

VÀ ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Văn Trường

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ KHÁNG VIÊM CỦA CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ LÁ CÂY KHOAI TRÒI (DIOSCOREA BULBIFERA L.)

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. NGUYỄN THI THANH NGÂN

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan kết quả nghiên cứu trong luận văn: "Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.)" là công trình nghiên cứu của tôi cùng nhóm nghiên cứu dưới sự góp ý của người hướng dẫn và dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, tất cả kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, các kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực. Nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm về luận văn của bản thân.

Hà Nội, ngày 22 tháng 5 năm 2023

Người cam đoan

Vũ Văn Trường

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến giáo viên hướng dẫn TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân đang công tác tại Viện Nghiên cứu hệ gen. Nhờ có sự chỉ dẫn tận tình và định hướng tốt trong suốt quá trình làm việc tôi đã hoàn thành được luận văn này. Trong thời gian học tập và thực hiện luận văn tại Viện Nghiên cứu hệ gen, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến tập thể cán bộ Phòng Hệ gen học chức năng đã luôn đồng hành và giúp đỡ để tôi hoàn thành tốt nhiệm vụ nghiên cứu được giao.

Tôi xin cảm ơn Ban lãnh đạo cùng toàn thể thầy cô, các anh chị thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình học tập và nghiên cứu đề tài.

Đồng thời gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo cùng các thầy cô giáo Khoa Công nghệ sinh học và các phòng ban liên quan thuộc Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt kiến thức và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ về mặt kinh phí từ đề tài: "Nghiên cứu tính đa dạng di truyền và tìm kiếm các hợp chất thứ cấp có khả năng kháng viêm và kháng ung thư từ các loài cây lương thực thuộc chi Củ nâu (*Dioscorea*) ở Việt Nam". Mã số đề tài: 106.02-2017.320 do Quỹ Phát triển Khoa học & Công nghệ Quốc gia (Nafosted) tài trợ.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, người thân, bạn bè, đơn vị công tác và đồng nghiệp là những người đã luôn động viên, tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận văn này./.

Học viên

Vũ Văn Trường

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU TỔNG QUAN VỀ CHI	
DIOSCOREA Ở VIỆT NAM	3
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CHI DIOSCOREA	3
1.2. CÂY KHOAI TRỜI (DIOSCOREA BULBIFERA L.)	6
1.2.1. Mô tả và phân bố	6
1.2.2. Công dụng và được liệu	6
1.3. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY	ζ
KHOAI TRÒI	7
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN	
CÚU	13
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	13
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.2.1. Phương pháp thu thập và định danh mẫu nghiên cứu	13
2.2.2. Các phương pháp nghiên cứu hoạt tính sinh học	15
2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất	17
2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất	18
2.2.5. Phương pháp phân tích thống kê	19
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	20
3.1. KẾT QUẢ THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH MÃU NGHIÊN CỨU	20
3.1.1. Thu thập mẫu nghiên cứu	20
3.1.2. Tách chiết, tinh sạch, kiểm tra nồng độ và bảo quản DNA	20
3.1.3. Định danh mẫu nghiên cứu	21
3.2. TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH , XÁC ĐỊNH CẦU TRÚC VÀ ĐỊN	H
TÊN CHẤT TRONG MẫU NGHIÊN CỨU	24
3.2.1. Tách chiết và tinh sạch các hợp chất từ mẫu nghiên cứu	24
3.2.2. Xác định sơ bộ cấu trúc hóa học và tên khoa học của 07 hợp chất	27
3.2.3. Đặc điểm hóa lý của 03 hợp chất mới	27
3.2.4. Cấu trúc hóa học của 03 chất mới	27

3.3. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 07 HỢP CHẤT TÁCH	
CHIẾT ĐƯỢC	54
3.3.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất	54
3.3.2. Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất	55
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	57
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO	59

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
МеОН	Methanol	
H ₂ O		Νước
CH ₂ Cl ₂		Dichloromethan
EtOAc		Ethyl acetat
DMSO		Dimethyl Sulfoxide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
MCF-7	Michigan Cancer Foundation- 7	Một dòng tế bào ung thư vú được phân lập vào năm 1970
Hep G2		Một dòng tế bào ung thư gan ở người
SK MEL – 2		Tế bào u ác tính ở người.
BV2		Tế bào ung thư cổ tử cung ở người
LPS	Lipopolysaccharide	
RP HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
NO		Khí Nitơ monoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid	
СТАВ	Cetyltrimethylammonium bromide	

PCR	Polymerase chain reaction	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
HEPES	N-(2- Hydroxyethyl)piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid)	
FBS	Fetal Bovine Serum	
TAE	Tris-acetate-EDTA	
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	
TBUT		Tế bào ung thư
EI – MS	Electron ionization mass spectrometry	
ESI - MS	Electrospray ionization mass spectrometry	
MS	Mass spectrometry	Phương pháp phổ khối lượng
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều về tương tác giữa C và H
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều giữa proton của các carbon kế cận nhau
НМВС	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều giữa proton của các carbon ở xa nhau

DANH MỤC BẢNG

Tên bảng	Số trang
Bảng 3.1: Nồng độ DNA tổng số của các mẫu	21
Bảng 3.2: Thành phần phản ứng PCR cho mồi lục lạp	22
Bảng 3.3: Danh sách tên chất phân lập từ mẫu nghiên cứu	27
Bảng 3.4: Dữ liệu NMR của hợp chất 1	36
Bảng 3.5: Dữ liệu NMR của các hợp chất 2	45
Bảng 3.6: Dữ liệu NMR của các hợp chất 3	53
Bảng 3.7: Kết quả gây độc tế bào ung thư của các hợp chất 1–7	55
Bảng 3.8: Kết quả ức chế sản sinh nitric oxit của các hợp chất 1-7	56

PHỤ LỤC HÌNH ẢNH

Danh mục hình ảnh	Số trang
Hình 1.1: Thân và lá cây Khoai trời (Dioscorea bulbifera L.)	6
<i>Hình 1.2</i> : Cấu trúc hóa học các chất 1-15 được phân lập từ <i>Dioscorea</i> .	8
<i>Hình 1.3</i> : Cấu trúc hóa học các chất 16-29 được phân lập từ <i>Dioscorea</i> .	9
Hình 1.4: Cấu trúc hóa học các chất 30-52 được phân lập từ Dioscorea.	10
<i>Hình 1.5</i> : Cấu trúc hóa học các chất 53-60 được phân lập từ <i>Dioscorea</i> .	11
<i>Hình 3.1</i> : Mẫu cành và lá cây Khoai trời (<i>Dioscorea bulbifera</i> L.).	20
<i>Hình 3.2</i> : Ảnh điện di DNA tổng số của mẫu tách chiết được.	21
<i>Hình 3.3</i> : Ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi lục lạp.	22
<i>Hình 3.4</i> : Sơ đồ minh họa cho tách chiết và phân lập 07 hợp chất từ mẫu nghiên cứu.	26
<i>Hình 3.5</i> : Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (\rightarrow) và COSY (—) chính của hợp chất 1	28
Hình 3.6: Phổ HRESITOF của hợp chất 1	29
<i>Hình 3.7</i> : Phổ ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 1	30
Hình 3.8: Phổ ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 125 MHz) của hợp chất 1	30
Hình 3.9: Phổ HSQC (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1	31
Hình 3.10: Phổ HMBC (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1	32
Hình 3.11: Phổ COSY (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1	32
Hình 3.12: Phổ NOESY (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 1	33
Hình 3.13: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 1	34
Hình 3.14: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 1	34
<i>Hình 3.15</i> : Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (\rightarrow) và COSY (-) chính của hợp chất 2	37
<i>Hình 3.16</i> : Phổ HRESITOF mass của hợp chất 2	37
Hình 3.17: Phổ ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 2	38
Hình 3.18: Phổ ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 125 MHz) của hợp chất 2	38
Hình 3.19: Phổ HSQC (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 2	39
Hình 3.20: Phổ HMBC (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 2	39
Hình 3.21: Phổ COSY (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 2	40

Hình 3.22: Phổ NOESY (DMSO-d ₆ , 500 MHz) của hợp chất 2	41
<i>Hình 3.23</i> : Phổ NOESY giãn vùng 1 của hợp chất 2	42
<i>Hình 3.24</i> : Phổ NOESY giãn vùng 2 của hợp chất 2	43
Hình 3.25: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 2	43
Hình 3.26: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 2	44
<i>Hình 3.27</i> : Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (\rightarrow) và COSY (—) chính của hợp chất 3	46
Hình 3.28: Phổ HRESITOF mass của hợp chất 3	46
Hình 3.29: Phổ ¹ H NMR (CD ₃ OD, 500 MHz) của hợp chất 3	47
Hình 3.30: Phổ ¹³ C NMR (CD ₃ OD, 125 MHz) của hợp chất 3	48
Hình 3.31: Phổ HSQC (CD ₃ OD, 500 MHz) của hợp chất 3	48
Hình 3.32: Phổ HMBC (CD ₃ OD, 500 MHz) của hợp chất 3	49
Hình 3.33: Phổ COSY (CD ₃ OD, 500 MHz) của hợp chất 3	50
Hình 3.34: Phổ NOESY (CD ₃ OD, 500 MHz) của hợp chất 3	51
Hình 3.35: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 3	51
Hình 3.36: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 3	52
Hình 3.37: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-7	54

MỞ ĐẦU

Việc nghiên cứu về tính đa dạng di truyền, đánh giá các tác dụng có ích đối với sức khỏe con người, và tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên mới có vai trò dẫn đường, có hoạt tính sinh học cao từ các loài cây thuốc ở nước ta ngày nay đã có những bước tiến vượt bậc và đạt được nhiều kết quả rất khả quan. Công nghê và trang thiết bị phục vụ cho nghiên cứu đã có nhiều cải tiến quan trong giúp cho viêc nghiên cứu về sinh học và hóa học được thực hiên chính xác và hiêu quả hơn, giúp rút ngắn khoảng cách về nghiên cứu khoa học mà các nước tiên tiến đang thực hiện. Để phục vụ các nghiên cứu về dược lý nhằm tìm ra các loài được liệu có giá trị và các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, có giá trị trong chăm sóc sức khỏe con người thì không thể thiếu các phương pháp thử hoạt tính sinh học. Hiện nay, ở nước ta đã có nhiều phương pháp thử hoạt tính sinh học có giá trị kháng enzyme, kháng khuẩn, chống oxi hóa, ức chế sản sinh NO, gây độc tế bào ung thư (khoảng 08 dòng tế bào), kháng tiểu đường ở các mô hình in vitro và in vivo đã được phát triển và đã có nhiều thành công. Tuy nhiên, việc phát triển các phép thử sinh học có khả năng nghiên cứu về cơ chế phân tử, qua đó giải thích cơ chế hoat đông của các hoạt chất là rất cần thiết, từ đó giúp các nghiên cứu trong nước có thể tiếp cân với thế giới.

Cây lương thực thuộc chi *Dioscorea* có thành phần chính là tinh bột và là một trong những cây lương thực ở một số nước vùng nhiệt đới khí hậu nóng ẩm. Một số loài là dạng dây leo mọc hoang nên bên cạnh yếu tố di truyền gần gũi với các cây lương thực mà chúng ta đang sử dụng, thì chúng còn có những ưu điểm của cây mọc dại như có thể sống dưới những môi trường tự nhiên khác nhau, khả năng chống chịu và thích nghi tốt. Dân số thế giới hiện nay đang ở con số hơn 8 tỉ người, và tới năm 2050, con số này sẽ tăng lên đến 9,6 tỷ theo tính toán. Do đó, việc bảo tồn các loài cây lương thực hoang dã là rất cấp thiết và sẽ trở thành một phần tất yếu trong việc giải quyết vấn đề về an ninh lương thực toàn cầu trong tương lai.

Cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.) là cây vị thuốc hoàng được tử (là vị thuốc nam quý), được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về công dụng và thành phần hóa học của củ cây Khoai

trời. Tuy nhiên việc nghiên cứu các loài thuộc chi *Dioscorea* ở Việt Nam còn rất ít được biết đến đặc biệt là lá Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.). Do đó, đề tài này được xây dựng để phân tích hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư từ các hợp chất thứ cấp của lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.) ở Việt Nam.

Mục tiêu của luận văn:

- Thu thập và định danh khoa học cho mẫu lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.) ở Việt Nam.

- Nghiên cứu tách chiết các hợp chất thứ cấp và đánh giá hoạt tính sinh học gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất phân lập được.

Nội dung luận văn bao gồm:

- Thu thập và định danh khoa học cho mẫu lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.) ở Việt Nam bằng các phương pháp sinh học phân tử.

 Phân lập các hợp chất từ cao chiết tổng của cành và lá cây bằng các phương pháp sắc ký kết hợp.

 Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được bằng các phương pháp vật lý, hóa học.

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

- Đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro của các hợp chất phân lập được.

Các kết quả của đề tài sẽ góp phần giải thích cơ chế khoa học căn bản tác dụng tăng cường sức khỏe, chữa bệnh của các loài cây lương thực thuộc chi *Dioscorea* và tìm ra các hợp chất mới có hoạt tính sinh học cao, từ đó đánh giá khả năng khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học phục vụ cho sự phát triển canh tác sản xuất nông nghiệp, chăm sóc sức khỏe con người.

CHƯỜNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU TỔNG QUAN VỀ CHI *DIOSCOREA* Ở VIỆT NAM 1.1. GIỚI THIÊU CHUNG VỀ CHI *DIOSCOREA*

Chi Củ nâu (Dioscorea) là một chi thực vật lớn thuộc họ Củ nâu (Dioscoreaceae), bao gồm 600 loài thực vật có hoa, phân bố rộng rã ở những vùng nhiệt đới và ôn đới thuộc châu Á, châu Phi, và châu Mỹ [1]. Chi Củ nâu gồm các cây có dạng dây leo, thân thảo, có thể vươn tới chiều cao 5m ở trên các cây lớn và cây bui, các dây leo quấn từ trái sang phải. Thân cây có dang rễ hoặc củ và có nhiều màu sắc [2]. Thân cây được phân nhánh hoặc không, nhẵn hoặc đôi khi mang gai. Lá mọc xen kẽ hoặc đối diện, có hình trái tim với đầu dài và nhọn. Lề, cuống lá và thân có màu tía hoặc đỏ. Hoa nhỏ, màu trắng hoặc vàng xanh, và có thể có mùi hương quế. Hoa đơn tính (cây đơn tính khác gốc), phát triển từ nách lá thành cụm hoặc hình chùy. Quả dạng viên nang ba góc và có chứa các hạt có cánh. Nhiều loài thuộc chi Củ nâu hoang dã được xem như là một nguồn cung cấp quan trọng của các chất chuyển hóa thứ cấp được sử dụng trong ngành công nghiệp được phẩm và y học. Một số loài hoang dã của chi Dioscorea là nguồn cung dồi dào của các hợp chất được sử dụng trong tổng hợp hormone giới tính và corticosteroid và các loài được canh tác là nguồn thực phẩm được sử dụng rộng rãi ở một số nước [3,4].

Cho đến nay đã có một số tác giả Việt Nam và nước ngoài nghiên cứu về phân loại thực vật học chi *Dioscorea* ở Việt Nam. Trong bộ "Thực vật chí Nam bộ", Loureiro đã mô tả 6 loài thuộc chi *Dioscorea* L.[5]. Prain và Burkill đã mô tả 51 loài thuộc chi *Dioscorea* L. ở Đông Dương, trong đó có 27 loài phân bố ở Việt Nam [6]. Năm 1972, Phạm Hoàng Hộ trong cuốn "Hải nam thực Vật chí" đã giới thiệu 26 loài ở Việt Nam, trong đó tác giả đã tóm tất sự phân bố và bổ sung thêm hình vẽ các loài *Dioscorea* mà Prain và Burkill đã công bố trước đó. Từ năm 1977, Lê Đình Bích đã thống kê và lập danh mục gồm 36 loài thuộc chi *Dioscorea*, tác giả đã mô tả 8 loài trong đó có 2 loài mới đối với hệ thực vật Việt nam. Kết hợp điều tra nghiên cứu thực địa với việc tra cứu các tài liệu, Lê Đình Bích và cộng sự đã đưa ra bảng gồm 41 loài thuộc chi Củ nâu và nêu sự phân bố của các loài này ở Việt Nam và các nước lân cận [7]. Đặc biệt là năm 2012, Ds. Lê Đình Bích và nhóm các nhà khoa học vinh dự được nhà nước trao tặng Giải thưởng Hồ Chí Minh về khoa học

và công nghệ - giải thưởng cao quý cho người làm khoa học. Công trình gồm nhiều cây thuốc quý hiếm trong đó có cây thuốc Nần Nghệ (Dioscorea collettii) và một số cây thuộc chi Dioscorea. Theo nghiên cứu được cập nhật gần đây nhất của tác giả Võ Văn Chi, chi Củ nâu tại Việt Nam bao gồm 20 loài là: khoai vac (D. alata), khoai dái (D. bulbifera), từ chinh (D. chingii), củ nâu (D. cirrhosa), từ Collettii (D. collettii), củ nêm (D. deltoidea), nần gừng (D. dissimulans), củ từ (D. esculenta), khoai rạng (D. glabra), từ Hemsley (D. hemsleyi), củ nấn (D. hispida), từ Nhật Bản (D. japonica), từ khăm muộn (D. kamoonensis), từ mỏng (D. membranacea), củ trâu (D. pentaphylla), củ mài (D. persimilis), từ nước (D. pierrei), từ Poilane (D. poilanei), củ mài gừng (D. zingiberensis), và từ điểm tuyến (D. subcalva). Trong những loài củ nâu này, các loài củ như D. alata, D. cirrhosa, D. glabra, D. esculenta, D. japonica, D. persimilis, D. zingiberensis, D. pierrei từ lâu đã được nhân dân ta sử dụng rộng rãi làm thực phẩm và thức ăn dinh dưỡng. Một số loài củ từ như từ D. bulbifera, D. hispida, và D. pentaphylla, được biết đến là có chất độc khi chúng ở trong trạng thái tươi, tuy nhiên những củ này có thể được sử dụng làm thực phẩm sau khi loại bỏ chất độc bằng cách nấu chín thật kỹ [8]. Trong y học cổ truyền, các loài *Dioscorea* cũng được sử dung rông rãi với các mục đích sử dụng chính của mỗi loài khác nhau.

Một số cây thuộc chi *Dioscorea* trên thế giới đã có các công bố về thành phần hoá học, tuy nhiên ở Việt Nam mới chỉ có một số nghiên cứu sơ bộ với kết quả chủ yếu trong thân rễ của các loài này là tinh bột. Nhiều loài được xếp vào danh sách nguyên liệu để thu tinh bột như khoai mỡ (*D. alata*). Tinh bột trong thân rễ của một số loài *Dioscorea* không chỉ sử dụng làm lương thực, thực phẩm mà còn làm tá dược trong sản xuất thuốc. Năm 1986, Nguyễn Hoàng và Lê Đình Bích đã nghiên cứu chiết xuất steroid saponin của một số loài *Dioscorea* [9]. Kết quả cho thấy hàm lượng diosgenin trong thân rễ và rễ củ (tính theo trọng lượng khô) của chúng rất khác nhau [7]. Nguyễn Hoàng và cộng sự đã nghiên cứu diosgenin trong nần gừng và đã xác định hàm lượng 1% diosgenin trong thân rễ. Nguyễn Xuân Cường và cộng sự đã xác định hàm lượng trị nấm ngoài da. Các nghiên cứu sơ bộ này cho thấy steroid saponin có trong nhiều loài thuộc chi *Dioscorea* ở nước ta. Một số loài có

hàm lượng diosgenin lớn có thể nghiên cứu trồng để chiết xuất diosgenin, phục vụ cho công nghiệp dược [10,11].

