

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**



ĐỒNG PHAN SĨ NGUYỄN

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE
CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CAO ETHYL
ACETATE CỦA LOÀI ĐỊA Y *PARMOTREMA TINCTORUM***

LUẬN VĂN THẠC SĨ
(*Chuyên ngành Hóa Hữu cơ*)

ĐỒNG PHAN SĨ NGUYỄN

HÓA HỮU CƠ

NĂM 2023

Tp. Hồ Chí Minh - Năm 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỒNG PHAN SĨ NGUYỄN

Lớp: Hóa Hữu cơ – 2021A – Thành phố Hồ Chí Minh, Khóa: 2021A

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE CỦA
MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CAO ETHYL ACETATE CỦA LOÀI
ĐỊA Y *PARMOTREMA TINCTORUM***

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ

Mã số: 8440114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. Nguyễn Văn Kiều
2. PGS.TS. Lê Tiến Dũng

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, 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 trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên

ĐỒNG PHAN SĨ NGUYỄN

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành được luận văn này, lời đầu tiên tôi chân thành cảm ơn hai người Thầy, TS. Nguyễn Văn Kiều - Đại Học Duy Tân và PGS.TS Lê Tiến Dũng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ đã luôn hướng dẫn tận tình, hỗ trợ tôi trong nghiên cứu khoa học và truyền dạy những kiến thức quý báu trong cuộc sống để tôi có thể đạt được kết quả như mong muốn.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo và phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo mọi điều kiện cũng như những yếu tố cần thiết để tôi có thể hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn toàn thể Quý Thầy Cô khoa Hóa Học – Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn nhiệt tình và chu đáo trong giảng dạy, giúp tôi học hỏi thêm nhiều kiến thức mới mẻ, những kỹ năng và kinh nghiệm sống quý báu.

Ngoài ra, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các tập thể phòng thí nghiệm và đặc biệt là NCS.TS Trần Thanh Nhã và NCS.TS Đào Thị Bích Ngọc đã luôn giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình làm luận văn tốt nghiệp. Những kinh nghiệm mà hai anh chị chỉ bảo và chia sẻ sẽ là nền tảng cho quá trình nghiên cứu và là hành trang quý báu cho tôi trong tương lai.

Cuối cùng, tôi xin kính chúc Quý Thầy Cô sức khỏe và thành công trong sự nghiệp cao quý. Đồng thời tôi chúc các anh chị phòng nghiên cứu đạt được nhiều thành công tốt đẹp trong công việc và cuộc sống.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả luận văn

Đông Phan Sĩ Nguyên

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | ii |
| MỤC LỤC..... | iii |
| DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT | v |
| DANH MỤC BẢNG..... | vi |
| DANH MỤC HÌNH ẢNH | vii |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| 1. Lý do chọn đề tài | 1 |
| 2. Mục đích nghiên cứu | 2 |
| 3. Nội dung nghiên cứu..... | 2 |
| 4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài..... | 3 |
| 5. Những đóng góp của luận văn | 3 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU..... | 4 |
| 1. Tổng quan về Địa Y <i>Parmotrema tinctorum</i> | 4 |
| 2. Thành phần hóa học..... | 7 |
| 3. Hoạt tính sinh học | 11 |
| 3.1. Hoạt tính sinh học của các cao chiết và hợp chất cô lập từ địa y..... | 11 |
| 3.2. Hoạt tính ức chế enzyme alpha glucosidase của các hợp chất địa y và các cao chiết..... | 12 |
| CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 13 |
| 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU | 13 |
| 2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ | 13 |
| 2.2.1. Hóa chất..... | 13 |
| 2.2.2. Thiết bị..... | 14 |
| 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 14 |
| 2.3.1. Thu hái, xử lý mẫu thân cây Địa y | 14 |
| 2.3.2. Điều chế cao phân đoạn..... | 14 |
| 2.3.3. Quy trình phân lập hợp chất | 15 |
| 2.3.3.1. Phương pháp sắc ký..... | 15 |
| 2.3.3.2. Quy trình phân lập..... | 15 |
| 2.3.3.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.3.4. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase | 17 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 18 |
| 3.1. Khảo sát cấu trúc | 18 |
| 3.1.1. Khảo sát cấu trúc hợp chất 1 | 18 |
| 3.1.2. Khảo sát cấu trúc hợp chất 2 | 20 |
| 3.1.3. Khảo sát cấu trúc hợp chất 3 | 24 |
| 3.1.4. Khảo sát cấu trúc hợp chất 4 | 27 |
| 3.1.5. Khảo sát cấu trúc hợp chất 5 | 32 |
| 3.2. Kết quả hoạt tính sinh học của các chất đã phân lập. | 36 |
| KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ | 38 |
| 1. Kết luận..... | 38 |
| 2. Kiến nghị..... | 38 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | 40 |

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

| | |
|---------------------|---|
| IDF | International Diabetes Federation |
| IC ₅₀ | Half-maximal Inhibitory Concentration |
| TLC | Thin Layer Chromatography |
| CC | Column Chromatography |
| HR-ESI-MS | High-Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| ¹ H-NMR | Proton Nuclear Magnetic Resonance |
| ¹³ C-NMR | Carbon Nuclear Magnetic Resonance |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 1.1. Bảng phân loại sinh học của địa y..... | 7 |
| Bảng 3.1. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất 1 và methyl orselinate..... | 20 |
| Bảng 3.2. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất 2 | 24 |
| Bảng 3.3. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất 3 | 27 |
| Bảng 3.4. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất 4 | 31 |
| Bảng 3.5. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất 4 và 5 | 35 |
| Bảng 3.6. Giá trị IC_{50} của các chất | 37 |

DANH MỤC HÌNH ẢNH

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Hình ảnh các loài địa y..... | 6 |
| Hình 1.2. Hình ảnh loài địa y <i>Pamotrema tinctorum</i> | 7 |
| Hình 1.3. Các hợp chất cô lập từ địa y <i>Pamotrema tinctorum</i> | 10 |
| Hình 2.1. Quá trình phân lập các chất trong cao ethyl acetate..... | 17 |
| Hình 3.1. Công thức hoá học hợp chất 1 | 20 |
| Hình 3.2. Cấu trúc hoá học có thể có của hợp chất 2 | 23 |
| Hình 3.3. Công thức hoá học của hợp chất 2 và Idicuen | 23 |
| Hình 3.4. Tương quan HMBC, và NOESY của hợp chất 2 | 23 |
| Hình 3.5. Công thức hoá học của hợp chất 3 và Zeorin..... | 26 |
| Hình 3.6. Tương quan HMBC, và NOESY của hợp chất 3 | 27 |
| Hình 3.7. Hai đồng phân có thể có của hợp chất 4 | 30 |
| Hình 3.8. Công thức hoá học hợp chất 4 và Reticulatin | 30 |
| Hình 3.9. Tương quan HMBC hợp chất 4 | 31 |
| Hình 3.10. Tương quan NOESY hợp chất 4 | 31 |
| Hình 3.11. Hai đồng phân có thể có của hợp chất 5 | 34 |
| Hình 3.12. Cấu trúc hoá học của hợp chất 5 | 35 |
| Hình 3.13. Tương quan HMBC của hợp chất 5 | 35 |
| Hình 3.14. Tương quan NOESY của hợp chất 5 | 35 |

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Địa y là loài thực vật bậc thấp cộng sinh giữa nấm, tảo, vi khuẩn lam và thường được phân chia thành 3 dạng: khảm, sợi và tảng [1]. Vì thế, địa y có thể sống được ở nhiều nơi từ vùng khô hạn đến vùng khắc nghiệt [2]. Các nghiên cứu về địa y cho thấy chúng thường chứa các loại hợp chất như depside, depsidone, dẫn xuất dibenzofuran, acid usnic, terpenoid. Các chất chuyển hóa của địa y đã được chứng minh là có hoạt tính sinh học và được phẩm đa dạng như kháng khuẩn, kháng vi rút, gây độc tế bào ung thư, kháng u, dị ứng, ức chế tăng trưởng thực vật, chất ức chế enzyme [3-7]. Chính vì vậy, địa y được sử dụng như một bài thuốc trong y học dân gian ở New Zealand, Ấn Độ, Nepal và Trung Quốc [8]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về thành phần hoá học của địa y còn hạn chế, đặc biệt là loài địa y *Parmotrema tinctorum*. Loài địa y *P. tinctorum* là một trong những loài đặc trưng trong chi *Parmotrema* được tìm thấy phổ biến ở Việt Nam [9]. Trên thế giới, loài địa y này được dùng làm gia vị và hương liệu thực phẩm [10], chất hấp phụ uranium(VI) [11], cobalt [12], nghiên cứu phân loại ô nhiễm không khí bởi ngành công nghiệp hóa dầu [13, 14], và loài thực vật này có thể phát triển thành thực phẩm chức năng chữa bệnh đái tháo đường [15, 16]. Tuy nhiên, với ứng dụng phong phú và đa dạng như vậy, mới chỉ có bốn nghiên cứu về thành phần hóa học của loài địa y này được tìm thấy. Hơn nữa, các nghiên cứu này chỉ tập trung vào việc khảo sát thành phần hóa học chính mà chưa đi sâu vào việc tìm kiếm các hợp chất phụ mới, chứng tỏ việc tiếp tục khảo sát hóa học trên loài địa y này là hướng đi tiềm năng trong việc tìm kiếm các dược chất mới và góp phần lý giải về tính ứng dụng cao. Việt Nam là nước có lợi thế nhiệt đới gió mùa ẩm với nguồn thực vật phong phú và đa dạng. Vì thế, việc khảo sát thành phần hóa học của loài địa y *P. tinctorum* thu hái ở nước ta để tìm ra thành phần hóa học, đồng thời có thể cô lập được các hợp chất mới hoặc có hoạt tính sinh học là việc làm cần thiết và quan trọng để có thể đóng góp các hoạt chất mới vào kho tàng cây thuốc Việt Nam và thế giới.

Mặt khác, ở Việt Nam và cả ở các nước tiên tiến trên thế giới, bệnh đái tháo đường type 2 là căn bệnh mãn tính gây ra nhiều khó khăn trong sinh hoạt và kinh tế cho bệnh nhân. Một trong các phương pháp điều trị bệnh đái tháo

đường là ức chế enzyme α -glucosidase. Vì vậy đề tài lựa chọn nghiên cứu: **“Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số hợp chất phân lập từ cao Ethyl acetate của loài địa y *Parmotrema tinctorum*”**, với mục tiêu hy vọng từ loài địa y khảo sát, tôi sẽ tiến hành phân lập nhằm tìm kiếm các hợp chất mới hoặc tìm ra các hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ góp phần tìm hiểu thêm về các hoạt chất có trong loài địa y, khảo sát và đóng góp các hoạt chất mới vào kho tàng cây thuốc Việt Nam nhằm tìm kiếm vật liệu thân thiện môi trường cho lĩnh vực y sinh.

2. Mục đích nghiên cứu

- **Mục tiêu tổng quát:**

Từ loài địa y *Parmotrema tinctorum* tiến hành cô lập và xác định cấu trúc hoá học các hợp chất hữu cơ. Tiến hành khảo sát hoạt ức chế enzyme α -glucosidase các hợp chất phân lập góp phần làm phong phú thêm kho tàng các cây thuốc y học cổ truyền Việt Nam.

- **Mục tiêu cụ thể :**

- Điều chế cao tổng của địa y bằng phương pháp thẩm tích với ethyl acetate (cao EtOAc)

- Sử dụng sắc ký gel - Sephadex LH 20 để điều chế cao phân đoạn từ cao tổng EtOAc vừa thu được.

- Tiến hành phân lập các hợp chất hữu cơ có trong cao phân đoạn, xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được bằng các phương pháp vật lý hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), khối phổ....

- Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase các hợp chất phân lập.

3. Nội dung nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu bao gồm 5 nội dung chính :

- **Nội dung 1:** Thu hái mẫu địa y *Parmotrema tinctorum* và tiến hành định danh tên khoa học.

- **Nội dung 2:** Điều chế cao tổng bằng phương pháp thẩm tích địa y khô đã nghiền nhỏ với ethyl acetate. Cô quay thu hồi dung môi. Sử dụng sắc ký gel Sephadex - LH 20 để điều chế cao phân đoạn.

- **Nội dung 3:** Sắc ký cột pha thường, sắc ký cột pha đảo, sắc ký điều

chế, nhằm cô lập các nguyên vật liệu/ hợp chất hữu cơ trên loài địa y *Parmotrema tinctorum*.

- **Nội dung 4:** Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được sử dụng các phương pháp phổ nghiệm 1D-, 2D-NMR, HRESIMS.

- **Nội dung 5:** Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được.

4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Trên thế giới, các nghiên cứu về thành phần hoá học của địa y vẫn chưa nhiều. Việt Nam là nước nhiệt đới gió mùa ẩm, có nguồn thực vật phong phú và đa dạng, còn nhiều loài địa y mà thế giới chưa biết đến. Đặc biệt, loài địa y *Parmotrema tinctorum* chưa được công bố quốc tế nhiều. Các nghiên cứu cho thấy loài địa y này có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu tập trung khảo sát hoạt tính của các cao chiết mà chưa phân lập và khảo sát hoạt tính của các hợp chất có trong cây. Bước đầu khảo sát cho thấy chúng có chứa những loại hợp chất đặc hữu của địa y như depside, depsidone, dẫn xuất dibenzofuran. Mặt khác, ở Việt Nam và cả ở các nước tiên tiến trên thế giới, bệnh đái tháo đường type 2 là căn bệnh mãn tính gây ra nhiều khó khăn trong sinh hoạt và kinh tế cho bệnh nhân. Một trong các phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường là ức chế enzyme α -glucosidase. Vì vậy đề tài lựa chọn nghiên cứu: “Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số hợp chất phân lập từ cao Ethyl acetate của loài địa y *Parmotrema tinctorum*”. Với hy vọng từ loài địa y khảo sát, chúng tôi sẽ cô lập được thêm các hợp chất mới hoặc tìm ra các hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ góp phần tìm hiểu thêm về các hoạt chất có trong loài địa y khảo sát đóng góp các hoạt chất mới vào kho tàng cây thuốc Việt Nam nhằm tìm kiếm vật liệu thân thiện môi trường

5. Những đóng góp của luận văn

Luận văn góp phần làm sáng tỏ thành phần hoá học trong loài địa y *Parmotrema tinctorum*. Mặt khác, các hợp chất được phân lập được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase góp phần tìm kiếm các hoạt chất ứng dụng điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1. Tổng quan về Địa Y *Parmotrema tinctorum*

Chi *Parmotrema* là chi lớn thuộc họ Parmeliaceae [17]. Trên thế giới ước tính khoảng 350 loài [18] phân bố chủ yếu ở các vùng cận nhiệt đới của Nam Mỹ và các đảo Thái Bình Dương [18, 19].

Qua khảo sát, nhận thấy sự hiện diện của carbohydrate, phenol, flavanoids, tannin, terpenoids, coumarins và saponin có thể là cơ sở hoạt tính sinh học của loài [18]. Chi *Parmotrema* đặc trưng bởi dạng phiến ngắn và rộng, thùy có lông, vỏ ngoài xốp, bào tử đính hình trụ, rễ ngắn và nhỏ, bao gồm các dạng địa y trung gian giữa chi *Cetraria* và loài *Xanthoparmelia*. Mặt dưới của phiến lá có màu trắng đến đen [20]. Những nghiên cứu hóa học cho đến nay được thông kê trên 14 loài địa y thuộc chi *Parmotrema* (hình 1.1).

- *Parmotrema conformatum* (A)
- *Parmotrema dilatatum* (B)
- *Parmotrema lichexanthonicum* (C)
- *Parmotrema mellissii* (D)
- *Parmotrema nilgherrense* (E)
- *Parmotrema planatilobatum* (F)
- *Parmotrema praesorediosum* (G)
- *Parmotrema reticulatum* (H)
- *Parmotrema saccatilobum* (I)
- *Parmotrema sancti-angelii* (J)
- *Parmotrema stuppeum* (K)
- *Parmotrema subisidiosum* (L)
- *Parmotrema tinctorum* (M)
- *Parmotrema tsavoense* (N)



Parmotrema conformatum



Parmotrema dilatatum



Parmotrema mellissii



Parmotrema nilgherrense



Parmotrema praesorediosum



Parmotrema reticulatum

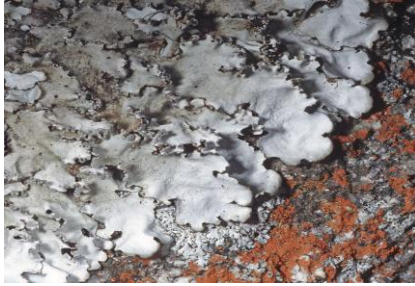


Parmotrema saccatilobum



Parmotrema sancti-angelii

K

*Parmotrema stuppeum*

L

*Parmotrema subsidiosum*

M

*Parmotrema tinctorum*

N

*Parmotrema tsavoense*

Hình 1.1. Hình ảnh các loài địa y A, B, D, E, G, H, I, J, K,L, M, N thuộc chi *Parmotrema*

Parmotrema tinctorum là một trong những loài địa y đặc trưng trong chi *Parmotrema* thuộc dòng địa y Parmeliaceae được tìm thấy phổ biến ở Việt Nam [9]. Trên thế giới, loài địa y này chủ yếu được ứng dụng làm thực phẩm hoặc ứng dụng trong lĩnh vực phân tích và xử lý môi trường. *Parmotrema tinctorum* được dùng rộng rãi làm gia vị và hương liệu thực phẩm ở Ấn Độ và Nepal [10]. Sinh khối của loài địa y này được nghiên cứu có khả năng hấp phụ uranium (VI) [11], hấp phụ và khử plutonium (VI) thành plutonium (IV) [11] và hấp phụ Cobalt [12] từ môi trường xung quanh. Ngoài ra, *Parmotrema tinctorum* còn được dùng trong việc ứng dụng phân tích chất lượng không khí ở các khu đô thị và rừng ở Brazil thông qua các đặc điểm về các sắc tố quang hợp, đặc điểm hình thái và thành phần kim loại nặng như Pb, Cr, Zn, Hg,... [21, 22], hay nghiên cứu phân loại ô nhiễm không khí bởi ngành công nghiệp hóa dầu ở Thái Lan [13, 14].

| | |
|----------------|---|
| Tên Khoa Học | <i>Parmotrema tinctorum</i> |
| Tên gọi khác | <i>Parmelia tinctorum</i> , <i>Parmelia tinctoria</i> , <i>Lichen chinensis</i> |
| Giới (Kingdom) | Nấm |
| Ngành (phylum) | Pezizomycotina |
| Lớp (class) | Lecanoromycetes |
| Bộ (order) | Leacanorineae |
| Họ (family) | Parmeliaceae |
| Chi (genus) | <i>Parmotrema</i> |
| Loài (species) | <i>Parmotrema tinctorum</i> (Nyl.) Hale |

Bảng 1.1. Bảng phân loại sinh giới của địa y

Trong lĩnh vực y sinh, cao methanol của loài địa y *P. tinctorum* được chứng minh có khả năng chống oxi-hóa [23], chống ung thư [23] và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn [23-26]. Cao ethyl acetate của *P. tinctorum* có thể được phát triển thành thực phẩm chức năng để chữa bệnh đái tháo đường [27, 28].



Hình 1.2. Hình ảnh về loài địa y *P. tinctorum*

2. Thành phần hóa học

Trước đây đã có một số các nghiên cứu về thành phần hóa học từ các loài địa y. Tuy nhiên, các công bố khoa học về ứng dụng trong lĩnh vực y sinh của *P. tinctorum* chỉ ngừng lại ở việc nghiên cứu hoạt tính sinh học của các cao chiết từ *P. tinctorum*, mà chưa tập trung phân lập thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của từng hợp chất. Trên thực tế, việc phân lập thành phần hóa học của loài địa y *P. tinctorum* chưa được phổ biến. Các hợp

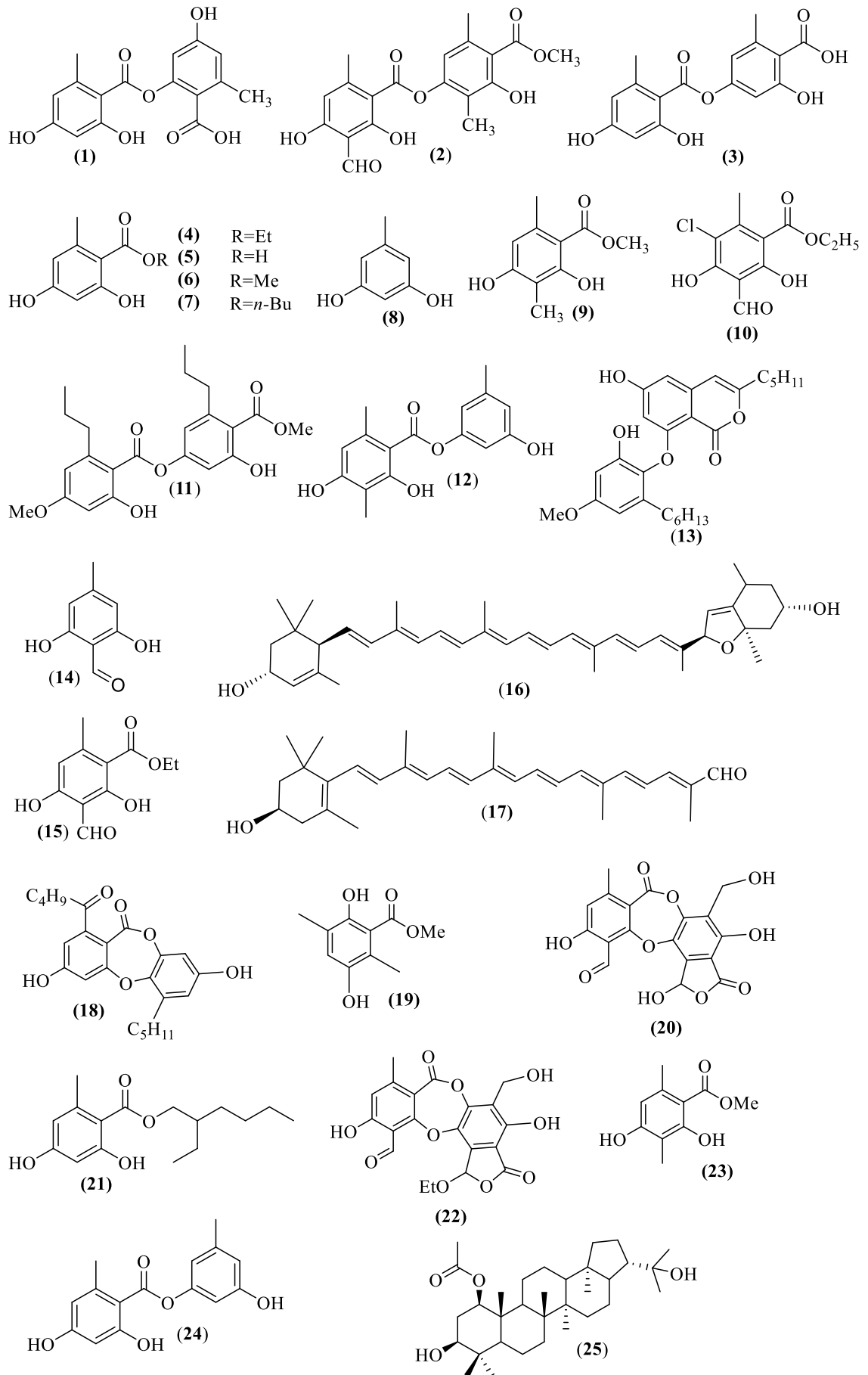
chất đã được phân lập như:

- ❖ Nhóm nghiên cứu của Sakurai A. [29] phân lập acid isolecanoric (1) vào năm 1987.
- ❖ Nhóm nghiên cứu của Honda N. K. phân lập atranorin (2) và acid lecanoric (3) vào năm 2010 [17].
- ❖ Nhóm nghiên cứu của Santos L. C. [30] phân lập ethyl orsellinate (4) từ loài *P. tinctorum* vào năm 2004.
- ❖ Vào năm 2020, nhóm nghiên cứu Tuan N.T [9] công bố 14 hợp chất được phân lập từ loài *P. tinctorum* bao gồm: atranorin (2), ethyl orsellinate (4), orsellinic acid (5), methyl orsellinate (6), n-butyl orsellinate (7), Orcinol (8), methyl β -orsellinate (9), methyl haematommate (10), methyl divaricatinat (11), lecanorin (12), lecanoric acid (3), 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1H-isochromen-1-one (14), atranol (15), ethyl haematommate (16).
- ❖ Nhóm nghiên cứu của Czezug, B. và Kashiwadani, H. phân lập flavoxanthin (16) và β -citraurin (17) của loài địa y *P. tinctorum* vào năm 1993 [31].
- ❖ Nghiên cứu Pavan Kumar, P. đã phân lập được 6 hợp chất từ địa y *P. tinctorum*, bao gồm: lecanoric acid (3), atranorin (2), norlobaridone (18), methyl atrate (19), orsellinic acid (5), salazinic acid (20) vào năm 2019 [32].
- ❖ Nhóm nghiên cứu Bui, V.-M đã phân được hai hợp chất phenolic mới: 2-ethylhexyl orsellinate (21) và tinctorinone A (22) [33].
- ❖ Nhóm nghiên cứu Nguyen, T. T. T. đã phân lập 5 hợp chất từ địa y *P. tinctorum* bao gồm: methyl β -orcinol carboxylate (23), atranorin (2), lecanorol (24), salazinic acid (20), 1 β -acetoxyhopan-3 β ,22-diol (25) [34].

Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ tập trung vào việc khảo sát thành phần hóa học chính của loài địa y này mà chưa đi sâu vào việc tìm kiếm các hợp chất phụ mới và khảo sát hoạt tính sinh học của chúng.

Việc phân lập thành phần hóa học của địa y mang ý nghĩa quan trọng, đặc biệt là đối với loài địa y có khả năng thể hiện hoạt tính cao như *P. tinctorum*. Dịch chiết cao ethyl acetate của địa y này cho thấy khả năng ức

chế enzyme α -glucosidase [27]. Theo các nghiên cứu cho thấy các chất ức chế α -glucosidase đã chứng tỏ tầm quan trọng lớn trong điều trị lâm sàng bệnh đái tháo đường loại II. Loại bệnh này với lượng đường trong máu cao gây ra những tổn thương lâu dài, rối loạn chức năng và suy các cơ quan khác nhau như mắt, thận, dây thần kinh, tim và mạch máu nếu không được điều trị [35]. Enzyme α -glucosidase chuyển đổi disaccharide thành glucose để xúc tác sự phá vỡ các liên kết α -1,4-glycosidic [36, 37]. Do đó, việc ức chế enzyme này sẽ đưa đến việc giảm tốc độ hấp thụ glucose nhằm kiểm soát mức độ glucose trong bệnh nhân tiểu đường loại II [37, 38]. Do đó, việc tiếp tục nghiên cứu phân lập hợp chất hữu cơ trên loài địa y *P. tinctorum* là hướng đi tiềm năng trong tìm kiếm các hợp chất mới hoặc tìm ra các hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.



Hình 1.3. Các hợp chất cô lập từ địa y *Pamotrema tinctorum*.

3. Hoạt tính sinh học

3.1. Hoạt tính sinh học của các cao chiết và hợp chất cô lập từ địa y

Năm 2003, Bézivin C. và cộng sự [39] đã khảo sát khả năng gây độc tế bào của các loại cao chiết *n*-hexane, diethyl ether và methanol của 8 loài địa y bao gồm *Cladonia convoluta*, *Cladonia rangiformis*, *Evernia prunastri*, *Parmelia caperata*, *Parmelia perlata*, *Platismatia glauca*, *Ramalina cuspidata*, *Usnea rubicunda* trên 4 dòng tế bào ung thư người K-562, DU145, MCF7, U251 và dòng tế bào thường Vero (African green monkey kidney cell line). Theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cao chiết thô có thể được coi là có hoạt tính mạnh khi $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ [39]. Trong số 24 cao chiết thu được từ tám loài địa y, có 16 cao chiết có giá trị $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ trên 1, 2, 3 hoặc cả 4 dòng tế bào ung thư được thử nghiệm. Các cao chiết *n*-hexan thường có hoạt tính mạnh nhất. Hầu hết các cao chiết có hoạt tính mạnh trên 2 dòng tế bào DU145 và U251. Đặc biệt một số cao chiết có hoạt tính mạnh và độ chọn lọc hoạt tính (SI) giữa tế bào ung thư và tế bào thường rất cao, như loài *Cladonia convoluta* có cao chiết diethyl ether với IC_{50} là $2,7 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$, SI = 56 (DU145), cao chiết methanol với IC_{50} là $2,4 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ và SI = 53 (U251); loài *Cladonia rangiformis* có cao chiết diethyl ether với IC_{50} là $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ và SI = 63,6 (U251).

Tháng 6/2020, Tatipamula V. B. và cộng sự [40] báo cáo kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc 6 dòng tế bào ung thư MDA-MB-231, SW620, HeLa, FADU, A549, SKOV3 của cao chiết ethanol thô và 6 hợp chất cô lập từ *Parmotrema tinctorum*. Hợp chất haematommic acid và ethyl haematommate có hoạt tính mạnh trên 3 dòng tế bào ung thư HeLa, FADU, A549 với IC_{50} từ 22-27 $\mu\text{g/mL}$, còn hợp chất methyl- β -orcinolcarboxylate có hoạt tính mạnh trên dòng tế bào W620 với IC_{50} là 26,5 $\mu\text{g/mL}$.

Theo báo cáo của Harikrishnan A và cộng sự [41] năm 2020, hợp chất atranorin cô lập từ *Parmotrema rampoddense* có hoạt tính gây độc tế bào ung thư MDA MB-231 và MCF-7 với giá trị IC_{50} lần lượt là $5,36 \pm 0,85$ và $7,55 \pm 1,2 \mu\text{M}$.

Năm 2019, Sichatôi [42] báo cáo hợp chất 6α -acetoxyhopane- $16\beta,22$ -diol cô lập từ loài *Parmotrema sancti-angelii* có hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên 3 dòng HepG2, NCI-H460, và MCF-7 với IC_{50} lần lượt là $52,67 \pm 2,82$, $77,86 \pm 5,61$ và $47,08 \pm 2,64 \mu\text{g/mL}$.

Hợp chất Parmoether B cô lập từ loài *Parmotrema tsavoense* thu hái tạo núi Tà Cú, Bình Thuận có hoạt tính gây độc trung bình trên 3 dòng tế bào với IC_{50} là $44,72 \pm 7,33$ (HepG2), $36,48 \pm 2,34$ (NCI-H460), $22,32 \pm 6,51$ (MCF-7) [43].

