

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BÁ THỊ CHÂM

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
CHỐNG UNG THƯ CỦA HAI LOÀI XƯƠNG QUẠT (*Dianella
ensifolia*) VÀ CÔM HẢI NAM (*Elaeocarpus hainanensis*)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỮU CƠ

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

BÁ THỊ CHÂM

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
CHỐNG UNG THƯ CỦA HAI LOÀI XƯƠNG QUẠT (*Dianella
ensifolia*) VÀ CÔM HẢI NAM (*Elaeocarpus hainanensis*)

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS.TS. Vũ Đình Hoàng
- PGS. TS. Trịnh Thị Thủy

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính chống ung thư của hai loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) và Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*)" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 20

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện tại Viện Hóa học –Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam. Trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu tại Viện, tác giả đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp cả trong và ngoài Viện cũng như của bạn bè và gia đình.

Tôi xin trân trọng bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới PGS. TS. Vũ Đình Hoàng và PGS.TS. Trinh Thị Thủy là những người thầy đã dành nhiều thời gian tâm huyết hướng dẫn chỉ bảo cho tôi tận tình về khoa học cũng như chuyên môn. Đồng thời các thầy còn động viên và tạo mọi điều kiện hết sức thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa học cùng các cán bộ của Viện hóa học đã quan tâm giúp đỡ tôi, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi cũng bày tỏ lòng biết ơn tới tập thể phòng Nghiên cứu các hợp chất tự nhiên và phòng Hóa sinh ứng dụng đã quan tâm giúp đỡ tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ cùng tập thể cán bộ thuộc Học viện đã giúp đỡ tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn quan tâm, khích lệ, dành thời gian cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả

Bá Thị Châm

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC HÌNH	viii
DANH MỤC BẢNG	xii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Dianella</i>	3
1.1.1. Đặc điểm thực vật	3
1.1.2. Công dụng trong y học cổ truyền	3
1.1.3. Thành phần hóa học	4
1.1.4. Hoạt tính sinh học	9
1.1.5. Tổng quan về loài <i>Dianella ensifolia</i>	9
1.1.5.1. Đặc điểm thực vật	9
1.1.5.2. Ứng dụng trong y học cổ truyền	10
1.1.5.3. Thành phần hóa học	10
1.1.5.4. Hoạt tính sinh học	13
1.2. Tổng quan về chi <i>Côm (Elaeocarpus)</i>	13
1.2.1. Đặc điểm thực vật	13
1.2.2. Ứng dụng trong y học cổ truyền	14
1.2.3. Thành phần hóa học	14
1.2.4. Hoạt tính sinh học	22
1.2.5. Tổng quan về loài <i>Elaeocarpus hainanensis</i>	23
1.2.5.1. Đặc điểm thực vật	23
1.2.5.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học	23
1.5. Về hoạt tính chống ung thư của các cucurbitane	25
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1. MẪU THỰC VẬT	29

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.2.1. <i>Phương pháp phân lập các chất</i>	30
2.2.2. <i>Phương pháp xác định cấu trúc hóa học</i>	30
2.2.3. <i>Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học</i>	31
2.2.3.1. <i>Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào</i>	31
2.2.3.2. <i>Phương pháp phân tích số lượng tế bào, chu trình tế bào, xác định cảm ứng tế bào chết theo chương trình apoptosis.....</i>	33
2.2.3.3. <i>Phương pháp xác định biểu hiện một số gen liên quan đến ung thư bằng phương pháp Real-time PCR</i>	34
CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM	36
3.1. <i>Loài Xương quạt (D. ensifolia).....</i>	36
3.1.1. <i>Chiết phân lớp các hoạt chất</i>	36
3.1.2. <i>Chiết, tách các hợp chất.....</i>	36
3.1.3. <i>Hàng số vật lý và dữ liệu phổ.....</i>	41
3.2. <i>Loài Côm hải nam (E. hainanensis).....</i>	42
3.2.1. <i>Chiết phân lớp các hoạt chất</i>	42
3.2.2. <i>Chiết, tách các chất</i>	43
3.2.3. <i>Hàng số vật lý và dữ liệu phổ.....</i>	45
3.3. <i>Thử hoạt tính chống ung thư.....</i>	47
3.3.1 <i>Các hợp chất phân lập từ loài Xương quạt.....</i>	47
3.3.2. <i>Các hợp chất phân lập từ loài Côm hải nam</i>	48
4.1. <i>Các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học.....</i>	49
4.1.1. <i>Xác định cấu trúc hóa học của các chất phân lập từ loài Xương quạt (Dianella ensifolia).....</i>	49
4.1.2. <i>Xác định cấu trúc hóa học các chất từ loài Côm hải nam (Elaeocarpus hainanensis)</i>	75
4.1.2.1. <i>Các hợp chất cucurbitacin</i>	75
4.1.2.2. <i>Các hợp chất olean triterpene.....</i>	95
4.1.2.3. <i>Các hợp chất khác.....</i>	116
4.2. <i>Kết quả nghiên cứu hoạt tính chống ung thư</i>	119
4.2.1. <i>Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất phân lập từ cây Xương quạt</i>	119

<i>4.2.2. Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất phân lập từ cây Côm hải nam.....</i>	<i>120</i>
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	129
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	131
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	132
TÀI LIỆU THAM KHẢO	133
PHỤ LỤC	146

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng anh	Diễn giải
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
8505	Human undifferentiated thyroid carcinoma	Ung thư biểu mô tuyến giáp không biệt hóa ở người
A549	Human lung carcinoma	Ung thư phổi ở người
ATTC	American Type Culture Collection	Trung tâm lưu giữ chủng Hoa kỳ
br	broad	
COSY	^1H - ^1H -Correlation Spectroscopy	Phổ 2 chiều thể hiện tương tác giữa proton của các carbon kế cận nhau
Cq		Cacbon không liên kết với hidro
d	doublet	
DCM	Dichlometan	
dd	doublet of doublets	Doublet của doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modifile Eagle Medium	
dt	doublet of triplets	
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectra	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
EtOAc		Ethyl acetat
EtOH		Ethanol
Hela	Human cervix carcinoma	Ung thư tử cung ở người
Hep3B	Human hepatocellular carcinoma	Ung thư gan người
HMBC	Heteronuclear Mutiple Bone Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết

HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spetrum	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
Huh-7	Human hepatocyte-derived carcinoma	Ung thư gan ở người
IC ₅₀	Inhibition concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50%
<i>J</i> (Hz)		Hằng số tương tác tính bằng Hz
MCF-7	Human breast carcinoma	Ung thư vú người phụ thuộc estrogen
m	multiplet	
MeOH		Methanol
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ 2 chiều thể hiện tương tác giữa các proton gần nhau trong không gian
OCI/AML3	Acute myeloid leukemia	Ung thư bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính
OD	Optical density	Mật độ quang học
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
RT-PCR	Real-time reverse transcription polymerase chain reaction	
q	quartet	
quint	quintet	
s	singlet	
T24	Human urine bladder carcinoma	Ung thư bàng quang ở người
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
SNU-1	Human gastric carcinoma	Ung thư dạ dày ở người
δ (ppm)	ppm = part per million	Độ dịch chuyển hóa học tính bằng phần triệu

