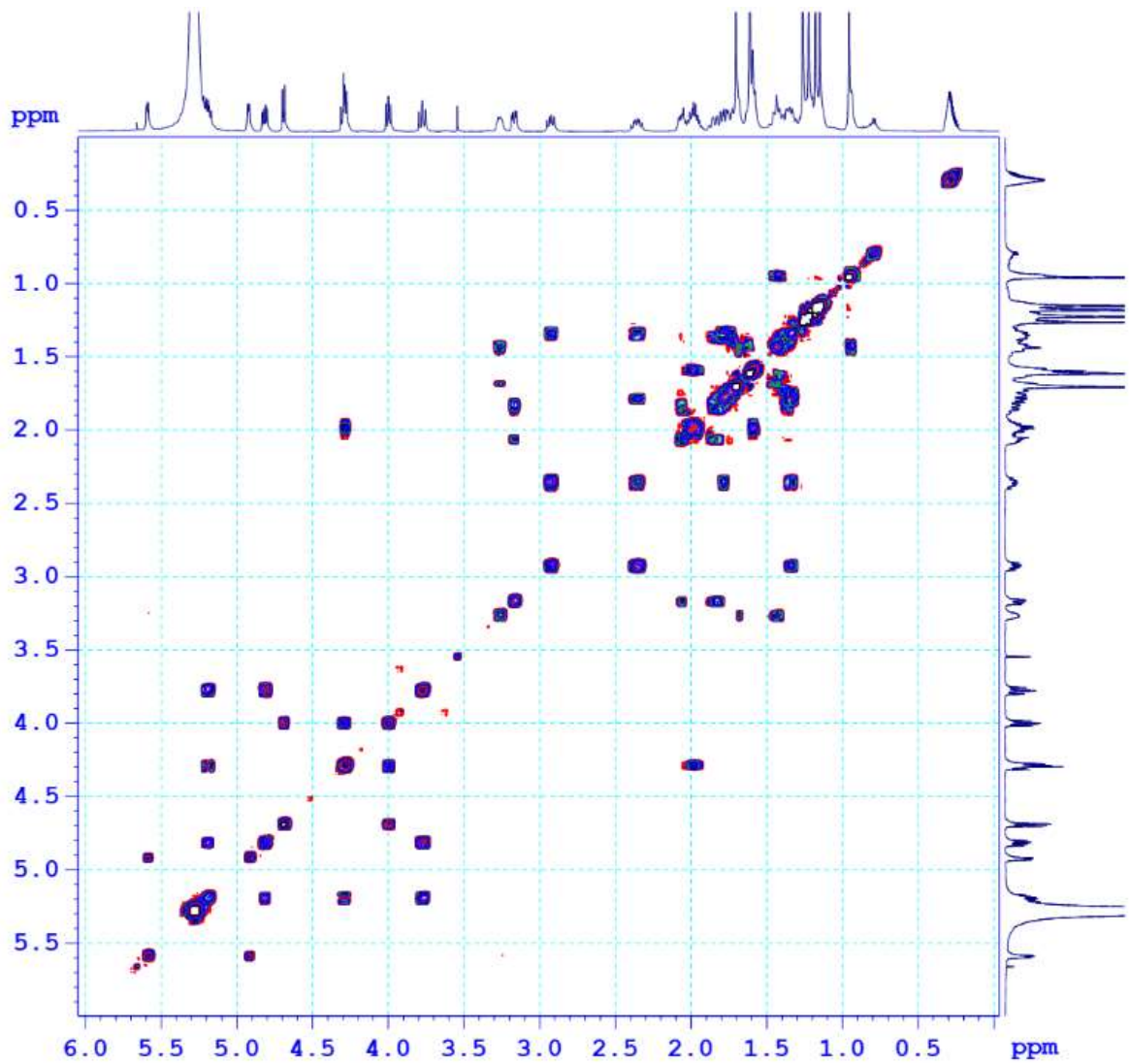




Hình S98. Phổ HSQC của HE8.



Hình S99. Phổ HMBC của HE8.



Hình S100. Phổ COSY của **HE8**.