3.2. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất địa y và các cao chiết

Kết quả khảo sát về thành phần và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các chất đã phân lập từ loài địa y *Parmotrema tsavoense* và *Parmotrema dilatatum* của nhóm nghiên cứu công bố năm 2020 cho thấy sự hiện diện của nhiều hợp chất depsidone và diphenyl ether mới [44, 45]. Các hợp chất depsidone thể hiện khả năng ức chế mạnh enzyme α -glucosidase như hợp chất parmosidones F và G với IC_{50} lần lượt là 2,2 và 4,3 μ M cô lập từ *P. tsavoense* [45] và parmosidones H và I có IC_{50} lần lượt là 17,6 và 10,3 μ M từ *P. dilatatum* [44] (chất đối dương acarbose 449 μ M). Bên cạnh đó địa y *P. tsavoense* và *P. praesorediosum* mang hàm lượng lớn hợp chất atranorin, được sử dụng như chất nền trong bán tổng hợp các dẫn xuất hydrazide. Các dẫn xuất hydrazide thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn so với chất nền atranorin. Trong đó dẫn xuất hydrazide có nhóm benzyl thể hiện khả năng ức chế mạnh với IC_{50} $6,67 \pm 0,60$ μ M (acarbose $93,6 \pm 0,49$ μ M) [46].

Nghiên cứu hoá sinh học trên các loài địa y cùng chi *Parmotrema* cho thấy tiềm năng phát hiện các hợp chất mới có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trên địa y *P. cristiferum* cũng như hy vọng tìm kiếm các chất nền thực hiện bán tổng hợp, nhằm tạo ra các dẫn xuất có khả năng ức chế mạnh hơn so với chất nền ban đầu.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- **Đối tượng nghiên cứu:**

Mẫu vật *P. tinctorum* được thu thập từ vỏ cây ở tỉnh Lâm Đồng tại Việt Nam (độ cao 800-1000 m so với mực nước biển vào tháng 5 năm 2020. Mẫu tiêu bản của địa y đã được Tiến sĩ Võ Thị Phi Giao, Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam, gửi vào Phòng lưu trữ của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (PHH) với số đăng ký PHH0011338.

- **Phạm vi nghiên cứu:**

Khảo sát thành phần hóa học trên cao phân đoạn điều chế từ địa y (*P. tinctorum*) được thu hái tại Lâm Đồng. Thử nghiệm và đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase ở các hợp chất phân lập được. Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm hợp chất tự nhiên Viện Khoa học Cơ bản và Ứng dụng Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Các dung môi hữu cơ được dùng trong các quá trình ly trích, sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng bao gồm: *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate (EtOAc), acetone, methanol (MeOH), ethanol 96% (Trung Quốc và Việt Nam) và nước cất;
- Thuốc thử dùng để phát hiện các vết hữu cơ bằng phương pháp sắc ký bản mỏng: acid sulfuric (H₂SO₄) 10% trong ethanol (làm nóng trên bếp điện);
- Silica gel dùng cho sắc lý ký cột: (1) Pha thường, cỡ hạt 0,04 – 0,06 mm (240 – 430 mesh) Merck; (2) Pha đảo, Rp-18 cỡ hạt 0,03 – 0,05 mm; (3) Sephadex LH-20;
- Sắc ký bản mỏng: (1) DC - Alufolien F254 (Merck) dùng cho sắc lý bản mỏng pha thường và (2) Rp-18 F254s (Merck) dùng cho sắc ký bản mỏng pha đảo.

2.2.2. Thiết bị

Các thiết bị và dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Dụng cụ dùng để li trích: erlen, ống nghiệm, pipet pasteur, hủ bi, ...;
- Bình cô quay (100, 250, 500 mL); Cốc thủy tinh (250, 500, 1000 mL); Ống đong (10, 50, 100 mL);
- Cột sắc ký;
- Ống vi quản (Kapillaren) dùng cho sắc ký bản mỏng;
- Kẹp gấp bản mỏng;
- Giấy lọc Advantec (Nhật Bản);
- Hệ thống cô quay chân không ở áp suất thấp Heidolph Hei-VAP Precision (Heildolph-Germany);
- Bếp điện từ; Tủ sấy (Mermmert); Tủ lạnh;
- Đèn UV ở bước sóng 254 - 365 nm;
- Máy khối phổ HR-ESI-MS; Máy cộng hưởng từ hạt nhân (BRUKER AVANCE) - tần số 400-600 MHz đối với phổ $^1\text{H-NMR}$ và 100-150 MHz đối với phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân (BRUKER AVANCE III) tần số 500 MHz (đối với phổ $^1\text{H-NMR}$) và 125 MHz (đối với phổ $^{13}\text{C-NMR}$) đại học Chulalongkorn, Thailand.
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân (BRUKER AVANCE III) tần số 400 MHz (đối với phổ $^1\text{H-NMR}$) và 100 MHz (đối với phổ $^{13}\text{C-NMR}$) tại Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP.HCM.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thu hái, xử lý mẫu thân cây Địa y

Mẫu thân địa y (*P. tinctorum*) được thu hái, rửa sạch, làm khô tự nhiên và được xay nhuyễn thành bột khô. Mẫu bột được bảo quản kín nhiệt độ phòng và chuẩn bị để thực hiện các bước thực nghiệm tiếp theo.

2.3.2. Điều chế cao phân đoạn

Mẫu bột địa y (*P. tinctorum*) được ngâm lần lượt trong (3 x 10L) dung môi EtOAc và MeOH ở nhiệt độ phòng. Sau đó, tiến hành lọc dung dịch

ngâm để loại bỏ tạp chất rắn, đồng thời thực hiện cô quay dưới áp suất thấp để loại bỏ dung môi và thu được cao chiết thô EtOAc khối lượng (105,2 g) và MeOH (135,5 g). Dịch chiết thô EtOAc được rửa bằng EtOAc để thu được hai phần: EL (23,5 g) và EP (75,8 g).

2.3.3. Quy trình phân lập hợp chất

2.3.3.1. Phương pháp sắc ký

- **Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography – TLC):**

Quá trình sắc ký được thực hiện trên một bản mỏng, đã được tráng sẵn một lớp DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) (đối với sắc ký lớp mỏng pha thường) hoặc RP18 F254S (Merck) (đối với sắc ký lớp mỏng pha đảo). Các phân tử hữu cơ sẽ được phát hiện bằng cách sử dụng đèn tử ngoại (UV light) ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm, hoặc bằng cách tráng đều bề mặt bản sắc ký bằng dung dịch H₂SO₄ 10% rồi sấy khô và hơi nóng từ từ trên bếp điện cho đến khi hiện màu;

- **Sắc ký lớp mỏng điều chế:**

Phương pháp sắc ký này được thực hiện trên bản mỏng tương tự như phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Sau khi quá trình giải ly được tiến hành, vị trí và sự phân tách của các phân tử hữu cơ sẽ được xác định bằng đèn tử ngoại hoặc bằng thuốc thử dung dịch H₂SO₄ 10% tương tự như sắc ký lớp mỏng. Lớp silica gel ứng với vị trí hợp chất hữu cơ cần phân lập được cạo sạch, và sau đó quá trình giải hấp phụ sử dụng dung môi thích hợp được tiến hành để thu được hợp chất tinh, sạch.

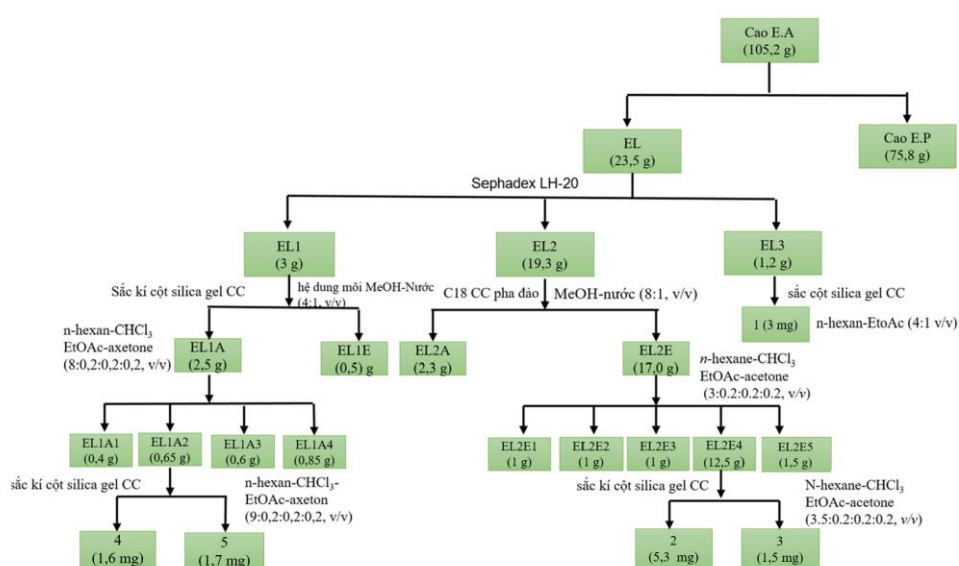
- **Sắc ký cột (Column Chromatography – CC):**

Quá trình sắc ký được tiến hành với chất hấp phụ được nhồi trong một cột thủy tinh. Các chất hấp phụ thường được sử dụng như: silica gel pha thường (cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm; 240 - 430 mesh); silica gel pha đảo ODS; hoặc Sephadex LH20.

2.3.3.2. Quy trình phân lập

Bột địa y *P. tinctorum* 2,5 kg được làm khô tự nhiên, sau đó được ngâm lần lượt (3 × 10 L) với EtOAc và MeOH ở nhiệt độ phòng. Cô dịch chiết xuất trong điều kiện áp suất giảm để thu được dịch chiết thô EtOAc (105,2 g) và MeOH (135,5 g) tương ứng. Dịch chiết thô EtOAc được rửa bằng EtOAc để

thu được hai phần, **EL** (23,5 g) và **EP** (75,8 g). Dịch chiết EtOAc được xử lý bằng sắc ký cột gel Sephadex LH-20 (column chromatography), sử dụng MeOH làm dung môi triển khai để thu được ba phân đoạn, **EL1- EL3**. Phân đoạn **EL1** (3 g) được xử lý bằng C18 column chromatography pha đảo với hệ dung môi MeOH-nước (4:1, v/v) để tạo ra 2 phân đoạn nhỏ **EL1A-EL1E**. Phân đoạn **EL1A** được áp dụng kỹ thuật sắc ký cột silica gel column chromatography rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexane-CHCl₃- EtOAc-Acetone (8:0,2:0,2:0,2, v/v) để tạo thành 4 phân đoạn phụ, **EL1A1-EL1A4**. Phần **EL1A2** (0,65 g) được sắc ký liên tục trên sắc ký cột pha thường rửa giải bằng *n*-hexane-CHCl₃-EtOAc-Acetone (9:0,2:0,2:0,2, v/v) để thu được hợp chất (**4**) (1,6 mg) và hợp chất (**5**) (1,7 mg). Phân đoạn **EL2** (19,3 g) được xử lý bằng C18 column chromatography pha đảo với hệ dung môi MeOH-nước (8:1, v/v) để tạo ra năm phân đoạn, **EL2A- EL2E**. Phân đoạn **EL2E** (17,0 g) được xử lý bằng silica gel column chromatography và được rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexane-CHCl₃-EtOAc-Acetone (3:0,2:0,2:0,2, v/v) từ đó, thu được năm phân đoạn phụ, **EL2E1-EL2E5**. Phần **EL2E4** (12,5 mg) được sắc ký liên tục trên silica gel column chromatography rửa giải bằng *n*-hexan-CHCl₃-EtOAc-Acetone (3,5:0,2:0,2:0,2, v/v) để thu được hợp chất (**2**) (5,3 mg) và hợp chất (**3**) (1,5 mg). Phân đoạn **EL3** (1,2 gam) được xử lý bằng sắc ký cột liên tục trên silica gel column chromatography rửa giải bằng *n*-hexane-EtOAc (4:1 v/v) thu được hợp chất (**1**) (3 mg)



Sơ đồ 2.1. Quá trình phân lập các chất trong cao ethyl acetate.

2.3.3.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập

- Khối phổ (HR-ESI-MS): Máy HR-ESI-MS (Bruker MicroOTOF-Q 10187);
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân – NMR (i) 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), (ii) 2D-NMR (HSQC, HMBC, COSY, NOESY): Máy cộng hưởng từ hạt nhân (BRUKER AVANCE) - tần số 400 - 600 MHz (phổ $^1\text{H-NMR}$) và 100-125 MHz (phổ $^{13}\text{C-NMR}$) tại Trung tâm phổ ứng dụng – Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Hà Nội) và Máy cộng hưởng từ hạt nhân (BRUKER AVANCE III) tần số 400 MHz (đối với phổ $^1\text{H-NMR}$) và 100 MHz (đối với phổ $^{13}\text{C-NMR}$) tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3.4. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

- **Nguyên tắc:**

Hoạt tính ức chế alpha-glucosidase của tất cả các hợp chất phân lập được xác định bằng phương pháp từ Kurihara [47] với một số thay đổi. Các alpha-glucosidase (0,1 U/mL) và cơ chất (3,0 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) đã được hòa tan trong dung dịch đệm natri phosphat 0.01 mM pH 7,0. Chất ức chế (50 μL) đã được xác định trước bằng α -glucosidase ở 37° C trong 20 phút, và sau đó chất nền (40 μL) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng enzyme được thực hiện ở 37°C trong 30 phút và dừng lại bằng cách thêm Na_2CO_3 0,1 M (375 μL). Hoạt tính của enzyme được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ ở 415 nm bằng máy quang phổ Shimadzu UV-1800. Tất cả các mẫu được phân tích ba lần ở năm nồng độ khác nhau xung quanh các giá trị IC_{50} và các giá trị trung bình được giữ lại. Tỷ lệ phần trăm ức chế (%) được tính theo phương trình sau:

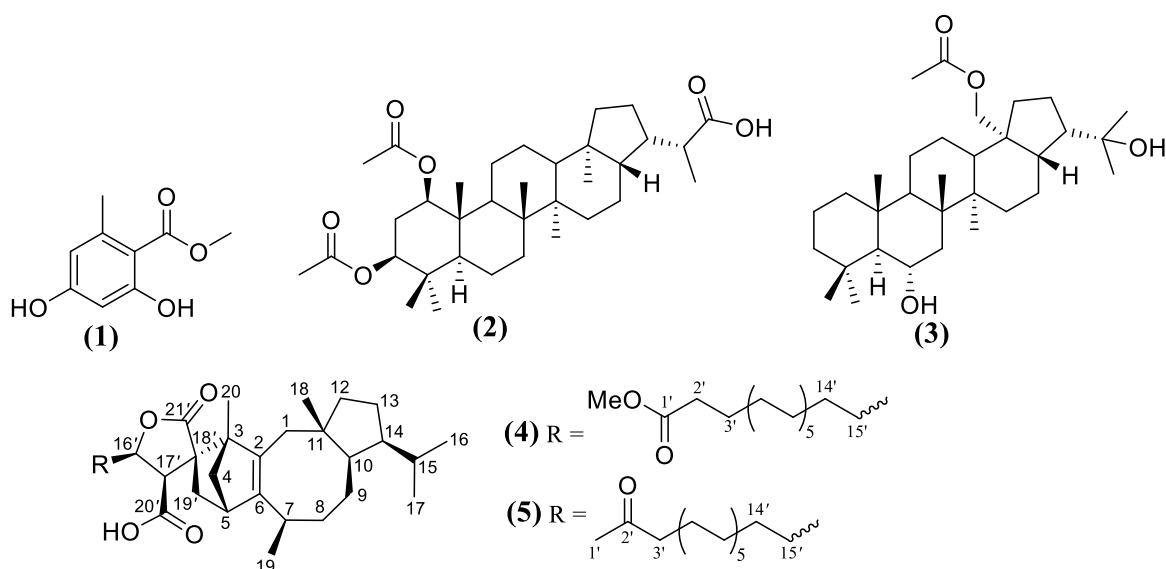
$$\text{Ức chế (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A sample: Độ hấp phụ bước sóng tại 425 nm của mẫu đo

A control: Độ hấp phụ bước sóng tại 425 nm của chất chuẩn.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sử dụng các phương pháp chiết xuất và sắc ký đã cô lập được từ cao ethyl acetate của cây địa y *Parmotrema tinctorum* năm hợp chất. Bằng các phương pháp phổ nghiệm và so sánh với tài liệu tham khảo, các hợp chất trên có công thức cấu tạo đề nghị là:



3.1. Khảo sát cấu trúc

3.1.1. Khảo sát cấu trúc hợp chất 1

Hợp chất 1 thu được từ phân đoạn cao ethyl acetate của cây *Parmotrema tinctorum* có dạng chất vô định hình màu trắng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , phụ lục 1).

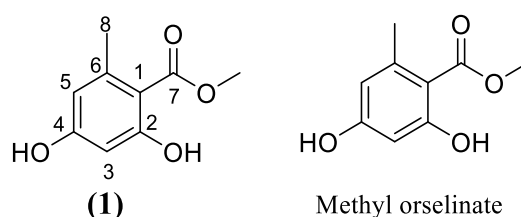
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , phụ lục 2).

Biện luận cấu trúc

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 1 cho thấy sự hiện diện hai tín hiệu của hai proton vòng thơm tại δ_{H} 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3) và 6,16 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5), hằng số tách nhỏ 2,0 Hz giúp xác định hai proton này ở vị trí meta với nhau. Ngoài ra còn có sự xuất hiện của một methyl mũi đơn tại δ_{H} 2,44 ppm và một oxymethyl tại δ_{H} 3,89 ppm.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất 1 có sự hiện diện của 9 tín hiệu carbon bao gồm: sáu tín hiệu carbon vòng thơm (δ_{C} 166,1, 163,8, 144,5, 112,4, 105,7, 101,7 ppm), một carbon ketone (δ_{C} 173,4 ppm), một carbon gắn dị tố (δ_{C} 52,1 ppm), một carbon methyl (δ_{C} 24,2 ppm).

Từ dữ liệu phân tích phổ cho thấy hợp chất **1** là một mono aromatic có 9 carbon. Trong đó có sự xuất hiện của một nhóm CH₃OCO- dựa vào tín hiệu phổ tại carbon ketone C-7 (δ_C 173,4) và OCH₃ (δ_C 52,1 ppm). Ngoài ra, tín hiệu methyl tại δ_H 2,44 ppm giúp xác định methyl gắn trực tiếp vòng thơm. Bên cạnh đó, hai tín hiệu carbon tại δ_C 166,1, 163,8 ppm giúp xác định hai carbon gắn nhóm OH tại C-2 và C-4. Từ những nhận định trên giúp xác định hợp chất **1** là methyl orselinate. Cấu trúc hoá học của **1** được củng cố bằng việc so sánh dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **1** với dữ liệu phổ tương ứng của hợp chất methyl orselinate [48] nhận thấy có sự tương đồng nhất định. Từ đó kết luận hợp chất **1** là methyl orselinate.



Hình 3.1. Công thức hoá học hợp chất **1**

Bảng 3.1. So sánh dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **1** và methyl orselinate.

| No. | 1 | | <i>Methyl orselinate</i> | |
|-----------|---|---------------------|---|---------------------|
| | δ_H^a ppm, <i>J</i> (Hz) | δ_C^a ppm | δ_H^b ppm, <i>J</i> (Hz) | δ_C^b ppm |
| 1 | - | 105,7 | - | 105,7 |
| 2 | - | 166,1 | - | 165,4 |
| 3 | 6,20, 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz | 101,7 | 6,28, 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz | 101,4 |
| 4 | - | 163,8 | - | 160,7 |
| 5 | 6,16, 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz | 112,4 | 6,23, 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz | 111,6 |
| 6 | - | 144,5 | - | 144,1 |
| 7 | - | 173,4 | - | 172,3 |
| 8 | 2,44, 3H, <i>s</i> | 24,2 | 2,48, 3H, <i>s</i> | 24,4 |
| 7- OMe | 3,89, 3H, <i>s</i> | 52,1 | 3,92, 3H, <i>s</i> | 52,0 |

^a: Phổ ¹H-NMR (400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) được đo trong CD₃OD

^b: Phổ ¹H-NMR (400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) được đo trong CDCl₃

3.1.2. Khảo sát cấu trúc hợp chất 2

Hợp chất **2** thu được từ phân đoạn cao ethyl acetate của cây *Parmotrema tinctorum* có dạng chất vô định hình màu trắng.

Phổ HR-ESI-MS (phụ lục 3).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , phụ lục 4).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , phụ lục 5).

Phổ HSQC (Acetone- d_6 , phụ lục 6).

Phổ HMBC (Acetone- d_6 , phụ lục 7).

Phổ NOESY (Acetone- d_6 , phụ lục 8).

Tính toán mô phỏng DP4⁺ (phụ lục 29-31).

Biện luận cấu trúc

Hợp chất **2** (5,3 mg) được phân lập từ cao ethyl acetate điều chế từ địa y *Parmotrema tinctorum* ở dạng chất vô định hình màu trắng.

Từ dữ liệu phổ HR-ESI-MS ở chế độ ion dương, công thức phân tử của hợp chất **2** được xác định là $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_6$, được kết luận từ mũi ion giả phân tử tại m/z 559,3974 (ứng với giá trị 559,3999 của $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_6 + \text{H}^+$).

Từ các dữ liệu thu thập được từ các phổ $^1\text{H-NMR}$ và HSQC của hợp chất **2**, đã cho thấy sự hiện diện của các nhóm chức quan trọng bao gồm sáu nhóm methyl liên kết với carbon tứ cấp lần lượt tại các tín hiệu δ_{H} (ppm): 1,04 (3H, s, H-25), 1,01 (3H, s, H-26), 0,98 (3H, s, H-27), 0,87 (3H, s, H-24), 0,86 (3H, s, H-23), 0,74 (3H, s, H-28); một nhóm methyl liên kết với carbon methine no tại tín hiệu δ_{H} (ppm): 1,08 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-29); hai nhóm methyl liên kết với carbon carbonyl tại các tín hiệu δ_{H} (ppm): 1,97 (3H, s, H-34); 1,95 (3H, s, H-32); hai nhóm oxymethine lần lượt tại các tín hiệu δ_{H} (ppm): 4,64 (1H, *dd*, $J = 11,4, 4,8$ Hz, H-1), 4,53 (*dd*, $J = 12,0, 4,2$ Hz, H-3) và một nhóm các tín hiệu phân bố ở vùng từ trường cao dao động trong khoảng độ dịch chuyển 2,33 – 0,93 ppm. Tiếp tục phân tích và kết nối các dữ liệu được thể hiện từ phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất **2** cho thấy hợp chất này có cấu trúc gồm 34 carbon trong đó bao gồm ba carbon carboxyl lần lượt tại các tín hiệu δ_{C} (ppm): 178,0 (C-30), 170,5 (C-33), 170,2 (C-31); sáu carbon methine lần lượt tại δ_{C} (ppm): 54,6 (C-17), 53,2 (C-5), 51,4 (C-9), 49,5 (C-13), 43,0 (C-21), 42,9 (C-22); hai carbon oxymethine lần lượt tại δ_{C} (ppm): 80,7 (C-1), 76,9 (C-3); chín carbon methylene lần lượt tại δ_{C} (ppm): 41,6 (C-19), 34,2 (C-7),

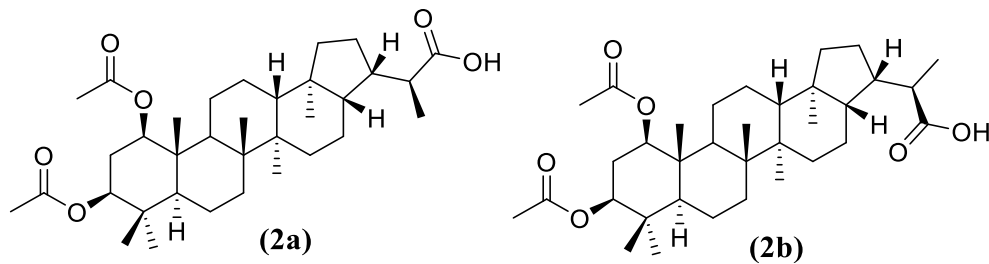
33,7 (C-15), 30,3 (C-2), 27,1 (C-20), 24,6 (C-12), 23,8 (C-11), 20,5 (C-16), 18,3 (C-6); chín carbon methyl lần lượt tại δ_C (ppm): 28,0 (C-23), 21,6 (C-34), 20,9 (C-32), 18,0 (C-29), 17,2 (C-26), 17,0 (C-27), 16,4 (C-24), 16,0 (C-28), 13,2 (C-25); và năm carbon tứ cấp lần lượt tại δ_C (ppm): 45,0 (C-18), 42,8 (C-8), 42,7 (C-10), 42,7 (C-14), 38,4 (C-4). Từ những dữ liệu đã được nêu, hợp chất **2** được khẳng định là một hợp chất triterpenoid mang khung hopane, đã được chứng minh tồn tại trong *P. tinctorum* [49]

Việc phân tích dữ liệu phổ HMBC của hợp chất **2** cho thấy các tương quan quan trọng giữa các tín hiệu proton nhóm methyl tại δ_H 1,99 (H₃-34) và 1,95 (H₃-32) lần lượt với các carbon C-33 (δ_C 170,5) và carbon C-31 (δ_C 170,2). Từ đó, giúp xác nhận sự hiện diện của hai nhóm acetoxycarbonyl tương ứng tại các vị trí C-1 (δ_C 80,7) và C-3 (δ_C 76,9). Sự có mặt của hai nhóm cấu trúc này được khẳng định thêm dựa trên tương quan HMBC giữa các tín hiệu proton oxymethin là H-1 (δ_H 4,64, *dd*, $J = 11,4, 4,8$ Hz) và H-3 (δ_H 4,53, *dd*, $J = 12,0, 4,2$ Hz) lần lượt với carbon C-31 và C-33. Bên cạnh đó, các tương quan HMBC giữa tín hiệu proton H₃-29 (δ_H 1,08, *d*, $J = 6,0$ Hz) và các tín hiệu carbon C-21 (δ_C 43,0), C-22 (δ_C 42,9) và C-30 (δ_C 182,0) khẳng định sự có mặt của một nhánh isopropyl tại vị trí C-21. Khi so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **2** và hợp chất indicuen đã được báo cáo [50] cho thấy nhiều sự tương đồng trong cấu trúc của hai hợp chất. Điểm khác biệt rõ nhất ở cả hai hợp chất này chính là sự hiện diện của nhóm acetoxy tại vị trí C-1 của hợp chất **2** thay vì nhóm hydroxyl trong indicuen, được củng cố bằng tín hiệu nhóm acetoxy tại [δ_C 170,5 (C-33); δ_H 1,99, *s* (H-34)] và phổ khối lượng HR-ESI-MS.

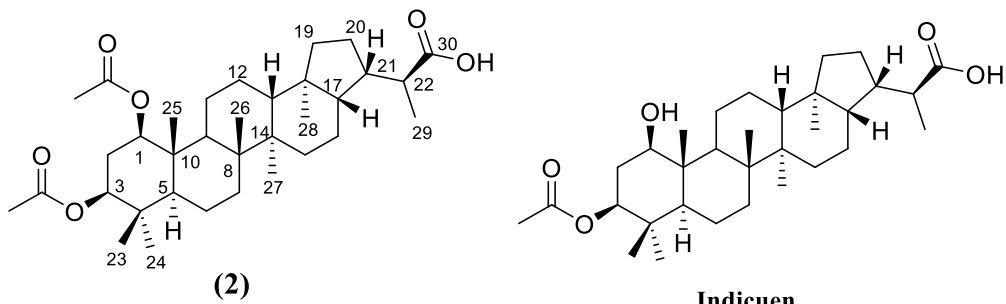
Cấu trúc của hợp chất **2** được củng cố bằng tín hiệu HMBC hình 3.4: H-1 tương quan C-33; H-3 tương quan C-31, H-34 tương quan C-33; H-32 tương quan C-31, H-25 tương quan C-1, C-10, C-5; H-23 và H-24 cũng cho tương quan C-3, C-4, C-5; H-26 tương quan C-7, C-8, C-9, C-14; H-27 tương quan C-8, C-13, C-14, C-15; H-28 tương quan C-17, C-18, C-19; H-29 tương quan C-22 và C-30.

Từ các hằng số ghép của hai tín hiệu proton oxymethine H-1 (δ_H 4,64, *dd*, $J = 11,4, 4,8$ Hz) và H-3 (δ_H 4,53, *dd*, $J = 12,0, 4,2$ Hz) giúp xác định cấu trúc lập thể tương đối tại vị trí trục của hai nhóm cấu trúc này. Bên cạnh đó, từ dữ liệu phổ NOESY của hợp chất **2**, tương quan theo từng cặp giữa các tín

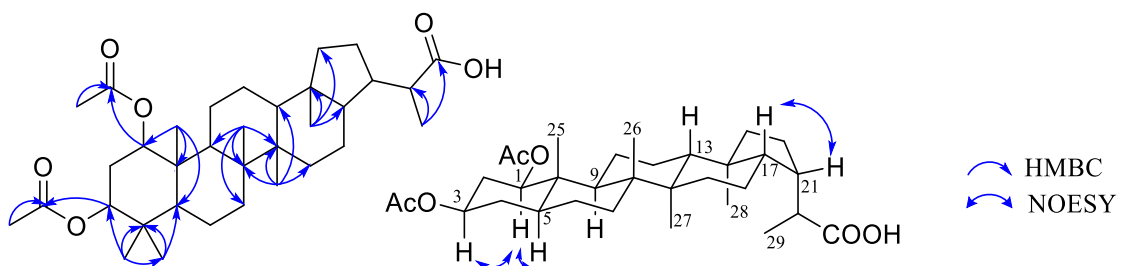
hiệu proton H-1, H-3, H-5 (δ_H 0,93) từ đó xác định được lập thể tại tâm C-1, 3 với các H-1,3 tồn tại ở cùng phía α với H-5. Ngoài ra, tương quan Noesy giữa proton H-17 (δ_H 1,24) và H-21 (δ_H 2,33) cũng cho phép xác định được định hướng syn- α của các proton này. Tuy nhiên, lập thể tại vị trí C-22 không thể được xác định bởi phổ Noesy, nên tại C-22 có 2 trường hợp đồng phân lập thể R/S. Từ đó, hai xuyên lập thể phân (2a) và (2b) (hình 3.2) được đề nghị cho cấu trúc lập thể của hợp chất 2. Phương pháp tính toán DP4⁺ được áp dụng cho 2 xuyên lập thể phân này cho thấy cấu trúc (2b) cho độ trùng khớp lên đến 87,70% (phụ lục 29-31). Kết hợp tất cả các dữ liệu đã được nêu, cấu trúc lập thể của hợp chất 2 được xác định là 2b như hình 3.4, được đặt tên là Tinctorin C. Sau khi tiến hành kiểm tra Scifinder vào 18/5/2023 tại trường Đại Học Chulalongkorn, Thái Lan, hợp chất 2 được xác định là hợp chất mới.