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Ảnh minh họa một số loài điển hình thuộc chi <i>Dianella</i>	4
Hình 1.2. Cấu trúc một số flavonoid được tìm thấy ở chi <i>Dianella</i>	6
Hình 1.3. Cấu trúc một số quinone được tìm thấy ở chi <i>Dianella</i>	7
Hình 1.4. Cấu trúc một số naphthalene được tìm thấy ở chi <i>Dianella</i>	9
Hình 1.5. Cấu trúc các hợp chất triterpenoid được phân lập từ loài <i>D. ensifolia</i> ...	11
Hình 1.6. Cấu trúc các hợp chất khác được phân lập từ loài <i>D. ensifolia</i>	12
Hình 1.7. Cấu trúc của các chất trong tinh dầu của loài <i>D. ensifolia</i>	13
Hình 1.8. Một số loài điển hình thuộc chi <i>Côm</i> phân bố tại Việt Nam.....	14
Hình 1.9. Cấu trúc một số terpenoid tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	17
Hình 1.10. Cấu trúc một số alkaloid tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	18
Hình 1.11. Cấu trúc các flavonoid được tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	20
Hình 1.12. Cấu trúc các chất khác tìm được ở chi <i>Elaeocarpus</i>	21
Hình 1.13. Cấu trúc hóa học khung cucurbitane.....	25
Hình 1.14. Cấu trúc hóa học của cucurbitacin có tác dụng gây độc tế bào ung thư	26
Hình 2.1. Ảnh tiêu bản cây <i>Xương quạt</i> (<i>D. ensifolia</i>)	29
Hình 2.2. Ảnh loài <i>Côm hải nam</i> (<i>E. hainanensis</i>).	29
Hình 3.1. Sơ đồ tạo cao chiết từ mẫu loài <i>Xương quạt</i> (<i>D. ensifolia</i>).....	39
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết <i>n</i> -hexane và buthanol của loài <i>Xương quạt</i>	40
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết ethyl acetat của loài <i>Xương quạt</i> ...	40
Hình 3.4. Sơ đồ phân lập chất từ cặn chiết dichloromethan của loài <i>Xương quạt</i> ..	41
Hình 3.5. Sơ đồ tạo cao chiết từ loài <i>Côm hải nam</i> (<i>E. hainanensis</i>)	44
Hình 3.6. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết DCM của loài <i>Côm hải nam</i>	45
Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết methanol của loài <i>Côm hải nam</i>	45
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của chất DNI	50
Hình 4.2. Phổ CD của hợp chất DNI	51
Hình 4.3. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất DNI	51
Hình 4.4. Phổ ¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃) của hợp chất DNI	52
Hình 4.5. Phổ ¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃) của hợp chất DNI	52

Hình 4.6. Phổ HMBC của hợp chất DN1	53
Hình 4.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN2	53
Hình 4.8. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất DN2	55
Hình 4.9. Phổ ¹ H-NMR (500 MHz, CD ₃ OD) của hợp chất DN2	55
Hình 4.10. Phổ ¹³ C-NMR (125 MHz, CD ₃ OD) của hợp chất DN2	56
Hình 4.11. Phổ HMBC của hợp chất DN2	56
Hình 4.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN3	57
Hình 4.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN4	58
Hình 4.14. Phổ ¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃) của hợp chất DN4	60
Hình 4.15. Phổ ¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃) hợp chất DN4	60
Hình 4.16. Phổ HSQC của hợp chất DN4	61
Hình 4.17. Phổ HMBC của hợp chất DN4	61
Hình 4.18. Phổ NOESY của hợp chất DN4	62
Hình 4.19. Phổ khối (+)-HR ESI MS của hợp chất DN4	62
Hình 4.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN5	63
Hình 4.21. Phổ khối (-)-HR-ESI-MS của hợp chất DN5	63
Hình 4.22. Phổ ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 500MHz) của hợp chất DN5	64
Hình 4.23. Phổ ¹³ C-NMR (CDCl ₃ , 125MHz) của hợp chất DN5	64
Hình 4.24. Phổ HSQC của hợp chất DN5	65
Hình 4.25. Phổ HMBC của hợp chất DN5	65
Hình 4.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN6	67
Hình 4.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN7	68
Hình 4.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN8	70
Hình 4.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN9	72
Hình 4.30. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN10	74
Hình 4.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH1	75
Hình 4.32. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH2 (cucurbitacin I).....	77
Hình 4.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH3	79
Hình 4.34. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH4	80
Hình 4.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH5	82
Hình 4.36. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH6	84
Hình 4.37. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH7	86

Hình 4.38. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH8	88
Hình 4.39. Phổ HR-ESI-MS (positive) của hợp chất EH8	88
Hình 4.40. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất EH8	89
Hình 4.41. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất EH8	89
Hình 4.42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn 5,7-3,1 ppm) của hợp chất EH8	90
Hình 4.43. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất EH8	90
Hình 4.44. Phổ HSQC của hợp chất EH8	91
Hình 4.45. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất EH8	91
Hình 4.46. Phổ HMBC của hợp chất EH8	92
Hình 4.47. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất EH8	93
Hình 4.48. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH9	95
Hình 4.49. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất EH9	98
Hình 4.50. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 5,2 đến 2,2 ppm) của hợp chất EH9	98
Hình 4.51. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất EH9	99
Hình 4.52. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (giãn từ 52 đến 16 ppm) của hợp chất EH9	99
Hình 4.53. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất EH9	100
Hình 4.54. Phổ HR-ESI-MS (positive) của hợp chất EH9	100
Hình 4.55. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH10	100
Hình 4.56. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH11	103
Hình 4.57. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH12	104
Hình 4.58. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH13	107
Hình 4.59. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất EH13	109
Hình 4.60. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 5,0 đến 2,5 ppm) của hợp chất EH13	109
Hình 4.61. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 1,9 đến 0,8 ppm) của hợp chất EH13	110
Hình 4.62. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất EH13	110
Hình 4.63. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (giãn từ 140 đến 20 ppm) của hợp chất EH13	111
Hình 4.64. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (giãn từ 50 đến 20 ppm) của hợp chất EH13	111
Hình 4.65. Phổ HSQC của hợp chất EH13	112
Hình 4.66. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất EH13	112
Hình 4.67. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất EH13	113
Hình 4.68. Phổ HMBC của hợp chất EH13	113
Hình 4.69. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất EH13	114