Ở nhiều nơi trên thế giới, một số củ Dioscorea được coi là một trong những thực phẩm chính của địa phương. Củ *Dioscorea* cung cấp việc làm cho hàng ngàn nông dân và tạo việc làm và sinh kế cho hàng ngàn hộ gia đình ở nông thôn. Ngoài ra, củ Dioscorea đã phát triển trở thành một loại cây trồng xuất khẩu đáng kể với tiềm năng thu nhập chưa được khai thác. Với những thành công trên trường quốc tế và tiềm năng toàn cầu, củ Dioscorea có thể trở thành những cây lương thực thâm chí còn quan trong hơn trong an ninh lượng thực quốc gia. Ngoài các tác dung to lớn về thực phẩm và kinh thế, củ của Dioscorea cũng được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền dân tộc để điều trị nhiều loại bệnh khác nhau như bệnh lao, u xơ dạ dày và ruột, chảy máu, mụn nhọt, chó dại cắn, các bệnh về phổi, thận, tỳ, và bệnh ung thư ... Các nghiên cứu cập nhật hiện nay đã chứng minh rằng củ Dioscorea có nhiều tác dụng dược lý nổi bật, như kháng viêm, kháng tiểu đường, bảo vệ thần kinh, và kháng ung thư. Củ *Dioscorea* cũng được xem như nguồn cung cấp quan trọng các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các steroidal saponin với các hoạt tính sinh học nổi bật như kháng viêm, kháng tiểu đường, và kháng ung thư,... Với các lợi ích tuyệt vời của các loại củ Dioscorea trong kinh tế, an ninh lương thực, và chăm sóc sức khỏe, việc nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen các loài cây lương thực *Dioscorea* có ý nghĩa quan trong trong viêc bảo tồn tính đa dang sinh học và sử dụng có hiệu quả các nguồn gen phục vụ cho công tác chọn tạo giống tại các địa phương. Hơn nữa, việc nghiên cứu một cách có hệ thống về thành phần hóa học và tác dụng được lý các loài thuộc chi Dioscorea ở Việt Nam, qua đó giúp giải thích tác dụng chữa bệnh và chăm sóc sức khỏe, và tìm ra các hợp chất dẫn đường có hoạt tính sinh học nổi bật là thời sự, có ý nghĩa quan trọng, và cần thiết. Các kết quả của đề tài sẽ góp phần giải thích cơ chế căn bản tác dụng chữa bệnh của các loài Dioscorea, phân lập các hợp chất mới và có hoạt tính sinh học, đánh giá khả năng khai thác các chất có hoạt tính sinh học từ các loài cây lương thực có giá trị, qua đó phục vụ cho sự phát triển canh tác và sản xuất nông nghiệp, và cho sự chăm sóc sức khỏe cho con người của các loài Dioscorea ở Viêt Nam.

1.2. CÂY KHOAI TRỜI (DIOSCOREA BULBIFERA L.)

1.2.1. Mô tả và phân bố

Theo Từ điển cây thuốc Việt Nam thì Khoai trời là cây leo sống lâu năm, có một thân rễ dạng củ to, với thịt củ màu vàng hay màu kem (*Hình 1.1*). Thân nhẵn, tròn hay hơi có cánh, trơn bóng, màu tím. Lá đơn, to tới 34 x 32cm, mọc so le, nhẵn, hình tim, có mũi nhọn. Ở nách lá có những củ con, hình trứng hay hình cầu có kích thước thay đổi, có khi rất to, đường kính tới 10cm. Hoa mọc thành bông thõng xuống, bao hoa 6, nhị 6, chỉ nhị đứng. Hoa cái hình thái giống hoa đực và quả nang, mọc thõng xuống, có cánh. Cây ra hoa vào tháng 7-10, có quả tháng 8-11 [8].

Ở Trung Quốc cây Khoai trời thường gặp ở các tỉnh phía nam Hà Nam, miền nam An Huy, miền nam Giang Tô, Giang Tây, Chiết Giang, Phúc Kiến, Đài Loan, Hồ Bắc, Hồ Nam, Quảng Đông, Quảng Tây, phía nam Thiểm Tây, miền nam Cam Túc, Tứ Xuyên, Quý Châu, Vân Nam, Tây Tạng. Ngoài ra còn có ở các nước như Nhật Bản, Bắc Triều Tiên, Ấn Độ, Myanmar, Châu Đại Dương và Châu Phi và ở Việt Nam [8].



Hình 1.1: Thân và lá cây Khoai trời (Dioscorea bulbifera L.)

1.2.2. Công dụng và dược liệu

Người ta thường lấy củ Khoai trời luộc kỹ ăn. Bột củ Khoai trời cũng tương tự như bột ngũ cốc và bột gạo dùng làm thuốc. Khoai trời theo y học

dân gian thường dùng trị bướu giáp (sưng tuyến giáp trạng), viêm hạch bạch huyết do lao, loét dạ dày và đường ruột, nôn ra máu, ho ra máu, chảy máu cam, chảy máu tử cung. Củ Khoai trời có thể dùng chữa ho gà và dán hai bên thái dương chữa đau đầu, giải được chất độc của thuốc. Dùng ngoài trị đinh nhọt, rắn cắn, chó dại cắn. Ở Campuchia, người ta dùng củ Khoai trời trị rối loạn tuần hoàn. Ở Ấn Độ, những cây mọc hoang dùng đắp các vết loét. Ở Trung Quốc, theo Tân biên Trung y học, củ dùng trị loét thực quản, loét dạ dày, sưng tuyến giáp, nôn ra máu, khạc ra máu, chảy máu cam, chảy máu dạ con, nhọt độc, rắn cắn, chó dại cắn. Củ Khoai trời còn trị viêm phế quản cấp và mạn và hen suyễn [8].

Được mệnh danh là vị thuốc Hoàng dược tử, củ khoai trời thường được thu hoạch vào cuối mùa hè đến đầu mùa đông (từ tháng 9 - tháng 11). Hoàng dược tử trong y học cổ truyền có tác dụng tiêu viêm, tiêu sưng, long đờm, cầm máu. Được dùng trị bướu giáp, ung thư dạ dày thực quản, giang mai lở loét....

1.3. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY KHOAI TRỜI

Theo các nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới, các loài *Dioscorea* phân bố ở Việt Nam có thành phần hóa học đa dạng và thể hiện nhiều hoạt tính sinh học, như *D. bulbifera*, *D. alata*, *D. cirrhosa*, *D. collettii*, *D. deltoidea*, *D. dissimulans*, *D. hispida*, *D. japonica*, *D. membranacea*, and *D. zingiberensis*. *D. bulbifera* đã và đang rất được quan tâm nghiên cứu do thành phần hóa học rất đa dạng, với các nhóm chất chính là clerodane diterpenes (furanoid norditerpenes) và steroidal saponins. Năm 1993, Yonemitsu và cộng sự thông báo phân lập được một clerodane diterpene diosbulbin-B(1) từ là và thân của *D. bulbifera* [12]. Vào năm 1978, một số norditerpenes furanoid, được đặt tên là diosbulbin-D(2), -E(3), -F(4), -G(5), và -H(6) đã được phân lập từ *D. bulbifera* bởi Ida và cộng sự [13]. Năm 1984, Murray và cộng sự thông báo phân lập được hai norclerodane diterpenoids, diosbulbin D và 8-epidiosbulbin E acetate(7) từ củ *D. bulbifera* [14].



Hình 1.2: Cấu trúc hóa học các chất 1-15 được phân lập từ Dioscorea.

Một số nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc của các furanoid norditerpenes từ *D. bulbifera* cũng được thông báo, bao gồm: diosbulbin K, L(9), M(10), và một dẫn xuất enolglycoside mới, diosbulbinoside G(11) từ thân rễ *D. bulbifera* [15], 2 norditerpene glucoside mới: diosbublinosides D(12) và F(13) từ củ tươi *D. bulbifera* [16], 2 clerodane diterpenoid mới kháng khuẩn *Salmonella*: bafoudiosbulbins A(14) và B(15) [17] (*Hình 1.2*), 3 clerodane diterpenoid mới: bafoudiosbulbin C(16), bafoudiosbulbin(17), và bafoudiosbulbin E(18) [18], 2 furanoid norditerpene mới: diosbulbin I(19) and J(20) từ củ *D. bulbifera* [19], 9 norclerodane diterpenoid, trong đó có 2 hợp chất mới là diosbulbin N(23) và P(25), một hợp chất thiên nhiên mới: diosbulbin O(24), và 6 hợp chất đã biết: diosbulbin A, B, C, D, F và G [20], 6 hợp chất phân lập từ củ *D. bulbifera*: bafoudiosbulbin A(26), B(27), C(16), F



(28), và G(29) (*Hình 1.3*) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn Mycobacteria và Gram âm kháng thuốc (MDR) [21].

Hình 1.3: Cấu trúc hóa học các chất 16-29 được phân lập từ Dioscorea.

Thân rễ *D. bulbifera* được thông báo là nguồn cung quan trọng của các steroidal saponins. Bốn hợp chất steroidal sapogenins mới: diosbulbisin A-D (**30-33**), hai spirostane glycoside mới: diosbulbiside A(**34**) và B(**35**), một cholestane glycoside mới: diosbulbiside C(**36**), và các hợp chất đã biết như pennogenin(**37**), pennogenin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside(**38**), pennogenin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside(**38**), pennogenin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside(**38**), pennogenin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside(**39**) được phân lập từ thân rễ *D. bulbifera* [22]. Năm 2011, Liu và cộng sự thông báo phân lập được hai hợp chất steroidal saponin mới là diosbulbiside D(**40**) và E(**41**), cùng với năm saponin đã biết từ thân rễ của

D. bulbifera, trong đó hai dẫn xuất 3-O-trisaccharide của diosgenin spirostanes thể hiện hoạt tính độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan SMMC7721 và Bel-7402 [23]. Năm 2013, Tapondjou và cộng sự thông báo phân lập 11 steroidal saponin: *Dioscorea*nosides A-K (**42-52**) (*Hình 1.4*) cùng với năm dẫn xuất đã biết từ hoa của *D. bulbifera* [24].



Hình 1.4: Cấu trúc hóa học các chất 30-52 được phân lập từ Dioscorea.

Ngoài ra, một số hợp chất thuộc lớp chất khác cũng đã được phân lập từ *D. bulbifera* bao gồm: các dẫn xuất *p*-hydroxy acetophenone: 4-hydroxy-[2-trans-3',7'-dimethyl-octa-2',6'-dienyl]-6-methoxyacetophenone (**53**) và 4,6dihydroxy-2-O-(4'-droxybutyl)acetophenone(**54**) [25], và các hợp chất phenolic như: một bibenzyl mới (**55**), và một diarylheptanone mới là diobulbinone A(**56**) [26]. Chaniad và cộng sự (2016) thông báo phân lập được bảy hợp chất từ dịch chiết ethyl acetate và nước của *D.bulbifera*, trong đó myricetin (**58**) thể hiện hoạt tính kháng HIV-1 integrase rất hiệu quả, với giá trị IC₅₀ là 3.15 μ M, tiếp theo là hợp chất 2,4,6,7-tetrahydroxy-9,10dihydrophenanthrene(**57**, IC₅₀=14.20 μ M), quercetin-3-*O*- β -Dglucopyranoside(**59**, IC₅₀=19.39 μ M), và quercetin-3-O- β -Dgalactopyranoside (**60**, IC₅₀=21.80 μ M) [27] (*Hình* 1.5).



Hình 1.5: Cấu trúc hóa học các chất 53-60 được phân lập từ Dioscorea.

Theo nghiên cứu của Nguelefack và cộng sự (2010), dịch chiết methanol của củ *D.bulbifera* thể hiện hoạt tính giảm đau đáng kể ở chuột gây đau bởi Complete Freund's adjuvant (CFA) và gây đau thần kinh bởi PLSN. Các tác giả chỉ ra rằng hoạt tính giảm đau của *D.bulbifera* ở cả hai mô hình gây đau do viêm và gây đau thần kinh có thể là kết quả từ khả năng kích hoạt kênh NO-cGMP-ATP-sensitive potassium [28]. Theo Mbinatcha và cộng sự (2011), dịch chiết nước và methanol của củ *D.bulbifera* khô thể hiện khả năng ức chế đau và viêm theo nồng độ ở mô hình gây đau cực đại bằng acetic acid, formalin và áp suất. Hơn nữa, điều trị theo đường uống dịch chiết nước và methanol cho kết quả kháng viêm ở mô hình chân chuột gây phù nề bởi histamine, serotonin và formalin. Kết quả này cho thấy hoạt tính giảm đau có thể liên quan đến khả năng kháng viêm của củ *D.bulbifera* [29]. *D.bulbifera* cũng được biết đến là có khả năng kháng đái tháo đường thông qua ức chế enzyme amylase và glucosidase [30], kháng khối u [31], và kháng khuẩn [21]. Kết hợp các polysaccharide và cyclophosphamide từ *D.bulbifera* tăng hiệu quả kháng ung thư cổ tử cung và giảm quá trình ức chế miễn dịch và stress oxy hóa ở mô hình chuột [32].

Có thể nhận thấy các loại củ *Dioscorea* là những cây lương thực quan trọng trong nước, có giá trị kinh tế và văn hoá. Ở nhiều nơi trên thế giới, một số củ *Dioscorea* được coi là một trong những thực phẩm chính của địa phương. Củ *Dioscorea* cung cấp việc làm cho hàng ngàn nông dân và tạo việc làm và sinh kế cho hàng ngàn hộ gia đình ở nông thôn. Với các lợi ích tuyệt vời của các loại củ *Dioscorea* trong kinh tế, an ninh lương thực, và chăm sóc sức khỏe, việc nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen các loài cây lương thực *Dioscorea* có ý nghĩa quan trọng trong việc bảo tồn tính đa dạng sinh học và sử dụng có hiệu quả các nguồn gen phục vụ cho công tác chọn tạo giống tại các địa phương. Hơn nữa, việc nghiên cứu một cách có hệ thống về thành phần hóa học và tác dụng dược lý các loài thuộc chi *Dioscorea* ở Việt Nam, qua đó giúp giải thích tác dụng chữa bệnh và chăm sóc sức khỏe, và tìm ra các hợp chất dẫn đường có hoạt tính sinh học nổi bật là thời sự, có ý nghĩa quan trọng, và cần thiết.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

 Mẫu lá cây Khoai trời được thu thập ở Trạm đa dạng sinh học Vĩnh Phúc thời gian từ tháng 11/2018 cùng chuyên gia phân loại là Tiến sĩ Nguyễn Thế Cường – Bảo Tàng Thiên Nhiên Việt Nam.

- Hóa chất dùng cho tách chiết DNA từ thực vật.

 Hóa chất dùng trong phản ứng PCR như: Taq polymerase, dNTP, mồi lục lạp (mồi lục lạp sử dụng trong nghiên cứu này có trình tự là mồi RbcL) có trình tự như sau:

P2F-ATGTCACCACAAACAGAAAC và

P2R-TCGCATGTACCTGCAGTAGC của hãng IDT – Mỹ, kít tinh sạch sản phẩm PCR của hãng Thermofisher (GeneJET PCR Purification Kit, ký hiệu K0702).

- Các dung mỗi hữu cơ dùng cho nghiên cứu thành phần hóa học thông dụng như methanol, *n*-hexan, dicloroform, etyl axetat, bản sắc ký lớp mỏng TLC, sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC), sắc kí cột (CC), và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC),...

- Các hóa chất dùng trong đánh giá hoạt tính sinh học: các dòng tế bào ung thư KB (ung thư biểu mô miệng), MCF-7 (ung thư vú), HepG2 (ung thư gan), SK-Mel2 (ung thư da), HL-60 (ung thư bạch cầu) và hóa chất dùng trong nuôi cấy và thử nghiệm hoạt tính tế bào. Các hóa chất dùng trong thử nghiệm hoạt tính kháng viêm in vitro thông qua ức chế sản sinh NO như dòng tế bào BV2.

- Các trang thiết bị máy móc dùng trong nghiên cứu tại Viện Nghiên cứu hệ gen- Viện Hàn lâm KHCNVN.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập và định danh mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu được thu thập dưới dạng mẫu tươi và mẫu khô, đánh dấu, và lưu trữ ở -80°C để đảm bảo cho các nghiên cứu tiếp theo. Tách chiết

DNA theo phương pháp CTAB có cải tiến với độ tinh sạch $A_{260/280} > 1.8$ để tiến hành các thí nghiệm định danh. Thực hiện phản ứng PCR, tinh sạch và giải trình tự sản phẩm PCR dựa vào trình tự mồi lục lạp theo phương pháp Sanger trên máy đọc trình tự gen tự động ABI. Định danh khoa học cho mẫu nghiên cứu.

Sử dụng CTAB là chất tẩy rửa có tính khử mạnh làm hóa chất chính để tách chiết DNA, bổ sung PVP 10% (Polyvinylpyrrolidone) để thay thế cho β-Mercapto (trong phương pháp của Xavier 2000), nhằm loại bỏ các hợp chất phenolic, ngoài ra thay đổi một số điều kiện về ngâm ủ và kết tủa mẫu. Các bước tiến hành như sau:

Nghiền mẫu trong nitơ lỏng thành dạng bột mịn, sau đó chuyển
100mg bột mẫu vào ống ly tâm thể tích 2ml.

2- Ngâm mẫu trong 800µL đệm PBS 1X (NaCl 0,1M, KCl 0,1M, Na2HPO4 0,1 M, K2PO4 0,1M), pH 7,4 trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (Lắc đều sau mỗi 10 phút). Ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi. (Ngâm mẫu trong đệm PBS giúp làm sạch mẫu và cân bằng pH)

3- Bổ sung 600μL đệm chiết (NaCl 1,5M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, CTAB 4%, PVP 10%), đảo đều cho tới khi mẫu thành dung dịch đồng nhất, ủ mẫu ở 65°C trong 80 phút, đảo đều mẫu sau mỗi 15 phút. Bổ sung 4μL RNase (100mg/ml), ủ tiếp ở 65°C thêm 10 phút nữa. (Đệm chiết có chứa CTAB là hóa chất chính giúp phá vỡ màng tế bào, màng nhân, giải phóng acid-nucleic, bổ sung enzyme RNase ở 10 phút cuối giúp loại bỏ ARN).

4- Để nguội 5 phút ở nhiệt độ phòng.

5- Bổ sung 600µL Chloroform: Isoamylalcohol (24:1, v/v), đảo đều.

6- Ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, hút dịch nổi cho sang ống eppendoft mới, loại bỏ phần cặn.

7- Bổ sung 600μL Chloroform:iso-amyl alcohol (24:1, v/v), đảo đều, để mẫu ở -20°C trong 10 phút.

8- Lấy mẫu ra, ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, hút phần dịch nổi cho sang ống ly tâm mới.

9- Bổ sung Isopropanol lạnh vào mẫu theo tỷ lệ (Vmẫu:Visopropanol = 1:1) đảo nhẹ, để ở tủ -20°C trong ít nhất 1 giờ (có thể để qua đêm).

10- Ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi, thu tủa.

11- Bổ sung 500µL cồn 70%, ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút, thu tủa.