Hình 3.2. Cấu trúc hoá học có thể có của hợp chất 2



Hình 3.3. Công thức hoá học của hợp chất 2 và idicuen



Hình 3.4. Tương quan HMBC, và NOESY của hợp chất 2

Bảng 3.2. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **2**.

| No. | 2 | | Idicuen | |
|-----|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ppm, <i>J</i> (Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ ppm | $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ ppm, <i>J</i> (Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ ppm |
| 1 | 4,64 (<i>dd</i> , 4,8, 11,4) | 80,7 | 3,55, <i>dt</i> , 11,0, 5,0 | 78,9 |
| 2 | 1,87 (<i>m</i>) – 1,64 (<i>d</i> , 12 Hz) | 30,3 | 1,77 <i>m</i> | 35,1 |
| 3 | 4,53 (<i>dd</i> , 4,2, 12,0) | 76,9 | 1,73 <i>m</i> | 78,0 |
| 4 | - | 38,4 | 4,47, <i>dd</i> , 12,0, 4,5 | 38,5 |
| 5 | 0,93 (<i>m</i>) | 53,2 | 0,77 <i>m</i> | 53,7 |
| 6 | 1,60 (<i>m</i>) | 18,3 | 1,58 <i>m</i> 1,53 <i>m</i> | 18,7 |
| 7 | 1,37 (<i>m</i>) – 1,21 (<i>m</i>) | 34,2 | 1,05 <i>m</i> 0,88 <i>m</i> | 34,1 |
| 8 | - | 42,8 | - | 43,1 |
| 9 | 1,55 (<i>m</i>) | 51,4 | 1,59 <i>m</i> | 52,2 |
| 10 | - | 42,7 | - | 44,2 |
| 11 | 1,52 (<i>m</i>) – 1,37 (<i>m</i>) | 23,8 | 1,65 <i>m</i> 1,63 <i>m</i> | 20,7 |
| 12 | 1,53 (<i>m</i>) – 1,37 (<i>m</i>) | 24,6 | 2,61 <i>m</i> 1,54 <i>m</i> | 24,7 |
| 13 | 1,38 (<i>m</i>) | 49,5 | 1,40 <i>m</i> | 50,0 |
| 14 | - | 42,7 | - | 42,8 |
| 15 | 1,26 (<i>m</i>) | 33,7 | 2,30 <i>m</i> 1,21 <i>m</i> | 34,3 |
| 16 | 1,58 (<i>m</i>) – 1,47 (<i>m</i>) | 20,5 | 1,54 <i>m</i> 1,34 <i>m</i> | 24,4 |
| 17 | 1,24 (<i>m</i>) | 54,6 | 1,24 <i>m</i> | 54,7 |
| 18 | - | 45,0 | - | 45,1 |
| 19 | 1,51 (<i>m</i>) – 0,93 (<i>m</i>) | 41,6 | 1,62 <i>m</i> 1,00 <i>m</i> | 41,8 |
| 20 | 1,85 (<i>m</i>) – 1,48 (<i>m</i>) | 27,1 | 1,77 <i>m</i> 1,50 <i>m</i> | 27,1 |

| | | | | |
|----|-------------|-------|-----------------|-------|
| 21 | 2,33 (m) | 43,0 | 1,77 m | 42,9 |
| 22 | 2,32 (m) | 42,9 | 2,34 m | 43,6 |
| 23 | 0,86 (s) | 28,0 | 0,85 s | 28,2 |
| 24 | 0,87 (s) | 16,4 | 0,85 s | 16,6 |
| 25 | 1,04 (s) | 13,2 | 0,93 s | 12,3 |
| 26 | 1,01 (s) | 17,2 | 1,02 s | 17,3 |
| 27 | 0,98 (s) | 17,0 | 0,99 s | 17,1 |
| 28 | 0,74 (s) | 16,0 | 0,77 s | 16,2 |
| 29 | 1,08 (d, 6) | 18,0 | 1,08, d, 5,5 Hz | 18,0 |
| 30 | - | 178,0 | - | 178,6 |
| 31 | - | 170,2 | 1,99 s | 21,0 |
| 32 | 1,95 (s) | 20,9 | | 170,7 |
| 33 | - | 170,5 | | |
| 34 | 1,99 (s) | 21,6 | | |

^a: Phổ ¹H-NMR (600 MHz), ¹³C-NMR (150 MHz) được đo trong Acetone-*d*₆

^b: Phổ ¹H-NMR (500 MHz), ¹³C-NMR (125 MHz) được đo trong Acetone-*d*₆

3.1.3. Khảo sát cấu trúc hợp chất 3

Hợp chất **3** thu được từ phân đoạn cao ethyl acetate của cây *Pamotrema tinctorum* có dạng chất vô định hình màu trắng.

Phổ HR-ESI-MS (phụ lục 9).

Phổ ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, phụ lục 10).

Phổ ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, phụ lục 11).

Phổ HSQC (Acetone-*d*₆, phụ lục 12).

Phổ HMBC (Acetone-*d*₆, phụ lục 13).

Phổ NOESY (Acetone-*d*₆, phụ lục 14).

Biện luận cấu trúc

Công thức phân tử của **3** được xác định là C₃₂H₅₄O₄ được suy ra từ mũi ion giả phân tử tại m/z 503,4071 (tính toán cho C₃₂H₅₄O₄ + H⁺, 503,4100) trong phổ HR-ESI-MS.

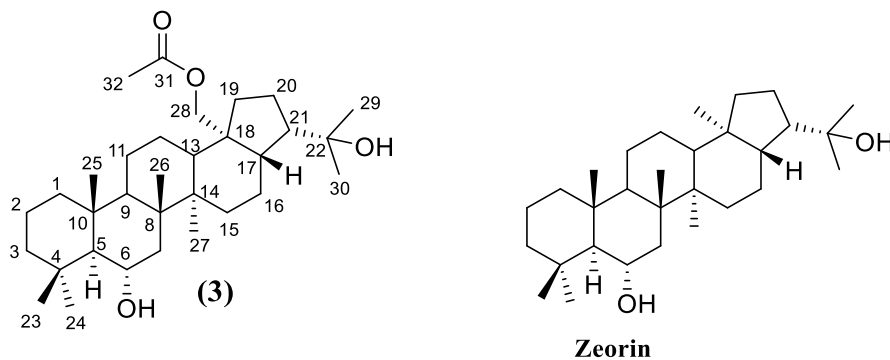
Phổ ¹H-NMR của hợp chất **3** cho thấy sự hiện diện của một tín hiệu oxymethine tại δ_H 3,92 (1H, m, H-6), một oxymethylene tại δ_H 4,60 (1H, d, *J* = 1,2, 12,0 Hz, H-28a) và 4,34 (1H, d, *J* = 1,8, 12,6 Hz, H-28b) và tám nhóm

methyl mũi đơn (δ_H 1,97), (1,27), (1,19), (1,15), (1,11), (1,08), (1,02), (0,90) ppm). Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ HSQC cho thấy hợp chất có sự hiện diện của 32 tín hiệu carbon bao gồm: sáu carbon methine tại δ_C (68,5), (61,3), (55,0), (51,0), (50,9), (50,7), mười một carbon methylene tại δ_C (64,9), (46,1), (44,7), (41,3), (36,2), (35,1), (26,8), (26,4), (22,3), (22,5), (18,9), tám carbon methyl tại δ_C (37,2), (31,7), (30,2), (22,5), (21,1), (18,8), (17,9), (17,6) và bảy carbon tứ cấp tại δ_C (171,0), (72,7), (47,8), (43,7), (42,7), (39,9), (34,3).

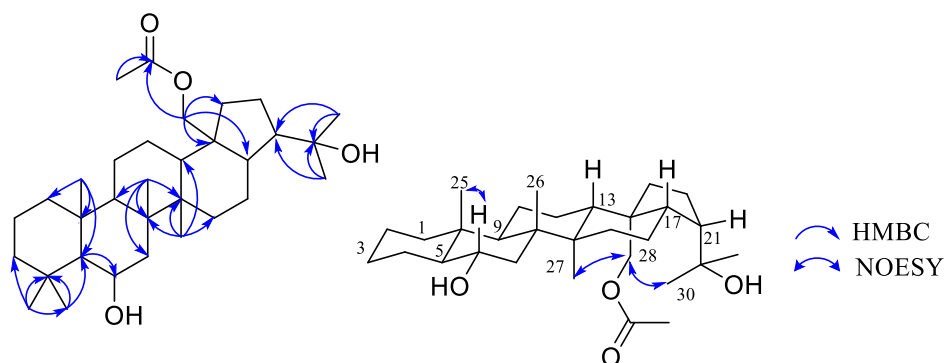
So sánh dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của **3** với dữ liệu phổ của zeorin nhận thấy có sự tương đồng nhất định. Điểm khác biệt lớn nhất nằm ở sự xuất hiện của nhóm acetoxy tại vị trí C-28 được củng cố bằng tương quan H-32 δ_H 1,97 (3H, s) tương quan C-31 (δ_C 171,0) và H-28 (δ_H 4,60 và 4,34) tương quan C-31 (δ_C 171,0), C-17 (δ_C 55,0), C-18 (δ_C 47,8), C-19 (δ_C 46,2).

Mặt khác, cấu trúc phẳng của hợp chất **3** được củng cố bằng tương quan HMBC (hình 3.6): H-5 tương quan C-6; H-23 và H-24 cùng tương quan C-4, C-3, C-5; H-25 tương quan C-1, C-5, C-10; H-26 tương quan C-7, C-8, C-9, C-14, H-27 tương quan C-8, C-13, C-14, C-15; H-28 tương quan C-17, C-18, C-19 và C-31; H-30 và H-29 cùng tương quan C-21 và C-22; H-32 tương quan C-31.

Cấu hình tương đối của **3** được xác định bằng việc phân tích tương quan phổ NOESY. Tương quan NOESY của H-25 với H-6 giúp xác định vị trí α của nhóm hydroxy tại vị trí C-6. Bên cạnh đó, tương quan NOESY của H-27, H₂-28, và H₂-30 cho thấy chúng cùng định hướng không gian như cấu trúc của Zeorin [56]. Từ những dữ kiện trên, kết luận hợp chất **3** có công thức như hình 3.5, được đặt tên Tinctorin B.



Hình 3.5. Công thức hoá học của hợp chất **3** và Zeorin



Hình 3.6. Tương quan HMBC, và NOESY của hợp chất **3**

Bảng 3.3. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **3**.

| No. | 3^a | | Zeorin^b | |
|-----|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ppm, <i>J</i> (Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ ppm | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ppm, <i>J</i> (Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ ppm |
| 1 | 1,62, 1H, <i>m</i> | 41,3 | | 40,5 |
| | 0,84, 1H, <i>m</i> | | | |
| 2 | 1,58, 1H, <i>m</i> | 18,9 | | 18,6 |
| | 1,35, 1H, <i>m</i> | | | |
| 3 | 1,30, 1H, <i>m</i> | 44,7 | | 43,9 |
| | 1,19, 1H, <i>m</i> | | | |
| 4 | - | 34,3 | | 33,7 |
| 5 | 0,87, 1H, <i>m</i> | 61,3 | 0,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,0 Hz) | 61,2 |
| 6 | 3,92, 1H, <i>m</i> | 68,5 | 3,96 (1H, <i>td</i> , <i>J</i> = 10,8, 4,0 Hz) | 69,5 |
| 7 | 1,53, 2H, <i>m</i> | 46,1 | | 45,5 |
| 8 | - | 43,7 | | 43,0 |
| 9 | 1,51, 1H, <i>m</i> | 50,7 | | 49,9 |
| 10 | - | 39,9 | | 39,5 |
| 11 | 2,00, 1H, <i>m</i> | 22,3 | | 20,8 |
| | 1,63, 1H, <i>m</i> | | | |
| 12 | 1,70, 2H, <i>m</i> | 26,8 | | 24,1 |
| 13 | 1,26, 1H, <i>m</i> | 51,0 | | 49,6 |
| 14 | - | 42,7 | | 42,0 |
| 15 | 1,47, 1H, <i>m</i> | 35,1 | | 34,5 |
| | 1,28, 1H, <i>m</i> | | | |

| | | | | |
|----|--|-------|--------------------|------|
| 16 | 1,52, 1H, <i>m</i> 1,26, 1H, <i>m</i> | 22,5 | | 21,2 |
| 17 | 1,62, 1H, <i>m</i> | 55,0 | | 54,1 |
| 18 | - | 47,8 | | 44,2 |
| 19 | 2,06, 1H, <i>m</i> 0,87, 1H, <i>m</i> | 36,2 | | 41,4 |
| 20 | 1,62, 2H, <i>m</i> | 26,4 | | 26,7 |
| 21 | 2,21, 1H, <i>m</i> | 50,9 | 2,17, 1H, <i>m</i> | 51,2 |
| 22 | - | 72,7 | - | 74,4 |
| 23 | 1,19, 3H, <i>s</i> | 37,2 | 1,19, 3H, <i>s</i> | 36,9 |
| 24 | 1,02, 3H, <i>s</i> | 22,5 | 1,00, 3H, <i>s</i> | 22,2 |
| 25 | 0,90, 3H, <i>s</i> | 17,6 | 0,85, 3H, <i>s</i> | 17,2 |
| 26 | 1,08, 3H, <i>s</i> | 18,8 | 1,03, 3H, <i>s</i> | 18,4 |
| 27 | 1,11, 3H, <i>s</i> | 17,9 | 0,96, 3H, <i>s</i> | 17,2 |
| 28 | 4,60, 1H, <i>dd</i> , J = 1,2, 12,0 4,34, 1H, <i>dd</i> , J = 1,8, 12,6 | 64,9 | 0,75, 3H, <i>s</i> | 16,2 |
| 29 | 1,27, 3H, <i>s</i> | 31,7 | 1,14, 3H, <i>s</i> | 28,8 |
| 30 | 1,15, 3H, <i>s</i> | 30,2 | 1,18, 3H, <i>s</i> | 30,9 |
| 31 | - | 171,0 | | |
| 32 | 1,97, 3H, <i>s</i> | 21,1 | | |

^a: Phổ ¹H-NMR (600 MHz), ¹³C-NMR (150 MHz) được đo trong Acetone-*d*₆

^b: Phổ ¹H-NMR (400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) được đo trong CDCl₃

3.1.4. Khảo sát cấu trúc hợp chất 4

Hợp chất **4** thu được từ phân đoạn cao ethyl acetate điều chế từ địa y *Parmotrema tinctorum* ở dạng chất vô định hình màu trắng.

Phổ HR-ESI-MS (phụ lục 15).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, phụ lục 16).

Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, phụ lục 17).

Phổ HSQC (CDCl₃, phụ lục 18).

Phổ HMBC (CDCl₃, phụ lục 19).

Phổ NOESY (CDCl₃, phụ lục 20).

Biện luận cấu trúc

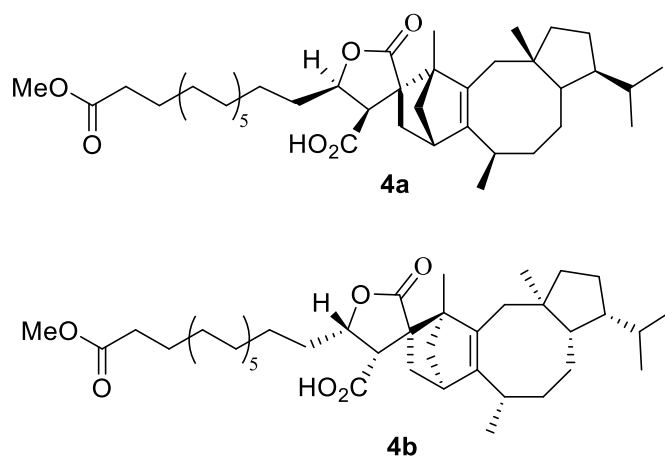
Hợp chất **4** có công thức phân tử ($C_{42}H_{68}O_6$) được suy ra trên cơ sở dữ liệu HR-ESI-MS ($[M-H]^-$ m/z 667,4932, tính toán cho $C_{42}H_{67}O_6^-$, 667,4943). Phổ 1H -NMR hiển thị tín hiệu cho hai nhóm methyl chẻ mũi đơn [δ_H 1,23 (H_3 -20) và 0,75 (H_3 -18)], ba nhóm methyl mũi đôi [δ_H 0,97 (CH_3 -19), 0,87 (H_3 -16), và 0,74 (H_3 -17)], một nhóm methoxy [δ_H 3,67 (s), 1'-OMe], một oxymethine [δ_H 4,44 (td, $J = 8,0, 4,5$ Hz), H-16'], ba nhóm methine [δ_H 2,88 (brd, $J = 3,2$ Hz, H-5); 2,69 (d, $J = 8,4$ Hz, H-17'); và 2,55 (m, H-7)] và các tín hiệu đường lên khác trong khoảng 1,20-1,80 ppm.

Dữ liệu ^{13}C -NMR thể hiện 42 tín hiệu carbon. Khi kết hợp với phổ HSQC, tín hiệu carbon được xác định là một carbon este carbon tại δ_C (174,7), C-1'), một carbon methoxy δ_C (51,7), (C-1'-OMe), hai carbon carboxylic δ_C (180,3), (C- 21' và 175,0, C-20'), hai carbon olefinic δ_C (150,5), (C-6 và 141,1, C-2), bảy carbon methin [δ_C 79,1 (C-16'), 52,8 (C-17'), 48,1 (C-10), 47,4 (C-14), 40,7 (C-5), 30,4 (C-7) và 28,5 (C-15)], 21 carbon methylene [δ_C 51,1 (C-4), 40,3 (C-1), 41,9 (C-12), 39,1 (C-19'), 36,9 (C-8), 35,3 (C-15'), 34,3 (C-2'), 29,5x10 (C- 5' đến C-14'), 25,1 (C-3'), 24,1 (C-9), 24,0 (C-4'), và 20,9 (C-13)], năm carbon methyl [δ_C 23,6 (C-16), 21,8 (C-18), 19,0 (C-17), 18,1 (C-19), và 13,4 (C-20)], và ba carbon bậc bốn (δ_C 61,4 (C-3), 58,7 (C-18 '), và 46,4 (C-11)]. Việc phân tích cẩn thận dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của **4** tương tự như của reticulatin [51], ngoại trừ việc thay thế nhóm acetyl tại C-3' trong reticulatin bởi nhóm 1-methoxy-1-oxoethyl trong **4**. Sự thay thế này được hỗ trợ bởi sự hiện diện của carbonyl este carbon (δ_C 174,7) trong **4** thay vì carbon ketone (δ_C 209,9) trong reticulatin, cùng với mối tương quan HMBC của các proton methoxy [δ_H 3,67 (s, 1'-OMe)] và các proton methylene [δ_H 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, H-2')] đến C-1' (δ_C 174,7).

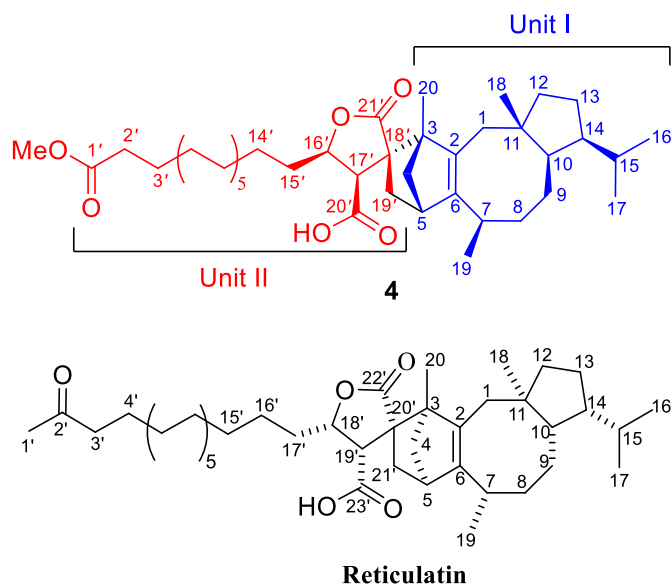
Cấu trúc phẳng của hợp chất **4** được củng cố bằng tương quan HMBC (hình 3.9): H-1' tương quan C-2'; H-3' tương quan C-2'; H-17' tương quan C-18', C-19', C-20', C-21', C-22', C-23', C-3; H-20 tương quan C-2, C-3, C-4 và C-20'; H-18 tương quan với C-1, C-10, C-11, C-12'; H-19 tương quan C-6, C-7, C-8; H-16 và H-17 cùng tương quan C-14 và C-15; H-16 tương quan C-17.

Ngoài ra, cấu hình tương đối của **4** được có độ tương đồng cao với cấu hình của reticulatin và *nor*-reticulatin, được xác nhận thêm bởi các tương quan NOESY chính của H-14/H-10/H-7, H-17'/H-16'/H₃-20 và H₃-19/H-5. Từ

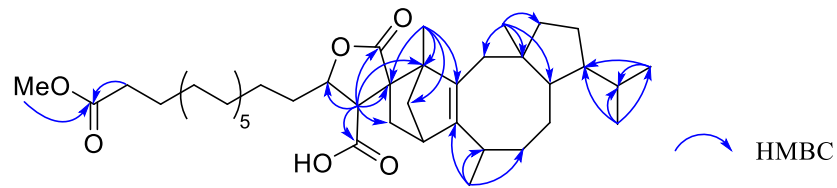
cấu hình tương đối của **4**, hai đồng phân (**4a** và **4b**) được đề nghị là cấu hình tuyệt đối có thể của **4**. Để xác nhận cấu hình lập thể của nó, phổ ECD của **4a** và **4b** được tiến hành mô phỏng và so sánh với phổ thực nghiệm của **4**. Kết quả cho thấy phổ ECD thực nghiệm của hợp chất **4** có hiệu ứng Cotton dương tại 195 và 220 nm, giống với phổ ECD mô phỏng của hợp chất **4a**. Do đó, **4a** được xác định là cấu hình tuyệt đối của **4** với các tâm thủ tính 3S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14S, 16'R, 17'R, 18'S. Trên cơ sở dữ liệu phổ ở trên kết hợp với dữ liệu kiểm tra scifinder, hợp chất **4** được xác định là C42-spiroterpenoid mới.



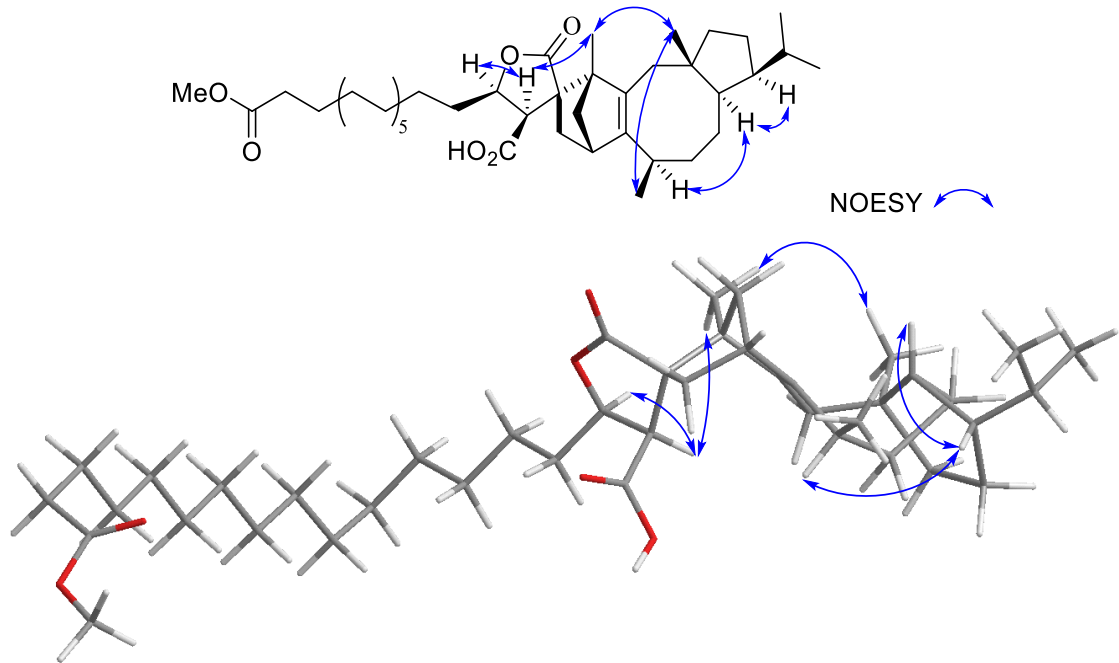
Hình 3.7. Hai đồng phân có thể có của hợp chất **4**.



Hình 3.8. Công thức hoá học hợp chất **4** và reticulatin



Hình 3.9. Tương quan HMBC hợp chất **4**.



Hình 3.10. Tương quan NOESY hợp chất **4**.

Bảng 3.4. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **4**.

| No. | 4^a | | Reticulatin^a | |
|-----|---|---------------------|---|---------------------|
| | δ_{H} , mult (<i>J</i> , Hz) | δ_{C} | δ_{H} , mult (<i>J</i> , Hz) | δ_{C} |
| 1 | 2,07 <i>d</i> (8,4) | 40,3 | 2,09 <i>s</i> | 40,3 |
| | 2,05 <i>d</i> (10,4) | | | |
| 2 | - | 141,1 | - | 141,1 |
| 3 | - | 61,4 | - | 61,5 |
| 4 | 2,27 <i>m</i> | 51,1 | 2,27 <i>d</i> (7,0) | 51,2 |
| | 1,37 <i>m</i> | | 1,35 <i>m</i> | |
| 5 | 2,88 brd (3,2) | 40,7 | 2,87 <i>d</i> (3,0) | 40,8 |
| 6 | - | 150,5 | - | 150,4 |
| 7 | 2,55 <i>m</i> | 30,4 | 2,56 <i>m</i> | 30,4 |
| 8 | 1,45 <i>m</i> | 36,9 | 1,45 <i>m</i> | 37,0 |
| | 1,37 <i>m</i> | | 1,34 <i>m</i> | |

| | | | | |
|--------|--|-------|--|-------|
| 9 | 1,53 <i>m</i> 1,38 <i>m</i> | 24,1 | 1,48 <i>m</i> 1,34 <i>m</i> | 24,2 |
| 10 | 1,79 <i>m</i> | 48,1 | 1,79 <i>m</i> | 48,2 |
| 11 | - | 46,4 | - | 46,4 |
| 12 | 1,40 <i>m</i> | 41,9 | 1,38 <i>m</i> | 41,9 |
| 13 | 1,45 <i>m</i> 1,13 <i>m</i> | 20,9 | 1,43 <i>m</i> | 21,0 |
| 14 | 2,08 <i>m</i> | 47,4 | 2,08 <i>m</i> | 47,6 |
| 15 | 1,70 <i>m</i> | 28,5 | 1,70 <i>m</i> | 28,6 |
| 16 | 0,87 <i>d</i> (6,4) | 23,6 | 0,87 <i>d</i> (6,5) | 23,6 |
| 17 | 0,74 <i>d</i> (8,0) | 19,0 | 0,74 <i>d</i> (8,0) | 19,1 |
| 18 | 0,75 <i>s</i> | 21,8 | 0,75 <i>s</i> | 21,8 |
| 19 | 0,97 <i>d</i> (6,4) | 18,1 | 0,98 <i>d</i> (6,5) | 18,2 |
| 20 | 1,23 <i>s</i> | 13,4 | 1,23 <i>s</i> | 13,4 |
| 1' | | 174,7 | 2,13 <i>s</i> | 29,7 |
| 2' | 2,30 <i>t</i> (7,6) | 34,3 | - | 209,9 |
| 3' | 1,61 <i>m</i> | 25,1 | 2,41 <i>t</i> (7,5) | 44,0 |
| 4' | 1,24-1,30 <i>m</i> | 24,0 | 1,51 <i>m</i> | 24,1 |
| 5'-14' | 1,24-1,30 <i>m</i> | 29,5 | 1,24-1,29 | 29,5 |
| 15' | 1,72 <i>m</i> 1,63 <i>m</i> | 35,3 | 1,24-1,29 | 25,5 |
| 16' | 4,44 <i>td</i> (8,0, 4,5) | 79,1 | 1,24-1,29 | 25,5 |
| 17' | 2,69 <i>d</i> (8,4) | 52,8 | 1,70 <i>m</i> 1,61 <i>m</i> | 35,3 |
| 18' | | 58,7 | 4,44 <i>td</i> (8,0, 4,5) | 79,3 |
| 19' | 2,16 <i>dd</i> (4,0, 12,5) 1,97 <i>dd</i> (3,0, 12,5) | 39,1 | 2,67 <i>d</i> (8,5) | 52,9 |
| 20' | - | 175,0 | - | 58,6 |
| 21' | - | 180,3 | 2,16 <i>dd</i> (4,0, 12,5) 1,96 <i>dd</i> (3,0, 12,5) | 39,2 |
| 22' | | | - | 174,2 |
| 23' | | | - | 180,4 |

| | | |
|-----|--------|------|
| 1'- | | |
| OMe | 3,67 s | 51,7 |

^a: Phổ ¹H-NMR (500 MHz), ¹³C-NMR (125 MHz) được đo trong CDCl₃

3.1.5 Khảo sát cấu trúc hợp chất 5

Hợp chất **5** thu được từ phân đoạn EL2E cao ethyl acetate điều chế từ địa y *Parmotrema tinctorum* ở dạng chất vô định hình màu trắng.

Phổ HR-ESI-MS (phụ lục 21).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, phụ lục 22).

Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, phụ lục 23).

Phổ HSQC (CDCl₃, phụ lục 24).

Phổ HMBC (CDCl₃, phụ lục 25).

Phổ COSY (CDCl₃, phụ lục 26).

Phổ NOESY (CDCl₃, phụ lục 27).

Biện luận cấu trúc

Hợp chất **5** có mũi ion giả phân tử m/z 667,4932 trên HR-ESI-MS, giúp xác định công thức phân tử C₄₂H₆₈O₆ (C₄₂H₆₈O₆-H, 667,4943, tương ứng).