Hình 4.70. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất EH13	114
Hình 4.71. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất EH13	115
Hình 4.72. Phổ COSY của hợp chất EH13	115
Hình 4.73. Phổ NOESY của hợp chất EH13	116
Hình 4.74. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất EH13	116
Hình 4.75. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH14	117
Hình 4.76. Cấu trúc hóa học của hợp chất EH15	117
Hình 4.77. Kết quả hoạt tính ức chế tế bào OCI-AML3 của một số chất từ loài Côm hải nam.....	122
Hình 4.78. Kết quả phân tích chu trình tế bào dòng OCI-AML3 của một số hợp chất từ loài Côm hải nam.....	124
Hình 4.79. Kết quả hoạt tính gây cảm ứng apoptosis dòng OCI-AML3 của một số cucurbitacine từ loài Côm hải nam.....	125
Hình 4.80. Kết quả tác động của EH1 (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) đến biểu hiện gen $\text{TNF-}\alpha$, Bcl-2 , $\text{TGF-}\beta$, ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3	127
Hình 4.81. Kết quả tác động của EH3 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) đến biểu hiện gen $\text{TNF-}\alpha$, Bcl-2 , $\text{TGF-}\beta$, ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3	127

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi <i>Dianella</i>	5
Bảng 1.2. Các quinone được tìm thấy ở chi <i>Dianella</i>	8
Bảng 1.3. Các naphthalene được tìm thấy ở chi <i>Dianella</i>	8
Bảng 1.4. Các hợp chất khác được phân lập từ loài <i>D. ensifolia</i>	11
Bảng 1.5. Thành phần chính trong tinh dầu loài <i>D. ensifolia</i>	12
Bảng 1.6. Các terpenoid được tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	15
Bảng 1.7. Các alkaloid được tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	19
Bảng 1.8. Các flavonoid được tìm thấy ở chi <i>Elaeocarpus</i>	20
Bảng 1.9. Các chất được tìm thấy từ loài <i>E.hainanensis</i>	24
Bảng 4.1. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của chất DN1	50
Bảng 4.2. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất DN2	54
Bảng 4.3. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất DN3 và 7,4'-dimethoxyflavan	57
Bảng 4.4. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất DN4 và 5-hydroxy-7,4'- dimethoxyflavan	59
Bảng 4.5. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của chất DN5 và DN4	66
Bảng 4.6. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của DN6 và chất so sánh	68
Bảng 4.7. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất DN7 và dianellose.....	69
Bảng 4.8. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất DN8 và amentoflavone.....	71
Bảng 4.9. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất DN9 và sitosterone.....	73
Bảng 4.10. Tổng hợp các chất được phân lập và xác định của loài <i>Xuong quạt</i>	74
Bảng 4.11. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất EH1 và cucurbitacin D	76
Bảng 4.12. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất EH2 với cucurbitacin I	77
Bảng 4.13. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của chất EH3 và 3-epi-isocucurbitacin D	79
Bảng 4.14. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất EH4 và cucurbitacin F.....	80
Bảng 4.15. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất EH5 và cucurbitacin H	83
Bảng 4.16. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất EH6 và chất so sánh	85
Bảng 4.17. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất EH7 và chất so sánh	87
Bảng 4.18. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất EH8	94

<i>Bảng 4.19. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất EH9</i>	<i>96</i>
<i>Bảng 4.20. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất EH10 và chất so sánh</i>	<i>102</i>
<i>Bảng 4.21. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất EH11 và EH12.....</i>	<i>105</i>
<i>Bảng 4.22. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất EH13</i>	<i>108</i>
<i>Bảng 4.23. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất EH14 và 5-(hydroxymethyl)-2 furancarboxaldehyde</i>	<i>117</i>
<i>Bảng 4.24. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất EH15 và blumenol A.....</i>	<i>118</i>
<i>Bảng 4.25. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ loài <i>Côm hải nam</i>.....</i>	<i>118</i>
<i>Bảng 4.26. Kết quả thử nghiệm ức chế tế bào ung thư của các chất từ loài <i>Xương quạt</i>.....</i>	<i>120</i>
<i>Bảng 4.27. Kết quả thử nghiệm ức chế tế bào ung thư của các chất từ loài <i>Côm hải nam</i></i>	<i>121</i>

MỞ ĐẦU

Việt nam do đặc điểm khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm, thiên nhiên ưu đãi nên thảm thực vật vô cùng đa dạng về loài. Các hợp chất thứ cấp cũng đa dạng về cấu trúc hóa học, về hoạt tính sinh học cũng như cơ chế tác dụng.

Từ thời cổ đại, thảo dược đã được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh khác nhau. Trong số các loại thuốc chống ung thư thì có đến 50% các hợp chất được phân lập hoặc bán tổng hợp từ thiên nhiên ví dụ như: Taxol, vinca alkaloid, camptothecin, podophyllotoxins, và các dẫn xuất bán tổng hợp của chúng đều là các loại thuốc chống ung thư quan trọng được sử dụng trong điều trị ung thư [1].

Curcumin là phenolic tìm thấy trong củ nghệ (*Curcuma longa*), theo WHO curcumin có thể làm chậm quá trình phát triển của ung thư đại trực tràng, phổi và tuyến tiền liệt. Epigallocatechin-3-gallate trong trà xanh (*Camellia sinensis*) cũng có hoạt tính chống nhiều loại ung thư trên mô hình thực nghiệm [1].

Cho đến nay, việc phát hiện các hợp chất chống ung thư có nguồn gốc thảo dược vẫn đang được quan tâm nghiên cứu. Việc nghiên cứu chiết tách, phân lập và xác định cấu trúc, thử nghiệm hoạt tính sinh học là phương pháp nghiên cứu hiện đại mang tính ứng dụng cao. Kết quả nghiên cứu sẽ giải thích một cách khoa học về tác dụng sinh dược học của nguồn tài nguyên, từ đó sẽ giúp định hướng các nghiên cứu tiếp theo để đẩy nhanh kết quả nghiên cứu vào ứng dụng cho việc sản xuất các dược phẩm, thực phẩm chức năng chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Chi *Dianella* có 30 loài được xác định tính đến hiện tại, nhưng mới chỉ có 9 loài *Dianella* được nghiên cứu về thành phần hóa học, trong đó loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) được tập trung nghiên cứu nhiều nhất. Dịch chiết, tinh dầu và chất sạch của một số loài thuộc chi này thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, kháng vi sinh vật, kháng viêm, kháng vi rút, chống ung thư và ức chế hoạt động của một số enzym [2-10].

Loài Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*) thuộc chi Côm (*Elaeocarpus*), họ Côm (Elaeocarpaceae) đã được công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Theo các tài liệu, đến năm 2022, đã tìm thấy 16 chất đều thuộc nhóm terpenoid, trong đó chủ yếu là các triterpen cucurbitane. Đáng chú ý các hợp chất triterpen

cucurbitan được tập trung nghiên cứu nhiều về tác dụng sinh học do có hoạt tính chống ung thư khá thú vị cả về khả năng ức chế và cơ chế tác dụng [11-13].

Với mục tiêu tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng chống ung thư đa tác dụng và đa cơ chế từ nguồn thực vật Việt Nam, tác giả lựa chọn đề tài luận án “**Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính chống ung thư của hai loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) và Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*)**”.