12- Làm khô cặn DNA trong máy speed-vac.

13- Hoà tan cặn DNA bằng 100µL nước khử trùng.

14- Kiểm tra DNA thu được bằng điện di trên gel Agarose 1%.

15- Bảo quản mẫu ở -20°C.

2.2.2. Các phương pháp nghiên cứu hoạt tính sinh học

2.2.2.1. Phương pháp gây độc dòng tế bào ung thư người

a. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

- Các dòng tế bào ung thư MCF7 (Ung thư vú ở người (human breast carcinoma)); HepG2 (Ung thư tế bào gan ở người (human hepatocellular carcinoma)); SK-Mel-2 (Ung thư tế bào da ở người (human melanoma)), được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, và 1mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% Fetal Bovine Serum – FBS (Gibco, Sigma...).

 Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

b. Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện in vitro. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991) [33]. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Mẫu thử (10 μ L) pha trong DMSO được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ sàng lọc là 200 μ g/mL.

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

Thêm vào các giếng thí nghiệm lượng tế bào phù hợp (trong 190 μL môi trường) và để chúng phát triển trong vòng từ 3-5 ngày.

Một khay 96 giếng khác không có chất thử nhưng có TBUT (180 μ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng ngày 0 sẽ được cố định tế bào bằng Trichloracetic acid – TCA.

Sau giai đoạn phát triển trong tủ ấm CO₂, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 30 phút, được nhuộm bằng SRB trong 1 giờ ở 37°C. Đổ bỏ SRB và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng 5% acetic acid rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng.

Cuối cùng, sử dụng 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, đưa lên máy lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút và sử dụng máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) để đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm SRB qua phổ hấp thụ ở bước sóng 515nm. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

[OD(chất thử) - OD(ngày 0)] x 100

% sống sót =

OD(đối chứng âm) - OD(ngày 0)

% ức chế = 100% - % sống sót

Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine (Sigma) được sử dụng như là chất đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 10 µg/mL; 2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,08 µg/mL.

DMSO 1.0 % luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve.

2.2.2.2. Phương pháp kháng viêm: theo mô hình in vitro ức chế sự sản sinh nitric oxide (NO) ở tế bào BV2 kích thích bởi LPS.

Để đánh giá tác dụng ức chế của các phân đoạn dịch chiết đối với sự sản sinh NO ở tế bào BV2 kích thích bởi LPS [34], các tế bào được cấy trên đĩa nuôi cấy 24 giếng với mật độ $5x10^5$ tế bào/mL. Sau 3h, các tế bào được xử lý với các mẫu thử ở nồng độ 200μ g/mL trong 24h trong điều kiện có hoặc không có LPS với nồng độ 1μ g/mL. Nồng độ nitrite trong môi trường nổi được xác định bởi phản ứng Griess và giá trị hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 525nm trên máy ELISA [35].

2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất

2.2.3.1. Sắc ký lớp mỏng (TLC):

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F_{254} (Merck 1.05715), $RP_{18} F_{2545}$ (Merck). Phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 368nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều trên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng trên bếp điện từ từ tới khi xuất hiện màu.

2.2.3.2. Sắc ký lớp mỏng điều chế:

Sắc ký lớp mỏng điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60G F_{254} (Merck, ký hiệu 105875), phát hiện vệt chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254nm và 368nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10%, hơ nóng để phát hiện vệt chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ thu được chất cần tinh chế.

2.2.3.3. Sắc ký cột (CC):

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silicagel pha thường và pha đảo. Silicagel pha thường có kích thước hạt là 0,040-0,063mm (240-430 mesh). Silicagel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50µm, Fujisilisa Chemical Ltd.).

2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

Cấu trúc hóa học các hợp chất hữu cơ được xác định nhờ vào phương pháp phổ kết hợp. Tùy thuộc vào cấu trúc hóa học của từng chất mà người ta sử dụng phương pháp phổ càng cao. Trong một số trường hợp, để xác định chính xác cấu trúc hóa học của các hợp chất, người ta phải dựa vào các phương pháp bổ sung khác như chuyển hóa học, các phương pháp sắc ký so sánh, ...

2.2.4.1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D):

+ Phổ ¹³C-NMR cung cấp thông tin về môi trường hóa học của carbon. Carbon lai hóa sp3 không liên kết với dị tố chuyển dịch trong khoảng 0 – 60 ppm. Carbon liên kết đôi với oxy có thể chuyển dịch tới 240ppm. Với kỹ thuật đo phổ hiện tại, phổ NMR của carbon là những vạch đơn, mỗi vạch ứng với 1 carbon (hơn 1 carbon nếu chúng có chung môi trường hóa học) của phân tử.

+ Phổ ¹H-NMR cho biết môi trường hóa học của proton trong phân tử. Các proton có môi trường hóa học khác nhau sẽ chuyển dịch hóa học khác nhau. Diện tích của mỗi đỉnh tỉ lệ với số lượng proton của đỉnh. Dựa vào diện tích có thể biết số proton của đỉnh đó. Một thông số quan trọng khác của phổ proton là hằng số tương tác (J) tính bằng Hz, cho biết tương tác của proton với các proton kế cận.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (2D):

+ Phổ HMBC thể hiện mối liên quan của tín hiệu proton ¹H ở một nguyên tử ¹³C với tín hiệu của nguyên tử ¹³C khác (bậc 2 hoặc 3) ở cách xa nó 2, 3 liên kết. Đó chính là tương tác xa của C-H trong phân tử. Nhờ các tương tác trên phổ này mà từng phần của phân tử, cũng như toàn bộ phân tử được xác định về cấu trúc.

+ Phổ HSQC thể hiện mối liên quan giữa tín hiệu proton ¹H và carbon ¹³C- NMR. Các tương tác trực tiếp C-H được xác định nhờ vào các tương tác trên phổ này. Trên phổ, một trục là phổ ¹H-NMR, còn trục kia là ¹³C-NMR. Các tương tác HSQC nằm trên đỉnh các ô vuông trên phổ. + Phổ COSY thể hiện sự tương tác của các proton ở hai nguyên tử carbon cạnh nhau. Khi có hai nhóm proton tương tác với nhau sẽ tạo ra hình vuông, hai đỉnh hình vuông nằm trên đường chéo, đó là vị trí hai tín hiệu của chúng còn hai đỉnh khác nằm phía ngoài đường chéo.

2.2.4.2. Phổ khối lượng (MS)

Dựa vào sự phân mảnh ion của các phân tử dưới sự bắn phá của chùm ion bên ngoài. Người ta có thể xác định được cơ chế phân mảnh và dựng lại được cấu trúc hóa học của các hợp chất vì phổ MS còn có các pic ion mảnh khác.

- Phổ ESI- MS (Electrob Sprayt Ionization Mass Spectroscopy) được thực hiện với năng lượng bắn phá thấp hơn nhiều so với phổ EI-MS, do đó phổ thu được chủ yếu là pic ion phân tử và các pic đặc trưng cho sự phá vỡ các liên kết có mức năng lượng thấp, dễ bị phá vỡ.

- Phổ khối lượng phân giải cao (High Resolution Mass Spectroscopy) cho phép xác định pic ion phân tử hoặc ion mảnh với độ chính xác khá cao.

2.2.5. Phương pháp phân tích thống kê

Các số liệu thể hiện bởi kết quả (Mean) \pm độ lệch chuẩn (SD) của ít nhất 3 thí nghiệm độc lập. Phân tích thống kê được thực hiện bằng chương trình GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 3.1. KẾT QUẢ THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH MÃU NGHIÊN CỨU

3.1.1. Thu thập mẫu nghiên cứu

Lá và thân của *Dioscorea bulbifera* được thu thập tại Huyện Mê Linh, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam vào tháng 11 năm 2018 (*Hình 3.1*). Mẫu cây được xác định bởi Tiến sĩ Nguyễn Thế Cường, Bảo Tàng Thiên Nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm KHCNVN. Một mẫu tiêu bản (NCHG.DB.11-2018) được lưu chiểu tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN. Mẫu tươi thu được ít nhất từ 2-3 lá/ cây, lá phải trong tình trạng tốt, không quá lớn và không quá nhỏ, một số mẫu có hoa có quả. Mẫu lá được cắt bằng dụng cụ vô trùng chuyên dụng và đựng riêng biệt trong các túi vô trùng có ghi kí hiệu dùng cho nghiên cứu sinh học. Ngoài ra đề tài cũng thu được mẫu lượng lớn trên 2kg bao gồm lá và thân dây leo dùng cho nghiên cứu thành phần hóa học.



Hình 3.1: Mẫu cành và lá cây Khoai trời (Dioscorea bulbifera L.)

3.1.2. Tách chiết, tinh sạch, kiểm tra nồng độ và bảo quản DNA

Sử dụng phương pháp tách DNA bằng CTAB mà Xavier và cộng sự cải tiến năm 2000 để thu được DNA đạt chất lượng tốt. Phương pháp này được giới thiệu là phù hợp cho tách DNA trên mọi đối tượng thực vật, từ cây lá kim, cây lá rộng, cho cả mẫu tươi và mẫu khô. Mẫu sau khi được tách chiết theo quy trình trên DNA thu được tiến hành kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel Agarose 1% (*Hình* 3.2) và kiểm tra nồng độ bằng đo OD ở các bước sóng 260nm và 280nm (Bảng 3.1).



Hình 3.2: Ảnh điện di DNA tổng số của mẫu tách chiết được

Nồng độ DNA của mẫu sau khi tách chiết được kiểm tra bằng cách pha loãng 100 lần và đo OD trên máy đo quang phổ ở bước sóng 260nm và 280nm. Kết quả OD và điện di cho thấy mẫu DNA tổng số thu được có chất lượng tốt, băng sáng, không đứt gãy, không nhiễm tạp chất, nồng độ thích hợp để phục vụ các bước nghiên cứu tiếp theo.

STT	Ký hiệu tên mẫu	OD 260nm	Tỷ lệ OD 260nm/280nm
1	DB-Dioscorea bulbifera	1.3	1.87

Bảng 3.1: Nồng độ DNA tổng số của các mẫu

3.1.3. Định danh mẫu nghiên cứu

DNA được ly trích và tinh sạch từ mô lá theo phương pháp CTAB rút gọn. Mồi lục lạp sử dụng trong nghiên cứu này có trình tự là (mồi RbcL): P2F- ATGTCACCACAAACAGAAAC và

P2R-TCGCATGTACCTGCAGTAGC.

Phản ứng PCR được thực hiện qua 30 chu kỳ gia nhiệt trên máy PCR GeneAmp PCR system 2700 như sau: 4 phút ở 94°C, 30 chu kỳ gồm 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 52°C và 1 giây ở 72°C, và cuối cùng là 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được trữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% trong dung dịch TAE 1X bằng máy điện di OWL A2. Sau đó gel được nhuộm với dung dịch ethidium bromide trong 10 phút và chụp hình dưới đèn UV. Các đoạn DNA khuếch đại sẽ được ghi nhận và phân tích. Thành phần phản ứng PCR với mồi lục lạp như Bảng 3.2.

Hóa chất	Thể tích (<u>µL</u>)	
Mastermix	25.0	
Forward primer	2.0	
Reverse primer	2.0	
Distilled water	17.0	
DNA	4.0	
Total	50.0	

Bảng 3.2: Thành phần phản ứng PCR cho mồi lục lạp

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy có băng đặc hiệu (*Hình 3.3*).



Hình 3.3: Ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi lục lạp

Sản phẩm PCR được kiểm tra và tiến hành làm sạch bằng bộ kít GeneJET PCR Purification Kit, ký hiệu: K0702 của hãng ThermoFisher, Mỹ. Sản phẩm PCR thu được là một băng vạch đặc hiệu, rõ nét và không có băng vạch phụ kèm theo, có kích thước khoảng 720 bp phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy sản phẩm PCR này sau khi làm sạch có độ tinh sạch cao và có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết đủ điều kiện cho việc xác định trình tự Sanger.

Trình tự của mẫu nghiên cứu:

AAGAGCCTTGAATTCGCCGTTTCGGCCTGTGCTTTACAAAGT GCTTCGGCACAAAATAAGAAACGGTCTCTCCAACGCATAAATGGT TGTGAGTTCACATTTTCATCATCCTTGGTAAAATCAAGTCCACCAC GTAGACATTCATAAACGGCTCTGCCGTAGTTCTTTGCGGATAACCC CAATTTTGGTTTAATAGTGCATCCCAATAGGGGACGGCCATACTTG TTCAACTTATCTCTTTCAACTTGGATGCCGTGTGGGGGCCTTGGA AAGTTTTGGAATAAGAAGTAGGAATTCGCAGATCCTCCAGACGTA GGGCTCGTAGGGCTTTGAAACCAAATACATTACCTACAATGGAAG TAAACATATTGGTAACAGAACCTTCCTCAAAAAGGTCTAAAGGAT AGGCTACATAAGCAATATATTGGTCTTCCTCCCCAACAACGGCCTC GATGTGGTAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCA TCAGTCCACACACTTGTCCATGTACCAGTGGACGATTCGGCGGCTA CTGCAGCTCCTGCTTCTTCGGGCGGAACCCCAGGTTGAGGAGTTAC TCGGAATGCCGCTAAGATATCAGTATCTTTGGTTTCGTAGTCAGGA GTATAATAAGTCAATTTATAATCTTTAACACCAGCTTTGAATCCAA CACTTGCTTTAGTTTCTGTTGTGGGGGTGACATAATA.

Sản phẩm PCR sau khi được làm sạch và giải trình tự bằng máy đọc trình tự tự động ABI3500. Kết quả giải trình tự đều cho tín hiệu tốt ở cả chiều xuôi và chiều ngược. Sau khi sắp gióng cột và hiệu chỉnh độ tin cậy, các trình tự được cắt bỏ bớt hai đầu nhiễu, ghép chiều xuôi và chiều ngược thành một trình tự thống nhất, chiều dài các vùng trình tự còn khoảng 715bp ở vùng cần xác định. Kết quả trình tự được so sánh với các trình tự của củ nâu thuộc chi *Dioscorea* tham khảo từ GenBank để phân tích và định danh tên khoa học. Kết quả phân tích dữ liệu thông tin gen cho thấy mẫu nghiên cứu có độ tương

đồng tới 99.16% so với mẫu *Dioscorea bulibifera* (NC_039708.1). Dựa vào kết quả phân tích mẫu nghiên cứu được định danh là *Dioscorea bulibifera* L.

3.2. TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH , XÁC ĐỊNH CẦU TRÚC VÀ ĐỊNH TÊN CHẤT TRONG MẫU NGHIÊN CỨU

3.2.1. Tách chiết và tinh sạch các hợp chất từ mẫu nghiên cứu

Lá và thân khô của D. bulbifera (2kg) được nghiền nhỏ, sau đó được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt đô phòng. Sau 10 ngày, các dịch chiết MeOH được loc qua giấy loc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết MeOH (190g). Cao chiết sau đó được phân bố đều trong H₂O và được chiết phân lớp lần lượt với các dung môi hữu cơ với đô phân cực tăng dần như n-Hexan và CH₂Cl₂ thu được phân lớp chiết n-hexan, CH₂Cl₂ và phân lớp nước. Dịch chiết CH₂Cl₂ được cất loại dung môi và sau đó được phân cắt phân đoạn qua cột silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi n-Hexan (100-10%) trong Axeton và cuối cùng được rửa bằng MeOH thu được 10 phân đoạn (D1-D10). Phân đoạn D2 được sắc ký trên cột pha đảo C_{18} , rửa giải bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2, v/v) để cho các phân đoạn D2.1 – D2.3. Phân đoạn D2.1 được tinh chế thêm bằng sắc ký cột silica gel, sử dụng hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂-MeOH (35:1, v/v) thu được hợp chất 6 (21mg). Phân đoạn D2.2 được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel và CH₂Cl₂-Axeton (20:1, v/v) làm pha động thu được hợp chất 7 (2,3mg). Phân đoạn D4 được phân cắt qua cột pha đảo C₁₈, sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient MeOH (50-100%) trong H₂O để tạo ra năm phân đoạn (D4.1 – D4.5). D4.2 sau đó được phân tách bằng silica gel CC, rửa giải với n-Hexane-EtOAc (1: 3, v/v) để thu được hợp chất 4 (2,5mg). D4.5 được phân tách qua cột silica gel và hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂-MeOH (30: 1, v/v) thu được hợp chất 1 (3,5mg). Phân lớp nước được phân tách qua sắc ký cột Diaion HP-20, sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient MeOH-H₂O thu được 3 phân đoạn (W1 – W3). W3 là được phân tách bằng RP C_{18} CC, với hệ dung môi rửa giải gradient với MeOH trong H₂O (1:1 đến 5:1, v/v) và cuối cùng được rửa bằng MeOH thu được năm phân đoạn (W3.1 – W3.5). W3.2 được phân tách bằng RP C_{18} CC, rửa giải bằng MeOH-H₂O (1: 1, v/v) và tiếp tục được tinh chế bằng silica gel CC, rửa giải bằng CH₂Cl₂-axeton (5: 1, v/v) thu được hợp chất 5 (2,5mg). Tương tự, hợp chất 2 (2,1mg) được phân lập từ W3.3 bằng silica gel CC, sử dụng CH₂Cl₂-

axeton (5: 1, v/v) làm pha động. W3.4 được phân tách qua pha đảo RP C₁₈, rửa giải bằng MeOH-H₂O (1: 1, v/v) cho các phân đoạn W3.4.1 – W3.4.4. W3.4.3 được phân tách bằng Sephadex LH-20 CC, rửa giải với MeOH-H₂O (1:1, v/v) và tiếp tục được tinh chế bằng RP C₁₈ CC, sử dụng Axeton-H2O (1:3,5, v/v) làm chất rửa giải thu được hợp chất 3 (3mg). Sơ đồ minh họa cho tách chiết và phân lập 07 hợp chất từ mẫu nghiên cứu được trình bày chi tiết trong *Hình 3.4*.


3.2.2. Xác định sơ bộ cấu trúc hóa học và tên khoa học của 07 hợp chất.

Sử dụng các phương pháp phổ kết hợp đã nêu trên, đồng thời xác định các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại để xác định cấu trúc hóa học các hợp chất sạch đã phân lập được từ mẫu nghiên cứu. Với 07 chất sạch phân lập từ mẫu nghiên cứu đã xác định chính xác cấu trúc hóa học và tên khoa học của 07 chất trong đó có 03 chất mới, danh sách tên chất được trình bày trong Bảng 3.3.

STT	Chất từ mẫu (DB)	
1.	Diosbulbiferin A (DB1)	
2.	Diosbulbiferin B (DB2)	
3.	Diosbulbiferinoside A (DB3)	
4.	Diosbulbiferin C (DB4)	
5.	8-epidiosbulbin G (DB5)	
6.	Diosbulbin D (DB6)	
7.	15,16-epoxy- 6α - O -acetyl- $8b$ -hydroxy- 19-nor-clero-13(16),14-diene-	
	17,12;18,2-diolide (DB7)	

Bảng 3.3: Danh sách tên chất phân lập từ mẫu nghiên cứu

3.2.3. Đặc điểm hóa lý của 03 hợp chất mới

3.2.3.1. Chất mới 1: Diosbulbiferin A

Dạng bột trắng, vô định hình; $[\alpha]_D^{25} = +55$ (c = 0,1, DMSO); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 220 (3,00), 208 (4,02) nm; IR (cm⁻¹) vmax 2921, 2850, 1771, 1730, 1570, 1370, 1258, 1149, 1055, 1018, 874, 750, 603; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 223 (- 5,99) nm; HRESIMS: m / z 423.1207 [M + Cl]⁻ (tính theo đơn vị C₂₁H₂₄O₇Cl⁻, 423.1216); (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{21}H_{24}O_7Cl^-$, 423.1216); ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) và ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): xem bảng 3.4.