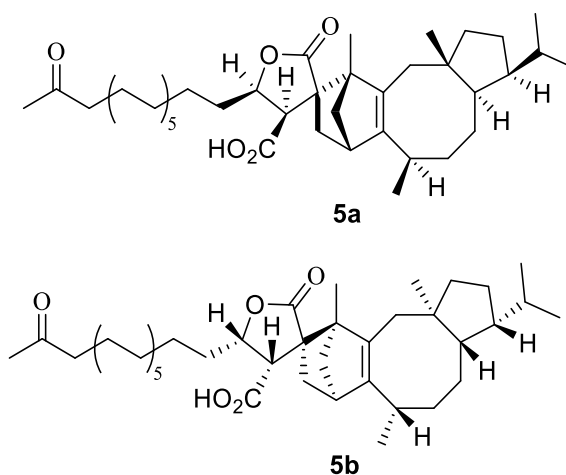
Phổ ¹H-NMR hiển thị tín hiệu cho hai nhóm methyl mũi đơn [δ_{H} 1,23 (H₃-20) và 0,75 (H₃-18)], ba nhóm methyl chẻ mũi đôi [0,97 (H₃-19), 0,87 (H₃-16), và 0,74 (H₃-17)], một nhóm methyl [δ_{H} 2.14 (s), H-1'], một oxymethine [δ_{H} 4,44 (td, J = 8,0, 4,5 Hz), H-16'], ba methine [δ_{H} 2,88 (brd, J = 3,2 Hz, H-5); 2,69 (d, J = 8,4 Hz, H-17'); và 2,55 (m, H-7)] và các tín hiệu đường lên khác trong khoảng 1,20-1,80 ppm.

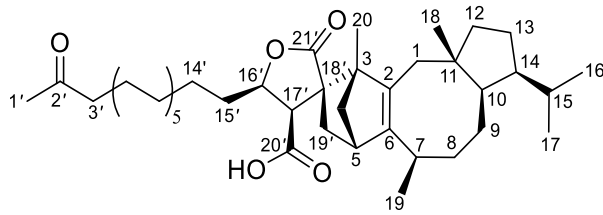
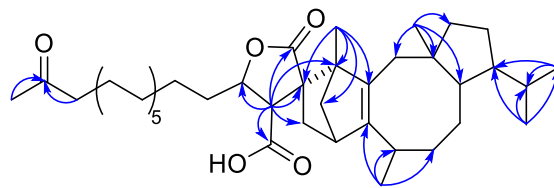
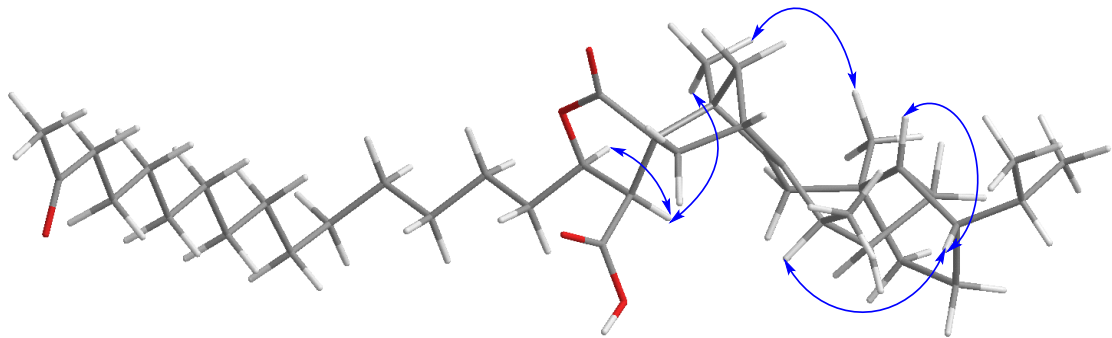
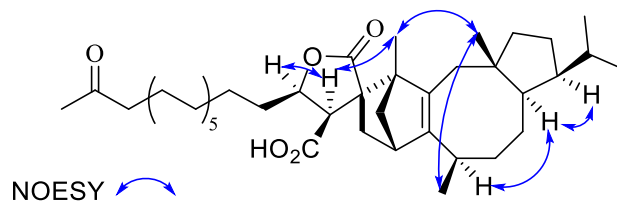
Dữ liệu ¹³C-NMR thể hiện 42 tín hiệu carbon. Khi kết hợp với phổ HSQC, tín hiệu carbon được xác định là một carbon ketone (210,0, C-2') carbon carboxylic (δ_{C} 180,3, C- 21' và 175,2, C-20'), hai carbon olefinic (δ_{C} 150,5, C-6 và 141,1, C-2), bảy methin [δ_{C} 79,1 (C-16'), 52,8 (C-17'), 48,1 (C-10), 47,4 (C-14), 40,7 (C-5), 30,4 (C-7) và 28,5 (C-15)], 21 methylene [δ_{C} 51,1 (C-4), 40,3 (C-1), 41,9 (C-12), 39,1 (C-19'), 36,9 (C-8), 35,3 (C-15'), 34,3 (C-2'), 29,5x10 (C- 5' đến C-14'), 25,1 (C-3'), 24,1 (C-9), 24,0 (C-4'), và 20,9 (C-13)], sáu methyl [δ_{C} 30,0 (C-1'), 23,6 (C-16), 21,8 (C-18), 19,0 (C-17), 18,1 (C-19), và 13,4 (C-20)], và ba carbon bậc bốn (δ_{C} 61,4 (C-3), 58,7 (C-18'), và 46,4 (C-11)].

Dữ liệu NMR cho thấy **5** gần giống với hợp chất **4**, ngoại trừ việc thay thế methyl keton bằng methyl este. Sự thay thế này được chứng minh bởi sự xuất hiện của carbon carboxy ở δ_C 174,7 thay vì carbon ketone ở δ_C 210,0 trong **4** cùng với mối tương quan HMBC của proton methoxy ở δ_H 3,67 và H₂-2' (δ_H 2,30) với C-1' (δ_C 174,7).

Cấu trúc phẳng của hợp chất **5** được làm sáng tỏ bằng các tương quan HMBC (hình 3.13): H-1' tương quan C-2'; H-3' tương quan C-2'; H-17' tương quan C-16, C-18, C-19, C-20', C-21' và C-3; H-18 tương quan C-1, C-10, C-11, C-12; H-19 tương quan C-6, C-7, C-8; H-20 tương quan với C-2, C-3, C-4 và C-18', H-17 và H-16 cùng tương quan C-14 và C-15.

Ngoài ra, cấu hình tương đối của **5** có độ tương đồng cao với cấu hình tương đối của **4**, được xác nhận bởi các tương quan NOESY của H-14 với H-10 và H-7; của H-17' đến H-16' và H₃-20; và của H₃-19 đến H-5. Do đó, hai đối phân **5a** và **5b** cũng được đề xuất để tính toán ECD tương tự như cách xác định cấu hình tuyệt đối của hợp chất **4**. Việc so sánh tính toán ECD của **5a** và **5b** với ECD thử nghiệm đã dẫn đến kết luận về cấu hình tuyệt đối là (3S, 5S, 7R, 10R, 11S, 14S, 16'R, 17'R, 18'S)-**5**. Cụ thể, phổ ECD thử nghiệm của hợp chất **5** cho thấy có hiệu ứng Cotton dương tại 195 và 230 nm, tương đồng với phổ ECD tính toán của hợp chất **5a** cũng như phổ ECD thực nghiệm của **4**. Từ những phân tích trên giúp xác định cấu trúc hoá học của **5** như **5a** (hình 3.10). Tuy hợp chất **5** có cấu trúc phẳng tương đồng với hợp chất *nor*-reticulatin [52], việc xác định cấu trúc lập thể của *nor*-reticulatin chỉ mới dừng lại ở việc xác định cấu hình tương đối. Do đó đây là lần đầu tiên hợp chất **5** được báo cáo cấu hình tuyệt đối.



Hình 3.11. Hai đồng phân có thể có của hợp chất **5****Hình 3.12.** Cấu trúc hoá học của hợp chất **5****Hình 3.13.** Tương quan HMBC của hợp chất **5****Hình 3.14.** Tương quan NOESY của hợp chất **5**.**Bảng 3.5.** So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **4** và **5**.

| No. | 4^a | | 5^a | |
|-----|---|---------------------|---|---------------------|
| | δ_{H} , mult (<i>J</i> , Hz) | δ_{C} | δ_{H} , mult (<i>J</i> , Hz) | δ_{C} |
| 1 | 2,07 <i>d</i> (8,4) | 40,3 | 2,07 <i>d</i> (8,4) | 40,3 |
| | 2,05 <i>d</i> (10,4) | | 2,05 <i>d</i> (10,4) | |
| 2 | | 141,1 | | 141,1 |
| 3 | | 61,4 | | 61,5 |

| | | | | |
|--------|--|-------|---|-------|
| 4 | 2,27 <i>m</i> 1,37 <i>m</i> | 51,1 | 2,27 <i>brd</i> (8,4) 1,37 <i>m</i> | 51,1 |
| 5 | 2,88 <i>brd</i> (3,2) | 40,7 | 2,88 <i>brd</i> (3,2) | 40,8 |
| 6 | | 150,5 | | 150,5 |
| 7 | 2,55 <i>m</i> | 30,4 | 2,55 <i>m</i> | 30,4 |
| 8 | 1,45 <i>m</i> 1,37 <i>m</i> | 36,9 | 1,45 <i>m</i> 1,35 <i>m</i> | 36,9 |
| 9 | 1,53 <i>m</i> 1,38 <i>m</i> | 24,1 | 1,55 <i>m</i> 1,37 <i>m</i> | 24,1 |
| 10 | 1,79 <i>m</i> | 48,1 | 1,80 <i>m</i> | 48,1 |
| 11 | - | 46,4 | | 46,4 |
| 12 | 1,40 <i>m</i> | 41,9 | 1,40 <i>m</i> | 41,9 |
| 13 | 1,45 <i>m</i> 1,13 <i>m</i> | 20,9 | 1,45 <i>m</i> 1,13 <i>m</i> | 20,9 |
| 14 | 2,08 <i>m</i> | 47,4 | 2,10 <i>m</i> | 47,4 |
| 15 | 1,70 <i>m</i> | 28,5 | 1,70 <i>m</i> | 28,5 |
| 16 | 0,87 <i>d</i> (6,4) | 23,6 | 0,87 <i>d</i> (6,4) | 23,6 |
| 17 | 0,74 <i>d</i> (8,0) | 19,0 | 0,74 <i>d</i> (8,0) | 19,0 |
| 18 | 0,75 <i>s</i> | 21,8 | 0,75 <i>s</i> | 21,8 |
| 19 | 0,97 <i>d</i> (6,4) | 18,1 | 0,97 <i>d</i> (6,8) | 18,2 |
| 20 | 1,23 <i>s</i> | 13,4 | 1,23 <i>s</i> | 13,4 |
| 1' | | 174,7 | 2,14 <i>s</i> | 30,0 |
| 2' | 2,30 <i>t</i> (7,6) | 34,3 | | 210,0 |
| 3' | 1,61 <i>m</i> | 25,1 | 2,42 <i>t</i> (7,6) | 44,0 |
| 4' | 1,24-1,30 <i>m</i> | 24,0 | 1,24-1,30 <i>m</i> | 24,0 |
| 5'-14' | 1,24-1,30 <i>m</i> | 29,5 | 1,24-1,30 <i>m</i> | 29,5 |
| 15' | 1,72 <i>m</i> 1,63 <i>m</i> | 35,3 | 1,72 <i>m</i> 1,62 <i>m</i> | 35,3 |
| 16' | 4,44 <i>td</i> (8,0, 4,5) | 79,1 | 4,44 <i>td</i> (8,0, 4,5) | 79,1 |
| 17' | 2,69 <i>d</i> (8,4) | 52,8 | 2,69 <i>d</i> (8,4) | 52,8 |
| 18' | | 58,7 | | 58,7 |
| 19' | 2,16 <i>dd</i> (4,0, 12,5) 1,97 <i>dd</i> (3,0, 12,5) | 39,1 | 2,16 <i>dd</i> (3,6, 12,4) 1,95 <i>dd</i> (2,8, | 39,1 |

| | | 12,4) | |
|--------|--------|-------|-------|
| 20' | | 175,0 | 175,2 |
| 21' | | 180,3 | 180,3 |
| 1'-OMe | 3,67 s | 51,7 | |

^a: Phổ ¹H-NMR (500 MHz), ¹³C-NMR (125 MHz) được đo trong CDCl₃

3.2. Kết quả hoạt tính sinh học của các chất đã phân lập.

Terpene là một nhóm hợp chất hoá học đại diện cho một phần chính của các chất chuyển hoá thứ cấp. Terpene về cơ bản bao gồm các đơn vị isoprene-năm carbon, được lắp ráp với nhau theo nhiều cách. Terpeneoid là những terpene biến đổi với các nhóm chức khác nhau với nhóm methyl bị oxy hoá hoặc định vị tại những vị trí khác nhau. Trong một số hoạt tính sinh học, nhiều hợp chất terpene là tác nhân chống ung thư đặc biệt mạnh, thể hiện hoạt tính chống sốt rét [53], kháng khuẩn, độc tính tế bào, chống khối u [54]. Một số hợp chất thuộc khung sườn hopane đã được phân lập và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kháng viêm, ức chế ký sinh trùng, ức chế α -glucosidase [55].

Năm 2020, López-Huerta và cộng sự đã đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của bốn hợp chất cùng khung hopane bao gồm 3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene 9 (**R1**), hopenone (**R2**), hopenol B (**R3**), moretenone (**R4**). Kết quả cho thấy hợp chất **R1** thể hiện hoạt tính ức chế cao với IC₅₀ là 5,74 \pm 0,49 μ M so với acarbose đối chứng dương tính (7,26 \pm 0,34 mM) [55]. Trong khi đó, ba hợp chất **R2**, **R3** và **R4** không thể hiện hoạt tính ức chế. Từ góc độ mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính ức chế α -glucosidase, nhóm tác giả đã kết luận rằng sự hiện diện của nhóm acetoxy trong khung hopane là cần thiết cho hoạt tính ức chế α -glucosidase, đặc biệt hơn là acetoxy ở vị trí C-3 β [55]. Trong khi đó, cấu trúc của 2 hợp chất (**2**) và (**3**) đều có sự hiện diện của nhóm acetoxy, và **2** còn có sự hiện diện acetoxy tại C-3. Vì vậy, các hợp chất **2** và **3** (với khung sườn hopane với sự hiện diện của các nhóm acetoxy) được thử nghiệm hoạt tính ức chế α -glucosidase. Kết quả cho thấy hợp chất **2** và **3** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh và mạnh hơn so với chất chứng dương Acarbose (bảng 3.6). Thêm vào đó, hợp chất **2** và **3** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn nhiều so với indicuen, 16 β -acetoxyhopane-6 α ,22-diol (**R6**) và 6 α -acetoxyhopane-16 β ,22-diol (**R7**), và Zeorin được phân lập từ cùng chi *Parmotrema* [50] càng cho

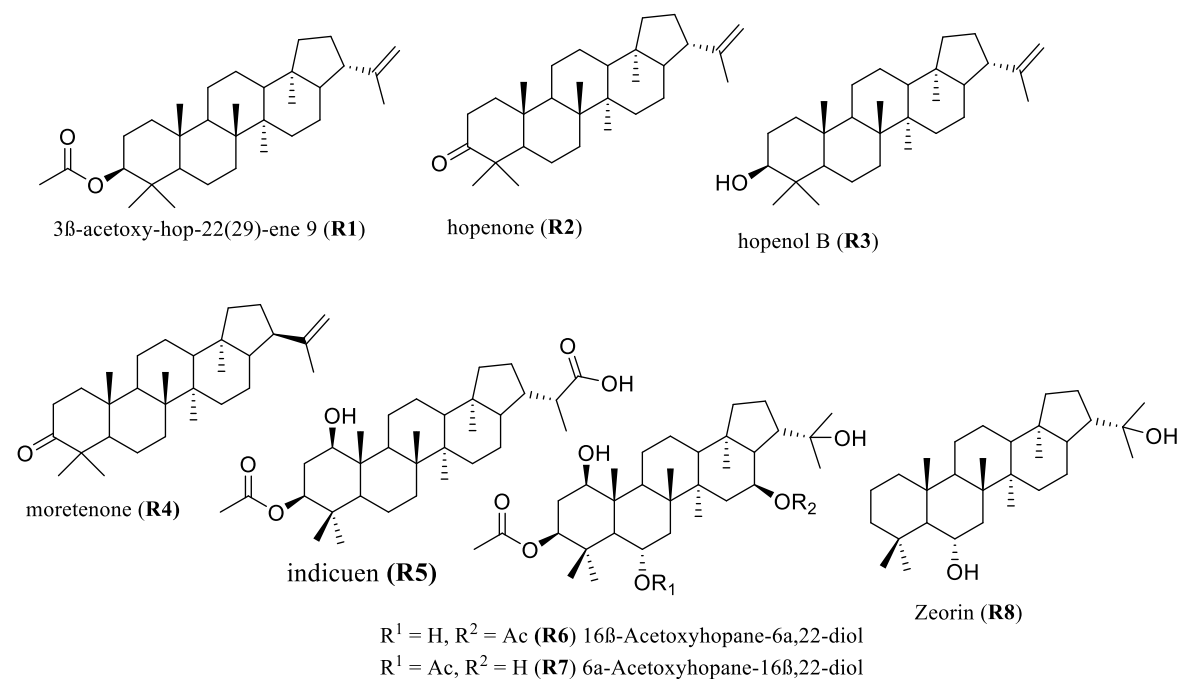
thấy sự có mặt của nhóm acetoxy tại vị trí C-1 giúp cải thiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy nghiên cứu này phù hợp với nhận định của nghiên cứu của nhóm tác giả López-Huerta.

Bảng 3.6. Giá trị IC_{50} của các chất **2, 3**.

| Chất | Tên chất | α -Glucosidase IC_{50} (μ M) |
|-----------------------|-------------|---|
| 2 | Tinctorin C | 74.7 |
| 3 | Tinctorin B | 98.2 |
| Chất đối chứng | Acarbose | 168.0 |

Thêm vào đó K. Ingólfssdóttir và cộng sự đã báo cáo hợp chất Methyl orselinate có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} 59,6 μ M cao hơn đối chứng là Acarbose với giá trị IC_{50} là 168,0 μ M [52].



Hình 3.15. Cấu trúc các hợp chất khung sườn hopane đã được báo cáo hoạt tính ức chế enzyme α - glucosidase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ranković B., Kosanić M., 2019, Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites, Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential, pp. 1-29.
2. Yousuf S., Choudhary M. I., Atta-ur R., 2014, Chapter 7 - Lichens: Chemistry and Biological Activities, *Study in Natural Products Chemistry*, 43, pp. 223-259.
3. Boustie J., Grube M., 2005, Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), pp. 273-287.
4. Boustie J., Tomasi S., Grube M., 2011, Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source, *Phytochemistry Reviews*, 10(3), pp. 287-307.
5. Huneck S., 1999, The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12), pp. 559-570.
6. Micheletti A. C., Beatriz A., Lima de D. P., Honda N. K., Pessoa C. do Ó., Moraes de M. O., Lotufo L.V., Magalhães H. I. F., Carvalho N. C. P., 2009, Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler: isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. *Química Nova*, 32, pp. 12-20.
7. Müller K., 2001, Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), pp. 9-16.
8. Malhotra S., Subban R., Singh A., 2007, Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery, 5, pp. 1-6.
9. Tuan N. T., Dam N.P., Hieu M.V., Trang D.T.X., Danh L. T., Men T. T., De T. Q., Bach L. T., Kanaori K., 2020, Chemical Constituents of the Lichen *Parmotrema Tinctorum* and their Antifungal Activity, *Chemistry of Natural Compounds*, 56, pp. 315-317.
10. Dalip K. U., Divakar P. K., Sanjeeva N., 2005, Commercial and Ethnic Use of Lichens in India. *Economic Botany*, 59(3), pp. 269-273.
11. Ohnuki T., Aoyagi H., Kitatsuji Y., Samadfam M., Kimura Y., Purvis O. W., 2004, Plutonium(VI) accumulation and reduction by lichen

- biomass: correlation with U(VI), *Journal of Environmental Radioactivity*, 77(3), pp. 339-353.
12. Ohnuki T., Sakamoto F., Kozai N., Sakai T., Kamiya T., Satoh T., Oikawa M., 2003, Micro-pixe study on sorption behaviors of cobalt by lichen biomass, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 210, pp. 407-411.
 13. Boonpeng C., Poluiam W., Sriviboon C., Sangiamdee D., Watthana S., Nimis P. L., Boonpragob K., 2017, Airborne trace elements near a petrochemical industrial complex in Thailand assessed by the lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(13), pp. 12393-12404.
 14. Boonpeng C., Sriviboon C., Poluiam W., Sangiamdee D., Watthana S., Boonpragob K., 2018, Assessing atmospheric pollution in a petrochemical industrial district using a lichen-air quality index (LiAQI), *Ecological Indicators*, 95, pp. 589-594.
 15. Raj P. S., Prathapan A., Sebastian J., Antony A. K., Riya M. P., Rani M. R. P., Biju H., Priya S., Raghu K. G., 2014, *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an *in vitro* study. *Natural Product Research*, 28(18), pp. 1480-1484.
 16. Khader S. Z. A., Ahmed S. S. Z., Arunachalam T., Radharkrishnan K., 2019, Therapeutic effect of *Parmotrema tinctorum* against complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats and identification of novel Isophthalic ester derivative, *Biomed Pharmacother*, 112, Article ID: 108646.
 17. Honda N. K., Pavan F. R., Coelho R. G., Leite S. R. de A., Micheletti A. C., Lopes T. I. B., Misutsu M. Y., Beatriz A., Brum R. L., 2010, Antimycobacterial activity of lichen substances, *Phytomedicine*, 17(5), pp. 328-332.
 18. Lohézic-Le Dévéhat F., Tomasi S., Elix J. A., Bernard A., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., 2007, Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities, *Journal of Natural Products*, 70(7), pp. 1218-1220.

19. Micheletti A. C., Beatriz A., Lima de D. P., Honda N. K., Pessoa C. do Ó, Moraes de M. O., Lotufo, Magalães H. I. F., Carvalho N. C. P., 2009, Chemical constituents of *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler: isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities, *Quim. Nova*, 32(1), pp. 12-20.
20. Huy D. T. H., Anh B. T. L., 2015, Some phenolic compounds from lichen *Parmotrema sancti-angelii* (Lynge) Hale (Parmeliaceae), *Ho Chi Minh University of Education Journal of Science*, 5(70).
21. Käffer M. I., Lemos A. T., Apel M. A., Rocha J. V., Martins S. M. de Azevedo, Vargas V. M. F., 2012, Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil, *Environmental Pollution*, 163, pp. 24-31.
22. Käffer M. I., Martins S. M. de Azevedo, Alves C., Pereira V. C., Fachel J., Vargas V. M. F., 2011, Corticolous lichens as environmental indicators in urban areas in southern Brazil, *Ecological Indicators*, 11(5), pp. 1319-1332.
23. Shanmugam P., Ponnusamy P., Balasubramanian M. G., Nagarajan N., Ganesan A., 2017, Evaluation of antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of few macrolichens collected from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India, *Int. Res. J. Pharm.*, 8, pp. 39-43.
24. Vivek M., Yashoda K., Manasa M., Prashith K. T. R., 2014, Antibacterial activity of three *Parmotrema* species from Western Ghats of Karnataka against clinical isolates of Burn and Dental caries, *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(1), pp. 132-135.
25. Rajan V. P., Gunasekaran S., Ramanathan S., Murugaiyah V., Samsudin Mohd W., Din L. B., 2015, Antibacterial activity of extracts of *Parmotrema praesorediosum*, *Parmotrema rampoddense*, *Parmotrema tinctorum* and *Parmotrema reticulatum*. in AIP Conference Proceedings, AIP Publishing LLC, 1678.
26. Kekuda T. R. P., Vinayaka K. S., 2016, Antifungal activity of *Parmotrema tinctorum* (Delise ex Nyl.) hale and *Parmotrema cristiferum* (Taylor) hale against seed mycoflora-A comparative study, *Science, Technology and Arts Research Journal*, 5(1), pp. 80-83.

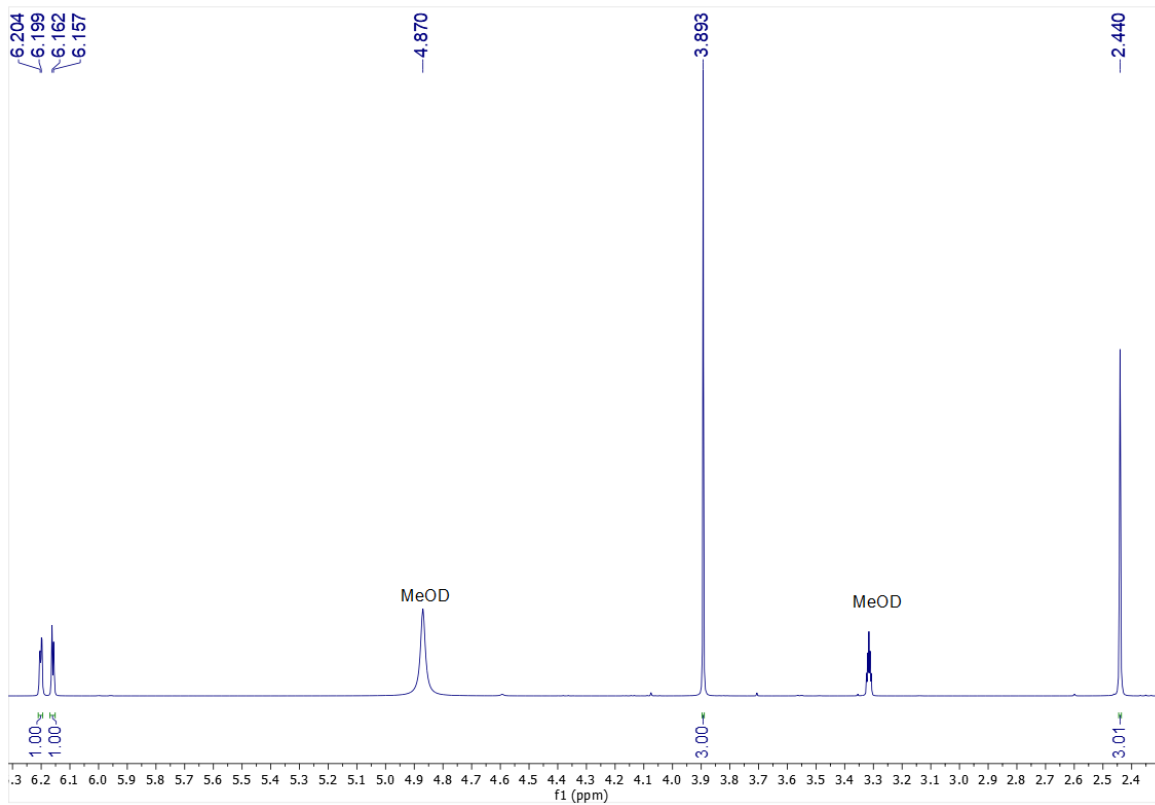
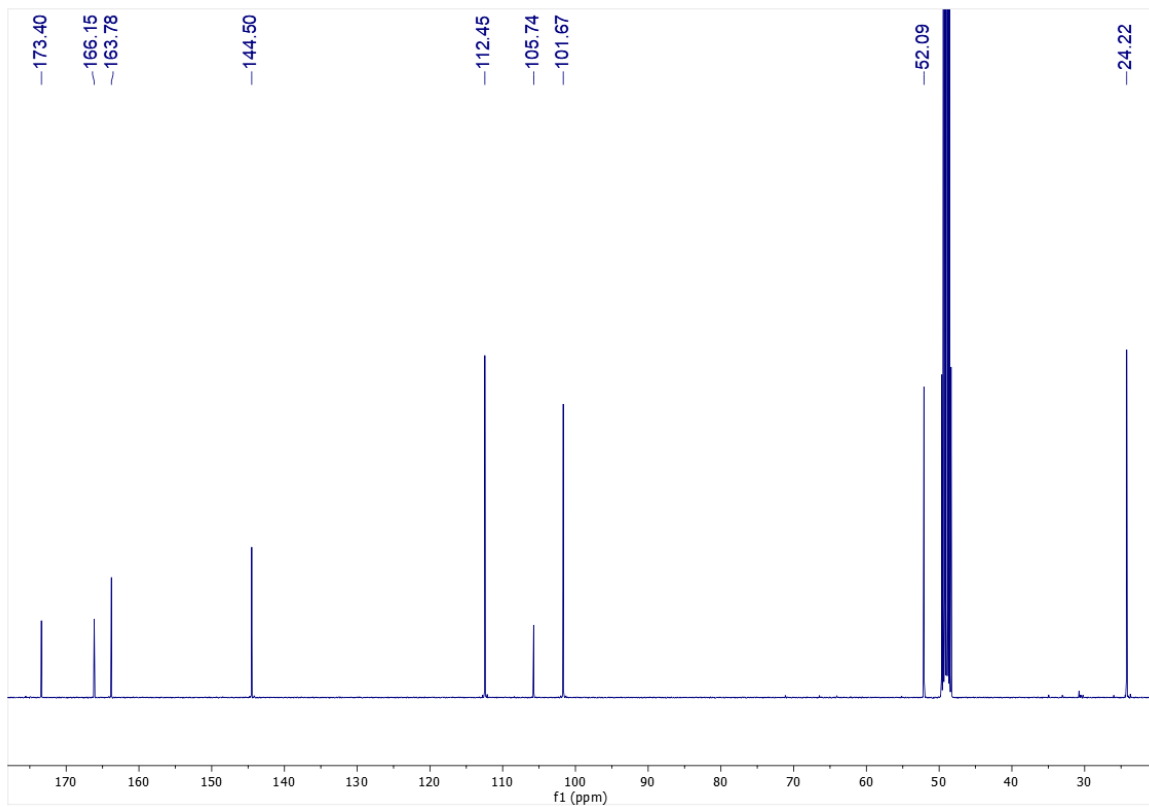
27. Raj S. P., Prathapan A., Sebastian J., Antony A. K., Riya M. P., Rani M. R. P., Biju H., Priya S., Raghu K. G., 2014, *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an *in vitro* study, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 28(18), pp. 1480-1484.
28. Khader S. Z. A., Ahmed S. S. Z., Arunachalam T., Radhakrishnan K., 2019, Therapeutic effect of *Parmotrema tinctorum* against complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats and identification of novel Isophthalic ester derivative, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, Article ID: 108646.
29. Atsushi S., Yohko G., 1987, Chemical studies on the Lichen. I. The structure of isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from *Parmelia tinctorum* Despr., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 60(5), pp. 1917-1918.
30. Santos L. C., Honda N. K., Carlos I. Z., Vilegas W., 2004, Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens, *Fitoterapia*, 75(5), pp. 473-479.
31. Czczuga B. and Kashiwadani H., 1993, Carotenoids of *Parmotrema tinctorum* and *Rimelia clavulifera* (Parmeliaceae, lichens) from various localities in Japan, *Bulletin of the National Science Museum, Series B: Botany*, 19(3), pp. 113-119.
32. Kumar P. P., Bandi S., Anand A., Tiwari A. K., Rao C. V., Boustie J., Babu K. S., 2020, Isolation, semi-synthesis, free-radicals scavenging, and advanced glycation end products formation inhibitory constituents from *Parmotrema tinctorum*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 22(10), pp. 976-988.
33. Bui V.-M., Duong T.-H., Nguyen T.-A.-M., Nguyen T.-N.-V., Nguyen N.-H., Nguyen H.-H., Chavasiri W., 2022, Two new phenolic compounds from the Vietnamese lichen *Parmotrema tinctorum*, *Natural Product Research*, 36(13), pp. 3429-3434.
34. Nguyen T. T. T., Vo T. T. D., Tran Y. H., Truong D. T., Phan D. C., Le P. H., 2021, Photoprotective activity of lichen extracts and isolated