Mục tiêu của luận án:

1. Xác định được thành phần hóa học của hai loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) và Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*).
2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, chống ung thư của các hợp chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu; Chất có hoạt tính tốt và có tiềm năng được tiếp tục nghiên cứu tác dụng ở mức độ phân tử.

Nội dung chính của luận án gồm:

1. Phân lập các hợp chất từ loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) và Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*) bằng các phương pháp sắc ký;
2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được bằng các phương pháp phổ;
3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư (cytotoxicity) của các chất sạch phân lập được. Chất có hoạt tính tốt được nghiên cứu tác động chống ung thư ở mức độ phân tử. Từ đó tạo cơ sở khoa học và kiến nghị cho việc nghiên cứu ứng dụng các loài lựa chọn được trong phòng và điều trị bệnh ung thư;

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về chi *Dianella*

1.1.1. Đặc điểm thực vật

Dianella là một chi của họ Liliaceae, gồm 30 loài phân bố từ Đông Nam châu Phi đến Đông Nam Á, Hawaii, các đảo nam Thái Bình Dương, Úc và New Zealand [14,15]. Các loài trong chi này là các loại thảo mộc mọc thành chùm với nhiều hoặc ít các lá thẳng và hoa lưỡng tính với ba lá đài nhiều hơn hoặc ít hơn giống với ba cánh hoa và một bầu nhụy cấp trên, quả mọng [16].

Xương quạ (*D. ensifolia*) là loài phổ biến nhất trong chi, được tìm thấy ở nhiều nơi khác nhau, và được các nhà khoa học tập trung vào nghiên cứu nhiều nhất so với các loài còn lại. *D. ensifolia* là loài có thân rễ nằm ngang, thân cao chừng 40-50 cm, có thể tới 1m. Lá mọc so le, ôm lấy thân theo hai bên thân hình nan quạt giấy trông như chiếc quạt. Loài cây này phân bố chủ yếu ở Ấn Độ, Nam Nhật Bản, Trung Quốc, và các nước Đông Nam Á, Australia, Nepal, Châu Phi. Ở Việt Nam, chúng phân bố hầu hết từ Bắc vào Nam, tập trung chủ yếu ở Thái Bình, Thanh Hóa, Nghệ An và Lâm Đồng [17, 18].

Ngoài ra, một số loài phổ biến khác thuộc chi *Dianella* như: *D. caerulea*, *D. amoena*, *D. ensifolia*, *D. revoluta*, *D. tasmanica*, *D. longifolia* cũng đã được nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học.

1.1.2. Công dụng trong y học cổ truyền

Các loài thuộc chi *Dianella* phân bố rộng rãi trên khắp thế giới. Kinh nghiệm dân gian cho rằng các loài thảo dược này có tác dụng rất tốt trong việc điều trị các bệnh ngoài da như nhiễm nấm, nhiễm khuẩn mãn tính. Rễ và lá cây *D. ensifolia* dùng đường uống để chữa các bệnh viêm đường tiêu hóa, tiết niệu và đường hô hấp [6, 9, 18, 19]. Theo phương thuốc chữa bệnh truyền thống của người dân Australia thì nước sắc rễ tươi từ loài *D. longifolia* được dùng để trị cảm lạnh. Quả chín của loài *D. caerulea* được sử dụng để chữa viêm loét [20].

*D. caerulea**D. amoena**D. ensifolia**D. revoluta**D. tasmanica**D. longifolia*

Hình 1.1. Ảnh minh họa một số loài điển hình thuộc chi *Dianella*

1.1.3. Thành phần hóa học

Đã có nhiều công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của dịch chiết cũng như của các chất sạch phân lập được nhằm giải thích tác dụng của các bài thuốc cổ truyền từ các loài của chi *Dianella* dựa trên cơ sở khoa học. Các công bố từ năm 1961 đến nay tập trung vào 9 loài đó là *D. ensifolia*, *D. caerulea*, *D. tasmanica*, *D. nigra*, *D. revoluta*, *D. callicarpa*, *D. longifolia*, *D. amoena*, *D. sandwicensis*. Theo khảo sát tài liệu, đã có trên 40 hợp chất được phân lập từ chi *Dianella*, bao gồm các lớp chất flavonoid, quinone, naphthalen, triterpenoid, steroid, và một số hợp chất khác. Trong đó các chất quinone, flavonoid naphthalen, và triterpenoid là những nhóm chất chính của chi này.