3.2.3.2. Chất mới 2: Diosbulbiferin B

Dạng bột trắng, vô định hình; $[\alpha]_D^{25} = +66$ (c = 0,1, DMSO); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 221 (3,07), 208 (3,97) nm; IR (cm⁻¹) ν_{max} 3406, 3279, 2919, 2851, 1791, 1717, 1502, 1467, 1383, 1310, 1271, 1177, 1151, 1027, 874, 792, 602; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 206 (+3,25), 232 (+4,74) nm; HRESIMS: m/z 397.1056 [M + Cl]⁻ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C₁₉H₂₂O₇Cl⁻, 397.1054); ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) và ¹³C Dữ liệu NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): xem bảng 3.5.

3.2.3.3. Chất mới 3: Diosbulbiferinoside A

Dạng bột trắng, vô định hình; $[\alpha]_D^{25} = +23$ (c = 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 221 (3,33), 208 (4,20) nm; IR (nguyên chất, cm⁻¹) ν_{max} 3371, 2918, 2851, 1783, 1731, 1593, 1466, 1375, 1248, 1195, 1063, 1023, 876, 790, 603; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 231 (- 3,90), 283 (+1,38) nm; HRESIMS: m / z 601.1682 [M + Cl]⁻ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C₂₇H₃₄O₁₃Cl⁻, 601.1693); ¹H (DMSO - d₆, 500 MHz) và ¹³C NMR (DMSO - d₆, 125 MHz): xem bảng 3.6.

3.2.4. Cấu trúc hóa học của 03 chất mới

3.2.4.1. Kết quả xác định cấu trúc hóa học các hợp chất 1



Hình 3.5: Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) và COSY (—) chính của hợp chất 1

Hợp chất **1** được phân lập ở dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử của hợp chất được thiết lập là $C_{21}H_{24}O_7$ (*Hình 3.5*) bởi sự xuất

hiện của ion giả phân tử $[M+C1]^-$ tại m/z 423.1207 trên phổ HRESIMS, cho thấy 10 độ không bão hòa.



Hình 3.6: Phổ HRESITOF của hợp chất 1

Trong phổ ¹H NMR (trong DMSO-d₆) (*Hình 3.7*), tín hiệu của ba proton olefin ở $\delta_{\rm H}$ 6,61 (d, J = 1,0 Hz, H-14), 7,67 (t, J = 1,5 Hz, H-15), và 7,75 (s, H-16) được ghi nhận, cho thấy sự xuất hiện của một β -vòng furan thể β . Phổ ¹H NMR cũng cho thấy tín hiệu của ba nhóm oxymethine ở $\delta_{\rm H}$ 4,97 (br s-like, H-2), 4,50 (q, J = 4,0 Hz, H-6) và 5,35 (dd, J = 3,0, 12,5 Hz, H-12) và một góc metyl ở $\delta_{\rm H}$ 0,98 (s, H₃–20).



Hình 3.7: Phổ ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất 1

Phân tích phổ ¹³CNMR và HSQC (trong DMSO-d₆) (*Hình 3.8, Hình 3.9*) cho thấy 21 tín hiệu, bao gồm ba nguyên tử cacbonyl ở δ_C 171,4 (C-17), 177,4 (C-18) và 169,6 (2-OAc), bốn nguyên tử cacbon sp² của vòng furan thể β , ba oxymethine, bốn metylene, và một metyl cacbon. Dữ liệu quang phổ này gọi ý rằng hợp chất **1** có dạng khung norclerodane diterpenoid- một trong những thành phần hóa học chính của cây thuốc này [36-43].



Hình 3.8: Phổ ¹³C NMR (DMSO-d6, 125 MHz) của hợp chất



Hình 3.9: Phổ HSQC (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1

Theo đó, tiến hành so sánh dữ liệu phổ ¹H và ¹³C NMR với dữ liệu của hợp chất 19-norclerodane diterpenoid đã biết là 8-epidioscbulbin G cho kết quả gần tương đồng, ngoại trừ sự hiện diện của các tín hiệu cho nhóm acetyl [δ C 169.6 và δ C 21.0 / δ H 1.92 (s)] ở hợp chất **1** [44]. Điều này đã được thể hiện bởi độ chuyển dịch hóa học về phía trường thấp của C-2 ở $\delta_{\rm C}$ 68,5 và tương tác NOESY giữa tín hiệu $\delta_{\rm H}$ 1,92 và 4,97 (H-2) trên phổ NOESY.



Hình 3.10: Phổ HMBC (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1



Hình 3.11: Phổ COSY (DMSO-d6, 500 MHz) của hợp chất 1

Cấu hình tương đối của hợp chất 1 được thiết lập bởi các phân tích phổ NOESY (Hình 3.12) cũng như so sánh với hợp chất 8-epidioscbulbin [44]. Trên phổ NOESY đo trong CD₃OD, tín hiệu proton ở $\delta_{\rm H}$ 5.13 (H-2) thể hiện tương tác với $\delta_{\rm H}$ 1,95 (H_a-1), 1,45 (H_b-1), 2,47 (H_a-3) và 1,92 (H_b-3) nhưng không tương tác với với $\delta_{\rm H}$ 2,01 (H-10 α) cho thấy H-2 quay theo chiều β . Ngoài ra, hằng số bắt cặp nhỏ (${}^{3}J = 1.8-3.6$ Hz) giữa H-2 / H₂-1 và giữa H-2 / H₂-3 là phù hợp với mối quan hệ with equatorial-equatorial và equatorialaxial giữa H-2 và H₂-1/H₂-3, qua đó khẳng định hướng quay β của H-2. Điều này cũng tương đồng với các hợp chất norclerodane đã biết từ loài D. bulbifera [36,39]. Tương tác NOE giữa H-5/H₃-20 gọi ý những proton này nằm ở cùng một phía của phân tử và vòng A hợp nhất dạng trans với vòng B. Điều này cũng phù hợp với con đường sinh tổng hợp của các diterpenoit norclearodane trước đây phân lập từ D. bulbifera [36,39,43]. Ngoài ra, các tương tác NOESY giữa H-5/H-4/H-6 và giữa H₃-20/H-8 (Hình 3.13) cũng được quan sát, cho thấy rằng các proton này có hướng quay β và vòng δ lacton (vòng C) hợp chất với vòng B theo dạng cis. Mặt khác, tương tác NOE giữa H-10 và H-12 cho thấy cả hai proton đều hướng về mặt phẳng α của phân tử.



Hình 3.12: Phổ NOESY (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất 1



Hình 3.13: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 1

Cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của hợp chất **1** được xác định bằng so sánh dữ liệu quang phổ ECD thực nghiệm và tính toán sử dụng chương trình Gaussian [45], với các thuật toán như MMFF (Spartan'18), b3lyp/6-311g(d,p) (Gaussian 16W) [46]. Tính toán quang phổ ECD được thực hiện tiếp theo với thuật toán TDDFT của Gaussian 16 W [45]. Cuối cùng, phổ tính toán ECD được mô phỏng bằng chương trình SpecDis 1.71 [47,48].



Hình 3.14: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 1

Kết quả *Hình 3.14* cho thấy, phổ ECD tính toán cho đồng phân 2R,4R,5S,6S,8R,9S,10R,12S-đồng phân của hợp chất **1** cho kết quả phù hợp với phổ ECD thử nghiệm, trong khi đồng phân đối quang thể hiện phổ ECD ngược lại (*Hình 3.14*). Trên cơ sở các phân tích phổ, cấu hình tuyệt đối của hợp chất **1** được xác định, và đây là một hợp chất mới, được đặt tên là **diosbulbiferin A**.

Vị trí	$\delta_{C}{}^{a,b}$	$\delta_{\rm H}{}^{\rm a,c}$ (<i>J</i> in Hz)	NOESY
1	26.8	1.79	
		1.36 (td, 2.5, 14.5)	
2	68.5	4.97 (br s-like)	1, 3, OAc
3	25.2	2.18 (br d, 15.5)	
		1.85	
4	39.8	2.94 (t, 6.0)	5, 6
5	37.0	2.38 (m)	b-1, 4, 6, 20
6	75.6	4.50 (q, 4.0)	4, 5
7	24.2	2.65 (dt, 4.0, 15.5)	
		2.16	
8	44.9	2.50	20
9	32.7	-	
10	29.1	1.80	12
	38.7	2.10 (dd, 3.0, 14.5)	
		1.89	
12	69.4	5.35 (dd, 3.0, 12.5)	10
13	125.0	-	
14	108.9	6.61 (d, 1.0)	
15	143.9	7.67 (t, 1.5)	
16	140.3	7.75 (s)	
17	171.4	-	
18	177.4	-	
20	20.4	0.98 (s)	b-1, 5, 8
2-OAc	169.6		
	21.0	1.92 (s)	2

Bảng 3.4: Dữ liệu NMR của hợp chất 1

^a Do trong DMSO-d₆; ^b 125 MHz; ^c 500 MHz;

Các vị trí được quy kết dựa trên các phân tích phổ HSQC, HMBC, và COSY

3.2.4.2. Kết quả xác định cấu trúc hóa học các hợp chất 2



Hình 3.15: Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) và COSY (-) chính của hợp chất 2

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng bột trắng, vô định hình. Công thức phân tử được xác định là $C_{19}H_{22}O_7$ (*Hình 3.15*) bởi phổ khối lượng phân giải cao HRESIMS tại m/z 397.1056 [M+Cl]⁻ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{19}H_{22}O_7Cl^-$, 397.1054).



Hình 3.16: Phổ HRESITOF mass của hợp chất 2

Tiến hành phân tích phổ ¹H và ¹³C NMR (*Hình 3.17, Hình 3.18*)cho thấy gần tương tự với hợp chất **1**, ngoại trừ sự mất đi tín hiệu của nhóm acetyl ở vị trí C-2 ở hợp chất **2** so với hợp chất **1** và sự thay thế của nhóm một nhóm methine ở hợp chất **1** bởi carbon không liên kết proton mang oxy tại δ_C 74,7(C-4) ở hợp chất **2**. Điều này phù hợp với sự khác biệt về công thức phân

tử giữa cả hai hợp chất, trong đó **2** có ít hơn hai nguyên tử và hai proton hơn so với **1**. Vị trí của nhóm hydroxy ở C-2 của hợp chất **2** được nhận biết rõ ràng bởi độ chuyển dịch hóa học lên trường cao của tín hiệu carbon oxymethine tại $\delta_{\rm H}$ 63.4 (C-2) [so với 68.5 (C-2) ở **1**] và tương tác HMBC từ $\delta_{\rm H}$ 4,56 (2-OH) tới C-1, C-2 và C-3 (*Hình 3.15*).



Hình 3.17: Phổ ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất 2



Hình 3.18: Phổ ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) của hợp chất 2



Hình 3.20: Phổ HMBC (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất $\mathbf{2}$

Ngoài ra, liên kết của một nhóm hydroxy ở C-4 của 2 được xác định bởi tương tác HMBC (*Hình 3.20*) từ H₂-3 và H-5 đến C-4 cũng như tương tác NOESY (*Hình 3.22*) giữa $\delta_{\rm H}$ 5,89 (4-OH) và $\delta_{\rm H}$ 1,63 (H_b-3). Như thể hiện trong Bảng 3.5, ghép nối giữa H_b-1 / H-2 (J = 2.0 Hz) và giữa H_b-3 / H-2 (J = 4.0 Hz), cùng với dạng tín hiệu "br s-like" của H-2, gợi ý rằng H-2 có tương tác equatorial-equatorial và equatorial-axial với H₂-1 / H₂-3. Các tương tác NOE từ H-2 đến H₂-1, H₂-3, và H-5 β , cùng với việc thiếu tương tác NOE giữa H-2 và H-10 α , cho thấy H-2 có hướng quay β - equatorial [36,39]. Các tương tác NOE giữa H-5 / H-6, H-5 / H₃–20, H-6/4-OH và giữa H₃–20 / H-8 cho thấy rằng các proton này nằm trên cùng một mặt không gian của phân tử. Ngoài ra, H-10 đã được chứng minh là có tương tác giữa NOE với H-12, chỉ ra rằng cả hai proton đều hướng α .



Hình 3.21: Phổ COSY (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất 2



Hình 3.22: Phổ NOESY (DMSO-d₆, 500 MHz) của hợp chất 2



Hình 3.23: Phổ NOESY giãn vùng 1 của hợp chất 2



Hình 3.24: Phổ NOESY giãn vùng 2 của hợp chất 2



Hình 3.25: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 2

Trên cơ sở các phân tích quang phổ, cấu hình tương đối của 2 được đề xuất là tương tự với cấu hình của 1. Cấu hình của 2 sau đó đã được làm rõ bằng quang phổ ECD phân tích bằng chương trình TDDFT-Gaussian 16 W [45]. Kết quả là phổ ECD thực nghiệm của 2 (*Hình 3.26*) cho thấy hiệu ứng Cotton dương ở bước sóng 206 (+3,25) và 232 (+4,74) nm, điều này phù hợp với dữ liệu ECD tính toán cho đồng phân 2R,4S,5R,6S,8R,9S,10R,12S (*Hình 3.26*). Như vậy, cấu trúc của 2 được xác định và được đặt tên là diosbulbiferin B. Điểm thú vị ở đây là sự hình thành nhóm hydroxy ở C-4 khi có mặt của cầu nối γ -lacton giữa C-2 và C-4 trong cấu trúc của hợp chất 2 hiếm khi được phát hiện trong số các diterpenoid loại norclerodane được báo cáo cho đến nay [49].



Hình 3.26: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 2

Position	2		
	$\delta c^{a,b}$	$\delta_{\rm H}^{\rm a,c}$ (<i>J</i> in Hz)	NOESY
1	29.8	H _a : 1.60	
		H _b : 1.22 (td, 2.0, 13.0)	
2	63.4	4.04 (br s-like)	1, 3, 5, 2-OH
3	38.0	H _a : 2.27 (br d, 14.0)	
		H _b : 1.63 (dd, 4.0, 14.0)	
4	74.7	-	
5	45.0	2.02 (dd, 4.0, 12.5)	b-1, 2, 6, 20, 4-OH
6	74.1	4.76 (m)	5, 4-OH
7	23.9	H _a : 2.65 (dt, 4.0, 15.5)	
		H _b : 2.12	
8	44.6	2.45 (q, 3.5)	20
9	32.8	-	
10	28.1	1.81	a-1, b-3, 12
11	39.0	H _a : 2.11	
		H _b : 1.83	
12	69.4	5.39 (dd, 3.0, 12.5)	10
13	125.3	-	
14	109.1	6.60(d, 1.0)	
15	143.8	7.50 (t, 1.5)	
16	140.1	7.61 (dd, 0.5, 1.5)	
17	171.3	-	
18	176.1	-	
20	20.5	0.97 (s)	b-1, 5, 8
2-OAc	-	-	
2-OH	-	4.56 (d, 2.0)	2
4-OH	-	5.89 (br s)	b-3, 5, 6
1'	-	-	
2'	-	-	
3'	-	-	
4′	-	-	
5'	-	-	
6′	-	-	

Bảng 3.5: Dữ liệu NMR của các hợp chất 2

^a Được đo trong DMSO-d6; ^b 125 MHz; ^c 500 MHz

3.2.4.3. Kết quả xác định cấu trúc hóa học các hợp chất 3



Hình 3.27: Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) và COSY (—) chính của hợp chất **3**

Hợp chất 3 thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử của nó được thiết lập là $C_{27}H_{34}O_{13}$ (*Hình 3.27*) dựa trên clorua ion cộng ở m/z 601.1682 [M+Cl]⁻ (tính theo đơn vị $C_{27}H_{34}ClO_{13}$ ⁻,601.1693) trong HRESIMS.



Hình 3.28: Phổ HRESITOF mass của hợp chất 3

Phân tích chi tiết NMR ¹H và ¹³C và phổ HSQC của 3 (*Hình 3.29, Hình 3.30, Hình 3.31*) chỉ ra rằng đây là một diterpenoid norclerodane glucosit. Thủy phân bằng axit sau đó là phân tích RP HPLC của Các sản phẩm thiocarbamoyl-thiazolidine dẫn đến việc xác định D-glucose [50]. Các tín hiệu điển hình của vị trí anome của đơn vị đường tại $\delta_{\rm H}$ 5,42 (d, *J* = 8,0 Hz, H-1') / $\delta_{\rm C}$ 96,3 (C-1'), cùng với tín hiệu carbon của bốn oxymethines ở $\delta_{\rm C}$ 74,0, 78,0, 70,9 và 78,9, và một oxymethylene ở $\delta_{\rm C}$ 62.2, cho thấy sự có mặt của một nhánh đường β-glucopyranosyl. Trong 21 tín hiệu carbon còn lại của phần aglycone 19-norclerodane diterpenoid có thể nhận biết được bốn nguyên tử cacbon cacbonyl ở $\delta_{\rm C}$ 208,5 (C-6), 173,5 (C-17), 173,9 (C-18), và 172,6 (2-OAc), hai oxymethin sp³ ở δC 70,1 (C-2) và 72,4 (C-12), 4 sp³ methines, 4 sp³ metylenes, một sp³ cacbon không sinh ra ở δC 35,7 (C-9), một metyl góc ở δC 20,8 (C-20), và bốn nguyên tử cacbon sp² của vòng furan.



Hình 3.29: Phổ ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất **3**



Hình 3.30: Phổ ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất **3**



Hình 3.31: Phổ HSQC (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất 3



Hình 3.32: Phổ HMBC (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất **3**



Hình 3.33: Phổ COSY (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất 3



Hình 3.34: Phổ NOESY (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất 3



Hình 3.35: Các tương tác NOESY chính của hợp chất 3

So sánh dữ liệu ¹H và ¹³C NMR của **3** với dữ liệu của diosbulbin K cho thấy sự tương đồng, ngoại trừ việc sự bổ sung một nhóm acetyl [δ C 172.6 và $21.4 / \delta H 2.06$ (s)] ở **3** và sự thay thế của một metyl este trong diosbulbin K bởi một đơn vị glucose trong 3 [36]. Vị trí của nhóm acetyl ở C-2 của aglycone được gán bởi sự chuyển dịch hóa học về phái trường thấp của C-2 ở $\delta_{\rm C}$ 70.1 cũng như tương quan NOE của $\delta_{\rm H}$ 2.06 với cả H_b-1 và H-2. Phần gốc glucozo được gắn vào C-18 của aglycone thông qua liên kết glycosidic bằng tương quan HMBC được từ H-1' đến C-18 (Hình 3.32). Cấu hình tương đối của 3 được xác đinh bởi thí nghiêm NOESY (Hình 3.34) so với thí nghiêm của đồng phân lập thể C-8, diosbulbins K và L [36]. Sự chuyển đổi hợp nhất của các vòng A và B là được suy ra bởi tương quan NOE giữa H-5 / H₃-20 và giữa H-10 / H-12, trong khi tương tác NOE giữa H-8 và H-20 là dấu hiệu của sự hợp nhất dạng cis của các vòng B và C (*Hình 3.35*). Cấu hình tuyệt đối của **3** xác định bằng phân tích quang phổ ECD (*Hình 3.36*) sử dụng Gaussian 16 W (Hình 3.36). Do đó, cấu trúc của hợp chất 3 được xác định với tên gọi diosbulbiferinoside A.