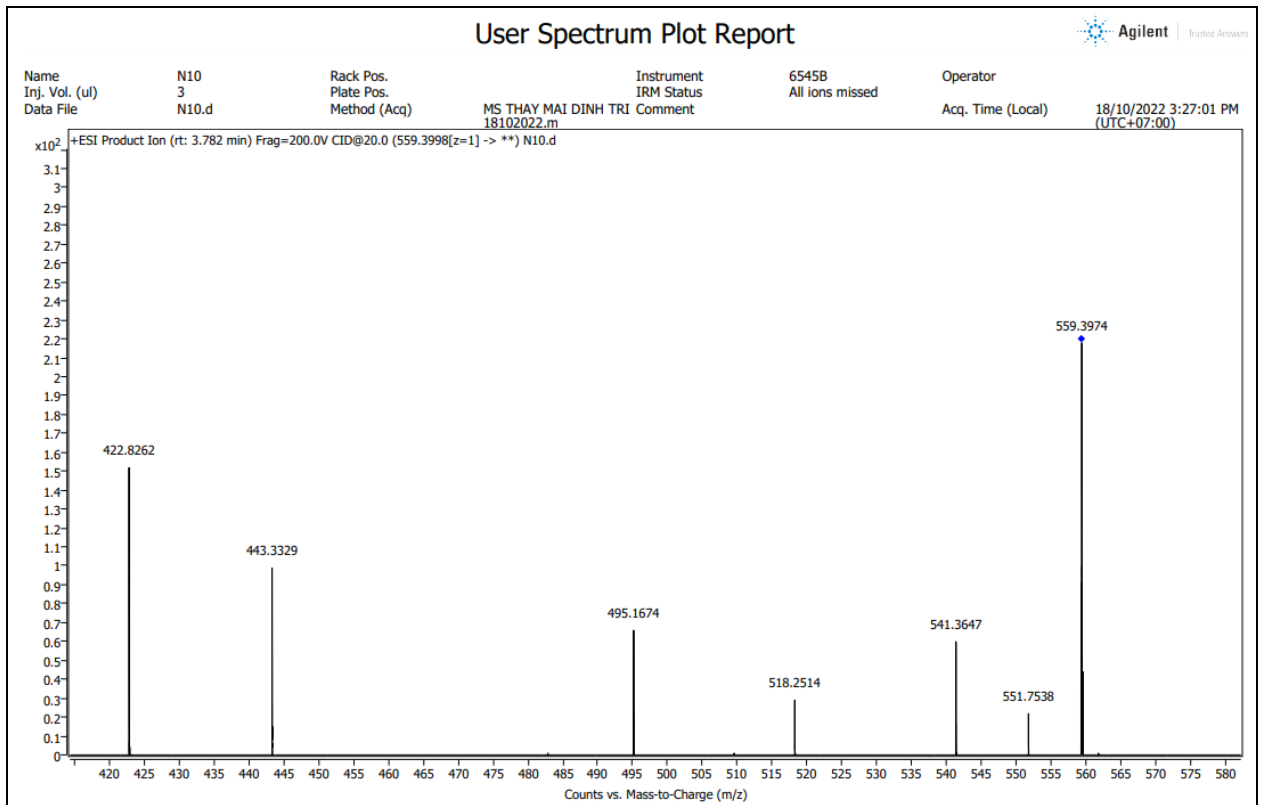
- compounds in *Parmotrema tinctorum*, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(5), pp. 12653-12661.
35. Sucheta S. T., Verma P. K., 2017, Biological potential of thiazolidinedione derivatives of synthetic origin, *Chemistry Central Journal*, 11, pp. 1-29.
 36. Van Beers E. H., Buller Hans A., Grand R. J., A., Einerhand A. W. C., Dekker J., 1995, Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), pp. 197-262.
 37. Sun H., Li Y., Zhang X., Lei Y., Ding W., Zhao X., Wang H., Wang R., Zhu T., Yu P., 2015, Synthesis, α -glucosidase inhibitory and molecular docking studies of prenylated and geranylated flavones, isoflavones and chalcones, *Biorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 25(20), pp. 4567-4571.
 38. Yousefi A., Yousefi R., Panahi F., Sarikhani S., Zolghadr A. R., Bahaoddini A., Khalafi-Nezhad A., 2015, Novel curcumin-based pyrano [2, 3-d] pyrimidine anti-oxidant inhibitors for α -amylase and α -glucosidase: Implications for their pleiotropic effects against diabetes complications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, pp. 46-55.
 39. Bézivin C., Tomasi S., Devehat F. L.-L., Boustie J., 2003, Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines, *Phytomedicines*, 10(6-7), pp. 499-503.
 40. Tatipamula V.B. and Ketha A., 2020, Manglicolous lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale: Isolation, characterization and biological evaluation. 2020, *Indian Journal of Chemistry-Section B*, 59B(6).
 41. Harikrishnan A., Veena V., Lakshmi B., Shanmugavalli R., Gubert S. T., Prashantha C. N., Tanya S., Oshin K., Ringu T., Nandi S., (2021), Atranorin, an antimicrobial metabolite from lichen *Parmotrema rampoddense* exhibited invitro anti-breast cancer activity through interaction with Akt activity, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(4), pp. 1248-1258.

42. SichatôJ., Nguyen H.-H., Duong T.-H., 2019, Hopane-6 α , 16 α , 22-triol: a new hopane triterpenoid from the lichen *Parmotrema sancti-angelii*, *Natural Product Communications*, 14(6).
43. Duong T.-H., Chavasiri W., Boustie J., Nguyen K.-P.-P., 2015, New meta-depsidones and diphenyl ethers from the lichen *Parmotrema tsavoense* (Krog & Swinscow) Krog & Swinscow, Parmeliaceae, *Tetrahedron*, 71(52), pp. 9684-9691.
44. Devi A. P., Duong T.-H., Ferron S., Beniddir M. A., Dinh M.-H., Nguyen V.-K., Pham N.-K.-T., Mac D.-H., Boustie J., Chavasiri W., Pogam P. L., 2020, Salazinic acid-derived depsidones and diphenylethers with α -glucosidase inhibitory activity from the lichen *Parmotrema dilatatum*, *Planta Med.*, 86(16), pp. 1216-1224.
45. Duong T.-H. Hang T.-X.-H., Pogam P. L., Tran T.-N., Mac D.-H., Dinh M.-H., SichatôJ., 2020, α -Glucosidase inhibitory depsidones from the lichen *Parmotrema tsavoense*, *Planta Med.*, 86(11), pp. 776-781.
46. Duong T.-H., Devi A. P., Tran N.-M.-A., Phan H.-V.-T., Huynh N.-V., SichatôJ., Tran H.-D., Alam M., Nguyen T.-P., Nguyen H.-H., Chavasiri W., Nguyen T.-C., 2020, Synthesis, α -glucosidase inhibition, and molecular docking studies of novel N-substituted hydrazide derivatives of atranorin as antidiabetic agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(17), Article ID: 127359.
47. L T.H., Nguyen N.-K.-T., Nguyen M.-T.-T., Nguyen N.-T., 2022, Two new phenylbutenoids from the rhizomes of cassumunar ginger and their α -glucosidase inhibitory activity, *Natural Product Research*.
48. Chi H. B. L., Bui V. M., Phan T.-Q.-N., Phenolic compounds from the lichen *Parmotrema tinctorum*, *VNUHCM Journal of Science and Technology Development*, 24(1), pp. 847-851.
49. Hoang L.-T.-T.-T., Tran T.-N., Vo T.-P.-G., Phan H.-V.-T. Dong P.-S.-N., Mai D.-T., Nguyen N.-A., Huynh T.-M.-S., Luu H. T., Le T.-D., Dao M.-T., Nguyen V.-K., 2022, Tinctotide A, a New Hopan-Type Triterpenoic Peracid from the Thallus of Lichen *Parmotrema Tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale., *Journal of Chemistry*, Article ID: 9092098.

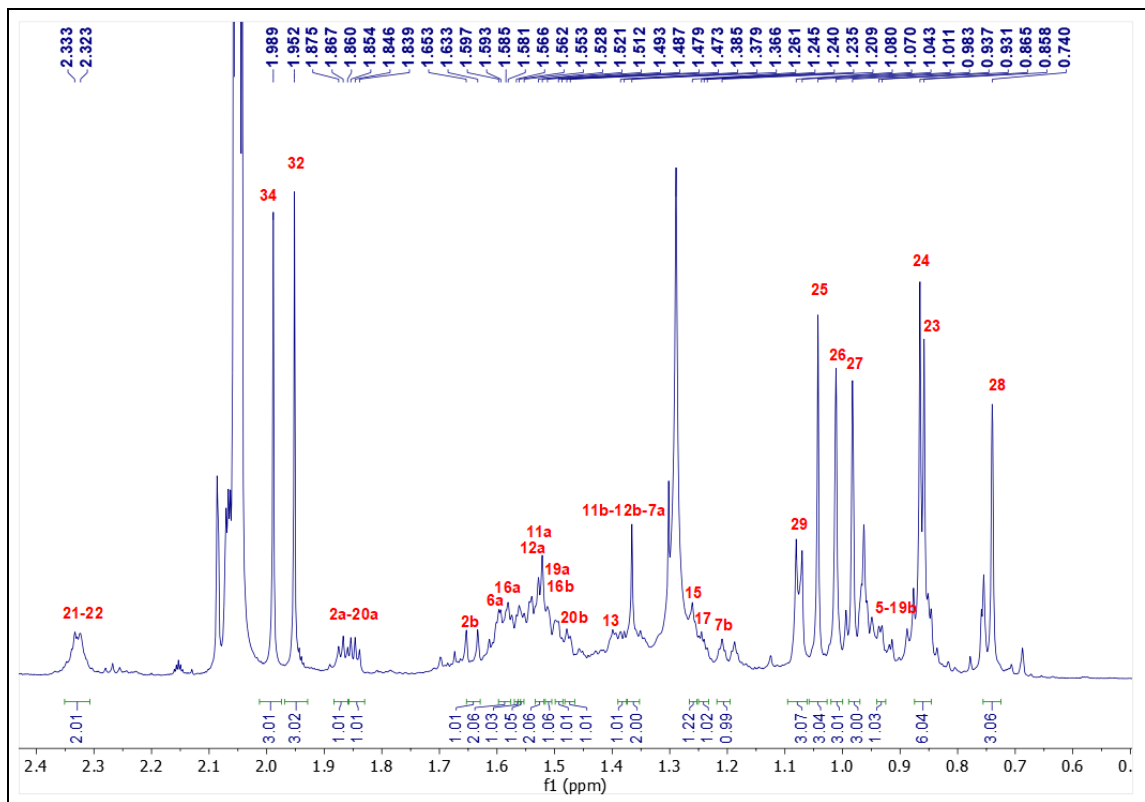
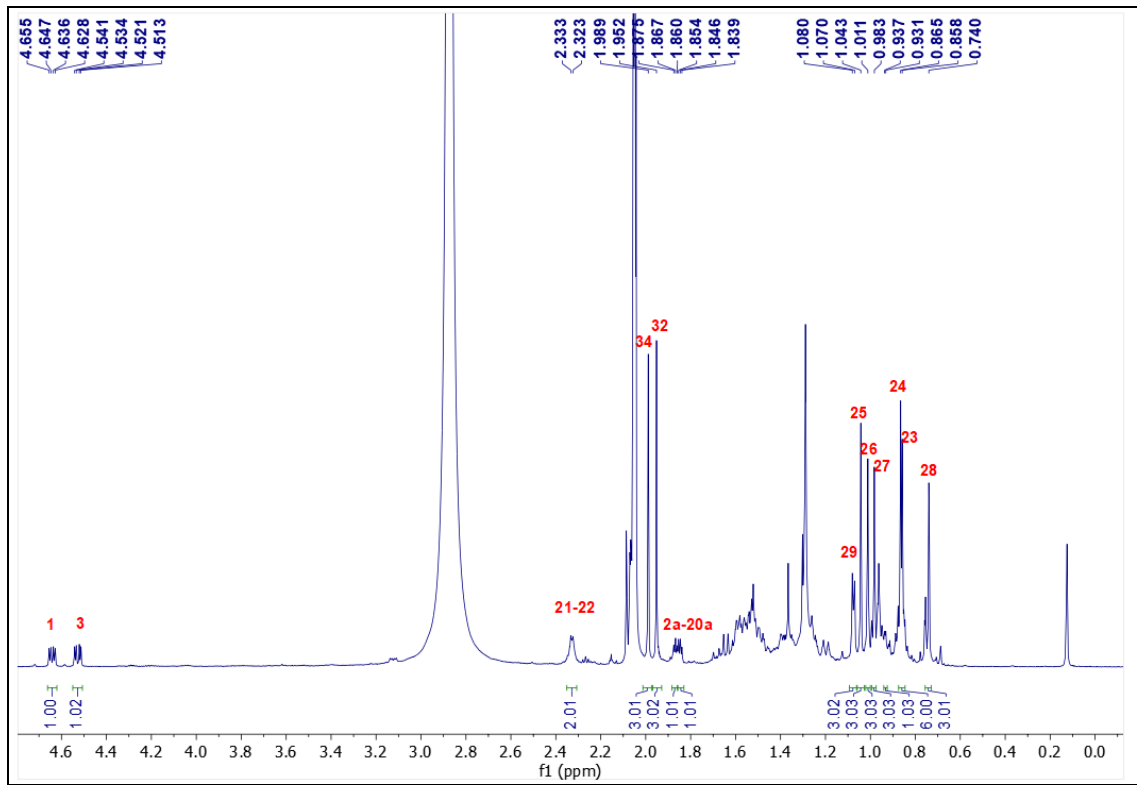
50. Nguyen T.-Q.-T., Pham N.-K.-T., Trung N.-T., An N.-T., Mai D.-T., Sichert J., Huynh B.-L.-C., Anh N.-T.-H., Nguyen N.-H., Duong T.-H., 2021, Indicuen, a new hopane from *Parmotrema indicum* Hale growing in Vietnam, *Natural Product Research*, pp. 1-8.
51. Duong T.-H., Nguyen V.-K., Sichert J., Tran T.-N., Do T.-H., Pham N.-K.-T., Nguyen T.-A.-T., Nguyen T.-T.-H., Mai D.-T., Nguyen N.-H., Huynh B.-L.-C., 2022, Reticulatin, a novel C43-spiroterpenoid from the lichen *Parmotrema reticulatum* growing in Vietnam, *Natural Product Research*, 36(14), pp. 3705-3712.
52. Duong T.-H., Tran T.-M.-D., Pham N.-K.-T., Mai D.-T., Nguyen N.-H., Sichert J., 2022, Secondary Metabolites of the Lichen *Parmotrema cristiferum*, *Chemistry of Natural Compounds*, 58(5), pp. 862-865.
53. Elkhateeb. WA, Daba GM., 2020, Occurrence of terpenes, polyketides, and tannins in some Japanese lichens and green mosses, 102.186.117.190.
54. Greay SJ, Hamer KA., 2015 Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity.
55. López-Huerta, F.A., et al., *Hopane-type triterpenes from Cnidoscolus spinosus and their bioactivities*. *Bioorg Chem*, 2020. **100**: pp. 103919.
56. Huy, D.T. and T.T.T.J.T.c.K.h. Thuy, *Some hopanes and esgostanes from lichen Parmotrema sancti-angelii (Lynge) Hale (Parmeliaceae)*. 2015(2 (67)): p. 13.

PHỤ LỤC

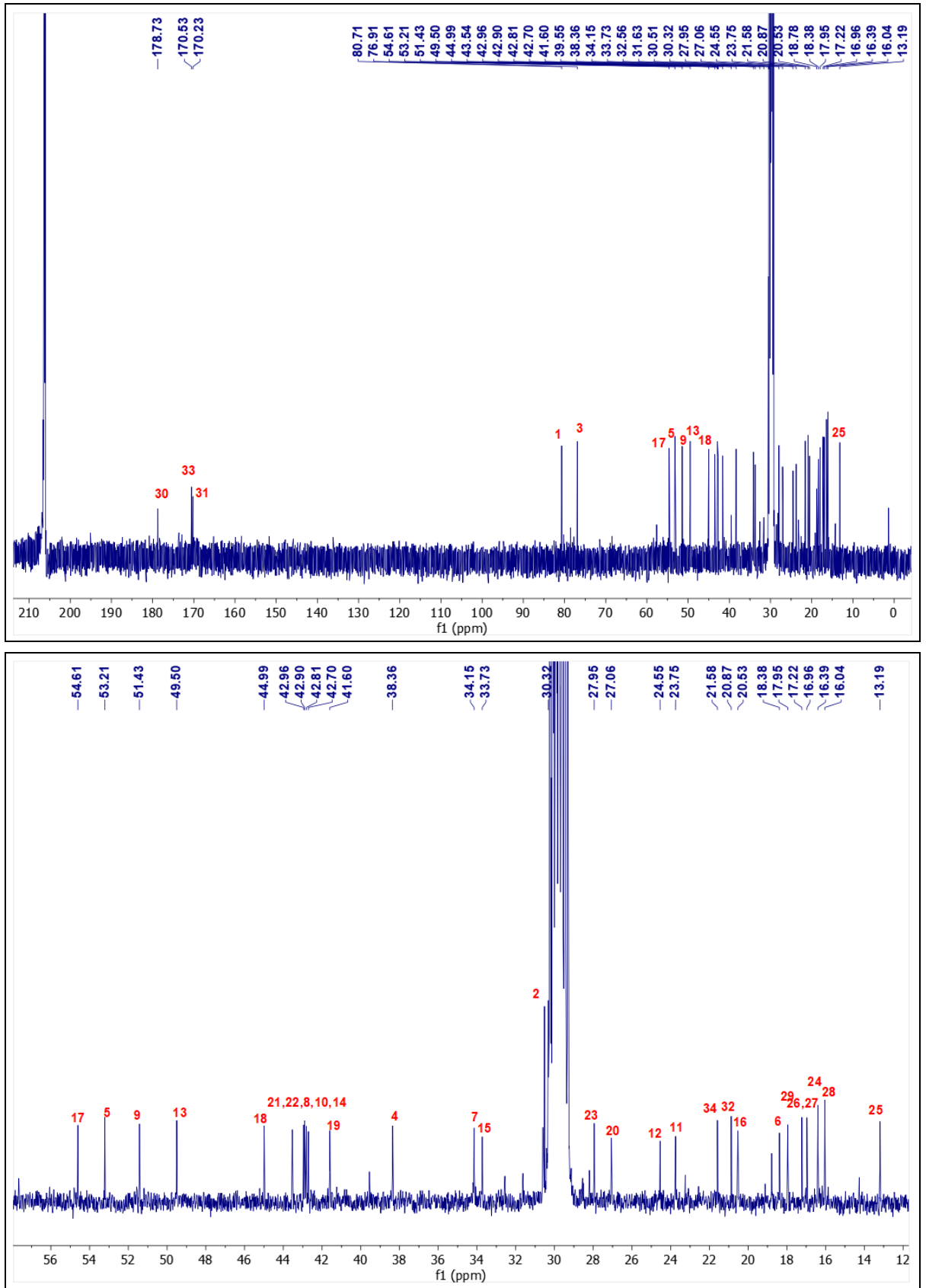
Phụ lục 1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **1** trong CD_3OD Phụ lục 2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **1** trong CD_3OD



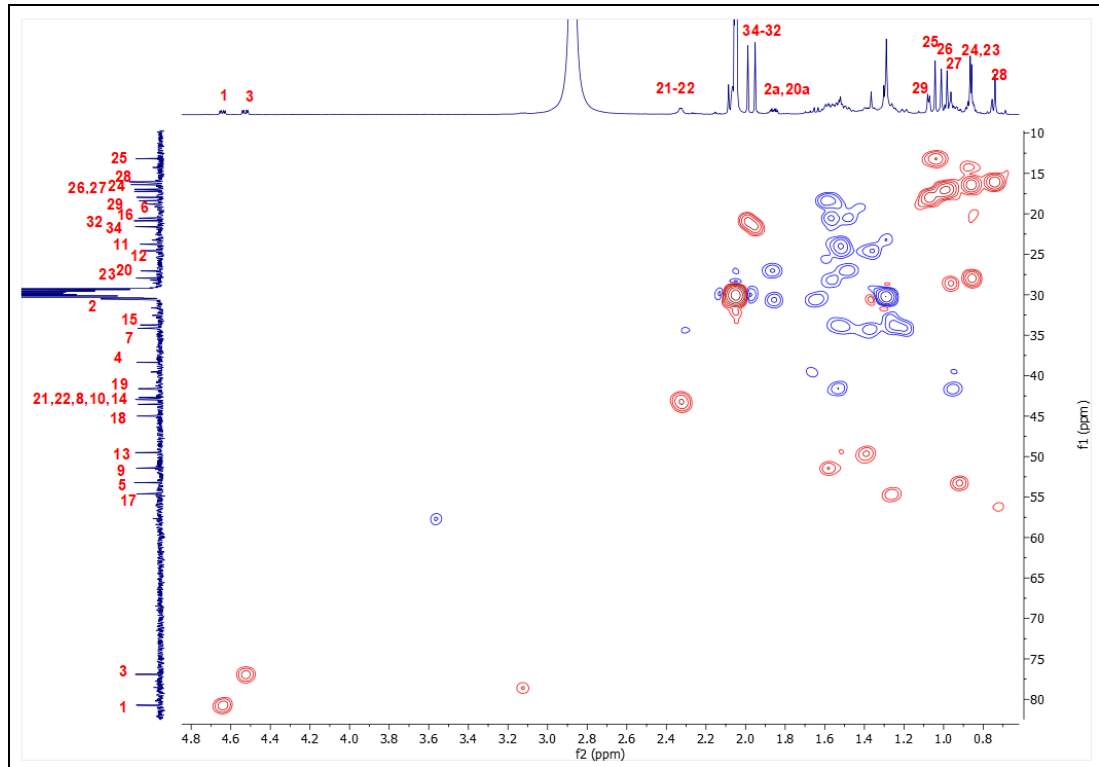
Phụ lục 3. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **2** trong Acetone- d_6



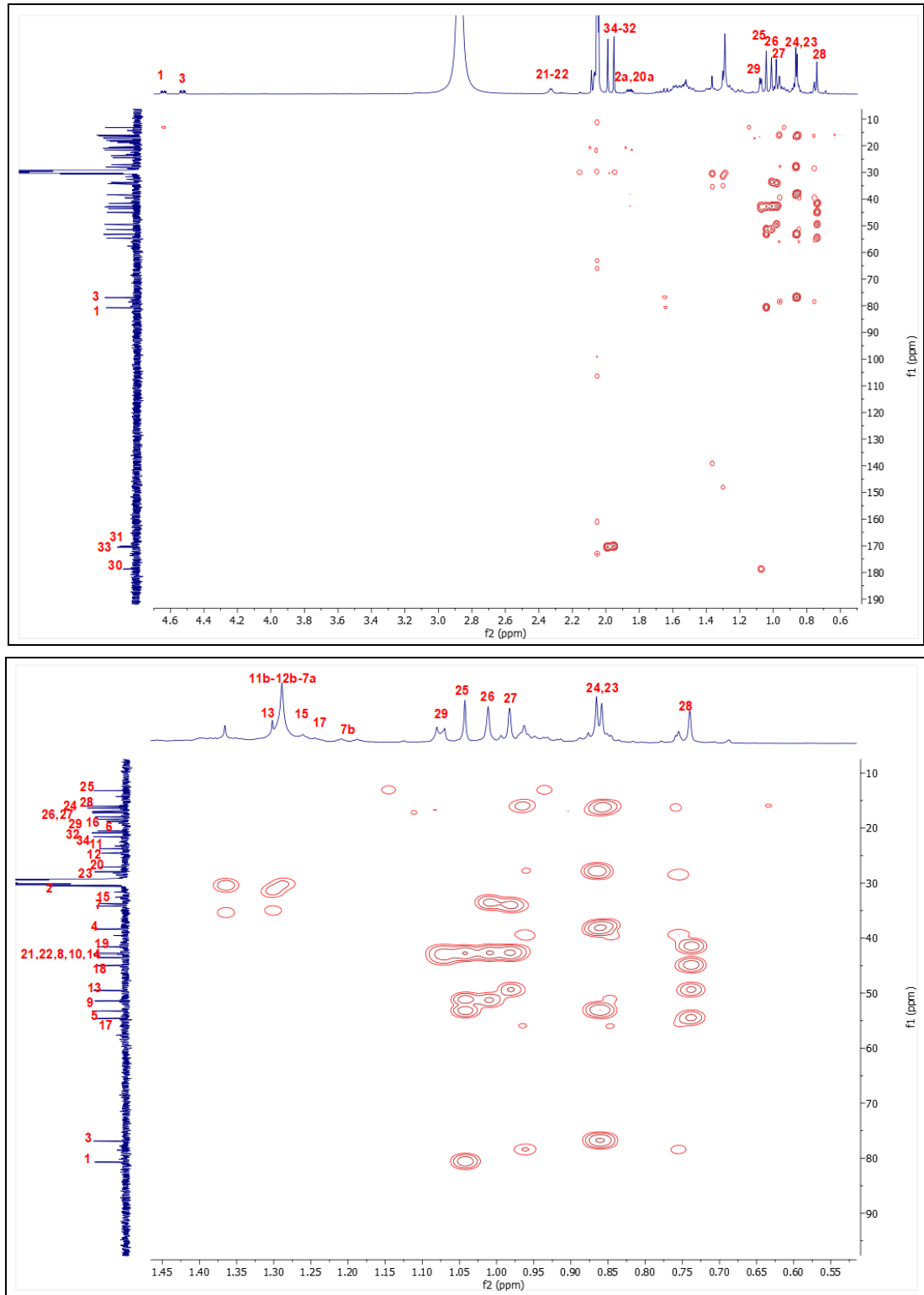
Phụ lục 4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **2** trong Acetone- d_6



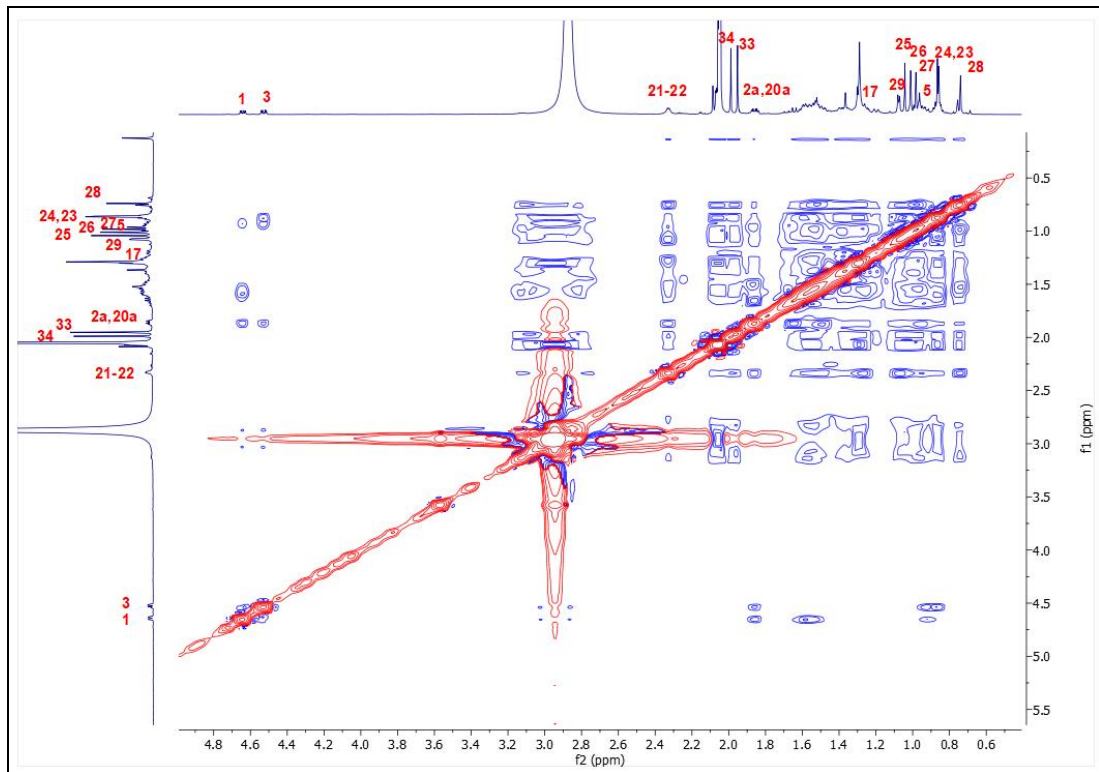
Phụ lục 5. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **2** trong $\text{Acetone-}d_6$