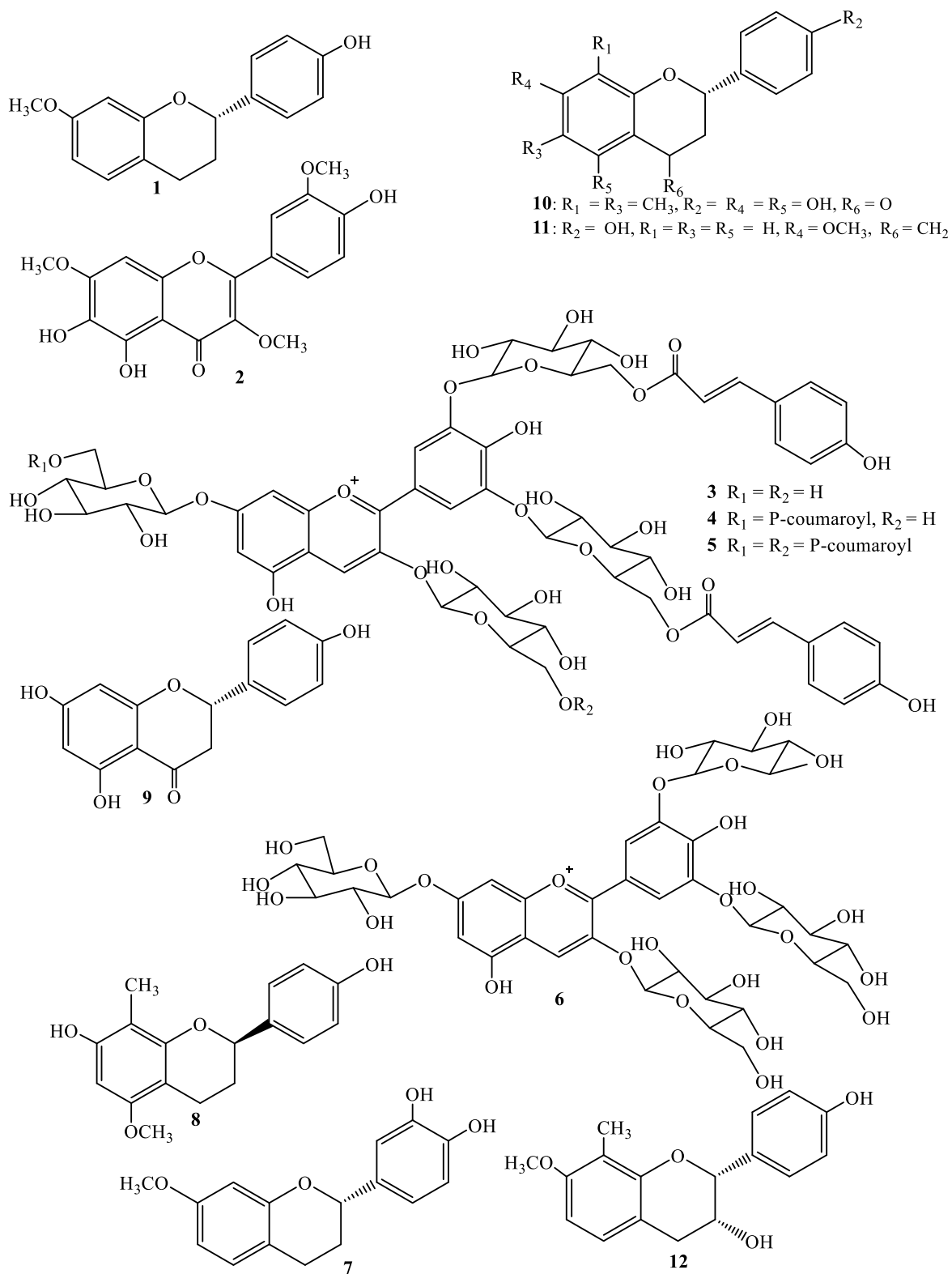
❖ Nhóm chất flavonoid

Các flavonoid là nhóm chất chính của các loài *D. ensifolia*, *D. nigra*, *D. tasmanica*, *D. revoluta* và *D. longifolia*, với 14 flavonoid, bao gồm 1 flavone, 4 anthocyanin, 6 flavan, và 2 flavanone, trên tổng số 42 chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ chi này. Trong đó, có ba hợp chất được phát hiện đầu tiên là: farrerol (**10**),

(2*S*)-2',4'-dihydroxy-7-methoxy-8-methylflavan (**13**), và (2*S*)-2'-hydroxy-4',7-dimethoxy-8-methylflavan (**14**).

Bảng 1.1. Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi *Dianella*

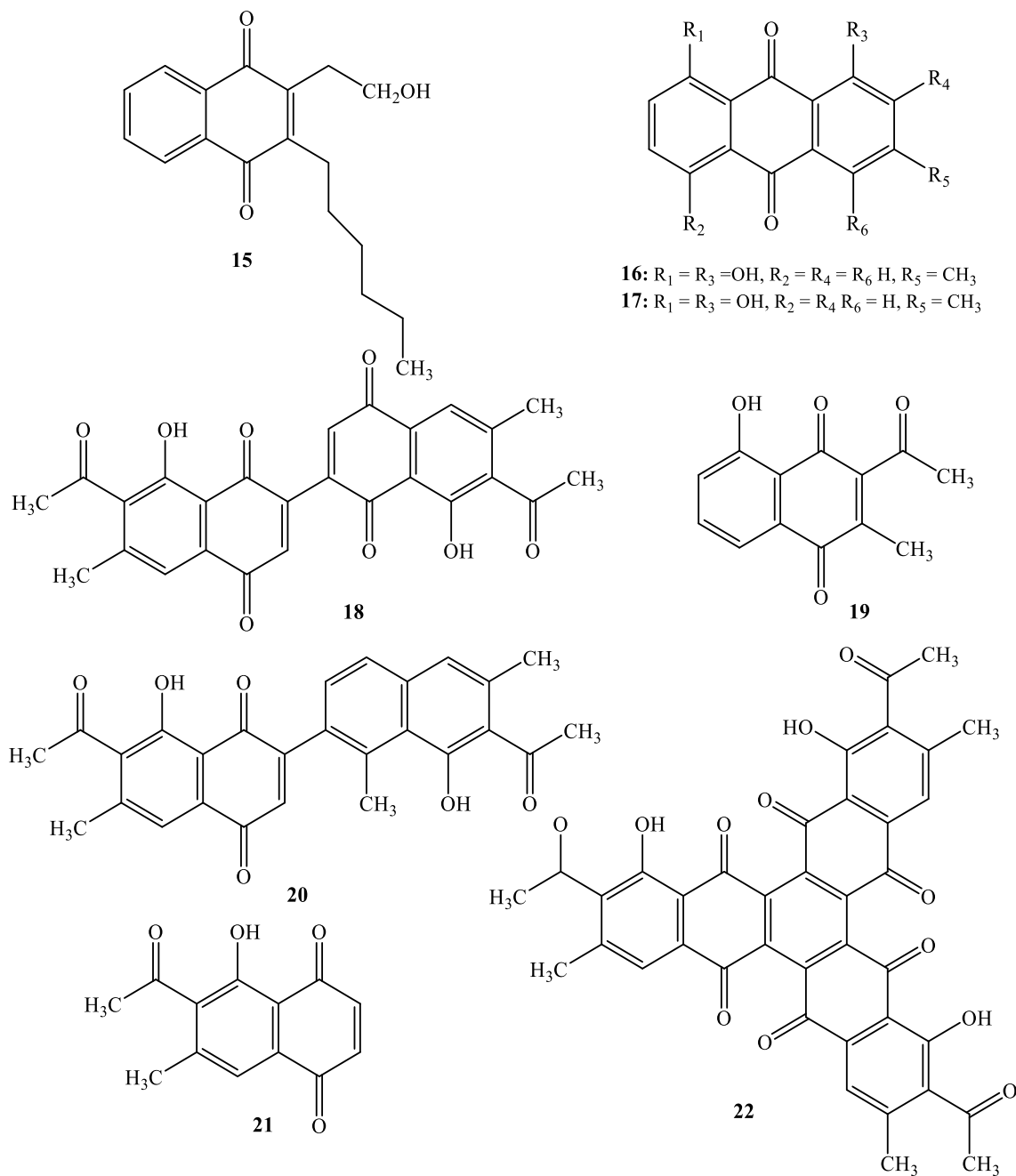
STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
1	(-)-4'-Hydroxy-7-methoxyflavan	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	[21]
2	Chrysofenol C	Phần trên mặt đất loài <i>D. longifolia</i>	[22, 23]
3	Delphinidin 3,7-diglucoside-3',5'-di(6- <i>O-p</i> -coumaroyl- β -glucoside)	Quả chín của loài <i>D. nigra</i> và <i>D. tasmanica</i>	[24]
4	Delphinidin 3-glucoside-7,3',5'-tri(6- <i>O-p</i> -coumaroyl- β -glucoside)	Quả chín của loài <i>D. nigra</i> và <i>D. tasmanica</i>	
5	Delphinidin 3,7,3',5'-tetra (6- <i>O-p</i> -coumaroyl- β -glucoside)	Quả chín của loài <i>D. nigra</i> và <i>D. tasmanica</i>	
6	Delphinidin 3,7,3',5'-tetraglucoside	Quả chín của loài <i>D. nigra</i> và <i>D. tasmanica</i>	
7	(2 <i>S</i>)-3',4'-Dihydroxy-7-methoxyflavan	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	[21]
8	(2 <i>R</i>)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-methylflavan	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	
9	Naringenin	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	
10	Farrerol	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	
11	(-)-4'-Hydroxy-7-methoxy-8-methylflavan	Rễ của loài <i>D. revoluta</i> và rễ loài <i>D. ensifolia</i>	[21, 22]
12	Tupichinol A	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	[21]
13	(2 <i>S</i>)-2',4'-Dihydroxy-7-methoxy-8-methylflavan	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	[25]
14	(2 <i>S</i>)-2'-Hydroxy-4',7-dimethoxy-8-methylflavan	Rễ loài <i>D. ensifolia</i>	