Hình 3.36: Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất 3

Vị trí	3		
	$\delta c^{a,b}$	$\delta_{\rm H}{}^{\rm a,c}$ (<i>J</i> in Hz)	NOESY
1	31.5	Ha: 2.07	
		H _b : 1.60 (td, 2.0, 14.0)	
2	70.1	5.12 (br t-like, 3.0)	1, 3
3	32.2	H _a : 2.58 (dd, 2.0, 15.0)	
		H _b : 1.95 (ddd, 2.0, 7.0, 15.0)	
4	38.4	3.48 (m)	3, 5
5	49.9	2.52 (dd, 7.5, 12.0)	b-1, b-3, 4, 8, 20
6	208.5	-	
7	38.0	H _a : 3.22 (dd, 1.0, 17.0)	
		H _b : 2.80 (dd, 7.5, 17.0)	
8	49.8	2.99	20
9	35.7	-	
10	33.5	2.99	12
11	40.3	H _a : 2.35 (dd, 4.0, 15.0)	
		Нь: 2.09	
12	72.4	5.42 (dd, 3.5, 9.0)	10
13	126.5	-	
14	109.6	6.58 (dd, 0.5, 1.5)	
15	145.1	7.54 (d, 1.5)	
16	141.3	7.62 (s)	
17	173.5	-	
18	173.9	-	
20	20.8	1.31 (s)	b-1, 5, 8
2-OAc	172.6))	
	21.4	2.06 (s)	
2-OH	-	-	
4-OH	-	-	
1′	96.3	5.42 (d, 8.0)	
2'	74.0	3.36 (d, 8.0, 9.0)	
3'	78.0	3.41	
4′	70.9	3.40	
5'	78.9	3.39 (m)	
6'	62.2	Ha: 3.84 (dd, 1.5, 12.0)	
		H _b : 3.73 (dd, 4.0, 12.0)	

Bảng 3.6: Dữ liệu NMR của các hợp chất 3

^{*a*} Được ghi trong CD₃OD; ^{*b*} 125 MHz; ^{*c*} 500 MHz

Bằng cách sử dụng phân tích quang phổ NMR và HRESIMS tương tự, cấu trúc của 4 hợp chất còn lại đã được xác định cấu trúc và là những chất đã biết (*Hình 3.37*) bao gồm: diosbulbiferin C (4) [51], 8-creiosbulbin G (5) [44], diosbulbin D (6) [52], 15,16-epoxy-6 α -O-acetyl-8b-hydroxy-19-nor-clero-13 (16), 14-diene-17,12;18,2-diolide (7) [53].



Hình 3.37: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-7

3.3. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 07 HỢP CHẤT TÁCH CHIẾT ĐƯỢC

3.3.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất

Tất cả các hợp chất phân lập được đánh giá về khả năng gây độc tế bào của chúng trên ba dòng tế bào ung thư ở người, bao gồm MCF-7, HepG2, và SK-Mel-2 bằng cách sử dụng SRB [41]. Kết quả cho thấy ở nồng độ 100 μ M, hợp chất **6** chỉ gây độc yếu đối với dòng tế bào MCF-7, với số tế bào chết là 46.77 %; hợp chất **4** và **7** có độc tính yếu trên dòng tế bào SK-Mel-2, với số tế bào chết lần lượt là 40.00% và 44.74 %. Các hợp chất còn lại được coi như không có hoạt tính gây độc đáng kể đối với các dòng tế bào ung thư thử

nghiệm. Ellipticine chất đối chứng dương hoạt động ổn định trong thí nghiệm với nồng độ 2.0 μ g/mL.

Hợp chất	Tế bào chết (%)		
	HepG2	MCF-7	SK-Mel-2
1	23.95	36.32	38.68
2	36.50	39.13	25.43
3	28.02	32.49	31.38
4	32.90	28.51	40.00
5	33.28	35.59	24.82
6	29.44	46.77	31.29
7	20.98	34.34	44.74
Ellipticine*	80.13	84.51	71.78

Bảng 3.7: Kết quả gây độc tế bào ung thư của các hợp chất 1–7

* Đối chứng dương thử ở nồng độ 2.0 μ g/mL

3.3.2. Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất

Tác dụng kháng viêm in vitro của các hợp chất cũng được đánh giá thông qua mô hình ức chế sản sinh quá mức nitric oxit (NO) ở tế bào BV2 được kích thích bởi LPS. Trước tiên, để loại trừ khả năng tác dụng ức chế NO của các hợp chất có thể bị ảnh hưởng bởi độc tính đối với tế bào BV2, phương pháp MTT được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất đối với sự sống sót của tế bào BV2. Kết quả cho thấy các hợp chất đều không có độc tính đáng kể cho tế bào BV2 (Bảng 3.8) ở nồng độ 80µM. Như vậy, các hợp chất được tiếp tục đánh giá tác dụng ức chế đối với sự sản sinh NO trong tế bào BV2 kích thích bởi LPS ở nồng đô cao nhất lên đến 80µM. Các chất sach ký hiệu 1-7 được pha trong DMSO với nồng đô thử nghiêm 20; 40 và 80µM, để thử nghiêm hoat tính ức chế sản sinh NO ở tế bào BV2 cells kích thích bởi LPS ở nồng độ 1 µg/mL và sử dụng chất chuẩn là Butein. Kết quả cho thấy, trong số các hợp chất dang 19-norclerodane diterpenoids được thử nghiêm, hợp chất 1 thể hiên tác dung ức chế sản sinh NO tốt nhất, với giá tri IC₅₀ là 14.8 ± 0.7 µM. Hợp chất **2–4**, **6** và **7** ức chế sản sinh NO ở mức trung bình, với giá trị IC₅₀ trong khoảng từ $30,3 \pm 3,6$ đến $37,1 \pm 1,9$ µM. Hợp chất 5 ức chế sản sinh NO ở mức yếu, với giá trị IC $_{50}$ là 54,0 \pm 2,7 $\mu M.$

Compound	IC ₅₀ values (µM) ^a	Tế bào sống (%) ở nồng độ thử nghiệm 80 μΜ
1	14.8 ± 0.7	94.55
2	35.4 ± 1.8	92.12
3	37.1 ± 1.9	91.49
4	30.3 ± 3.6	95.23
5	54.0 ± 2.7	94.88
6	31.3 ± 1.6	95.54
7	32.4 ± 1.6	96.27
Buletin ^b	4.3 ± 0.1	

Bảng 3.8: Kết quả ức chế sản sinh nitric oxit của các hợp chất 1-7

^{*a*} Trung bình \pm SD (n = 3), ^{*b*} Đối chứng dương, ^{*c*} không có hoạt tính

Như vậy, từ mẫu lá và dây leo của *D. bulbifera*, đã tách chiết và xác định cấu trúc hóa học của 07 hợp chất tự nhiên. Trong đó chất Diosbulbiferin A (1) là hợp chất mới và nó thể hiện hoạt tính kháng viêm ức chế sản sinh NO tốt nhất.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KÉT LUẬN

- Đã thu thập và định danh được mẫu nghiên cứu là *Dioscorea* bulbifera bằng các chỉ thị sinh học phân tử.

- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 07 hợp chất từ lá và dây leo của cây *Dioscorea bulbifera*, bao gồm: 03 hợp chất mới là diosbulbiferin A (1), diosbulbiferin B (2), diosbulbiferinoside A (3) và 04 hợp chất đã biết: diosbulbiferin C (4), 8-epidiosbulbin G (5), diosbulbin D (6), 15,16-epoxy- 6α -O-acetyl-8b-hydroxy-19-nor-clero-13(16), 14-diene-17,12;18,2-diolide (7).

 - Đã đánh giá được tác dụng gây độc tế bào trên 03 dòng tế bào ung thư người thử nghiệm, bao gồm HepG2, MCF-7, và SK-Mel-2 cho các hợp chất phân lập được.

- Đã đánh giá tác dụng kháng viêm trên mô hình ức chế sản sinh NO ở tế bào BV2 kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy 07 hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO, với giá trị IC_{50} trong khoảng 14.8-54.0 μ M. Trong đó chất mới diosbulbiferin A là chất có hoạt tính tốt nhất.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn tác dụng kháng viêm *in vitro* của hợp chất diosbulbiferin A đối với các đích phân tử khác của quá trình viêm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Nguyen Thi Thanh Ngan, Nguyen Huy Hoang, Vu Van Truong, Nguyen Thu Hien, Nguyen Ngoc Lan, Nguyen Van Tung, Pham Thi Mai Huong, Hyuncheol Oh, Tran Hong Quang. Anti-inflammatory norclerodane diterpenoids and tetrahydrophenanthrene from the leaves and stems of *Dioscorea bulbifera*. Fitoterapia 153 (2021) 104965.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Ayensu, E. S. Anatomy of the monocotyledons VI Dioscoreales. Oxford Press, Oxford 1972, p. 182.
- 2. Lacaille-Dubois, M.-A. A propos des Dioscorea (le "yam"). La *Phytothe rapie Europe enne* 2002, 7, 9-16.
- 3. Coursey, D. G. Yams. Longman, Green and Co, London 1967, p. 230.
- Coursey, D. G. Yams. *Dioscorea* spp.(Dioscoreaceae) In: Simmonds ED (ed) Evolution of crop plants. *Longman, London* 1976, p. 70-74.
- 5. De Loureiro, J. Flora Cochinchinensis. Líbon: Acamdemiac Ulyssipone 1970, II edition.
- Prain, D.; Burkill, I. H.; Dioscorearum novarum- Descriptiones quaedam. Journal and Proceedings of the Asiatic Society of Bengal 1908, 4, 447-457.
- 7. Hoàng, N.; Bích, L. Đ. Diosgenin trong một số loài Dioscorea ở Việt Nam. Công trình nghiên cứu khoa học y được 1986.
- 8. Chi, V. V. Dictionary of medicinal plants in Vietnam. *Vietnam Publisher of Medicine* 2012.
- Hoàng, N.; Hoán, H. V. Điều tra trữ lượng cây Nần nghệ (Dioscorea collettii Hook.f). Công trình nghiên cứu khoa học y dược 1986.
- Nguyen, X. C.; Nguyen, V. D. Chemical composition of *Dioscorea* hispida of the Dioscoreaceae family. *Tap Chi Duoc Hoc* 1987, *1*, 16-17.
- 11. Nguyen, X. C.; Zeigan, D.; Voigt, G.; Hiller, K. Steroidal saponins of *Dioscorea hispida* L. *Pharmazie* 1987, 42, 143.
- Yonemitsu, M.; Fukuda, N.; Kimura, T.; Komori, T. Diosbulbin-B from the Leaves and Stems of *Dioscorea bulbifera*: 1H-1H and 13C-1H COSY NMR Studies. *Planta Med* 1993, 59, 577-577.
- 13. Ida, Y.; Kubo, S.; Fujita, M.; Komori, T.; Kawasaki, T. Furanoid norditerpenes from Dioscoreaceae plants, V. Structures of the

diosbulbins-D, -E, -F, -G, and -H. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1978, 5, 818-833.

- Murray, R. D. H.; Jorge, Z. D.; Khan, N. H.; Shahjahan, M.; Quaisuddin, M. Diosbulbin d and 8-epidiosbulbin e acetate, norclerodane diterpenoids from dioscorea bulbifera tubers. *Phytochemistry* 1984, 23, 623-625.
- Liu, H.; Chou, G. X.; Guo, Y. L.; Ji, L. L.; Wang, J. M.; Wang, Z. T. Norclerodane diterpenoids from rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry* 2010, 71, 1174-1180.
- Ida, Y.; Noda, N.; Kubo, S.; Komori, T.; Kawasaki, T. Furanoid Norditerpenes from *Dioscorea* Plants. VII. Structures of Diosbulbinosides D and F. *Chem Pharm Bull* 1978, 26, 435-439.
- Teponno, R. B.; Tapondjou, A. L.; Gatsing, D.; Djoukeng, J. D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tane, P.; Stoekli-Evans, H.; Lontsi, D. Bafoudiosbulbins A, and B, two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. *Phytochemistry* 2006, 67, 1957-1963.
- Teponno, R. B.; Tapondjou, A. L.; Hyun, J.-J.; Nam, J.-H.; Tane, P.; Park, H.-J. Three new clerodane diterpenoids from the bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var. sativa. *Helv Chim Acta* 2007, *90*, 1599-1605.
- Wang, G.; Liu, J. S.; Lin, B. B.; Wang, G. K.; Liu, J. K. Two new furanoid norditerpenes from *Dioscorea bulbifera*. *Chem Pharm Bull* 2009, 57, 625-627.
- Tang, Y.; Xue, Y. B.; Zhou, L.; Zhang, J. W.; Yao, G. M.; Luo, Z. W.; Du, G.; Zhang, Y. H. New norclerodane diterpenoids from the tubers of *Dioscorea bulbifera*. *Chem Pharm Bull* 2014, *62*, 719-724.
- Kuete, V.; Betrandteponno, R.; Mbaveng, A. T.; Tapondjou, L. A.; Meyer, J. J.; Barboni, L.; Lall, N. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*. *BMC Complement Altern Med* 2012, *12*, 228.

- Liu, H.; Chou, G.-X.; Wu, T.; Guo, Y.-L.; Wang, S.-C.; Wang, C.-H.; Wang, Z.-T. Steroidal Sapogenins and Glycosides from the Rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. *J Nat Prod* 2009, 72, 1964-1968.
- Liu, H.; Chou, G. X.; Wang, J. M.; Ji, L. L.; Wang, Z. T. Steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea bulbifer*a and their cytotoxic activity. *Planta Medica* 2011, 77, 845-848.
- 24. Tapondjou, L. A.; Jenett-Siems, K.; Bottger, S.; Melzig, M. F. Steroidal saponins from the flowers of *Dioscorea bulbifera* var. *sativa*. *Phytochemistry* 2013, 95, 341-350.
- 25. Gupta, D.; Singh, J. p-Hydroxy acetophenone derivatives from *Dioscorea bulbifera*. 1989, 28, 947-949.
- 26. Liu, H.; Tsim, K. W. K.; Chou, G.-X.; Wang, J.-M.; Ji, L.-L.; Wang, Z.-T. Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. *Chem Biodivers* 2011, *8*, 2110-2116.
- Chaniad, P.; Wattanapiromsakul, C.; Pianwanit, S.; Tewtrakul, S. Anti-HIV-1 integrase compounds from *Dioscorea bulbifera* and molecular docking study. *Pharm Biol* 2016, *54*, 1077-1085.
- Nguelefack, T. B.; Dutra, R. C.; Paszcuk, A. F.; Andrade, E. L.; Tapondjou, L. A.; Calixto, J. B. Antinociceptive activities of the methanol extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L. var sativa in mice is dependent of NO-cGMP-ATP-sensitive-K(+) channel activation. *J Ethnopharmacol.* 2010, *128*, 567-574.
- Mbiantcha, M.; Kamanyi, A.; Teponno, R. B.; Tapondjou, A. L.; Watcho, P.; Nguelefack, T. B. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Extracts from the Bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* (Dioscoreaceae) in Mice and Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 2011.
- Ghosh, S.; Ahire, M.; Patil, S.; Jabgunde, A.; Bhat Dusane, M.; Joshi, B. N.; Pardesi, K.; Jachak, S.; Dhavale, D. D.; Chopade, B. A. Antidiabetic Activity of Gnidia glauca and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 2012, 929051.
- Wang, J. M.; Ji, L. L.; Branford-White, C. J.; Wang, Z. Y.; Shen, K. K.; Liu, H.; Wang, Z. T. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo. *Fitoterapia* 2012, *83*, 388-394.
- 32. Cui, H.; Li, T.; Wang, L.; Su, Y.; Xian, C. J. *Dioscorea bulbifera* polysaccharide and cyclophosphamide combination enhances anticervical cancer effect and attenuates immunosuppression and oxidative stress in mice. *Sci Rep* 2016, *5*, 19185.
- 33. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A and et al. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst, 83, 757-766.
- 34. Lee DS, Jeong GS, Li B, Park H and Kim YC. (2010) Anti-inflammatory effects of sulfuretin from Rhus verniciflua Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. International Immunopharmacology, 10, 850-858.
- 35. Altmann KH and Gertsch J. (2007) Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new nicrotubule-stabilizing agents. Natural Product Reports, 24, 327-357.
- 36. H. Liu, G.X. Chou, Y.L. Guo, L.L. Ji, J.M. Wang, Z.T. Wang, Norclerodane diterpenoids from rhizomes of Dioscorea bulbifera, Phytochemistry 71 (2010) 1174–1180.
- 37. H. Liu, K.W.K. Tsim, G.-X. Chou, J.-M. Wang, L.-L. Ji, Z.-T. Wang, Phenolic compounds from the rhizomes of Dioscorea bulbifera, Chem. Biodivers. 8 (2011) 2110–2116..
- 38. L.A. Tapondjou, K. Jenett-Siems, S. Bottger, M.F. Melzig, Steroidal saponins from the flowers of Dioscorea bulbifera var. sativa, Phytochemistry 95 (2013) 341–350.
- 39. Y. Tang, Y.B. Xue, L. Zhou, J.W. Zhang, G.M. Yao, Z.W. Luo, G. Du, Y.H. Zhang, New norclerodane diterpenoids from the tubers of Dioscorea bulbifera, Chem. Pharm. Bull. 62 (2014) 719–724

- 40. N.T.T. Ngan, N.H. Hoang, N.T. Hien, N.N. Lan, N.T.K. Lien, T.H. Quang, N.X. Cuong, N.H. Nam, C. Van Minh, Cytotoxic phenanthrenes and phenolicconstituents from the tubers of Dioscorea persimilis, Phytochem. Lett. 40 (2020) 139–143.
- 41. T.H. Quang, N.V. Phong, L.N. Anh, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, N.T.T. Ngan, N.Q. Trung, N.H. Nam, C.V. Minh, Secondary metabolites from a peanut-associated fungus Aspergillus niger IMBC-NMTP01 with cytotoxic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities, Nat. Prod. Res. (2020), <u>https://doi.org/10.1080/</u> 14786419.2020.1868462.
- 42. T.H. Quang, N.V. Phong, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, N.T.T. Ngan, H. Oh, N.H. Nam, C.V. Minh, Cytotoxic and immunomodulatory phenol derivatives from a marine sponge-derived fungus Ascomycota sp. VK12, Nat. Prod. Res. (2020), https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1786829
- 43. G.-K. Wang, J. Zheng, Y.-p. Sun, W.-f. Jin, H.-w. Liu, Y. Yu, Z.-y. Zhou, J.-s. Liu, New norclerodane diterpenoids from Dioscorea bulbifera, Phytochem. Lett. 27 (2018) 59–62
- 44. L. Rakotobe, L. Mambu, A. Deville, L. Dubost, V. Jeannoda, D. Rakoto,
 B. Bodo, Clerodane and 19-norclerodane diterpenoids from the tubers of Dioscorea antaly, Phytochemistry 71 (2010) 1007–1013.
- 45. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, F. Ding Williams, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L.