Phụ lục 6. Phổ HSQC của hợp chất **2** trong Acetone- d_6



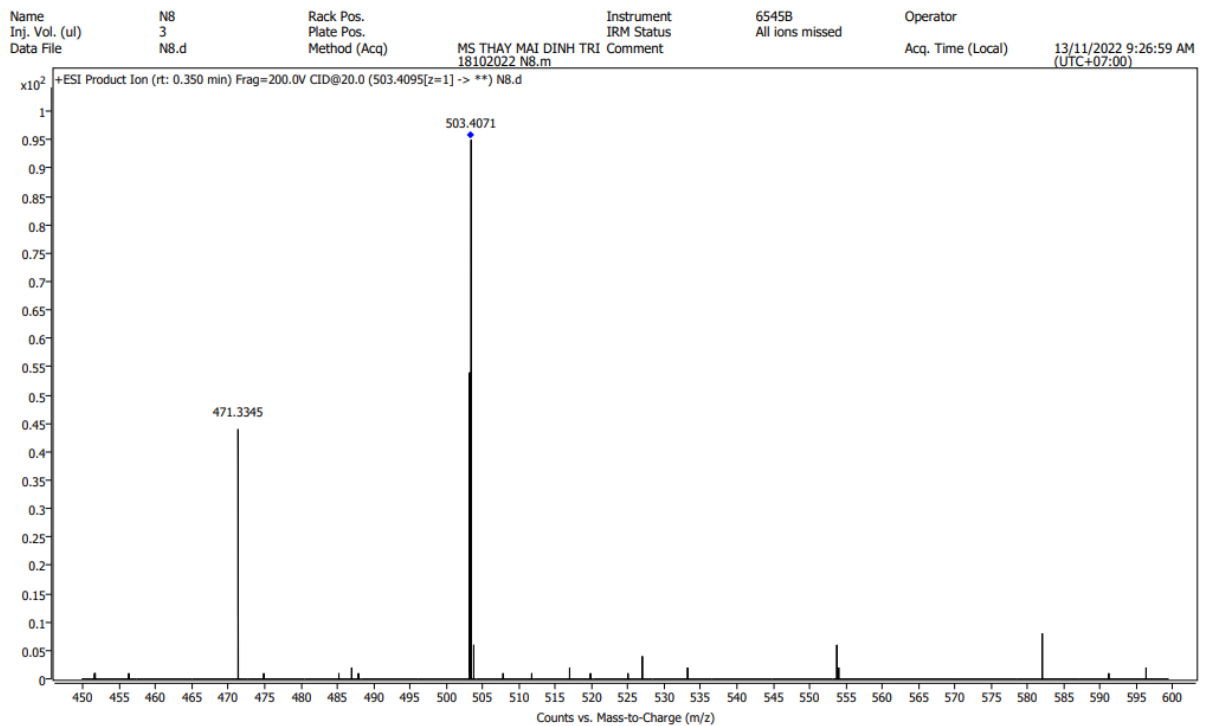
Phụ lục 7. Phổ HMBC của hợp chất **2 trong Acetone- d_6**



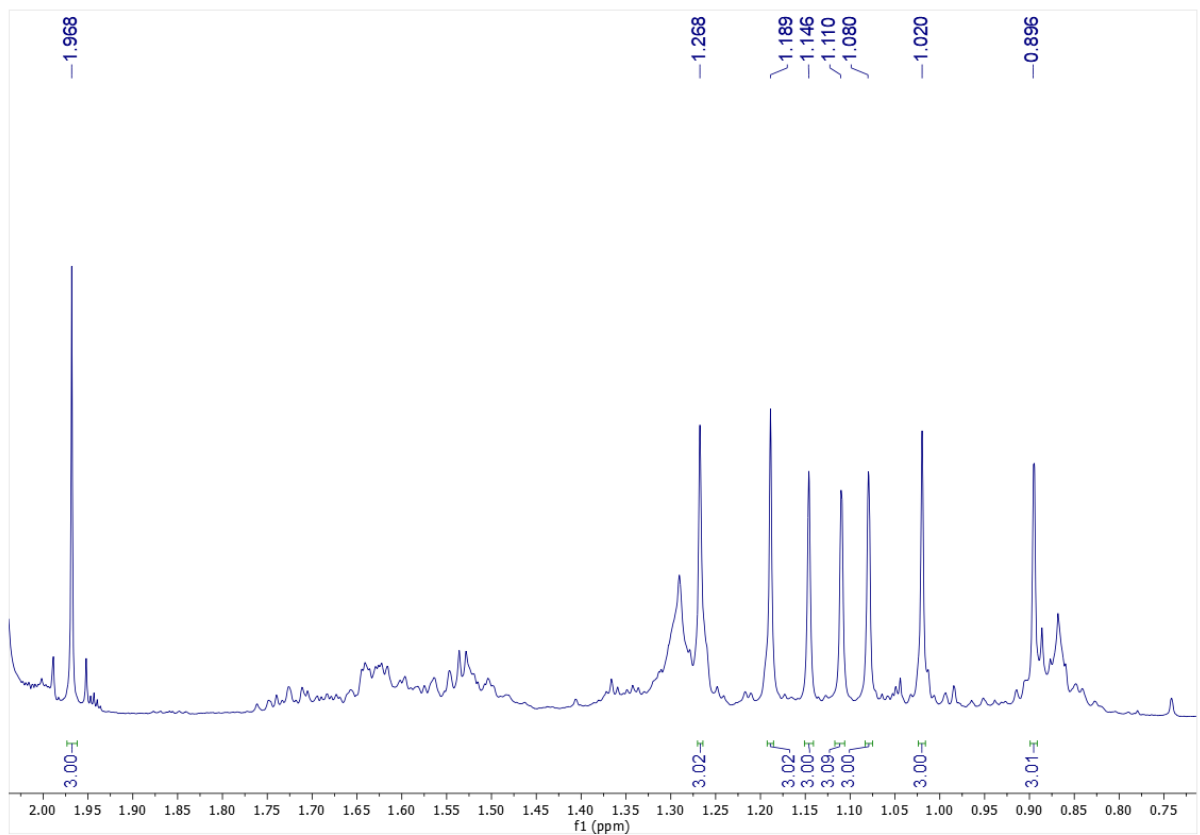
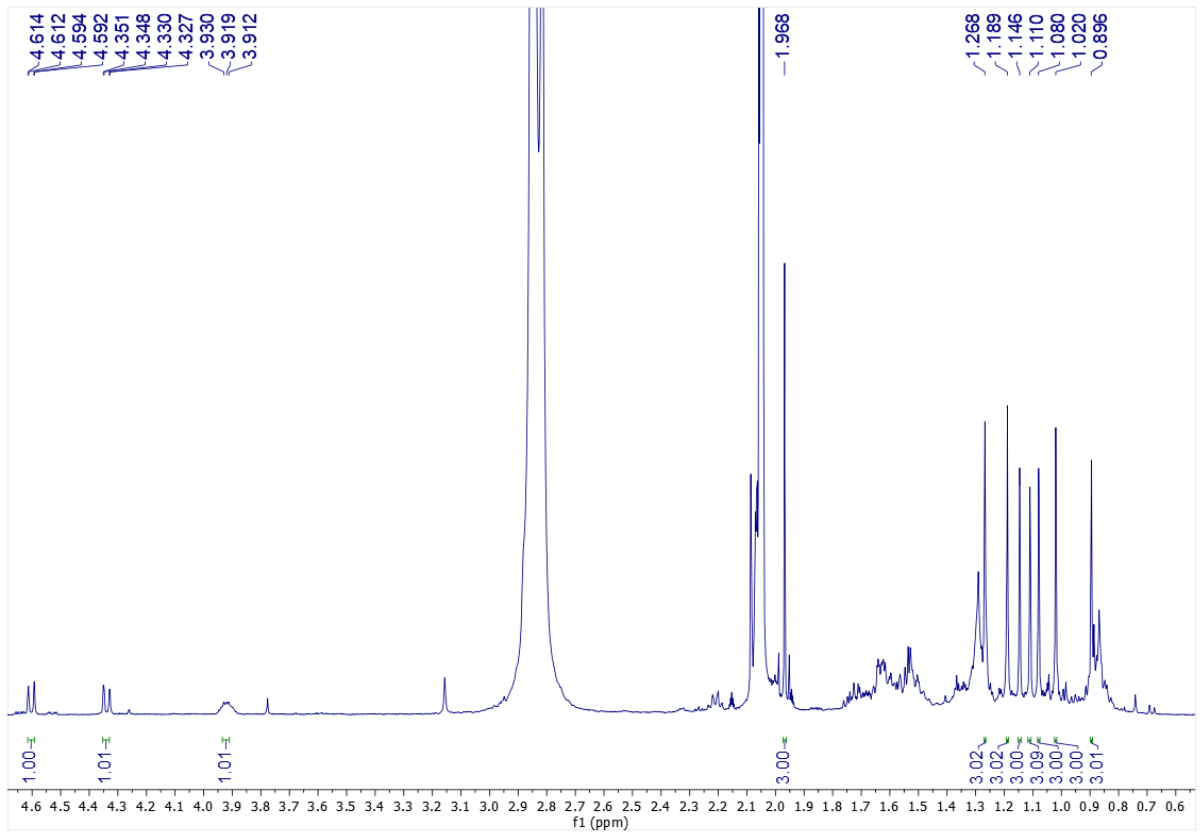
Phụ lục 8. Phổ NOESY của hợp chất **2** trong Acetone- d_6

User Spectrum Plot Report

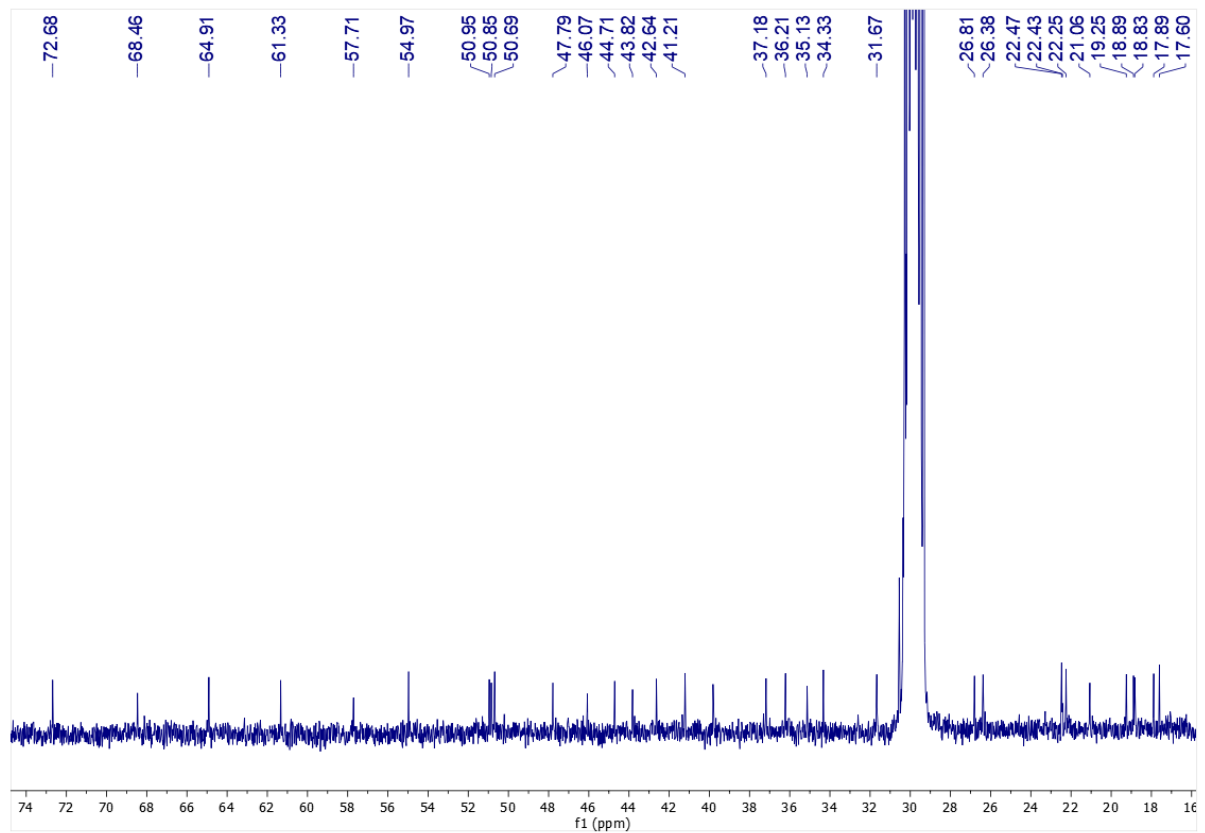
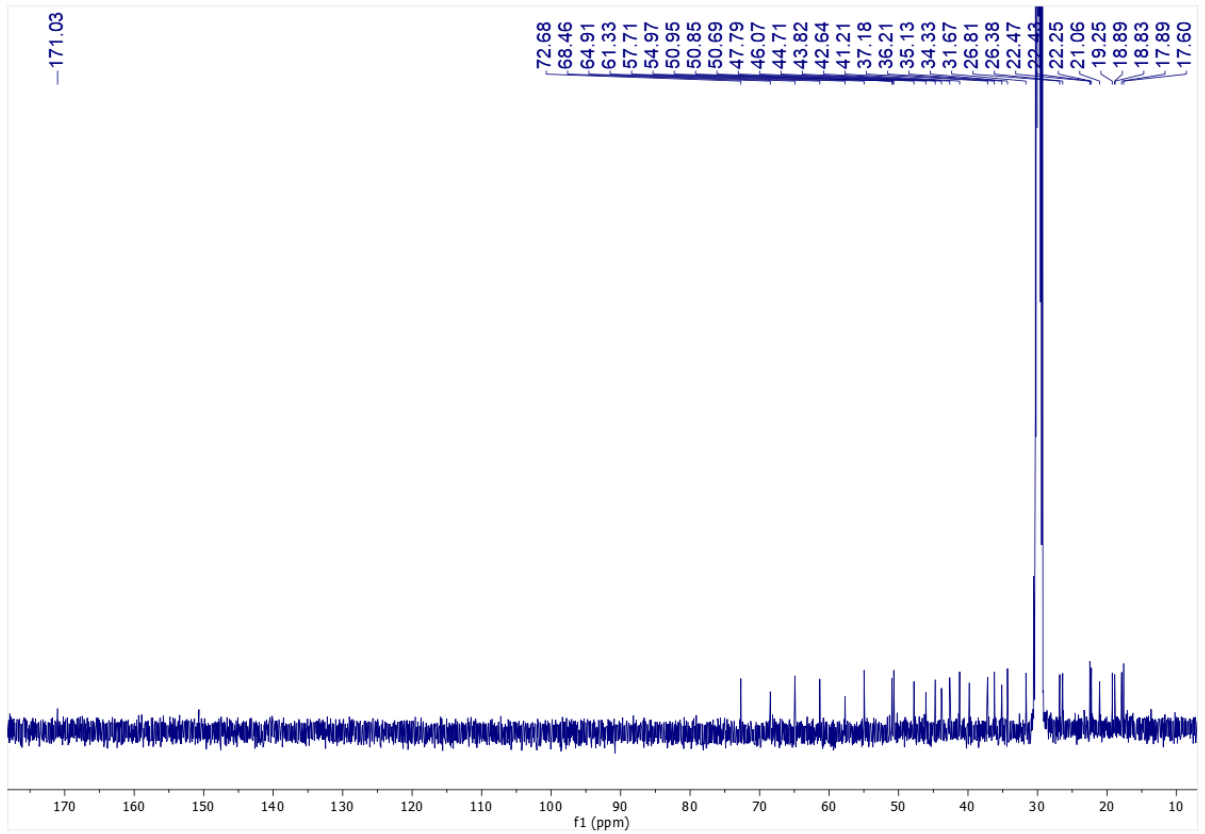
Agilent | Trusted Answers



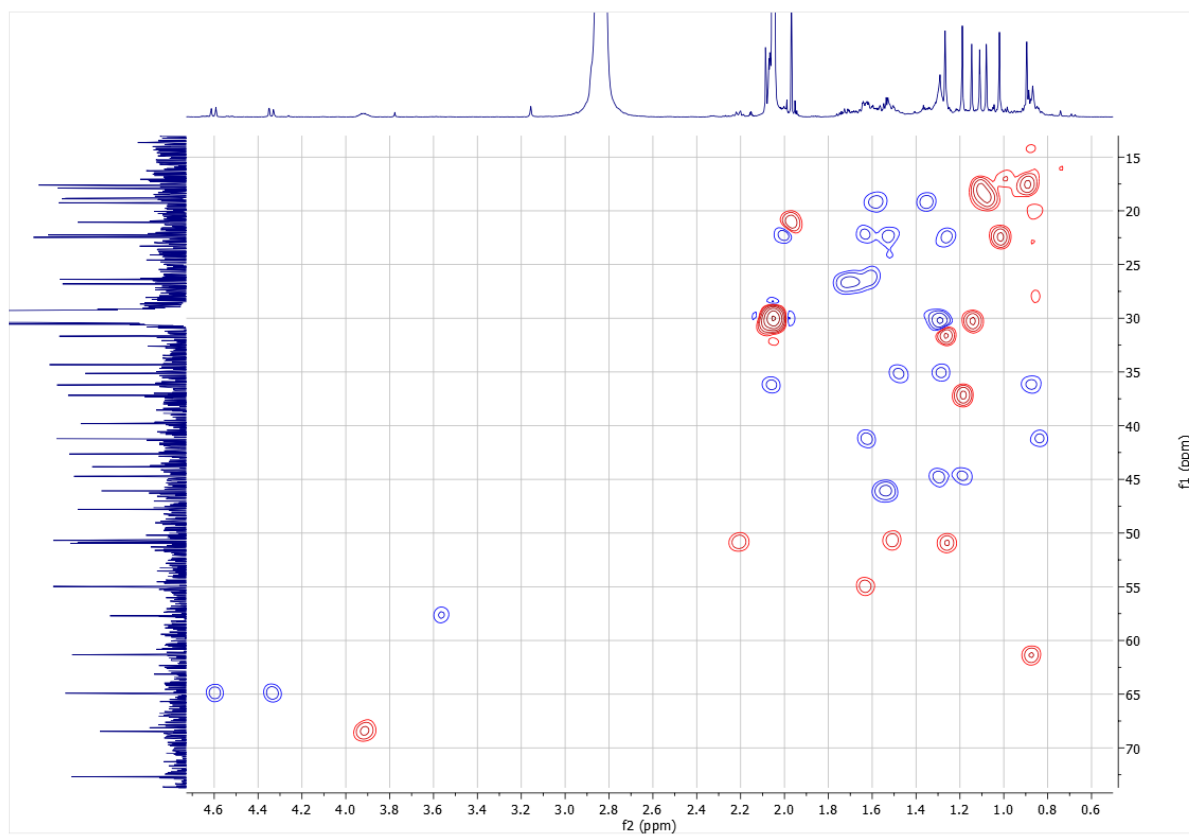
Phụ lục 9. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **3** trong Acetone- d_6



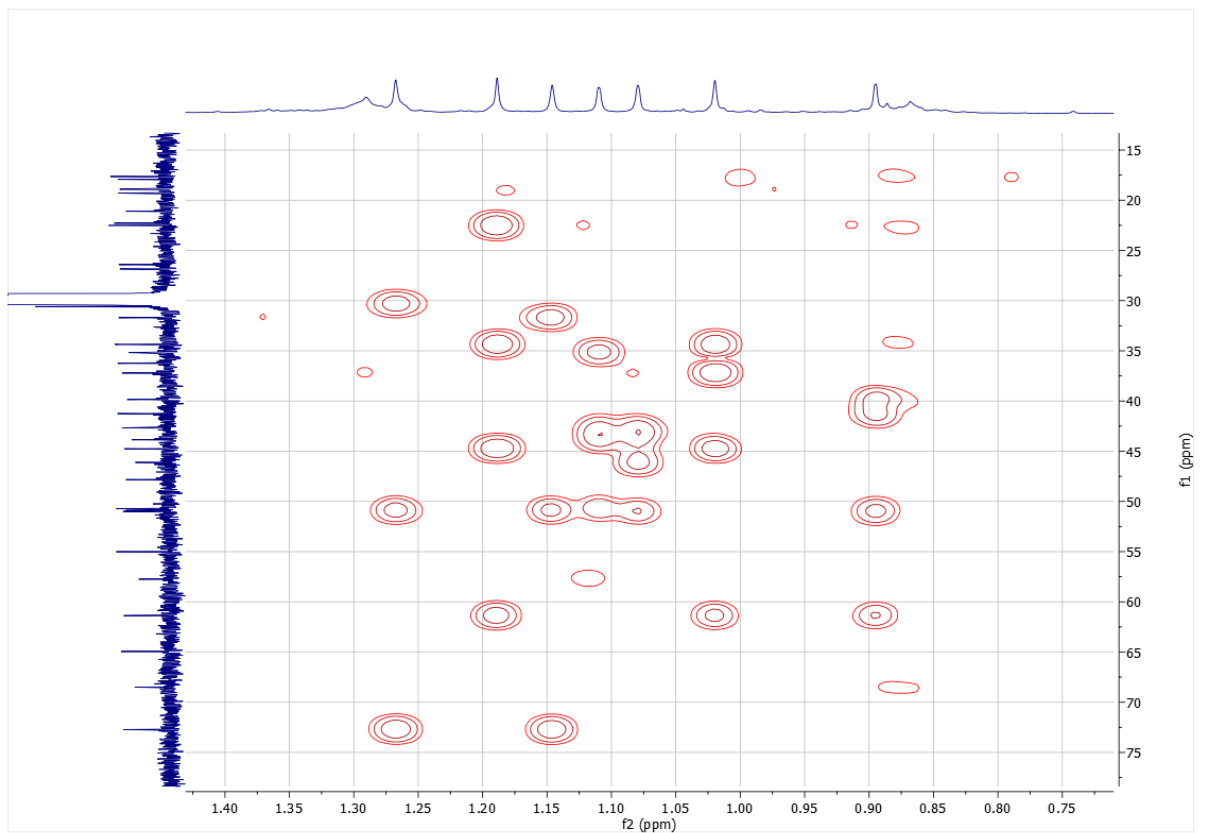
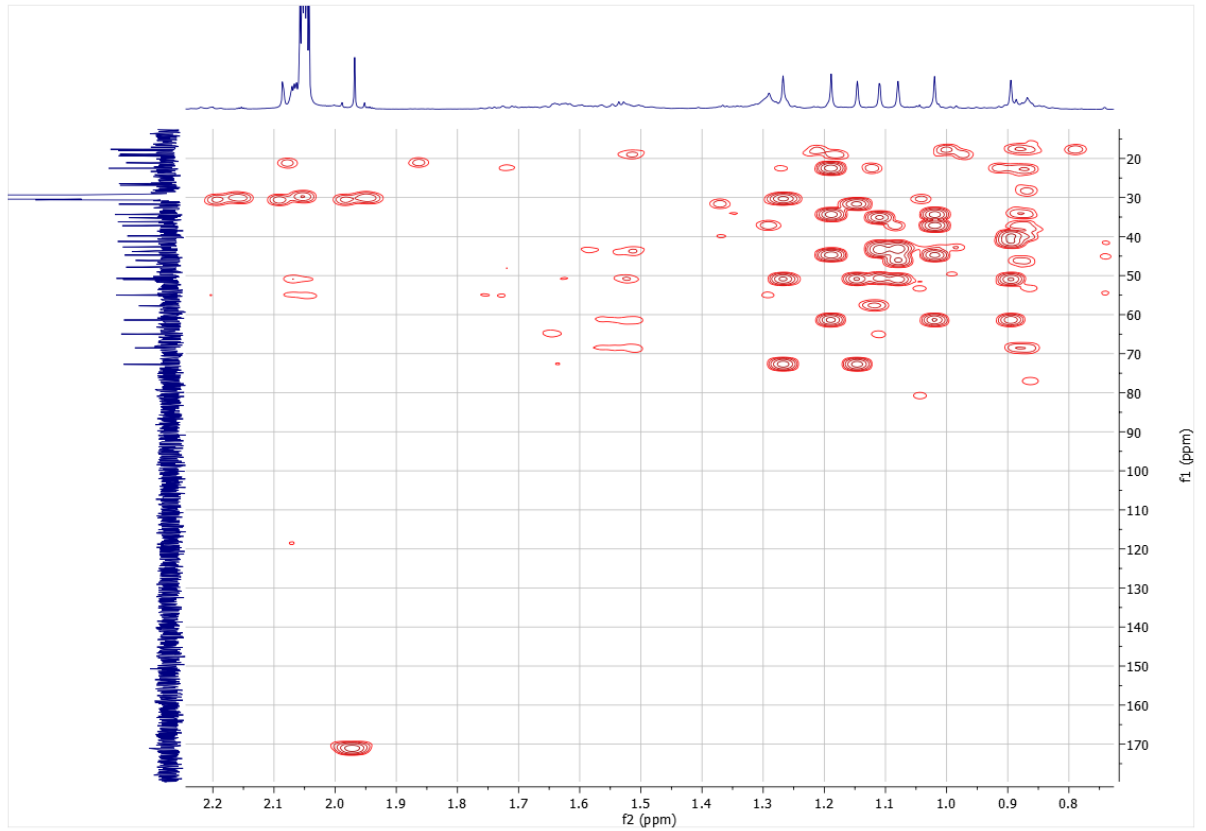
Phụ lục 10. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **3** trong $\text{Acetone-}d_6$



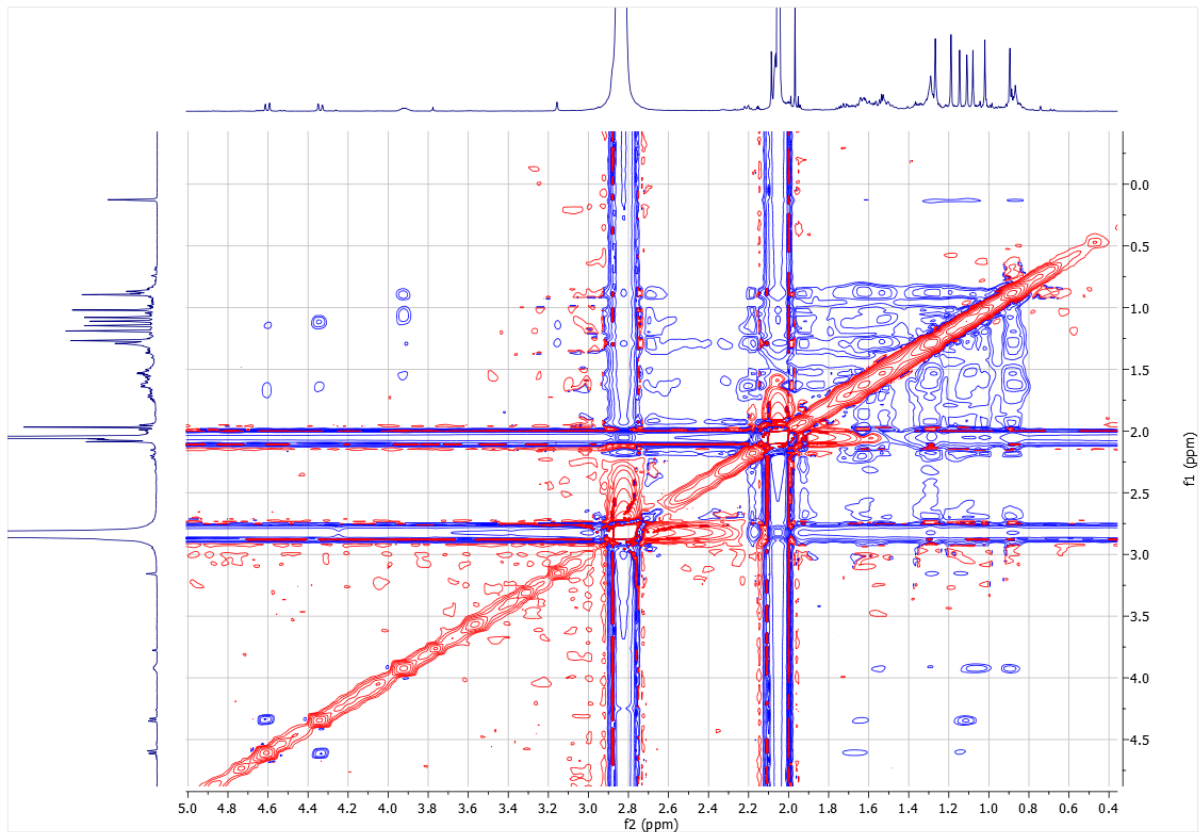
Phụ lục 11. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **3** trong Acetone- d_6



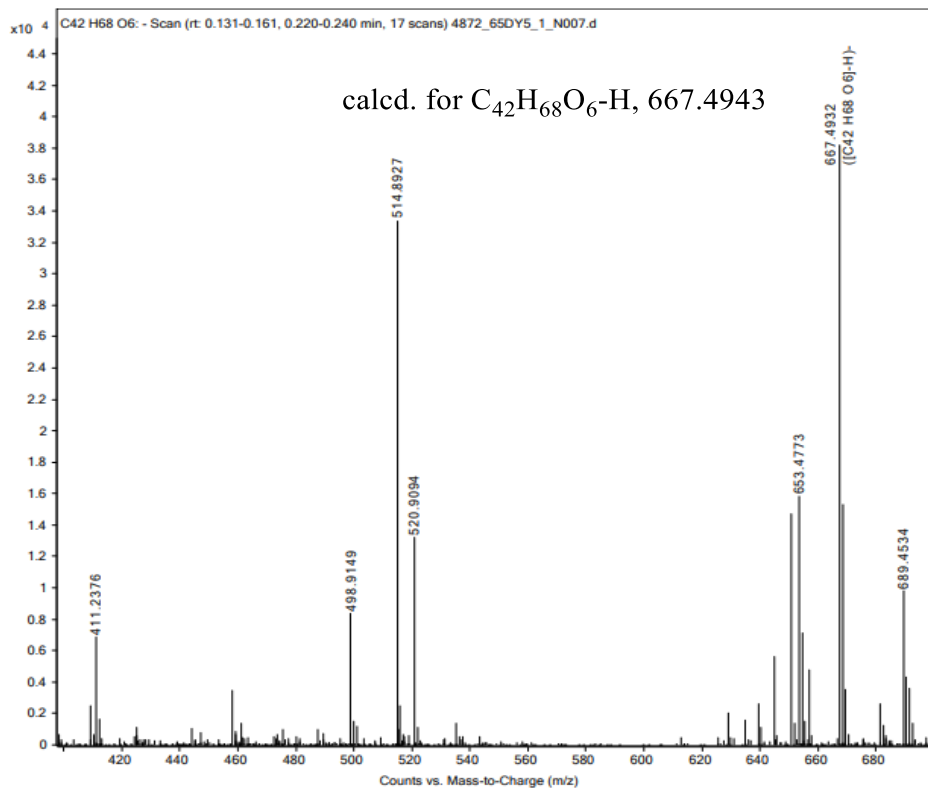
Phụ lục 12. Phổ HSQC của hợp chất **3** trong Acetone- d_6