Hình 1.2. Cấu trúc một số flavonoid được tìm thấy ở chi *Dianella*

❖ *Quinone*

Quinone là nhóm chất chính thứ 2 của chi *Dianella*, có 8 quinone được xác định trong 5 loài đó là *D. ensifolia*, *D. longifolia*, *D. revoluta*, *D. caerulea*, *D. laevis*. Có 3 chất là đầu tiên phát hiện là armandinol (**15**), dianellinone (**18**), và imbricatol (**20**) [26 – 28]. Các hợp chất quinone trong chi này thuộc ba nhóm gồm naphthaquinone (**15-17**, **19-21**), dinaphthaquinone (**18**), và triquinone (**22**).



Hình 1.3. Cấu trúc một số quinone được tìm thấy ở chi *Dianella*

Bảng 1.2. Các quinone được tìm thấy ở chi *Dianella*

STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
15	Armandinol (hoặc 2 - hexyl -3 - (2-hydroxyethyl) -2, 3-dihydronaphthoquinone 1-4	Lá của loài <i>D. ensifolia</i>	[26]
16	Chrysophanic acid (hoặc 1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone)	Phần trên mặt đất loài <i>D. longifolia</i>	[22, 23, 29]
17	Chrysophanol	Lá của loài <i>D. ensifolia</i>	[26]
18	Dianellinone	Rễ của loài <i>D. revoluta</i>	[27, 28, 30]
19	5-Hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinon	Rễ của loài <i>D. caerulea</i> và <i>D. laevis</i>	[31]
20	Imbricatanol (hoặc stypanol)	Rễ của loài <i>D. revoluta</i>	[28, 30]
21	Stypanolone (hoặc 6-Acetyl-5-hydroxy-7-methylnaphtho-1,4-quinone)	Rễ của loài <i>D. revoluta</i>	[27, 28, 30, 32]
22	Trianellinone	Rễ của loài <i>D. revoluta</i>	[33]

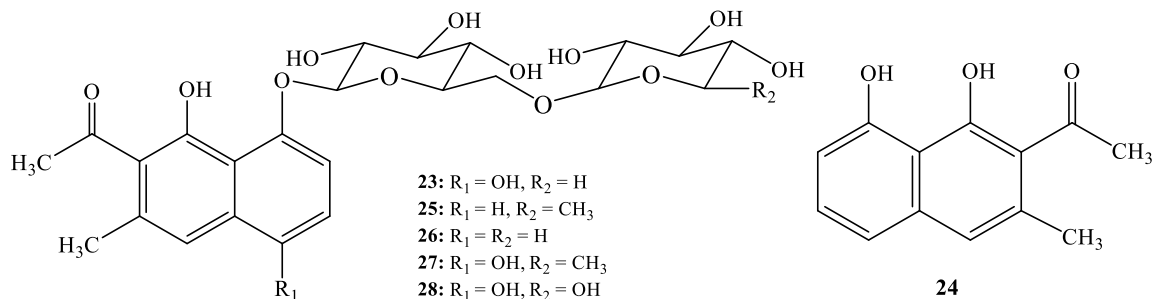
❖ *Naphthalen*

Naphthalen là nhóm chất đặc trưng của chi như chất mới dianellidin (**24**) và glycoside của nó là dianellin (**23**). Các naphthalen cũng được tìm thấy trong 4 loài khác nhau của chi này, ví dụ ba naphthalen glycoside (**25**, **26**, và **28**) chỉ khác nhau ở phân đường [28, 30, 31, 34, 35].

Bảng 1.3. Các naphthalene được tìm thấy ở chi *Dianella*

STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
23	2-Acetyl-1,5-dihydroxy-3-methyl-8-O(xylosyl(1→6)glucosyl)naphthalene	Quả chín của loài <i>D. nigra</i> và <i>D. tasmanica</i>	[24]
24	Dianellidin (syn. Musizin, or 1,8-dihydroxy-3-methyl-2-acetonaphthone)	Rễ của loài <i>D. ensifolia</i> , <i>D. laevis</i> , <i>D. revoluta</i> và <i>D. callicarpa</i>	[28, 30, 31, 35]
25	Dianellin	Rễ của loài <i>D. ensifolia</i> , <i>D. caerulea</i> , <i>D. laevis</i> và <i>D. callicarpa</i>	[31, 34, 35]

26	Dianellose	Rễ của loài <i>D. callicarpa</i>	[35]
27	5-Hydroxydianellin	Rễ của loài <i>D. callicarpa</i>	
28	Stellalderol	Rễ của loài <i>D. callicarpa</i>	



Hình 1.4. Cấu trúc một số naphthalene được tìm thấy ở chi *Dianella*

1.1.4. Hoạt tính sinh học

Cặn chiết và chất sạch của một số loài thuộc chi này có tác dụng chống oxy hóa, ức chế vi sinh vật, chống viêm, chống vi rút, chống ung thư và ức chế hoạt động của một số enzym [3-10, 26].

Dịch chiết thô của loài *D. Callicarpa* có khả năng ức chế các tế bào ung thư kém, tuy nhiên ba chất tách ra từ loài này là dianellin (**25**), stelladerol (**28**), naphthalene glycoside dialellose (**26**) có hoạt tính kháng tế bào ung thư ở mức trung bình [35].

Dưới đây luận án sẽ tổng quan chi tiết về loài *Dianella ensifolia*, là loài được lựa chọn để nghiên cứu.

1.1.5. Tổng quan về loài *Dianella ensifolia*

1.1.5.1. Đặc điểm thực vật

Loài *Dianella ensifolia* (L.) DC. (tên đồng nghĩa *Dianella nemorosa* Lam. Ex. Schiler f.), tên Việt Nam là Xương quạt, Hương lâu hay Huệ rừng, Bả chuột, họ Hành (Liliaceae) [17, 26]. Cây thân thảo sống lâu năm cao tới 1-2m, và có thân rễ nằm ngang. Lá hẹp hình thái dài tới 0,70 m, rộng 3cm, không có cuống, cái mọc từ rễ, cái mọc trên thân xếp hai dãy, các lá trên có dạng lá bắc và có kích thước nhỏ hơn. Cụm hoa chùy gồm nhiều xim ngắn, mang nhiều hoa mọc gần nhau; cuống hoa có thể dài tới 1cm, hoa màu trắng, vàng hay tím tím, bao hoa có 6 mảnh, nhị 6, bầu 3 ô. Quả nang màu lam hay màu tím sẫm, hình cầu nhẵn, to cỡ 1cm, mỗi ô quả chín chứa 1-3 hạt tròn. Ra hoa vào mùa hè. Nơi sống ở vùng nhiệt đới châu Á và châu Úc. Có phân bố ở Ấn Độ, Trung Quốc, Việt Nam. Ở nước ta, *D. ensifolia* là loài duy nhất trong

chi *Dianella* [36]. cây thường mọc hoang trong rừng, đất trồng, các savan cỏ từ bình nguyên đến cao nguyên [26, 37].