Martin,K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian 16 Rev. C.01, Gaussian,Inc, Wallingford, CT, 2016

- 46. N.M. O'Boyle, T. Vandermeersch, C.J. Flynn, A.R. Maguire, G.R. Hutchison, Confab-systematic generation of diverse low-energy conformers, J. Cheminform. 3 (2011) 1–9.
- 47. T. Bruhn, A. Schaumloffel, "Y. Hemberger, G. Bringmann, SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra, Chirality 25 (2013) 243–249.
- T. Bruhn, A. Schaumloffel, "Y. Hemberger, G. Pescitelli, SpecDis version 1.71, Berlin, Germany. https://specdis-software.jimdo.com, 2017
- 49. C.-R. Su, Y.-F. Ueng, N.X. Dung, M. Vijaya Bhaskar Reddy, T.-S. Wu, Cytochrome P3A4 inhibitors and other constituents of *Fibraurea tinctoria*, J. Nat. Prod. 70 (2007) 1930–1933
- 50. N.H.T. Phan, N.T.D. Thuan, N.T.T. Hien, P.V. Huyen, N.H.H. Duyen, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, T.H. Quang, N.H. Nam, C.V. Minh, Polyacetylene and phenolicconstituents from the roots of *Codonopsis javanica*, Nat. Prod. Res. (2020), https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1833200.
- 51. Y. Ida, S. Kubo, M. Fujita, T. Komori, T. Kawasaki, Furanoidnorditerpene aus Pflanzen der Familie Dioscoreaceae, V, Struktur der Diosbulbine-D, -E, -F, -G und -H 1978 (1978) 818–833
- 52. A. Lentini, J. Webster, B. Ternai, T. Komori, The 1H and 13C NMR spectra of some furanoid norditerpenes, Magn. Reson. Chem. 24 (1986) 646–648
- 53. K. Kidyu, H. Thaisuchat, P. Meepowpan, S. Sukdee, N. Nuntasaen, S. Punyanitya, W. Pompimon, New clerodane diterpenoid from the bulbils of *Dioscorea bulbifera*, Nat. Prod. Commun. 6 (2011) 1069–1072

Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fitote

Anti-inflammatory norclerodane diterpenoids and tetrahydrophenanthrene from the leaves and stems of *Dioscorea bulbifera*

Nguyen Thi Thanh Ngan^{a,*}, Nguyen Huy Hoang^a, Vu Van Truong^a, Nguyen Thu Hien^a, Nguyen Ngoc Lan^a, Nguyen Van Tung^a, Pham Thi Mai Huong^b, Hyuncheol Oh^c, Tran Hong Quang^{b,*}

^a Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi 10072, Viet Nam

^b Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi 10072, Viet Nam

^c College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords: Dioscorea bulbifera Dioscoreaceae Norclerodane diterpenoid Tetrahydrophenanthrene Cytotoxic Anti-inflammatory

ABSTRACT

Chemical investigation of the leaves and stems of *Dioscorea bulbifera* resulted in isolation of 10 compounds, including three new norclerodane diterpenoids, diosbulbiferins A (1) and B (2) and diosbulbiferinoside A (3), and one new natural congener, diosbulbiferin C (4), along with one new tetrahydrophenanthrene, diosbulbinone (8). Their structures were elucidated by comprehensive analyses of spectroscopic methods, including NMR and mass spectra. The absolute configurations of compounds 1–3 and 8 were deduced by time-dependent density functional theory (TD-DFT) electronic circular dichroism (ECD) spectroscopic analyses. In addition, cytotoxic effects against MCF-7, HepG2, and SK-Mel-2 cancer cells and *in vitro* anti-inflammatory effects of the isolated compounds in LPS-stimulated BV2 microglial cells were also reported.

1. Introduction

Dioscorea bulbifera L. (Dioscoreaceae family) is a perennial creeper, with a smooth and round stem and a large tuberous rhizome. Its leaves are solitary, staggered, heart-shaped, with egg or spherical-shaped small tubers at the axillaries. It is distributed in the Asian countries, such as India, Myanmar, China, Japan, North Korea, Cambodia, and Vietnam, as well as in Australia and Africa [1]. The aerial bulbils of the plant can be used as food after hard boiling. In the Vietnamese traditional medicine, the plant has been used to treat goiter, tuberculosis lymphadenitis, stomach and intestinal ulcers, hemoptysis, vomiting blood, and nosebleed. The bulbils have also been used to treat pertussis, headaches, and cancer or externally used to treat boils, snake bites, rabies bites [1]. The rhizomes and bulbils of the plant have been reported to have a wide range of pharmacological effects, including analgesic and antiinflammatory [2], anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic [3], antimicrobial [4], and anti-tumor activities [5]. Besides, the methanol extract of the D. bulbifera leaves has been shown to possess cytotoxic and antioxidant activities [6]. Although the clerodane diterpenoids, phenolics, steroidal saponins, and sapogenins have been well demonstrated as the major constituents of D. bulbifera rhizomes and bulbils [7-10], little is known about the chemical composition of the leaves and stems of this medicinal plant. In our ongoing search for bioactive phytochemicals from *Dioscorea* species [11], we report herein the isolation and structural elucidation of 10 secondary metabolites, including four new compounds (1–3 and 8) and one new natural product (4). In addition, cytotoxic and *in vitro* anti-inflammatory effects of the isolated compounds were also evaluated.

2. Experimental

2.1. Plant material

The leaves and stems of *Dioscorea bulbifera* were collected in Me Linh, Vinh Phuc province, Vietnam during November 2018. The plant sample was identified by Dr. Nguyen The Cuong, Institute of Ecology and Biological Resources, VAST. A voucher specimen (NCHG.DB.11–2018) was deposited at the Institute of Genome Research, VAST.

2.2. Extraction and isolation

The dried and powdered leaves and stems of D. bulbifera (2.0 kg)

* Corresponding authors. E-mail addresses: nguyenthithanhngan@igr.ac.vn (N.T.T. Ngan), quangtranhong@imbc.vast.vn (T.H. Quang).

https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104965

Received 15 April 2021; Received in revised form 6 June 2021; Accepted 10 June 2021 Available online 12 June 2021 0367-326X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.







Table 1

The NMR data of compounds 1.

		-			
Position	${\delta_C}^{a,b}$	$\delta_{\rm H}^{\rm a,c}$ (J in Hz)	${\delta_C}^{d,e}$	$\delta_{\rm H}^{\rm d,f}(J \text{ in Hz})$	NOESY
1	26.8	1.79	28.2	H _a : 1.95	
		1.36 (td, 2.5,		H _b : 1.45 (br t, 13.8)	
		14.5)			
2	68.5	4.97 (br s-	69.9	5.13 (br t-like, 1.8)	1, 3, OAc
		like)			
3	25.2	2.18 (br d,	26.4	H _a : 2.47 (br d, 15.6)	
		15.5)		H _b : 1.92 (ddd, 3.6,	
		1.85		7.8, 15.6)	
4	39.8	2.94 (t, 6.0)	41.5	2.94 (t, 7.2)	5, 6
5	37.0	2.38 (m)	38.8	2.48	b-1, 4, 6,
					20
6	75.6	4.50 (q, 4.0)	77.2	4.58 (q, 3.6)	4, 5
7	24.2	2.65 (dt, 4.0,	25.4	H _a : 2.90 (dt, 3.6,	
		15.5)		15.6)	
		2.16		H _b : 2.28 (dt, 6.0,	
				15.6)	
8	44.9	2.50	46.6	2.52	20
9	32.7	-	34.0		
10	29.1	1.80	30.5	2.01	12
	38.7	2.10 (dd, 3.0,	40.6	H _a : 2.25 (dd, 3.0,	
		14.5)		15.0)	
		1.89		H _b : 1.89 (br d, 15.0)	
12	69.4	5.35 (dd, 3.0,	71.5	5.45 (dd, 2.4, 12.6)	10
		12.5)			
13	125.0	-	125.6		
14	108.9	6.61 (d, 1.0)	109.0	6.49 (s)	
15	143.9	7.67 (t, 1.5)	144.7	7.48 (d, 1.2)	
16	140.3	7.75 (s)	140.7	7.55 (s)	
17	171.4	-	173.8		
18	177.4	-	179.2		
20	20.4	0.98 (s)	21.2	1.11 (s)	b-1, 5, 8
2-OAc	169.6		171.8		
	21.0	1.92 (s)	21.4	2.03 (s)	2

Overlapped signals are shown without multiplicity.

All the assignments were done by HSQC, HMBC, and COSY spectra.

^a Recorded in DMSO-d₆.

^b 125 MHz.

^c 500 MHz.

^d In CD₃OD.

^e 150 MHz.

^f 600 MHz.

were extracted with MeOH by maceration at the room temperature. The MeOH extract was concentrated to a residue (190 g) which was then suspended in H₂O and partitioned successively with n-hexane and CH₂Cl₂ to afford *n*-hexane, CH₂Cl₂, and water soluble extracts. The CH₂Cl₂ extract was evaporated and then subjected to a fractionation over silica gel, eluted with decreasing rates of n-hexane (100-10%) in acetone and finally washed with MeOH to yield five fractions (D1-D10). D1 was chromatographed over Sephadex LH-20, eluting with MeOH-H₂O (1:1, ν/ν) and further purified by reversed-phase (RP) C₁₈ column chromatography (CC), using MeOH-H₂O (1:2, ν/ν) as eluent to provide 8 (1.9 mg). D2 was chromatographed over RP C₁₈ resin, eluting with MeOH-H₂O (1:2, ν/ν) to give three subfractions (D2.1–D2.3). D2.1 was further purified by silica gel CC, using CH_2Cl_2 -MeOH (35:1, ν/ν) as eluent to give 6 (21 mg). D2.2 was subjected to purification using silica gel CC and CH₂Cl₂-acetone (20:1, ν/ν) as a mobile phase to release 7 (2.3 mg). D4 was introduced to fractionation over RP C₁₈ resin, using a gradient elution of MeOH (50-100%) in H₂O to afford five subfractions (D4.1-D4.5). D4.2 was then separated by silica gel CC, eluting with nhexane-EtOAc (1:3, v/v) to give 4 (2.5 mg). D4.5 was purified using silica gel CC and CH₂Cl₂-MeOH (30:1, ν/ν) to provide 1 (3.5 mg). The water soluble extract was separated by Diaion HP-20 CC, using gradient elution of MeOH in H₂O to provide three fractions (W1–W3). W3 was separated by RP C_{18} CC, eluting with increasing ratio of MeOH in $\mathrm{H_{2}O}$ (1:1 to 5:1, v/v) and eventually washed with MeOH to give five subfractions (W3.1-W3.5). W3.1 was separated by silica gel CC, eluting with CH₂Cl₂-MeOH (11:1, ν/ν) and subsequently purified by Sephadex

Table 2	
The NMR data of compounds 2 and 3 .	

Position	2	-		3		
	$\delta_{C}^{a,b}$	δ _H ^{a,c} (J in Hz)	NOESY	$\delta_{C}{}^{b,c}$	δ _H ^{c,d} (J in Hz)	NOESY
1	29.8	H _a : 1.60 H _b : 1.22 (td, 2.0, 13.0)		31.5	H _a : 2.07 H _b : 1.60 (td, 2.0, 14.0)	
2	63.4	4.04 (br s-like)	1, 3, 5, 2- OH	70.1	5.12 (br t-	1, 3
3	38.0	H _a : 2.27 (br d, 14.0) H _b : 1.63 (dd, 4.0, 14.0)		32.2	$H_{a}: 2.58 \\ (dd, 2.0, 15.0) \\ H_{b}: 1.95 \\ (ddd, 2.0, 7.0, 15.0)$	
4	74.7	-		38.4	3.48 (m)	3, 5
5	45.0	2.02 (dd, 4.0, 12.5)	b-1, 2, 6, 20, 4-OH	49.9	2.52 (dd, 7.5, 12.0)	b-1, b-3, 4, 8, 20
6	74.1	4.76 (m)	5, 4-OH	208.5	-	
7	23.9	H _a : 2.65 (dt, 4.0, 15.5) H _b : 2.12		38.0	H _a : 3.22 (dd, 1.0, 17.0) H _b : 2.80 (dd, 7.5, 17.0)	
8	44.6	2.45 (q, 3.5)	20	49.8	2.99	20
9	32.8	-		35.7	-	
10	28.1	1.81	a-1, b-3, 12	33.5	2.99	12
11	39.0	H _a : 2.11 H _b : 1.83		40.3	H _a : 2.35 (dd, 4.0, 15.0) H _b : 2.09	
12	69.4	5.39 (dd, 3.0, 12.5)	10	72.4	5.42 (dd, 3.5, 9.0)	10
13	125.3	-		126.5	-	
14	109.1	6.60(d, 1.0)		109.6	6.58 (dd, 0.5, 1.5)	
15	143.8	7.50 (t,		145.1	7.54 (d,	
16	140.1	7.61 (dd, 0.5, 1.5)		141.3	7.62 (s)	
17	171.3	-		173.5	-	
18	176.1	-		173.9	-	
20	20.5	0.97 (s)	b-1, 5, 8	20.8	1.31 (s)	b-1, 5, 8
2-OAc	-	-		172.6 21.4	2.06 (s)	
2-OH	-	4.56 (d, 2.0)	2	-	-	
4-OH	-	5.89 (br s)	b-3, 5, 6	-	-	
1′	-	_		96.3	5.42 (d, 8.0)	
2'	-	-		74.0	3.36 (d, 8.0, 9.0)	
3′	-	_		78.0	3.41	
4′	_	_		70.9	3.40	
5'	_	_		78.9	3.39 (m)	
6'	_	_		62.2	Ha: 3.84	
-					(dd, 1.5, 12.0)	
					H _b : 3.73	
					(dd, 4.0, 12.0)	

Overlapped signals are shown without multiplicity;

All the assignments were done by HSQC, HMBC, and COSY spectra.

^a Recorded in DMSO-d₆.

^b 125 MHz.

^c 500 MHz.

^d In CD₃OD.

Table 3

The NMR data for compound 8.

	-		
Position	$\delta_{C}^{\ \ a,b}$	$\delta_{\rm H}^{\rm a,c}$ (mult., J in Hz)	NOESY
1	72.5	4.90 (d, 6.0)	b-3, 10
2	81.8	3.83 (m)	a-3
3	43.6	H _a : 3.29 (dd, 4.0, 17.5)	
		H _b : 2.79 (dd, 8.0, 17.5)	
4	200.3	-	
4a	125.7	-	
4b	127.5	-	
5	106.8	8.98 (s)	6-OCH ₃
6	152.7	_	
7	148.3	-	
8	111.3	7.19 (s)	9
8a	131.8	-	
9	134.5	7.93 (d, 8.5)	8
10	125.0	7.61 (d, 8.5)	1
10a	144.1	_	
2-OCH ₃	57.5	3.50 (s)	b-3
6-OCH ₃	56.2	4.03 (s)	5

^a Recorded in CD₃OD.

^b 125 MHz.

^c 500MHz.

LH-20 CC, using MeOH-H₂O (1:1, ν/ν) to release **10** (2 mg). W3.2 was separated by RP C₁₈ CC, eluting with MeOH-H₂O (1:1, ν/ν) and further purified by silica gel CC, eluting with CH₂Cl₂-acetone (5:1, ν/ν) to afford **5** (2.5 mg). Similarly, compound **2** (2.1 mg) was isolated from W3.3 by silica gel CC, using CH₂Cl₂-acetone (5:1, ν/ν) as the mobile phase. W3.4 was separated over RP C₁₈ resin, eluting with MeOH-H₂O (1:1, ν/ν) to give four subfractions (W3.4.1–W3.4.4). W3.4.2 was separated by silica gel CC using CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (5,1:0.1, $\nu/\nu/\nu$) as eluent and then purified using RP C₁₈ CC and MeOH-H₂O (1,3, ν/ν) as the mobile phase to release **9** (8 mg). W3.4.3 was passed through Sephadex LH-20, eluting with MeOH-H₂O (1,1, ν/ν) and further purified by RP C₁₈ CC, using acetone-H₂O (1,3.5, ν/ν) as eluent to provide **3** (3.0 mg).

Diosbulbiferin A (1): white, amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} = +55$ (c = 0.1, DMSO); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 220 (3.00), 208 (4.02) nm; IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 2921, 2850, 1771, 1730, 1570, 1370, 1258, 1149, 1055, 1018, 874, 750, 603; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 223 (-5.99) nm; HRESIMS: m/z 423.1207 [M + Cl]⁻ (calcd for C₂₁H₂₄O₇Cl⁻, 423.1216); ¹H (DMSO- d_6 , 500 MHz and CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR data (DMSO- d_6 , 125 MHz and CD₃OD, 150 MHz): see Table 1.

Diosbulbiferin B (2): white, amorphous powder; $[a]_D^{25} = +66$ (c = 0.1, DMSO); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 221 (3.07), 208 (3.97) nm; IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3406, 3279, 2919, 2851, 1791, 1717, 1502, 1467, 1383, 1310, 1271, 1177, 1151, 1027, 874, 792, 602; ECD (MeOH) λ_{max} (Δ ε): 206 (+3.25), 232 (+4.74) nm; HRESIMS: m/z 397.1056 [M + Cl]⁻ (calcd for C₁₉H₂₂O₇Cl⁻, 397.1054); ¹H (DMSO- d_6 , 500 MHz) and ¹³C NMR data (DMSO- d_6 , 125 MHz): see Table 2.

Diosbulbiferinoside A (3): white, amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} = +23$ (c = 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 221 (3.33), 208 (4.20) nm; IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3371, 2918, 2851, 1783, 1731, 1593, 1466, 1375, 1248, 1195, 1063, 1023, 876, 790, 603; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 231 (-3.90), 283 (+1.38) nm; HRESIMS: m/z 601.1682 [M + Cl]⁻ (calcd for C₂₇H₃₄O₁₃Cl⁻, 601.1693); ¹H (DMSO- d_6 , 500 MHz) and ¹³C NMR data (DMSO- d_6 , 125 MHz): see Table 2.

Diosbulbiferin *C* (4): white, amorphous powder; $[a]_D^{25} = -68$ (*c* = 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 219 (3.55), 208 (4.25) nm; IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3445, 2918, 2851, 1766, 1716, 1504, 1467, 1299, 1207, 1150, 1022, 979, 875, 735, 603; HRESIMS: *m/z* 379.0951 [M + Cl]⁻ (calcd for C₁₉H₂₀O₆Cl⁻, 379.0954); ¹H NMR data (CDCl₃, 500 MHz): $\delta_{\rm H}$ 3.19 (m, H-4), 2.53 (m, H-5), 4.68 (q, *J* = 4.5 Hz, H-6), 2.44 (dd, *J* = 4.0, 6.5 Hz, H-8), 1.95 (td, *J* = 3.5, 13.5 Hz, H-10), 5.37 (dd, *J* = 3.0, 12.5 Hz, H-12), 6.41 (dd, *J* = 0.5, 1.0 Hz, H-14), 7.41 (t, *J* = 1.5 Hz, H-15), 7.47 (d, *J* = 0.5 Hz, H-16), 1.12 (s, H₃–20). ¹³C NMR data (CDCl₃, 125 MHz): 39.1 (C-1), 206.2 (C-2), 36.6 (C-3), 40.8 (C-4), 37.7 (C-5), 75.0 (C-6), 24.4 (C-7), 45.2 (C-8), 33.7 (C-9), 33.8 (C-10), 39.9 (C-11),

69.9 (C-12), 124.4 (C-13), 108.3 (C-14), 143.8 (C-15), 139.8 (C-16), 170.1 (C-17), 176.4 (C-18), 21.2 (C-20).