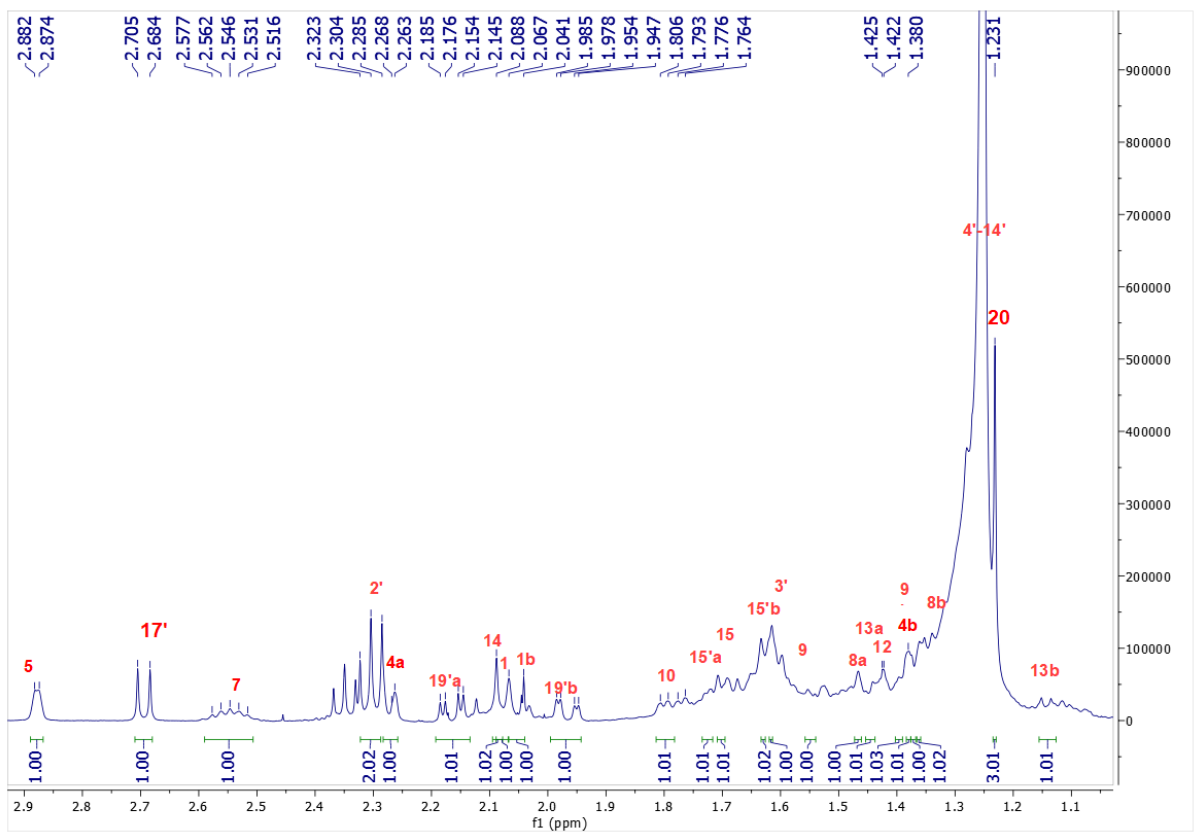
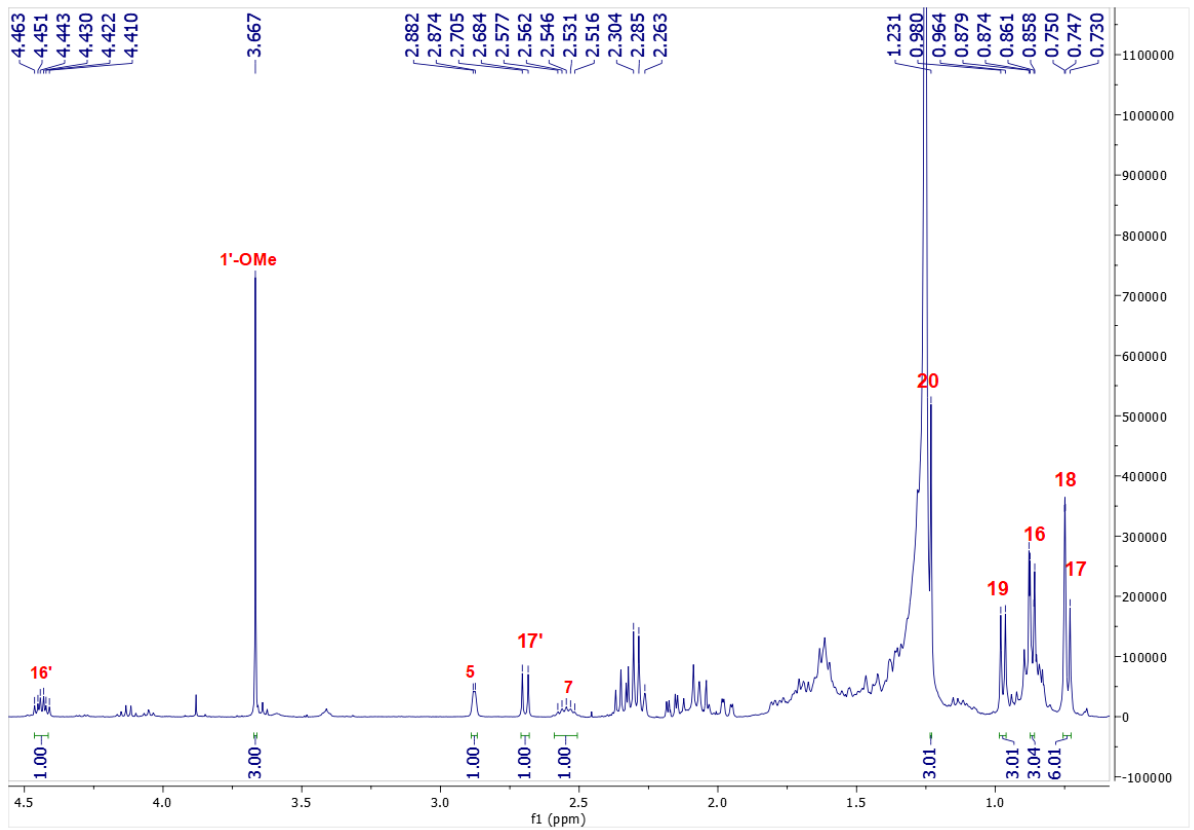
Phụ lục 13. Phổ HMBC của hợp chất **3** trong Acetone- d_6



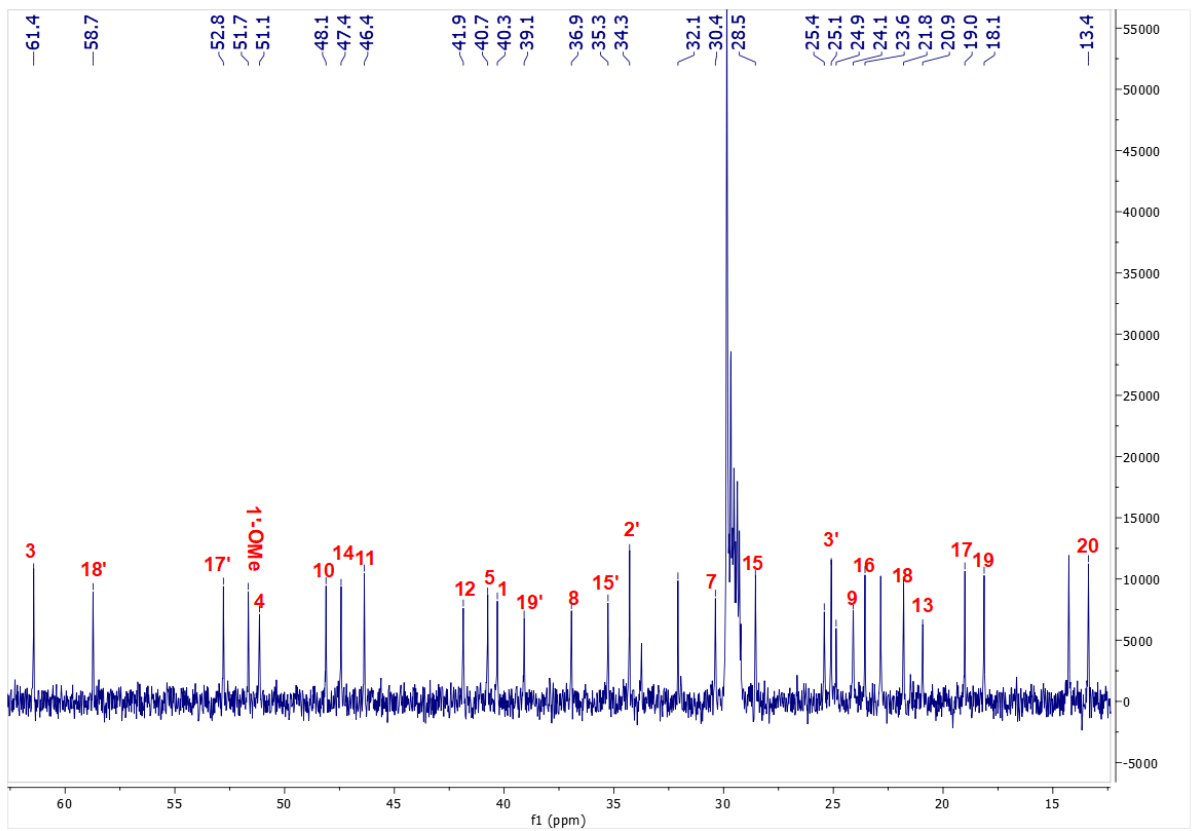
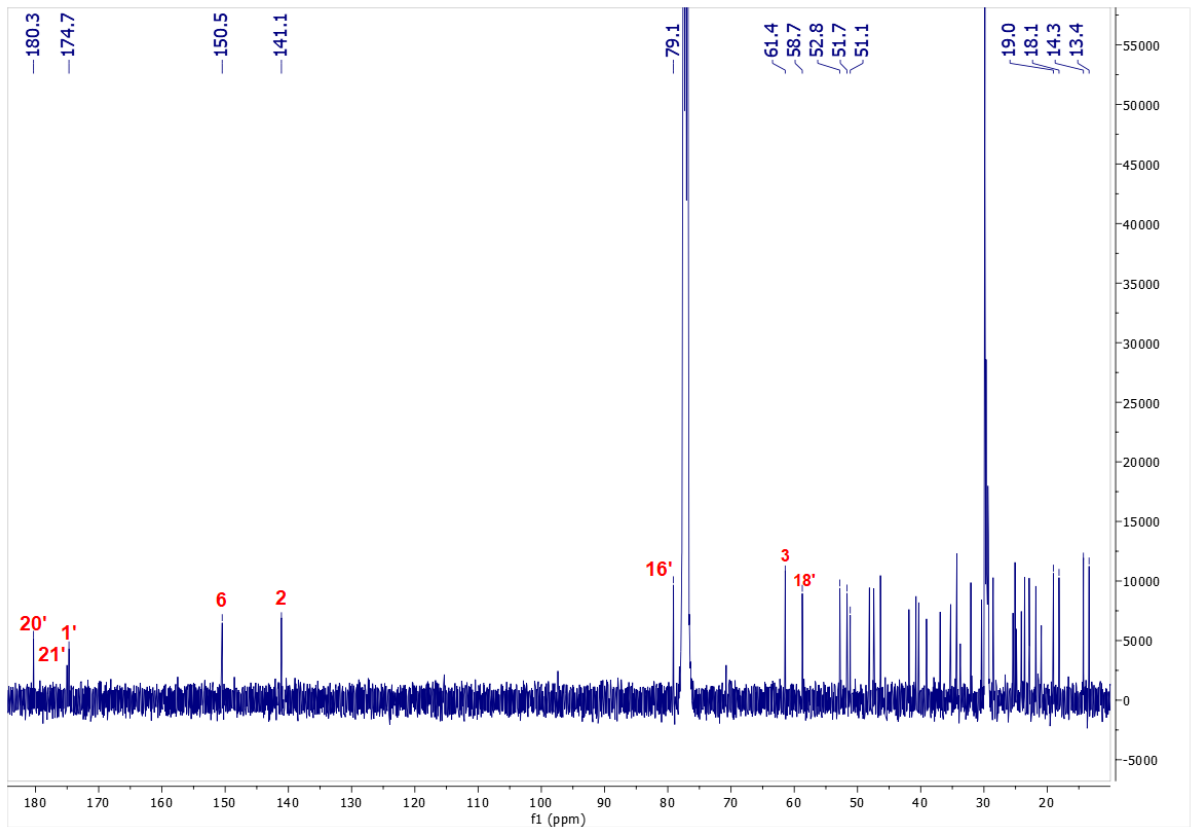
Phụ lục 14. Phổ NOESY của hợp chất **3** trong Acetone- d_6



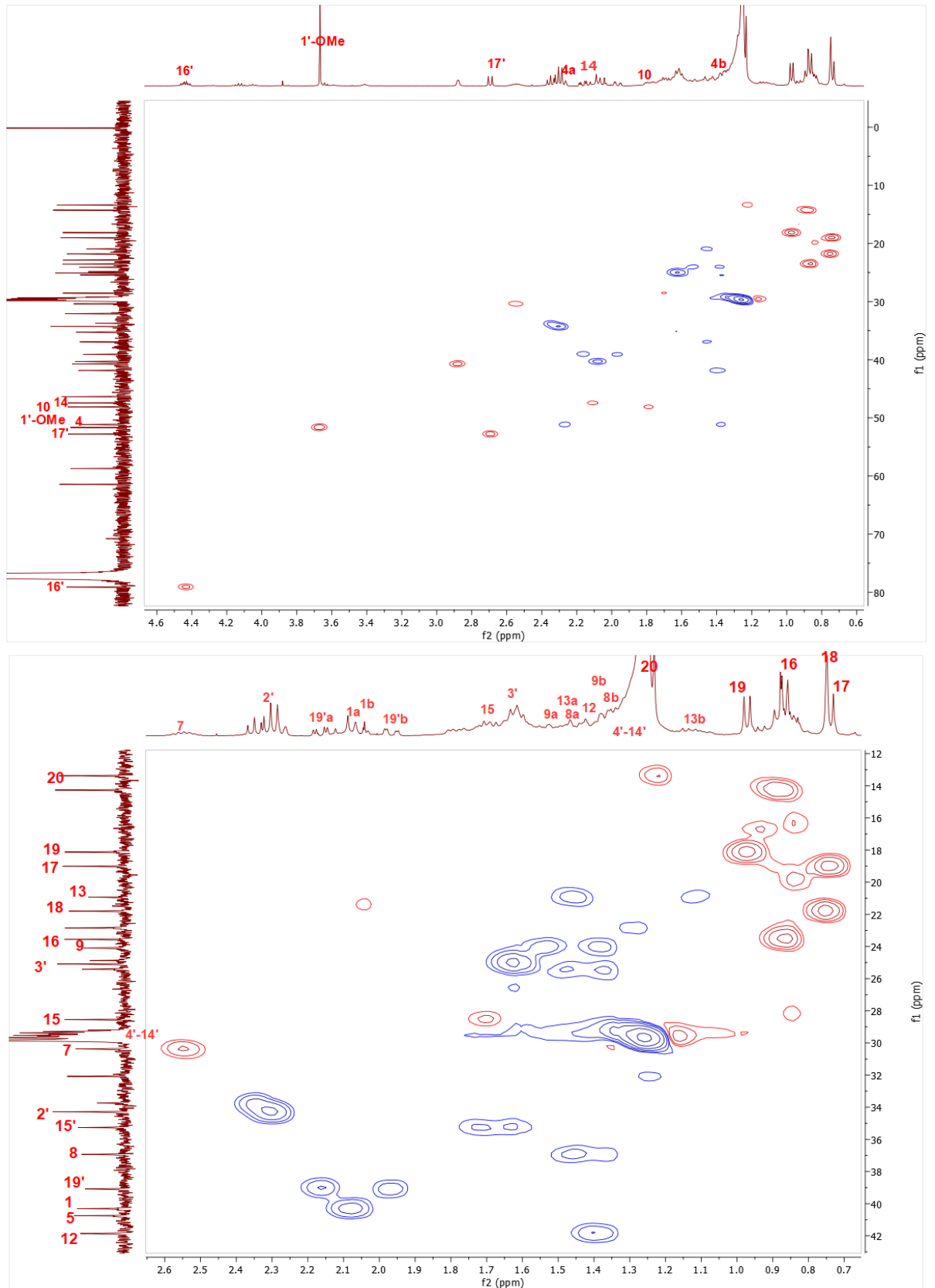
Phụ lục 15. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **4** trong $CDCl_3$



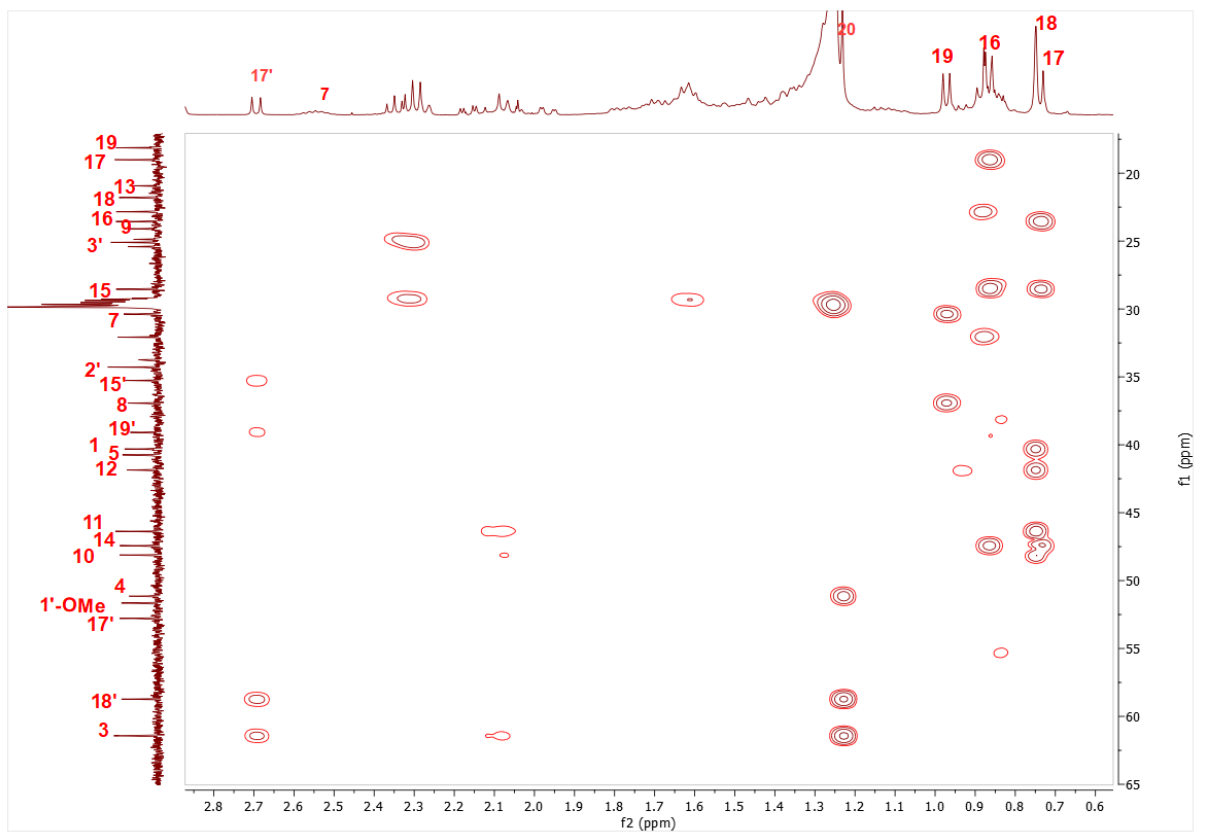
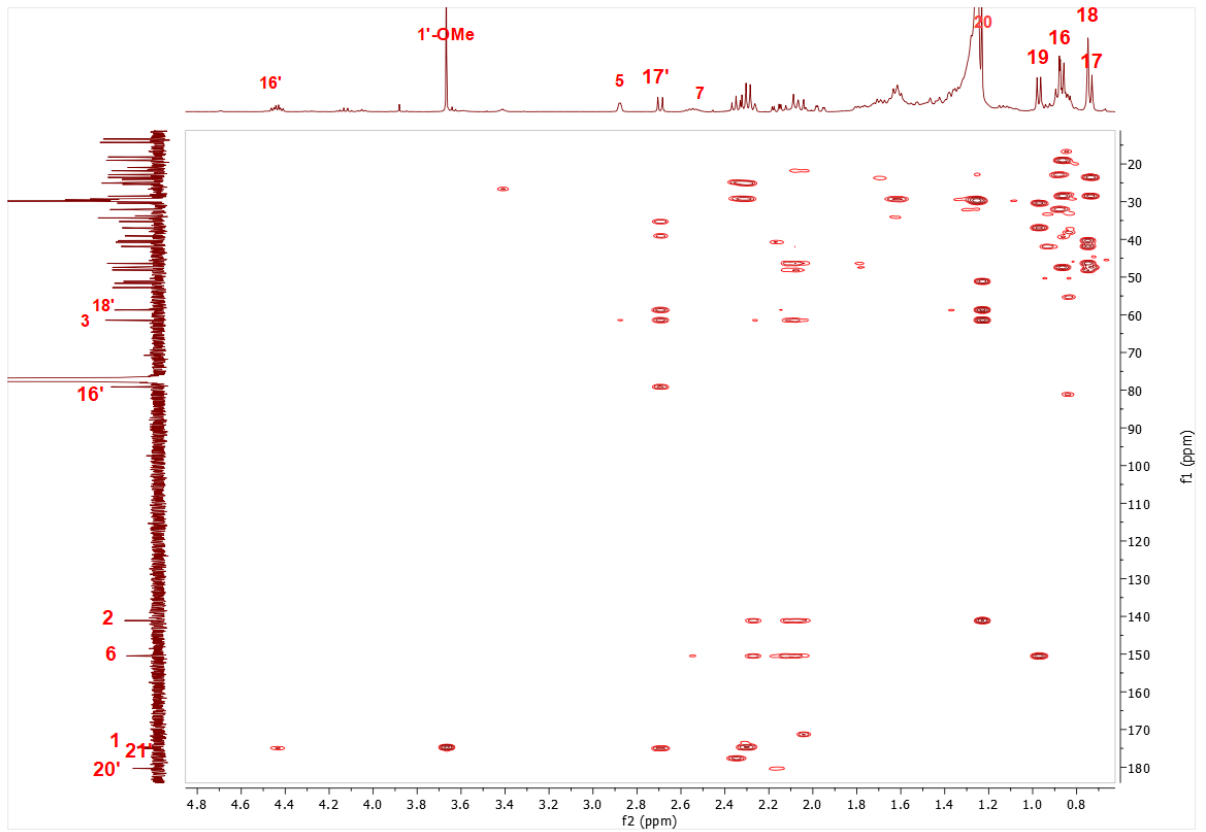
Phụ lục 16. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **4** trong CDCl_3



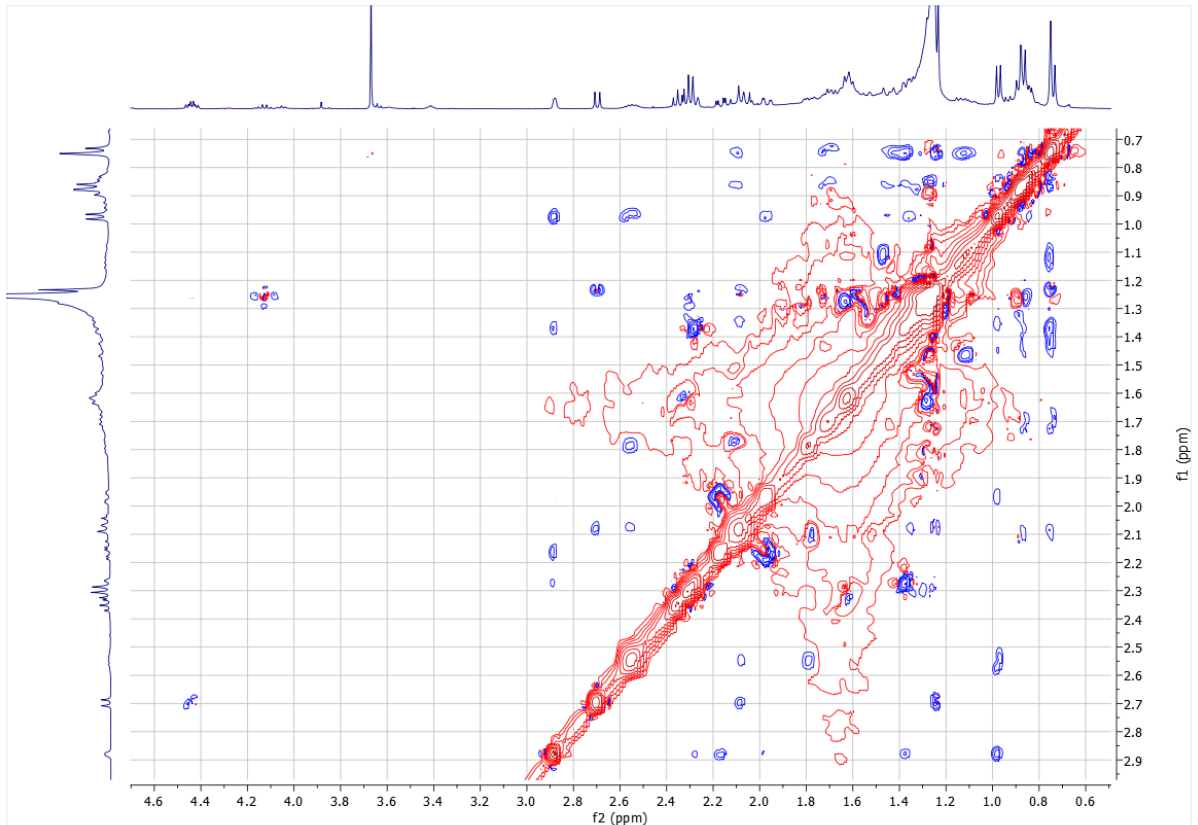
Phụ lục 17. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất 4 trong CDCl₃



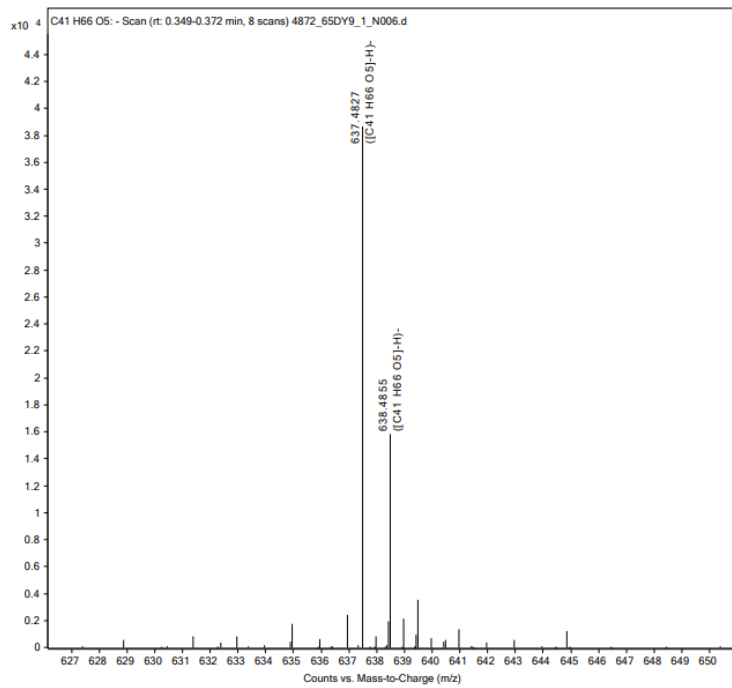
Phụ lục 18. Phổ HSQC của hợp chất 4 trong CDCl₃