1.1.5.2. Ứng dụng trong y học cổ truyền.

Ở Malaixia, dùng cây nấu nước xông, tro rễ và tro lá chế thuốc bột dẻo chữa mụn rộp mọc vòng. Trung Quốc dùng rễ cây chữa mụn sưng lở, ghẻ ngứa, đau họng, phong thấp tê đau [37]. Cây được dùng trong điều trị nhiễm khuẩn da mãn tính, viêm bạch huyết, nấm da và áp xe vết loét ở đốt sống [18]. Ở Việt Nam cây này mới chỉ được trộn cùng một số vị khác như quế, hồi làm hương còn về sử dụng trong các bài thuốc dân tộc thì chưa được đề cập đến [17].

1.1.5.3. Thành phần hóa học

Xương quạt (*D. ensifolia*) là loài phổ biến nhất trong chi, được tìm thấy ở nhiều nơi khác nhau, được tập trung nghiên cứu về thành phần hóa học nhiều nhất so với các loài còn lại. Theo tài liệu đã công bố, các nhóm chất quinone, flavonoid, naphthalen, triterpenoid là những thành phần chính của loài này.

❖ Các hợp chất flavonoid

Từ rễ loài *D. ensifolia*, hai flavan mới (2*S*)-2',4'-dihydroxy-7-methoxy-8-methylflavan (**13**), (2*S*)-2'-hydroxy-4',7-dimethoxy-8-methylflavan (**14**), một số flavan đã biết (-)-4'-hydroxy-7-methoxyflavan (**1**), (-)-4'-hydroxy-7-methoxy-8-methylflavan (**11**), (2*S*)-3',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (**7**), (2*R*)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-methylflavan (**8**), tupichinol A (**12**) [21, 25] và hai flavanone khác là naringenin (**9**), farrerol (**10**) được tinh sạch và chứng minh cấu trúc [21].

❖ Các hợp chất quinone

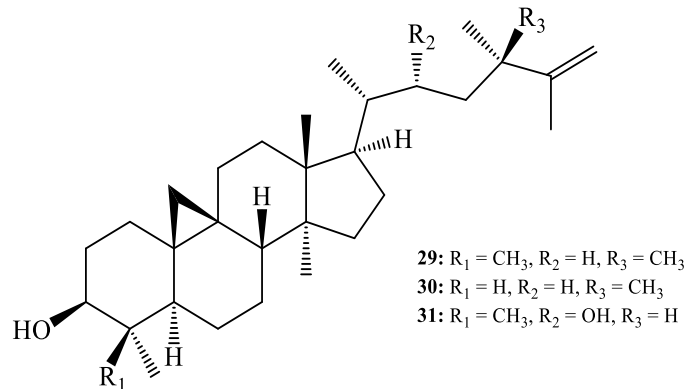
Các hợp chất quinone với tác dụng dược lý vô cùng phong phú. Từ lá và rễ của loài *D. ensifolia* chứa các hợp chất quinone. Mới chỉ có hai quinone được phân lập từ loài này là armandinol (hoặc 2 - hexyl -3 - (2-hydroxyethyl) -2, 3-dihydronaphtoquinone 1-4 (**15**) và chrysophanol (**17**).

❖ Các hợp chất naphthalene

Naphthalene là nhóm chất điển hình của chi này, trong số 6 naphthalene tách được từ chi này thì riêng loài *D. ensifolia* đã phát hiện được hai chất là dianellidin (**24**) và dianellin (**25**).

❖ Các hợp chất triterpenoid

Tất cả các bộ phận của loài *D. ensifolia* đã xác định được ba triterpene cùng khung cycloartane gồm cycloneolitsol (**29**), cyclopholidonol (**30**), và chất mới 22-hydroxy-cyclolaudenol (**31**).



Hình 1.5. Cấu trúc các hợp chất triterpenoid được phân lập từ loài *D. ensifolia*

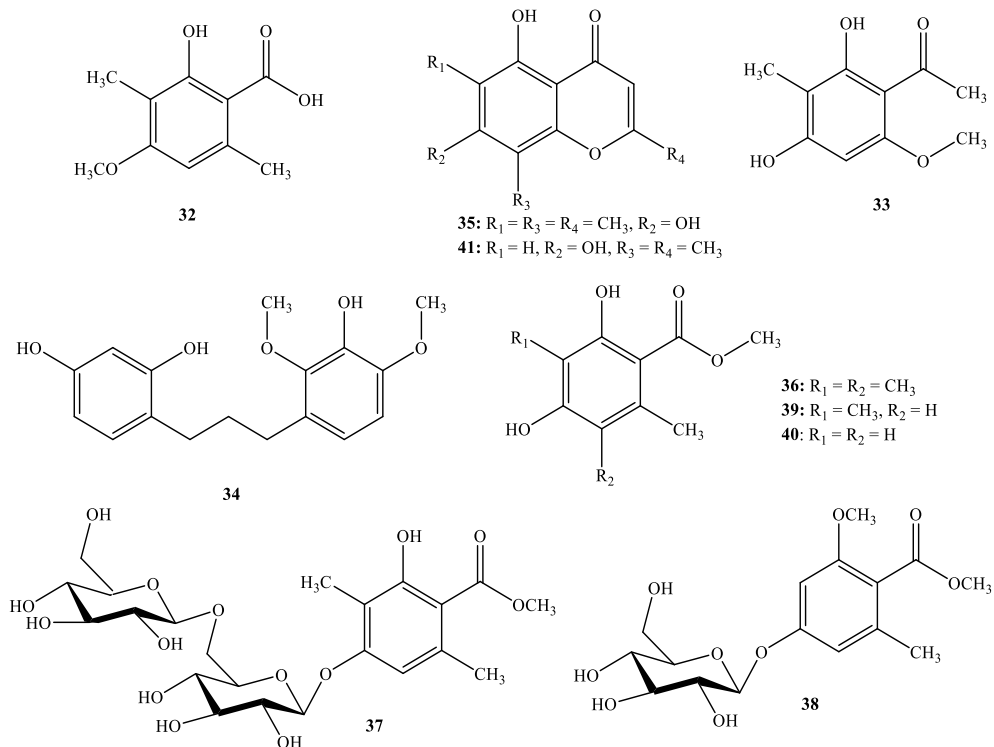
❖ Các hợp chất khác

Ngoài các nhóm chất trên, trong thành phần hóa học loài *D. ensifolia* còn có năm mono-phenol: Rhizinoic acid (**32**) [27], 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone (**33**), methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate (**36**), methyl β -orcinolcarboxylate (**39**), và methyl orsellinate (**40**) [34]; hai mono-phenol glycoside mới: methyl 2-hydroxy-3,6-dimethyl benzoate-4-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**37**), và methyl 2-methoxyl-6-methylbenzoate-4-O- β -D-glucopyranoside (**38**) [10] một diarylpropane mới 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane (được biết đến với tên DP hoặc UP302) (**34**) [9]; và hai chromone: 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone (**35**), và isoeugenitol (**41**) [34].