Diosbulbinone (8): white, amorphous powder; $[a]_D^{25} = -33$ (c = 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 352 (3.84), 246 (4.32), 225 (4.58) nm; IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3301, 2918, 2850, 1735, 1661, 1516, 1487, 1446, 1269, 1106, 874, 795; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \varepsilon$): 212 (-1.21), 229 (+1.85), 262 (-0.36), 320 (+0.25), 371 (-0.54) nm; HRESIMS: m/z 289.1078 [M + H]⁺ (calcd for C₁₆H₁₇O⁺₅, 289.1071); ¹H (CD₃OD, 500 MHz) and ¹³C NMR data (CD₃OD, 125 MHz), see Table 3.

2.3. Cytotoxic assay

Cytotoxicity of the compounds toward three human cancer cell lines, including MCF-7, HepG2, and SK-Mel-2 were evaluated using SRB assay [12] (see Supplementary material).

2.4. Anti-inflammatory assay

In vitro anti-inflammatory effects of the isolated compounds were examined through inhibition of NO overproduction in LPS-stimulated BV2 cells using the Griess assay [13] (see Supplementary material).

3. Results and discussion

Compound 1 was given as a white, amorphous powder. Its molecular formula was established as $C_{21}H_{24}O_7$ by the chloride adduct ion at m/z423.1207 present in the negative HRESIMS, implying 10 degrees of unsaturation. In the ¹H NMR spectrum (in DMSO- d_6), signals for three olefinic protons at $\delta_{\rm H}$ 6.61 (d, J = 1.0 Hz, H-14), 7.67 (t, J = 1.5 Hz, H-15), and 7.75 (s, H-16) were observed, suggesting the presence of a β -substituted furan ring. The ¹H NMR spectrum additionally showed signals for three oxymethine groups at $\delta_{\rm H}$ 4.97 (br s-like, H-2), 4.50 (q, J = 4.0 Hz, H-6), and 5.35 (dd, J = 3.0, 12.5 Hz, H-12) and an angular methyl at δ_{H} 0.98 (s, H_3–20). Analysis of the ^{13}C NMR and HSQC spectra (in DMSO- d_6) revealed 21 signals, including three carbonyl carbons at δ_C 171.4 (C-17), 177.4 (C-18), and 169.6 (2-OAc), four sp² carbons of the β -substituted furan ring, three oxymethines, four methylenes, and one methyl carbon. This spectroscopic data suggested that 1 has the norclerodane-type diterpenoid skeleton, one of the major constituents of this medicinal plant [7,10,14]. Accordingly, comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those of the previously reported 19-norclerodane diterpenoid, 8-epidioscbulbin G resulted in the close similarity, except for the additionally presence of signals for an acetyl group [$\delta_{\rm C}$ 169.6 and $\delta_{\rm C}$ 21.0/ $\delta_{\rm H}$ 1.92 (s)] in 1 [15]. This was confirmed by the deshielded chemical shift of C-2 at δ_C 68.5 and an NOE correlation between δ_H 1.92 and 4.97 (H-2) (Table 1). The relative configuration of 1 was deduced by an analysis of the NOESY spectrum (Fig. 2) as well as comparison with that of 8-epidioscbulbin G [15]. In the NOESY spectrum acquired in CD₃OD, a proton signal at $\delta_{\rm H}$ 5.13 (H-2) exhibited interactions with $\delta_{\rm H}$ 1.95 (H_a-1), 1.45 (H_b-1), 2.47 (H_a-3), and 1.92 (H_b-3) but not with $\delta_{\rm H}$ 2.01 (H-10 α), suggesting that H-2 is β -oriented. In addition, the small vicinal coupling constants (${}^{3}J = 1.8-3.6$ Hz) between H-2/H₂-1 and between H-2/H2-3 were consistent with equatorial-equatorial and equatorial-axial relationships between H-2 and H₂-1/H₂-3, supporting the β -equatorial position of H-2. This assignment was also in a good agreement with those of the norclerodane congeners reported previously from D. bulbifera [7,10]. An NOE cross peak observed between H- $5/H_3$ -20 revealed that these protons are located on the same side of the molecule and the ring A is trans-fused to ring B. This was consistent with the biosynthetic pathway of the norclearodane diterpenoids previously isolated from D. bulbifera [7,10,14]. In addition, NOE correlations between H-5/H-4/H-6 and between H₃-20/H-8 were also observed, suggesting that these protons are β -oriented and the δ -lactone (ring C) is *cis*fused to ring B. On the other hand, an NOE correlation between H-10 and H-12 suggested that both protons are oriented toward the α face of the molecule. Finally, the absolute configuration of 1 was determined by



Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-10.



Fig. 2. Selected COSY, HMBC, and NOESY correlations of 1-3 and 8.

comparison of experimental and calculated ECD spectroscopic data using Gaussian program [16]. Conformational search for the given structure was initially implemented using MMFF force field (Spartan'18 program), then optimization of the selected conformers were conducted using b3lyp/6-311 g(d,p) basic set and the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) in MeOH [17]. ECD spectroscopic calculation for the conformers were next carried out using TDDFT by Gaussian 16 W [16]. Finally, the computed ECD spectra were simulated using SpecDis 1.71 program [18,19]. As depicted in Fig. 3, the calculated ECD spectrum for the 2*R*,4*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*S*,10*R*,12*S*-isomer of 1 was shown to have an excellent fit with that of the experimental ECD evidence, whereas its enantiomer exhibited the mirrored calculated ECD spectrum, leading to an assignment of the gross structure of 1 (Fig. 1). On the basis of the aforementioned analysis, 1 was identified as a new compound, namely diosbulbiferin A.

Compound 2 was isolated as a white, amorphous powder and its



Fig. 3. Experimental and calculated ECD spectra for 1-3 and 8.

molecular formula, C19H22O7 was established by the negative HRESIMS: m/z 397.1056 [M + Cl]⁻ (calcd for C₁₉H₂₂O₇Cl⁻, 397.1054). Analysis of the ¹H and ¹³C NMR, as well as HSQC spectra revealed that this is also a norclerodane diterpenoid (Table 2). Accordingly, its ¹H and ¹³C NMR data were found to be in a close proximity with those of 1, except for the missing signals of the acetyl group at C-2 in 2 and a replacement of a methine group in 1 by a non-protonated carbon bearing oxygen [δ_C 74.7 (C-4)] in 2. This was in a good agreement with the difference in molecular formula between both compounds, where 2 has less two carbons and two protons than that of 1. The location of the hydroxy group at C-2 of 2 was clearly recognized by the upfield shift of the oxymethine carbon signal at δ_H 63.4 (C-2) [vs. 68.5 (C-2) in 1] and HMBC correlations from $\delta_{\rm H}$ 4.56 (2-OH) to C-1, C-2, and C-3 (Fig. 2). Furthermore, the attachment of a hydroxy group at C-4 of 2 was confirmed by HMBC cross-peaks from both H₂-3 and H-5 to C-4 as well as an NOESY correlation between $\delta_{\rm H}$ 5.89 (4-OH) and $\delta_{\rm H}$ 1.63 (H_b-3). As shown in Table 2, the small coupling between H_{b} -1/H-2 (J = 2.0 Hz) and between H_{b} -3/H-2 (J = 4.0 Hz), along with the peak shape "br s-like" of H-2, implied that H-2 has equatorial-equatorial and equatorial-axial interactions with H2-1/H2-3. Furthermore, NOE correlations observed from H-2 to H2-1, H2-3, and H-5 β , together with the lack of an NOE interaction between H-2 and H-10 α (Table 2), revealed that H-2 possesses a β -equatorial position [7,10]. NOE interactions between H-5/H-6, H-5/H₃-20, H-6/4-OH, and between H₃-20/H-8 revealed that these protons are located on the same spatial side of the molecule (Fig. 2). In addition, H-10 was shown to have an NOE interaction with H-12, indicating that both protons are α -oriented. On the basis of the spectroscopic analyses, the relative configuration of 2 was suggested to be similar with that of 1. The absolute configuration of 2 was subsequently clarified by ECD spectroscopic analysis by TDDFT-Gaussian 16 W program using mpw1pw91/6-311 g (d,p) basic set [16]. As the result, the experimental ECD spectrum of 2 showed positive Cotton effects at 206 (+3.25) and 232 (+4.74) nm, which were in a good agreement with the computed ECD data for the (2R,4S,5R,6S,8R,9S,10R,12S) stereoisomer (Fig. 3). Thus, the gross structure of 2 was elucidated as shown in Fig. 1, named diosbulbiferin B.

It is noted that the formation of the hydroxy group at C-4 in the presence of the γ -lactone bridge between C-2 and C-4 in the structure of **2** is rarely found among the norclerodane-type diterpenoids reported so far [20].

Compound 3 was obtained as a white, amorphous powder. Its molecular formula was established as C27H34O13 based on the chloride adduct ion at m/z 601.1682 [M + Cl]⁻ (calcd for C₂₇H₃₄ClO₁₃, 601.1693) in the HRESIMS. Detailed analysis of the ¹H and ¹³C NMR and HSQC spectra of 3 indicated that this is a norclerodane diterpenoid glycoside. Acid hydrolysis followed by RP HPLC analysis of the thiocarbamoyl-thiazolidine products resulted in the identification of Dglucose [21]. The typical signals for the anomeric position at $\delta_{\rm H}$ 5.42 (d, J = 8.0 Hz, H-1')/ $\delta_{\rm C}$ 96.3 (C-1'), along with carbon signals of four oxymethines at δ_{C} 74.0, 78.0, 70.9, and 78.9, and one oxymethylene at $\delta_{\rm C}$ 62.2, revealed that **3** contained a β -glucopyranosyl moiety. The remaining 21 carbon signals of the 19-norclerodane diterpenoid, including four carbonyl carbons at δ_C 208.5 (C-6), 173.5 (C-17), 173.9 (C-18), and 172.6 (2-OAc), two sp³ oxymethines at $\delta_{\rm C}$ 70.1 (C-2) and 72.4 (C-12), four sp³ methines, four sp³ methylenes, one sp³ nonprotonated carbon at δ_C 35.7 (C-9), one angular methyl at δ_C 20.8 (C-20), and four sp² carbons of the furan ring were also recognized. Comparison of the ¹H and ¹³C NMR data of **3** with those of diosbulbin K resulted in the close resemblance, except for the addition of an acetyl group [δ_C 172.6 and 21.4/ δ_H 2.06 (s)] in **3** and the replacement of a methyl ester in diosbulbin K by a glucose unit in 3 [7]. The location of the acetyl group at C-2 of the aglycone was assigned by the downfield chemical shift of C-2 at δ_C 70.1 as well as NOE correlations of δ_H 2.06 with both H_b-1 and H-2. The glucose moiety was attached to C-18 of the aglycone via a glycosidic linkage by an HMBC correlation observed from H-1' to C-18 (Fig. 2). The relative configuration of 3 was determined by the NOESY experiment in comparison with those of C-8 stereoisomers, diosbulbins K and L [7]. The trans-fusion of the rings A and B was deduced by NOE correlations between H-5/H $_3$ -20 and between H-10/H-12, whereas an NOE interaction between H-8 and H-20 was indicative of the cis-fusion of rings B and C (Fig. 2). Similarly as in case of 1 and 2, the β -equatorial position of H-2 of **3** was deduced by the small ${}^{3}J_{1,2}$ and ${}^{3}J_{3,2}$

coupling constants (J = 2.0 Hz), along with NOE correlations between H-2/H₂–1 and between H-2/H₂–3 and the absence of an NOE interaction between H-2 and H-10 α (Table 2). Finally, the absolute configuration of **3** was clarified by ECD spectroscopic analysis using b3lyp/6-311 g(d,p) basic set, Gaussian 16 W. As shown in Fig. 3, the calculated ECD curves for the 2*R*,4*R*,5*S*,8*R*,9*S*,10*R*,12*S*-isomer showed a good fit with the experimental ECD spectrum, while the reversed curves were observed for the enantiomer, therefore confirming the stereochemistry of **3** as depicted in Fig. 1. Consequently, the new structure of **3** was concluded as shown, namely diosbulbiferinoside A.

Compound 8 was obtained as a colorless gum. Its HRESIMS exhibited a quasi-molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 289.1078 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{16}H_{17}O_5^+$, 289.1071), corresponding with the molecular formula of C₁₆H₁₆O₅, with nine indexes of hydrogen deficiency. The ¹H NMR spectrum contained signals for two ortho-coupling aromatic protons at $\delta_{\rm H}$ 7.93 and 7.61 (each, d, J = 8.5 Hz, H-9 and H-10) and two aromatic protons with para-coupling relationship at $\delta_{\rm H}$ 8.98 and 7.19 (each s, H-5 and H-8), suggesting that 8 possesses one 1,2,3,4-tetrasubstituted and one 1,2,4,5- tetrasubstituted aromatic ring, respectively. In addition, signals for two oxygenated protons at $\delta_{\rm H}$ 4.90 (d, J = 6.0 Hz, H-1) and 3.83 (m, H-2) and two methoxy groups at $\delta_{\rm H}$ 3.50 (s, 2-OCH₃) and 4.03 (s, 6-OCH₃) were also observed in the ¹H NMR spectrum. Analysis of 13 C NMR and HSQC spectra pointed out the presence of 11 sp² carbons [including one carbonyl carbon at δ_{C} 200.3 (C-4), four aromatic methines, and six aromatic non-protonated carbons] and five sp³ carbons of which two oxymethines at δ_C 72.5 (C-3) and 81.8 (C-4), one methylene at δ_{C} 43.6 (C-3) and two methoxy groups were recognized (Table 3). This spectroscopic evidence suggested that 8 belongs to the 1,4-phenanthraquinone family which has been reported in several Dioscorea species [22,23]. Comparative analysis of the ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of 8 with those of the reported 1,4-phenanthraquinone derivative, dioscoreanone revealed that both structures are closely related, except for the replacement of the carbonyl carbon (C-1) in dioscoreanone by one oxygenated methine carbon at δ_C 72.5 in 8, suggesting that 8 is a tetrahydrophenanthrene. This feature was confirmed by a COSY correlation between H-2 and H-1 and HMBC crosspeaks from H-2, H₂–3, and H-10 to C-1 (Fig. 2). Furthermore, the location of two methoxy groups at C-2 and C-6 were approved by HMBC correlations from δ_H 3.50 to C-2 and from δ_H 4.03 to C-6, respectively. The relative large coupling value between H-1 and H-2 (J = 6.0 Hz) suggested that both protons have an axial-axial *trans* relationship [24], which was further supported by NOESY correlations between H-1 and H_b-3 and between H-2 and H_a-3. In addition, the proton signal of H_b-3 showed an NOE correlation with 2-OCH₃, suggesting that H_b-3, 2-OCH₃, and H-1 are cofacial. The stereochemistry of 8 was then confirmed by TD-DFT ECD spectroscopic analysis using b3lyp/6-311++g(d,p) basic set, Gaussian 16 W [16]. As shown in Fig. 3, the calculated ECD spectrum for the (1R, 2R)-steroisomer of **8** was in a good agreement with that of the experimental ECD evidence, while calculated ECD spectrum for the (1S,2S)-isomer showed the mirrored image. Thus, the gross structure of 8 was established as (1R,2R)-1,7-dihydroxy-2,6-dimethoxy-2,3dihydrophenanthren-4(1H)-one, named diosbulbinone.

By using the similar NMR and HRESIMS spectroscopic analysis, the structure of **4** was established as shown in Fig. 1. Since the structure was reported previously as an unnamed synthetic product [25], **4** was therefore considered as a new natural compound, named diosbulbiferin C.

The remaining compounds were identified as 8-epidiosbulbin G (5) [15], diosbulbin D (6) [26], 15,16-epoxy- 6α -O-acetyl-8b-hydroxy-19nor-clero-13(16),14-diene-17,12;18,2-diolide (7) [27], corchoionoside C (9) [28], and (*Z*)-3-hexenyl-1-O- β -D-glucopyranoside (10) [29] by comparative analysis of their NMR data with those reported in the literature.

All of the isolated compounds were evaluated for their cytotoxic activity against three human cancer cell lines, including MCF-7, HepG2, and SK-Mel-2 using SRB assay [12]. However, none of the compounds

Table 4

Nitric oxide inhibitory effects of **1–10** in LPS-stimulated BV2 cells.

Compound	IC ₅₀ values (µM) ^a	
1	14.8 ± 0.7	
2	35.4 ± 1.8	
3	37.1 ± 1.9	
4	30.3 ± 3.6	
5	54.0 ± 2.7	
6	31.3 ± 1.6	
7	32.4 ± 1.6	
8	$\textbf{27.2} \pm \textbf{1.4}$	
9	23.9 ± 1.2	
10	>80 ^c	
Buletin ^b	$\textbf{4.3}\pm\textbf{0.1}$	
^a Mean \pm SD ($n = 3$).		
^b Positive control		

rositive ee

^c Inactive.

exhibited significant cytotoxicity at the tested concentration up to 100 $\mu M.$

The *in vitro* anti-inflammatory effects of the compounds were also examined through inhibition of the nitric oxide (NO) overproduction in LPS-stimulated BV2 cells. As the result, among the tested 19-norclero-dane diterpenoids, **1** was shown to have the best NO inhibitory effect, with an IC₅₀ value of 14.8 \pm 0.7 μ M (Table 4); **2–4**, **6** and **7** suppressed the NO overproduction in the similar fashion, with IC₅₀ values ranging from 30.3 \pm 3.6 to 37.1 \pm 1.9 μ M, whereas **5** exhibited a weak effect, with an IC₅₀ value of 54.0 \pm 2.7 μ M. Besides, the tetrahydrophenanthrene (**8**) and the megastigmane (**9**) inhibited NO overproduction, with IC₅₀ values of 27.2 \pm 1.4 and 23.9 \pm 1.2 μ M, respectively, while **10** was inactive (IC₅₀ > 80 μ M).

4. Conclusion

In conclusion, our phytochemical study on the leaves and stems of *D. bulbifera* led to isolation and identification of 10 compounds, including three new norclerodane diterpenoids (1–3) and one new natural congener (4), along with one new tetrahydrophenanthrene (8). All of the isolated compounds, except 10, showed NO inhibitory effects in LPS-stimulated BV2 cells, with IC₅₀ values ranging from 14.8 to 54.0 μ M. However, all of the compounds were noncytotoxic toward MCF-7, HepG2, and SK-Mel-2 carcinoma cells. Our results contribute to unravelling the chemical constituents of the leaves and stems of *D. bulbifera* and provide a scientific base for further studies on mechanisms of action for 19-norclerodane diterpenoids and tetrahydrophenanthrenes with respect to the anti-neuroinflammatory activity.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by Vietnam National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED) under grant number 106.02-2017.320.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104965.

References

^[1] V.V. Chi, Dictionary of medicinal plants in Vietnam, Vietnam. Publ. Med. 1 (2012) 1207–1208.