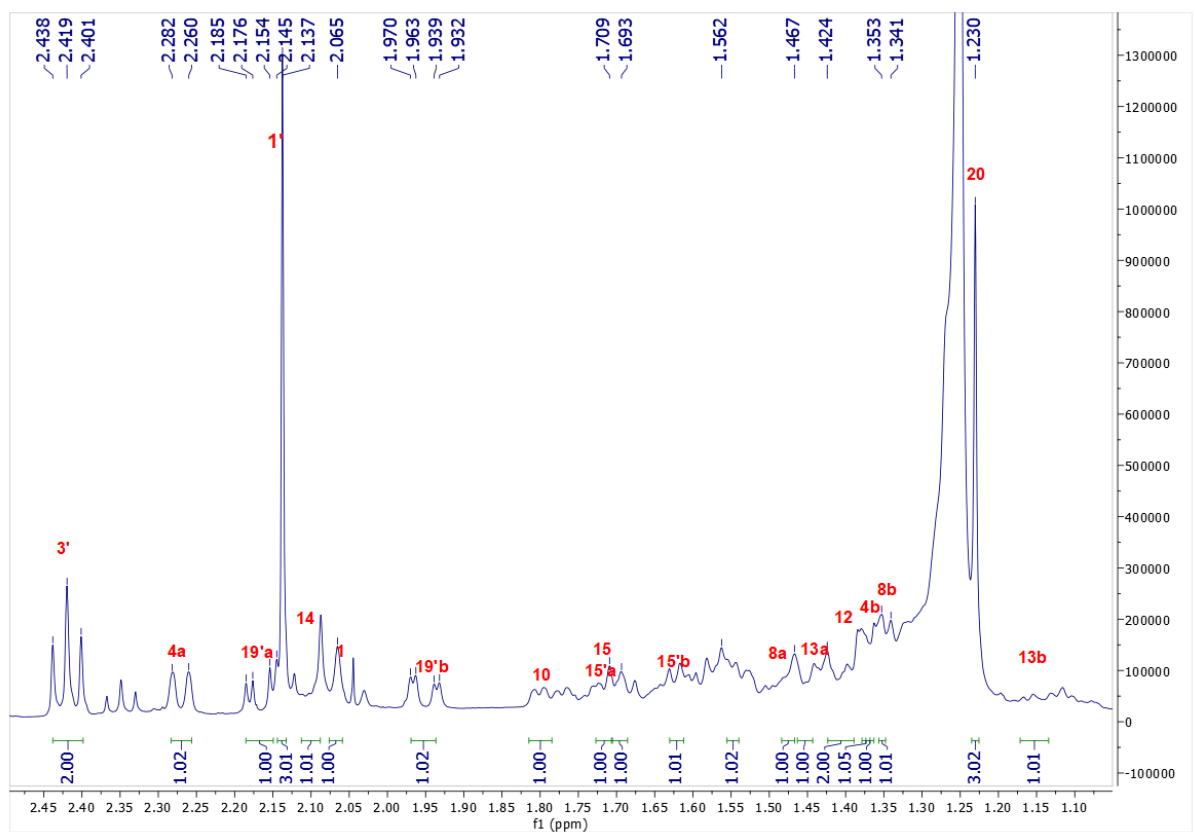
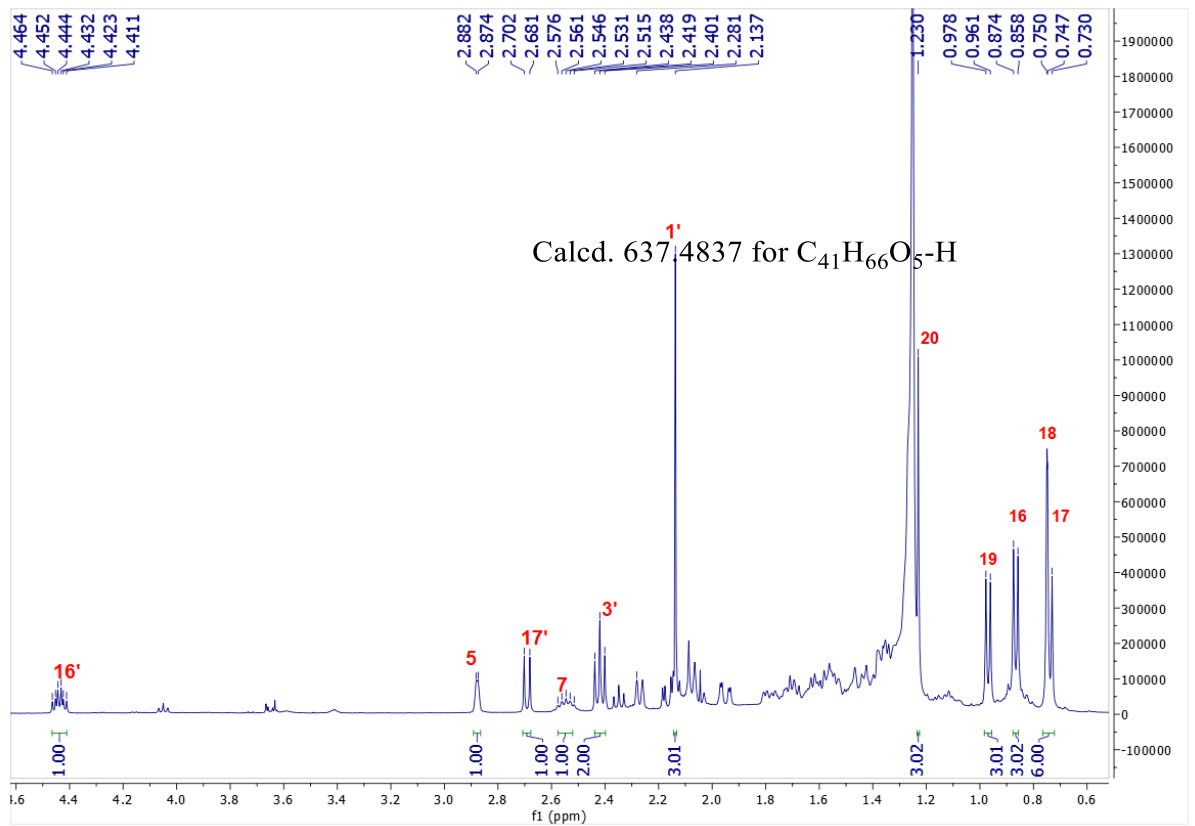
Phụ lục 19. Phổ HMBC của hợp chất 4 trong CDCl_3



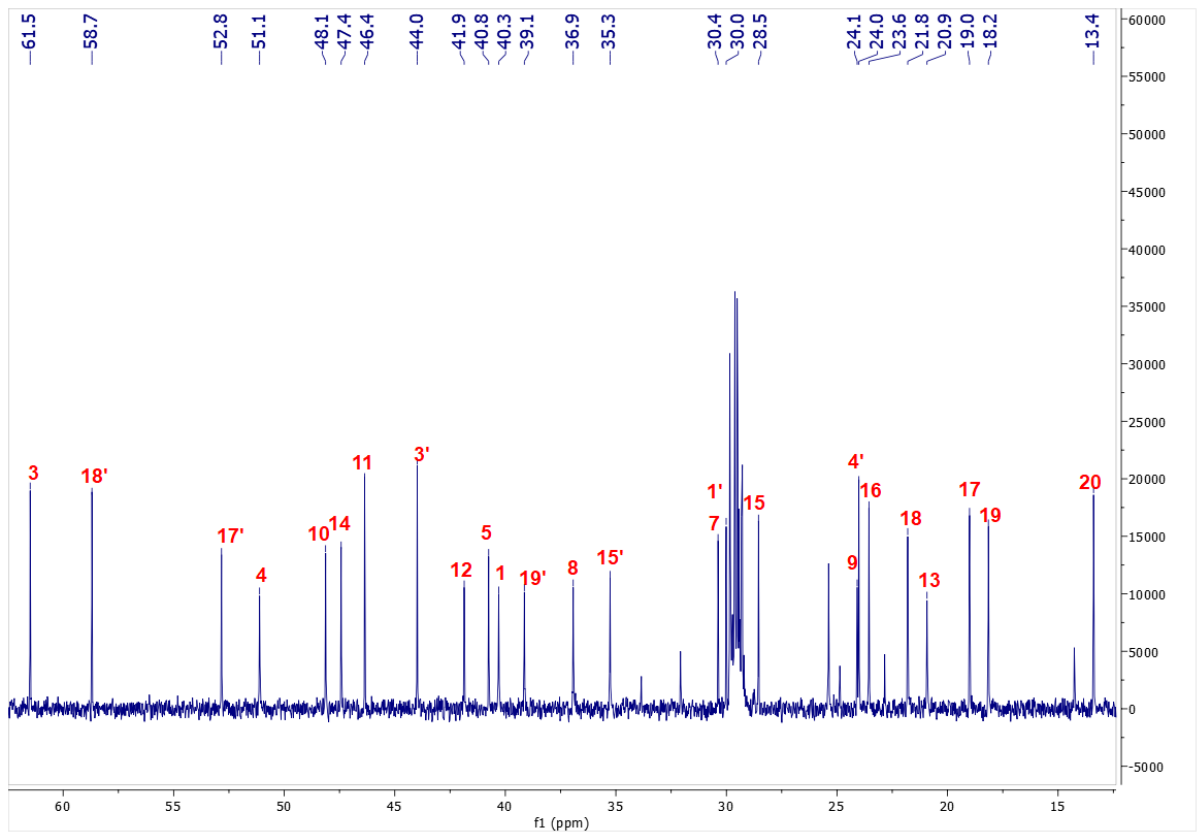
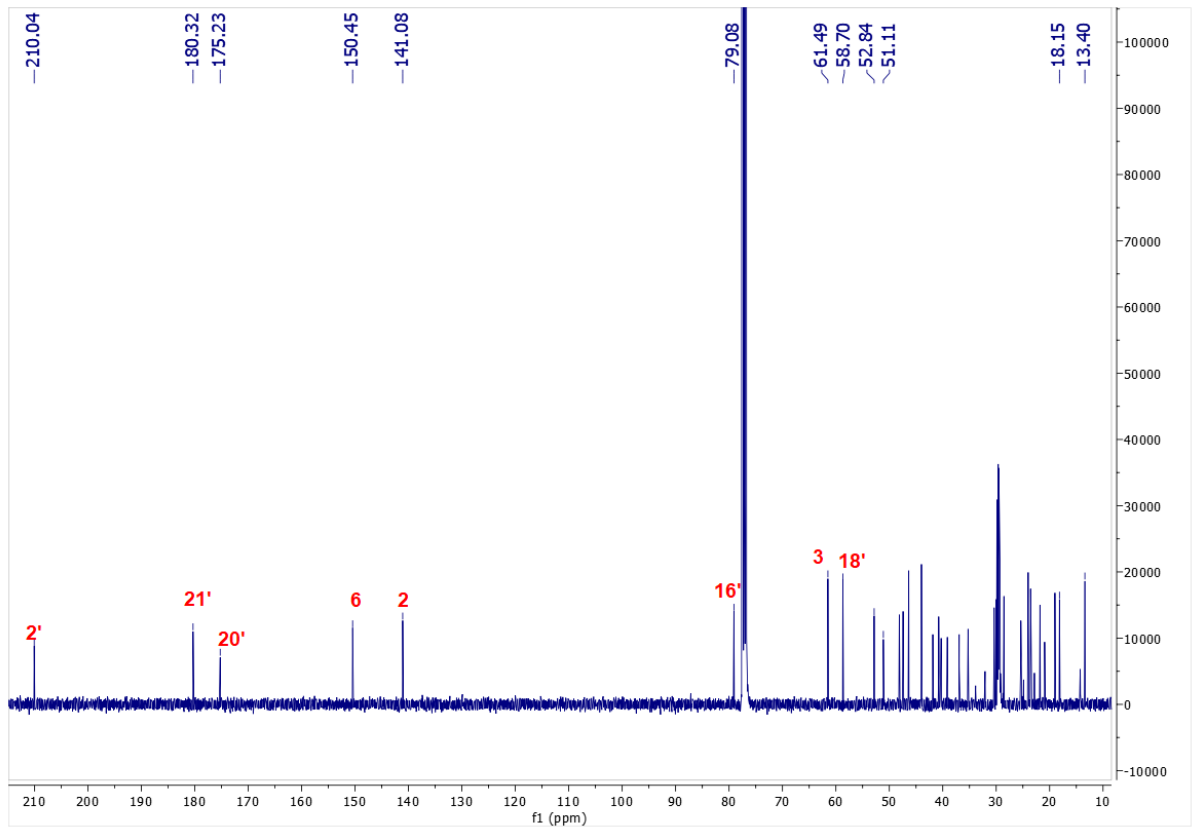
Phụ lục 20. Phổ NOESY của hợp chất **4** trong CDCl_3



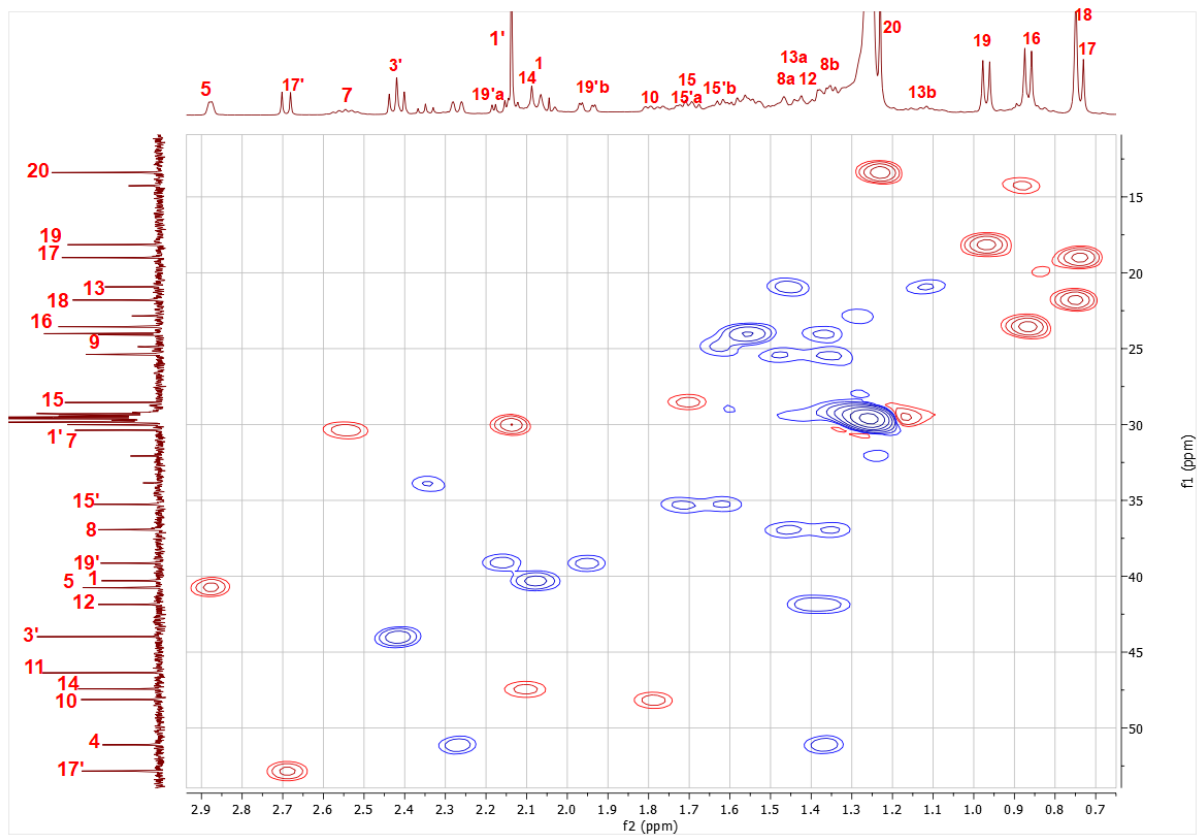
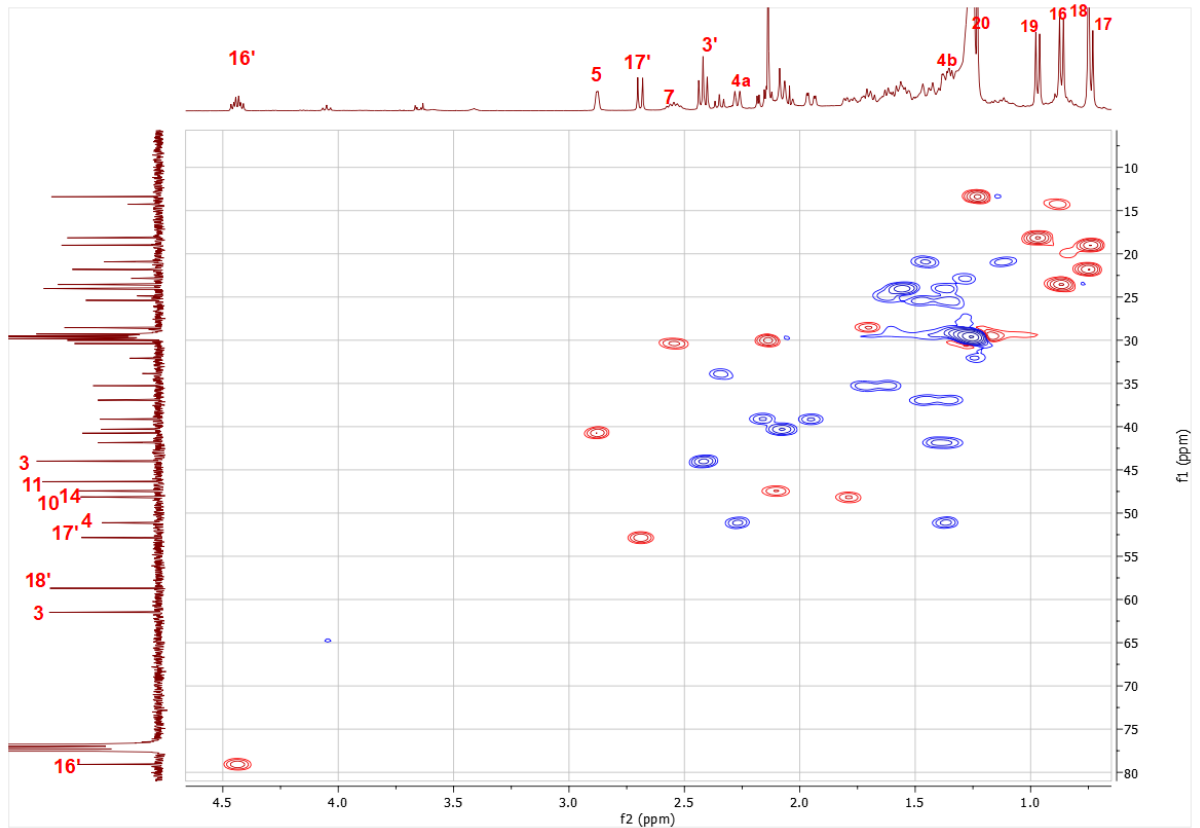
Phụ lục 21. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **5** trong CDCl_3



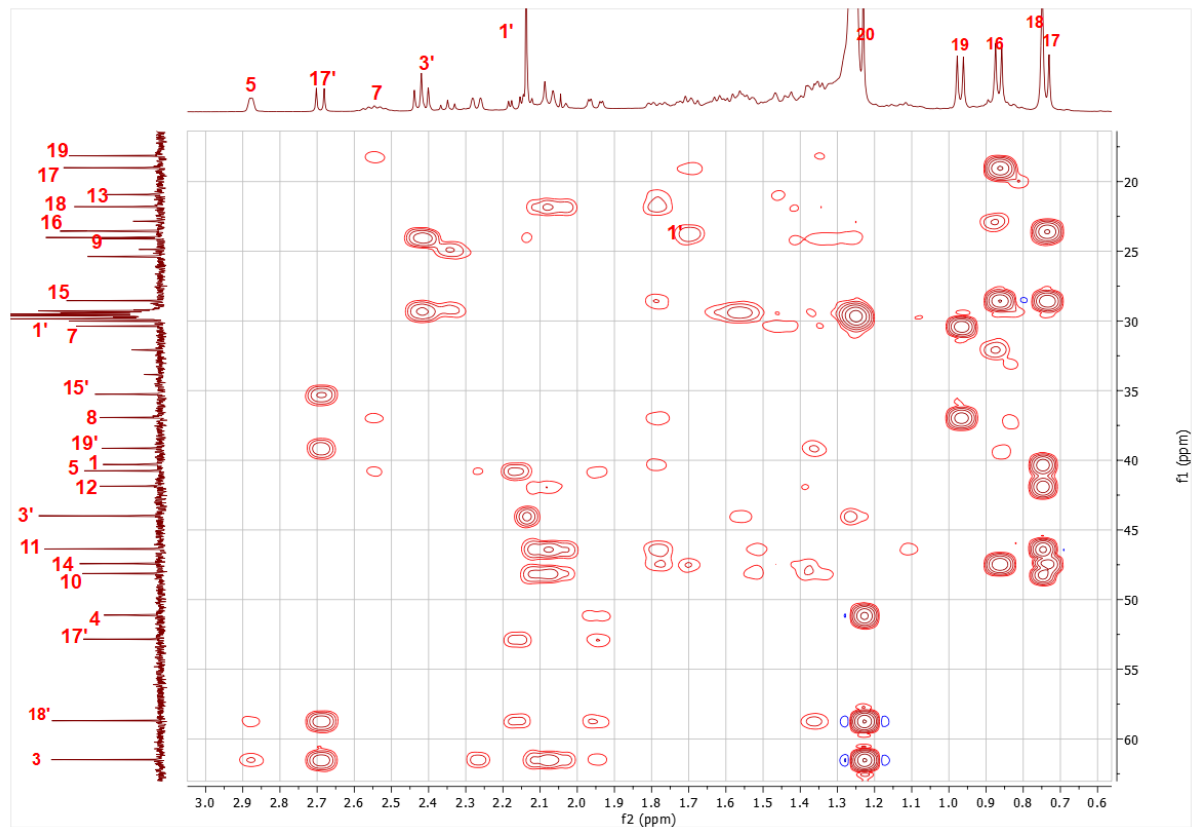
Phụ lục 22. Phổ 1H -NMR của hợp chất **5** trong $CDCl_3$



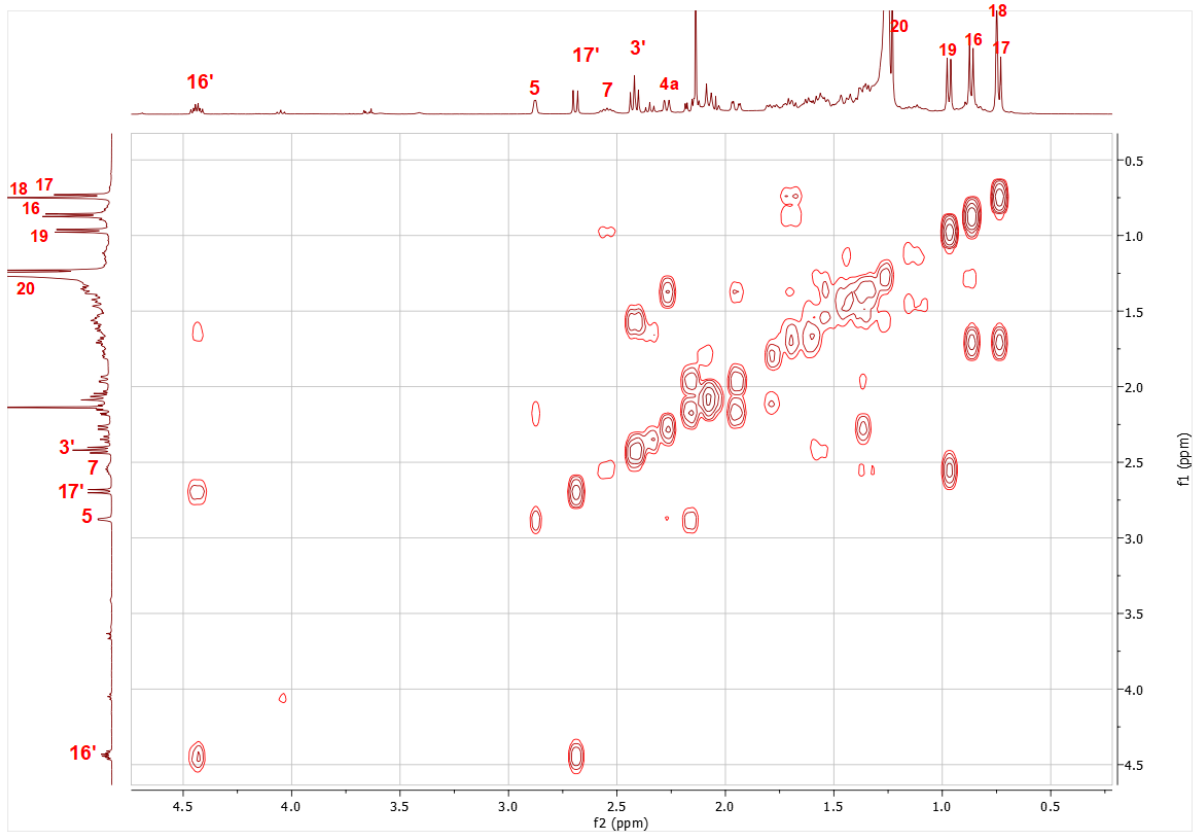
Phụ lục 23. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất **5** trong CDCl₃



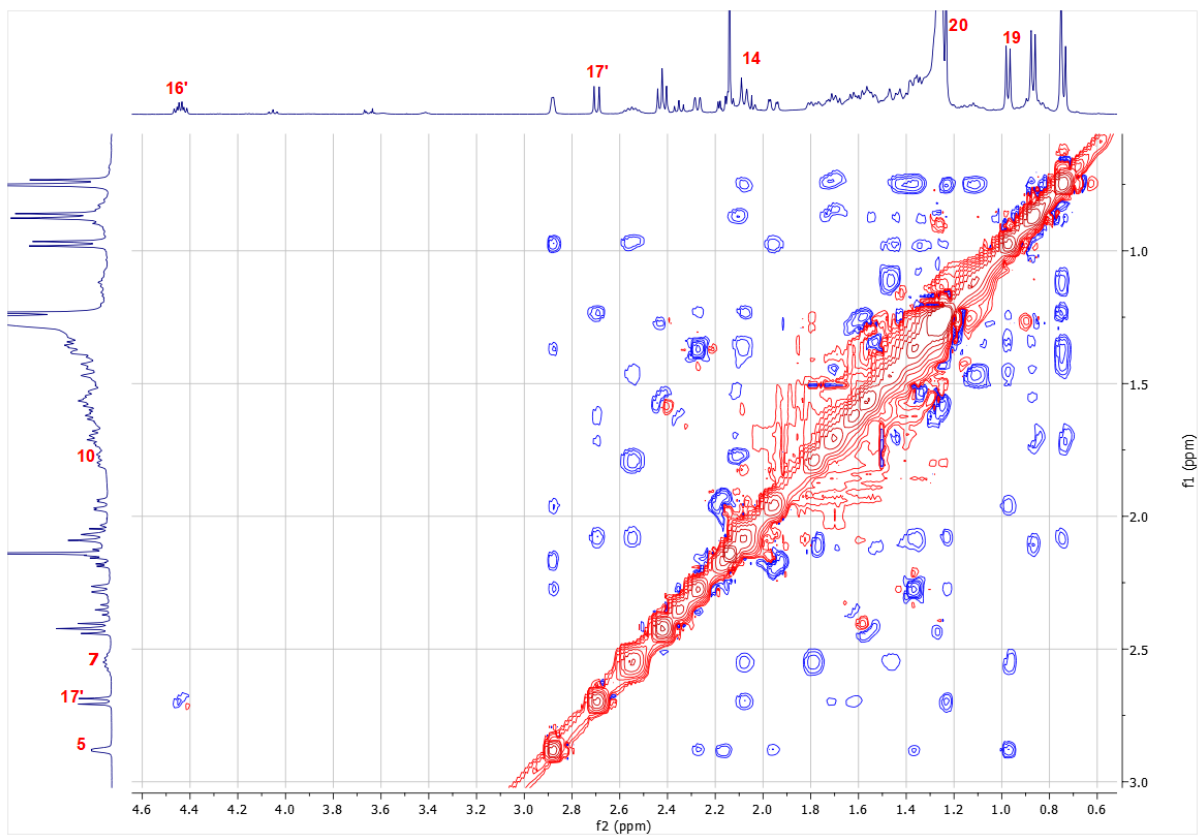
Phụ lục 24. Phổ HSQC của hợp chất **5** trong CDCl_3



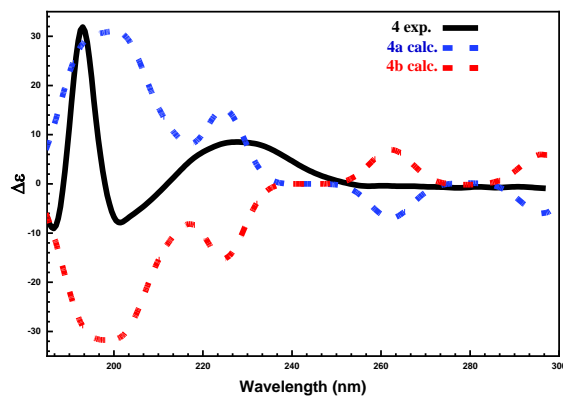
Phụ lục 25. Phổ HMBC của hợp chất 5 trong CDCl₃



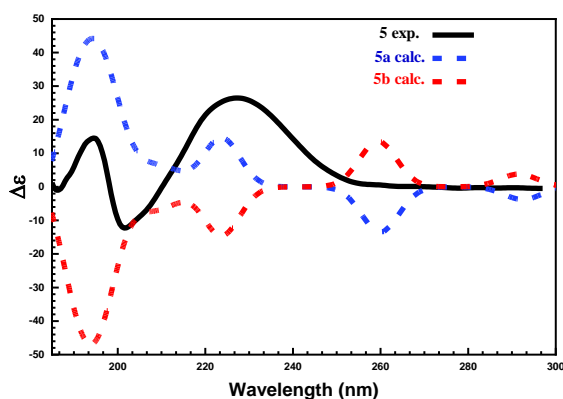
Phụ lục 26. Phổ COSY của hợp chất **5** trong CDCl₃



Phụ lục 27. Phổ NOESY của hợp chất **5** trong CDCl₃



Hình 28.1: Phổ ECD thực nghiệm và mô phỏng của hợp chất 4



Hình 28.2: Phổ ECD thực nghiệm và mô phỏng của hợp chất 5

Phụ lục 29. Chỉ số phân phối Boltzman cho đồng phân 2a (10 đồng phân)

| 2a conformers | Boltzmann distribution (%) |
|---------------------|----------------------------|
| 01 | 0,051 |
| 02 | $1,530 \times 10^{-4}$ |
| 03 | 0,487 |
| 04 | 0,025 |
| 05 | 76,431 |
| 06 | 22,407 |
| 07 | 0,051 |
| 08 | $1,351 \times 10^{-4}$ |
| 09 | 0,335 |
| 10 | 0,212 |
| 2a (average) | 99,999 |

Phụ lục 30. Chỉ số phân phối Boltzman cho đồng phân 2b (21 đồng phân)

| 2b conformers | Boltzmann distribution (%) |
|---------------------|----------------------------|
| 01 | 0,031 |
| 02 | 0,012 |
| 03 | 0,060 |
| 04 | $5,766 \times 10^{-7}$ |
| 05 | 0,077 |
| 06 | 0,024 |
| 07 | 19,691 |
| 08 | 11,220 |
| 09 | 5,836 |
| 10 | 37,604 |
| 11 | 25,214 |
| 12 | 0,005 |
| 13 | $1,321 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 0,011 |
| 15 | 0,048 |
| 16 | 0,047 |
| 17 | 0,002 |
| 18 | 0,012 |
| 19 | 0,054 |
| 20 | 0,004 |
| 21 | 0,047 |
| 2b (average) | 99,999 |

Phụ lục 31. Dữ liệu mô phỏng DP4+ and screening probabilities^a of selected conformers

| Conformer | DP4+ probabilities (%) | Screening probabilities (%) |
|---------------------|------------------------|-----------------------------|
| 2a05 | 81,83 | 62,54 |
| 2a06 | 18,17 | 4,07 |
| 2a (average) | 12,30 | 12,16 |
| 2bb07 | 36,87 | 7,26 |
| 2b08 | 51,10 | 5,73 |
| 2b10 | 6,29 | 2,37 |
| 2b11 | 5,74 | 1,45 |
| 2b (average) | 87,70 | 82,20 |

^a screening probability = Boltzmann distribution × DP4+ probability

Phụ lục 32. Dữ liệu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của hợp chất 2 và 3

| Hợp chất | Phần trăm ức chế (I, %) | | | | | IC ₅₀ (μ M) |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|----------------|---------------|------------|--------------------------------|
| | 250 μ M | 100 μ M | 50 μ M | 25 μ M | 10 μ M | |
| 2 | 51,4 \pm 1,0 | 12,6 \pm 1,7 | - | - | - | 98,2 |
| 3 | 72,1 \pm 1,5 | 27,8 \pm 2,6 | 9,4 \pm 1,6 | - | - | 74,7 |
| Acarbose^a | 64,5 \pm 1,3 | 37,9 \pm 1,2 | 15,5 \pm 3,1 | 2,8 \pm 1,7 | - | 168,0 |

Kết quả I (%) được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n = 3. cho thấy sự khác biệt các giá trị phần trăm ức chế giữa các nồng độ trong một mẫu thử nghiệm ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

– Không thể hiện hoạt tính ức chế.

*Không thử nghiệm. kết quả này không ảnh hưởng đến giá trị IC₅₀.

^aChất đối chứng dương