- [2] M. Mbiantcha, A. Kamanyi, R. Teponno, A. Tapondjou, P. Watcho, T.B. Nguelefack, Analgesic and anti-inflammatory properties of extracts from the bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var sativa (Dioscoreaceae) in mice and rats, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011 (2011) 912935.
- [3] Z. Ahmed, M.Z. Chishti, R.K. Johri, A. Bhagat, K.K. Gupta, G. Ram, Antihyperglycemic and antidyslipidemic activity of aqueous extract of *Dioscorea bulbifera* tubers, Diabetol. Croat. 38 (2009) 63–72.
- [4] R.B. Teponno, A.L. Tapondjou, D. Gatsing, J.D. Djoukeng, E. Abou-Mansour, R. Tabacchi, P. Tane, H. Stoekli-Evans, D. Lontsi, Bafoudiosbulbins A, and B, two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var sativa, Phytochemistry 67 (2006) 1957–1963.
- [5] J.M. Wang, L.L. Ji, C.J. Branford-White, Z.Y. Wang, K.K. Shen, H. Liu, Z.T. Wang, Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome *in vivo*, Fitoterapia 83 (2012) 388–394.
- [6] M.M. Mainasara, M.F. Abu Bakar, A. Md Akim, A.C. Linatoc, F.I. Abu Bakar, Y.K. H. Ranneh, Secondary metabolites, antioxidant, and antiproliferative activities of *Dioscorea bulbifera* leaf collected from Endau Rompin, Johor, Malaysia, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2021 (2021) 8826986.
- [7] H. Liu, G.X. Chou, Y.L. Guo, L.L. Ji, J.M. Wang, Z.T. Wang, Norclerodane diterpenoids from rhizomes of *Dioscorea bulbifera*, Phytochemistry 71 (2010) 1174–1180.
- [8] H. Liu, K.W.K. Tsim, G.-X. Chou, J.-M. Wang, L.-L. Ji, Z.-T. Wang, Phenolic compounds from the rhizomes of *Dioscorea bulbifera*, Chem. Biodivers. 8 (2011) 2110–2116.
- [9] L.A. Tapondjou, K. Jenett-Siems, S. Bottger, M.F. Melzig, Steroidal saponins from the flowers of *Dioscorea bulbifera* var. *sativa*, Phytochemistry 95 (2013) 341–350.
- [10] Y. Tang, Y.B. Xue, L. Zhou, J.W. Zhang, G.M. Yao, Z.W. Luo, G. Du, Y.H. Zhang, New norclerodane diterpenoids from the tubers of *Dioscorea bulbifera*, Chem. Pharm. Bull. 62 (2014) 719–724.
- [11] N.T.T. Ngan, N.H. Hoang, N.T. Hien, N.N. Lan, N.T.K. Lien, T.H. Quang, N. X. Cuong, N.H. Nam, C. Van Minh, Cytotoxic phenanthrenes and phenolic constituents from the tubers of *Dioscorea persimilis*, Phytochem. Lett. 40 (2020) 139–143.
- [12] T.H. Quang, N.V. Phong, L.N. Anh, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, N.T.T. Ngan, N. Q. Trung, N.H. Nam, C.V. Minh, Secondary metabolites from a peanut-associated fungus *Aspergillus niger* IMBC-NMTP01 with cytotoxic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities, Nat. Prod. Res. (2020), https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1868462.
- [13] T.H. Quang, N.V. Phong, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, N.T.T. Ngan, H. Oh, N.H. Nam, C.V. Minh, Cytotoxic and immunomodulatory phenol derivatives from a marine sponge-derived fungus Ascomycota sp. VK12, Nat. Prod. Res. (2020), https://doi. org/10.1080/14786419.2020.1786829.
- [14] G.-K. Wang, J. Zheng, Y.-p. Sun, W.-f. Jin, H.-w. Liu, Y. Yu, Z.-y. Zhou, J.-s. Liu, New norclerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera*, Phytochem. Lett. 27 (2018) 59–62.
- [15] L. Rakotobe, L. Mambu, A. Deville, L. Dubost, V. Jeannoda, D. Rakoto, B. Bodo, Clerodane and 19-norclerodane diterpenoids from the tubers of *Dioscorea antaly*, Phytochemistry 71 (2010) 1007–1013.
- [16] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.

- V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, F. Ding Williams, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian 16 Rev. C.01, Gaussian, Inc, Wallingford, CT, 2016.
- [17] N.M. O'Boyle, T. Vandermeersch, C.J. Flynn, A.R. Maguire, G.R. Hutchison, Confab-systematic generation of diverse low-energy conformers, J. Cheminform. 3 (2011) 1–9.
- [18] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, Y. Hemberger, G. Bringmann, SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra, Chirality 25 (2013) 243–249.
- [19] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, Y. Hemberger, G. Pescitelli, SpecDis version 1.71, Berlin, Germany. https://specdis-software.jimdo.com, 2017.
- [20] C.-R. Su, Y.-F. Ueng, N.X. Dung, M. Vijaya Bhaskar Reddy, T.-S. Wu, Cytochrome P3A4 inhibitors and other constituents of *Fibraurea tinctoria*, J. Nat. Prod. 70 (2007) 1930–1933.
- [21] N.H.T. Phan, N.T.D. Thuan, N.T.T. Hien, P.V. Huyen, N.H.H. Duyen, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, T.H. Quang, N.H. Nam, C.V. Minh, Polyacetylene and phenolic constituents from the roots of *Codonopsis javanica*, Nat. Prod. Res. (2020), https:// doi.org/10.1080/14786419.2020.1833200.
- [22] A. Itharat, A. Plubrukarn, P. Kongsaeree, T. Bui, N. Keawpradub, P.J. Houghton, Dioscorealides and dioscoreanone, novel cytotoxic naphthofuranoxepins, and 1,4phenanthraquinone from *Dioscorea membranacea* Pierre, Org. Lett. 5 (2003) 2879–2882.
- [23] C. Ma, W. Wang, Y.-Y. Chen, R.-N. Liu, R.-F. Wang, L.-J. Du, Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *Dioscorea opposita*, J. Nat. Prod. 68 (2005) 1259–1261.
- [24] P. Mukherjee, T.K. Sarkar, Heteroatom-directed Wacker oxidations. A protectionfree synthesis of (–)-heliophenanthrone, Org. Biomol. Chem. 10 (2012) 3060–3065.
- [25] Y. Ida, S. Kubo, M. Fujita, T. Komori, T. Kawasaki, Furanoid-norditerpene aus Pflanzen der Familie Dioscoreaceae, V, Struktur der Diosbulbine-D, -E, -F, -G und -H 1978 (1978) 818–833.
- [26] A. Lentini, J. Webster, B. Ternai, T. Komori, The ¹H and ¹³C NMR spectra of some furanoid norditerpenes, Magn. Reson. Chem. 24 (1986) 646–648.
- [27] K. Kidyu, H. Thaisuchat, P. Meepowpan, S. Sukdee, N. Nuntasaen, S. Punyanitya, W. Pompimon, New clerodane diterpenoid from the bulbils of *Dioscorea bulbifera*, Nat. Prod. Commun. 6 (2011) 1069–1072.
- [28] M. Yoshikawa, H. Shimada, M. Saka, S. Yoshizumi, J. Yamahara, H. Matsuda, Medicinal foodstuffs. V. Moroheiya. (1): Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae), Chem. Pharm. Bull. 45 (1997) 464–469.
- [29] K.H. Lee, S.U. Choi, K.R. Lee, Sesquiterpenes from *Syneilesis palmata* and their cytotoxicity against human cancer cell lines in vitro, Arch. Pharm. Res. 28 (2005) 280–284.

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN **HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

Số: 399/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 25 tháng 04 năm 2023

QUYẾT ĐỊNH Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1502/QĐ-HVKHCN ngày 18/11/2019 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 2 năm 2019;

Căn cứ Quyết định số 319/QĐ-HVKHCN ngày 19/03/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1916/QĐ-HVKHCN ngày 17/11/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 3 cho học viên Vũ Văn Trường;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYÉT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Vũ Văn Trường với đề tài: "Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.)".

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;

- Luu: VT, ĐT, MT.14.



DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

CKèm theo Quyết định số 399 /QĐ-HVKHCN ngày 25 / 04 /2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

còng nghế kến văn của học viên: Vũ Văn Trường

Tên để tải: Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.).

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

HOC VIÊN

Người hướng dẫn: TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

- Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh	Vi sinh vật học	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Trần Minh Đức	Sinh học phân tử	Viện Công nghê sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Trương Quốc Phong	Sinh học phân tử	Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội	Phản biện 2
4.	TS. Lê Thị Nguyên Bình	Sinh học phân tử	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Khổng Ngân Giang	Sinh học	Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. M^{\prime}

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN **HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

Hà Nội, ngày 08 tháng 05 năm 2023

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 399/QĐ-HVKHCN ngày 25/04/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Vũ Văn Trường

Tên đề tài: Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây Khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.).

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 08/05/2023 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 09 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh

- 2. TS. Lê Thị Nguyên Bình
- 3. TS. Trần Minh Đức
- 4. PGS.TS. Trương Quốc Phong
- 5. TS. Khổng Ngân Giang

Chủ tịch hội đồng Thư ký hội đồng Phản biện 1 Phản biện 2 Ủy viên hội đồng



NỘI DUNG LÀM VIỆC

1. Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn

2. Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp

3. Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên

4. Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1:

6. Phản biện 2: Lucunais có y nghĩa khoa học ra thúc heis Néi, chu thiế An o ang chi hệt hện bở sựn từ tiếu than khiến cho các phileg phép khôph Nên kiếu thến thể nghiên thiến thếng pháp khôn học và hệu tica, thến ve na duspthingher tac the tota te kin 7. Học viên trả lời: Lila chorneghiles the flas place hor doe & Dua trets het qua hues may ra lisa glas nhing het gua dua gran ne ti to? Anic. Migche lit grid non due nghierden hep. flue Alecivites se bip the che yfite dog gep va drige sia. Aleci y herein wa hostor 8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi TS. There Notes Grange Jucas in the hand high the house of non-due of mathies chie Bis Mary Stephyra xuije subt. her bot mot st mot & philog pla change gon is he This Nguye Bis. Dua va, dut hor bay bla kirang, hick all den ket pa obij shia blaa hoe. Nen duge sia lai har muc vittat, bo sung fai he flam blae ale mot st philog phag. GS F. Nghier, Nove Alex Chie and had check sap sep che, my surche nordes 9. Hoc viên trả lời theo thiế trì hép lý thân chủe sila che lou dùe trì a too trìs bỹ How vites hip the cac of kiew dong gop a se duing sid 10. Hội đồng họp kín và cho điểm - Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên: Trưởng ban: ...T.S....Ki đượng...Nyão...Gja....g. Ủy viên: ..T.S...Tră.a. Mưre... Bắc Uy viên: TS. Lê Mic Nguyên Bins. - Kết quả kiểm phiếu như sau: Số phiếu phát ra:....5..... Tổng số điểm:.....4.2..5... Điểm trung bình:8, .5......

Điểm thưởng công trình công bố:....., Q...... Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:......... - Kết luận của Hội đồng: + Luận văn ... M.t. yếu câu + Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố: Nou dung nă tên đề tàu không trung lặp với các công thể 11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau: Aberita chiere sha lat luces ray theong keen dong Juan vas the virg spens con and lucin was there sy

Buổi họp đã kết thúc vào. 1.1. giờ. 4.0. .. phút, ngày .08.1.0.5.1.20.2.3

Hà Nội, ngày 03 tháng 05 năm 2023

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Le Thi Nguyão Bios

CHỦ TỊCH HỘI ĐÒNG VÀ Hệ Đi co Smetter Nghiên Ngọc Mins

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO FẠO PHÓ GIÁM ĐỐC



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

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Trần Minh Đức.

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1

Cơ quan công tác: Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN

Họ và tên học viên: Vũ Văn Trường

Tên đề tài: Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây khoai trời (*Dioscorea Bulbifera L*.)

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Việt Nam là nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa ẩm nên có hệ thực vật rất đa dạng và phong phú, nhất là các loại cây thảo được. Các loại cây được liệu đã được sử dụng rộng rãi trong dân gian từ rất lâu, nhưng những hiểu biết về các loại hợp chất thứ cấp có trong các loại cây này còn rất hạn chế. Đề tài nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây khoa trời có tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao khi tập trung vào nghiên cứu xác định cấu trúc các hợp chất mới và hoạt tính sinh học của chúng. Thành công của đề tài có ý nghĩa lớn trong việc nghiên cứu phát triển các loại thuốc chữa ung thư và kháng viêm có nguồn gốc thảo được trong tương lai.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài tiếp cận nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp tách chiết từ lá cây khoai trời đã không bị trùng lặp với các đề tài trước đó. Tài liệu tham khảo được trích dẫn rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên để tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Các nội dung nghiên cứu phù hợp với tên để tài và chuyên ngành đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Đề tài sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại, có độ tin cậy cao như: Sắc ký lớp mỏng (TLC), Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), Khối phổ (MS), Phương pháp gây độc tế bào ung thư, Phương pháp kiểm tra hoạt tính kháng viêm của hợp chất... 5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã thu thập và định danh được mẫu nghiên cứu là *Dioscorea bulbifera* bằng các chi thị sinh học phân tử.

- Đã phân lập được các hợp chất từ cao chiết tổng của cành và lá cây khoai trời bằng, phương pháp sắc ký kết hợp

- Đã xác định được cấu trúc hoá học của các hợp chất phân lập được, trong đó có 3 hợp chất mới và 4 hợp chất đã biết.

- Đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất trên 3 dòng tế bào ung thư, bao gồm HepG2, MCF-7 và SK-Mel-2.

- Đã đánh giá tác dụng kháng viêm trên mô hình ức chế sản sinh NO ở tế bào BV2 kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy, cả 7 hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế NO, với giá trị IC_{50} trong khoảng 14.8-54 μ M. Trong đó, chất mới diosbulbiferin A là chất có hoạt tính cao nhất.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

a. Hình thức

- Còn nhiều lỗi chính tả và đánh máy.

- Bổ sung vào bảng viết tắt một số chữ viết tắt: MS, ESI-MS, EI-MS

- Thống nhất sử dụng ADN hay DNA

- Đánh số trang 26

- Sửa lại đơn vị μL

b. Nội dung

- Cần chuyển mục 2.2.2 ở phần Phương Pháp Nghiên Cứu xuống trước mục 2.2.5 để phù hợp với logic của luận văn.

- Tên Bảng 3.8 cần được viết rõ hơn

- Nên tách bảng 3.8 thành 2 bảng riêng biệt về tỉ lệ tế bào sống và IC50 value.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyền tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

.....

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?): Có

Luận văn đáp ứng yêu cầu đối với một luận văn thạc sĩ

Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hand , ngày 06. tháng 0.5 năm 202.3

Người nhận xét (Ký, ghi rõ họ tên)

Trần Minh Đức

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

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Trương Quốc Phong; Học hàm, học vị: PGS.TS Chức danh trong Hội đồng: Phản biện Cơ quan công tác: Đại học Bách khoa Hà Nội Họ và tên học viên: Vũ Văn Trường Tên đề tài: Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.)

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Việt Nam là nước nhiệt đới với nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng. Trong đó có rất nhiều thực vật là các cây thuốc có giá trị phòng và điều trị nhiều loại bệnh khác nhau. Hướng tiếp cận tách chiết, đánh giá đặc tính để tìm kiếm các hoạt chất có hoạt tính sinh học quý như kháng tế bào ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxi hoá,... là rất cần thiết để tạo ra được các sản phẩm có giá trị phục vụ con người. Do đó đề tài luận văn Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây khoai trời (*Dioscorea bulbifera* L.) của học viên Vũ Văn Trường là cần thiết và có ý nghĩa cả về khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

- Theo hiểu biết và thông tin có được của người viết nhận xét thì luận văn này không trùng lặp với các công trình khoa học khác.
- Các tài liệu tham khảo được trích dẫn trung thực và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

 Tên để tài là phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như chuyên ngành và mã số đào tạo

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

 Luận văn đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

- 5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:
 - Đã định danh được mẫu nghiên cứu là *Dioscorea bulbifera* bằng chỉ thị sinh học phân tử.
 - Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 7 hợp chất từ lá và dây leo của cây Dioscorea bulbifera, bao gồm: 3 hợp chất mới là diosbulbiferin A (1), diosbulbiferin B (2), diosbulbiferinoside A (3); 4 hợp chất đã biết: diosbulbiferin C (4), 8-epidiosbulbin G (5), diosbulbin D (6), 15,16-epoxy- 6α-O-acetyl-8b-hydroxy-19-nor-clero-13(16), 14-diene-17,12;18,2-diolide (7).
 - Đã đánh giá được tác dụng gây độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư người thử nghiệm, bao gồm HepG2, MCF-7, và SK-Mel-2 cho các hợp chất phân lập được.
 - Đã đánh giá được tác dụng kháng viêm trên mô hình ức chế sản sinh NO ở tế bào BV2 kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy 7 hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO, với giá trị IC50 trong khoảng 14.8-54.0 μM. Trong đó chất mới diosbulbiferin A là chất có hoạt tính tốt nhất.
- 6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:
 - Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận văn cần có trích dẫn tài liêu tham khảo.
 - Cần chú thích rõ đối với các hình ảnh kết quả.
 - Cần bổ sung kết quả giải trình tự gốc vào Phụ lục
 - Mục 3.2.1 cần trình bày rõ cơ sở khoa học phân tách các hoạt chất/nhóm hoạt chất. Ví dụ, tại sao lại chỉ dùng phân đoạn D2 và D4 để tiếp tục tách phân đoạn.
 - Kết quả mục 3.4.1 nên bổ sung đối chứng là tế bào bình thường

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

- Có

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

- Luận văn còn một số điểm cần bổ sung, làm rõ, tuy nhiên trên tổng thể thì nội dung đã đáp ứng được yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ.
- Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày OL. tháng O.S. năm 2023

Người nhận xét (Ký, ghi rõ họ tên)

MMM

PGS.TS Trương Quốc Phong

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN **HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

OA HỌC \ ÔNG NGH

BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ tên học viên: Vũ Văn Trường

Lóp: 2019B

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất thứ cấp từ lá cây Khoai trời (*Diocorea Bulbifera* L.)

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

Ngày bảo vệ luận văn: 08 / 05 /2023

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ và 05 nhận xét của các thành viên hôi đồng, học viên đã nghiêm túc tiếp thu các ý kiến góp ý và chỉnh sửa học viên luận văn chi tiết như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Các hình minh họa cần được trích dẫn vào từng mục cụ thể của luận văn.	Các hình minh họa đã được trích dẫn cụ thể vào từng mục của luận văn (trang 06, 08, 09, 10, 11, 20, 28, 29, 30, 33, 37, 40, 46, 47).
2	Một số câu cần hoàn thiện lại vì thiếu thành phần trong câu.	Đã hoàn thiện lại các câu thiếu thành thành phần trong câu của luận văn (trang 02, 12, 22).
3	Cần sắp xếp lại các mục trong phần kết quả cho hợp lý và hệ thống hơn.	Đã sắp xếp lại các mục trong phần 'CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN' cho luận văn hợp lý và hệ thống hơn (trang 24, 27, 28, 54).
4	Còn một số lỗi chính tả, in ấn, lỗi câu cần chỉnh sửa.	 Đã chỉnh sửa lỗi chính tả, in ấn, và các lỗi câu trong luận văn (trang 01, 02, 07, 13, 22, 26, 55).
5	Thống nhất sử dụng danh pháp ADN hay DNA, đơn vị μL	Thống nhất sử dụng danh pháp: DNA, và đơn vị: μL (trang 14, 15).

	hay μl.	
6	Bổ sung vào bảng viết tắt một số chữ viết tắt: MS, ESI – MS, EI – MS.	Đã bổ sung vào 'DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT' một số chứ viết tắt như: MS, ESI – MS, EI – MS.

Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2023

HỌC VIÊN

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẫN

Hrodniken Ngae Ming

Nguyên Thi Thank Ngân

U

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



Nguyễn Thị Trung