Bảng 1.4. Các hợp chất khác được phân lập từ loài *D. ensifolia*

TT chất	Tên chất	Bộ phận/cặn chiết	TLTK
32	Rhizinoic acid	Rễ/ chloroform	[21]
33	2,4-Dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone	Rễ/ chloroform	
34	1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane	Quả	[9]
35	5,7-Dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone	Rễ/chloroform	
36	Methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate	Rễ/ chloroform	[34]

37	Methyl 2-hydroxy-3,6-dimethyl benzoate-4-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside	Toàn thân/nước	[10]
38	Methyl 2-methoxyl-6-methylbenzoate-4-O- β -D-glucopyranoside	Toàn thân/nước	
39	Methyl β -orcinoic acid (hoặc Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate)	Rẽ/ chloroform	[34]
40	Methyl orsellinate	Rẽ/ chloroform	
41	Isoeugenitol	Rẽ/ chloroform	



Hình 1.6. Cấu trúc các hợp chất khác được phân lập từ loài *D. ensifolia*

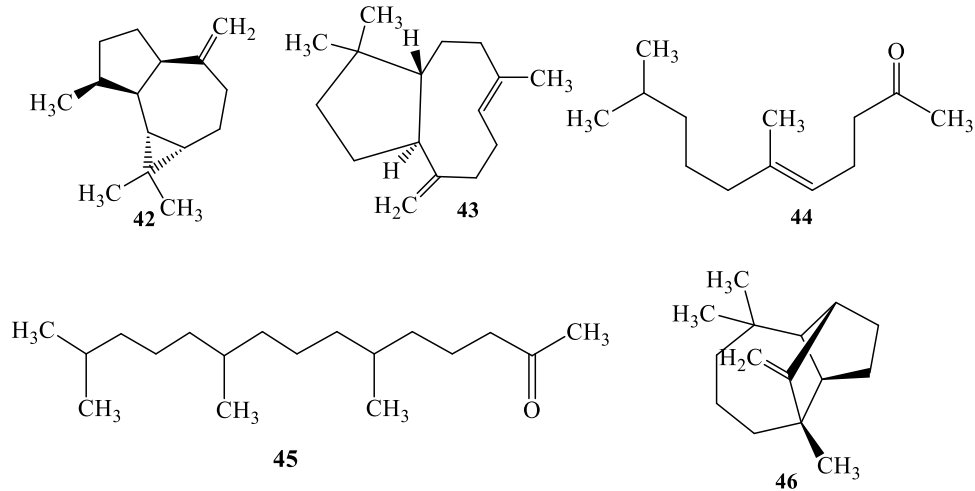
❖ Tinh dầu

Tinh dầu của phần trên mặt đất loài *D. ensifolia* được tách chiết bằng phương pháp chưng cất hơi nước. Thành phần các chất của nó được xác định bằng phương pháp GC-FID và GC-MS. Các thành phần chính được xác định trong tinh dầu gồm *allo*-aromadendrene (7,3%) (**42**), geranylacetone (6,2%) (**44**), perhydrofarnesyl acetone (4,4%) (**45**), longifolene (4,2%) (**46**) và β -caryophyllene (4,0%) (**43**) trong tổng số có 63 hợp chất được phát hiện (chiếm 97,2% tinh dầu) [6].

Bảng 1.5. Thành phần chính trong tinh dầu loài *D. ensifolia*

STT (chất)	Tên chất	Tỷ lệ (%)	Tài liệu
42	<i>allo</i> -aromadendrene	7,3%	[6]
43	β -Caryophyllene	4,0%	

44	Geranylacetone	6,2%	
45	Perhydrofarnesyl acetone	4,4%	
46	Longifolene	4,2%	



Hình 1.7. Cấu trúc của các chất trong tinh dầu của loài *D. ensifolia*

1.1.5.4. Hoạt tính sinh học

Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của loài *D. ensifolia* từ những năm 2000 trở lại đây đã làm sáng tỏ công dụng của loài này trong y học cổ truyền. Hoạt tính sinh học của loài *D. ensifolia* gồm: chống oxy hóa, kháng vi sinh vật, kháng viêm, ức chế enzym, gây độc tế bào ung thư [2-10].

Theo Tang và cộng sự năm 2016, chất mới 22-hydroxy-cyclolaudenol (**31**) phân lập từ loài *D. ensifolia* có khả năng kháng các dòng tế bào ung thư hắc sắc tố da B16-F10, ung thư phổi A549, ung thư vú MDA-MB-231 với giá trị IC_{50} tương ứng là 3,92; 10,39; 25,08 μ M [38].

Dịch chiết methanol của lá loài *D. ensifolia* (*D. nemorosa*) có tác dụng gây độc tế bào ung thư Hela với giá trị IC_{50} sau 48 giờ là 506,43 μ g/mL [39]. Tinh dầu của loài cũng được nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào dòng ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF7 và có tác dụng trung bình với giá trị IC_{50} ở khoảng 56,53 - 61,35 μ g/mL [6].

1.2. Tổng quan về chi Côm (*Elaeocarpus*)

1.2.1. Đặc điểm thực vật

Chi Côm (*Elaeocarpus*), là chi lớn nhất thuộc họ Elaeocarpaceae, bao gồm xấp xỉ 360 loài sinh trưởng ở vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới là chủ yếu [40]. Theo

Phạm Hoàng Hộ, chi Côm có 38 loài được tìm thấy ở Việt Nam [41]. Các loài thuộc chi Côm đa phần có kích thước lớn và trung bình, cây thường xanh có lá đơn, thường mọc so le, đôi khi mọc đối hay mọc vòng, thường cụm lại ở đầu cành, thường mép lá có khía nhưng đôi khi tiêu giảm thành vảy. Hoa mọc ở nách lá, đơn độc hay thành cụm, đối xứng tỏa tia. Hoa thường lưỡng tính, mẫu 4 hoặc 5, gồm 4-5 lá đài và 4-5 cánh hoa, quả nang, quả hạch hay quả mọng [42].



Côm hải nam (*E. hainanensis*)



Côm xanh (*E. sylvestris*)



Côm nhiều hoa (*E. floribundus*)



Côm tàng (*E. griffithii*)

Hình 1.8. Một số loài điển hình thuộc chi Côm phân bố tại Việt Nam

1.2.2. Ứng dụng trong y học cổ truyền

Trong y học cổ truyền, các loài thuộc chi Côm được biết đến như dược liệu với nhiều công dụng như trị loét, viêm phổi và bệnh phong, tăng huyết áp, trầm cảm, động kinh và các bệnh về gan, cải thiện lưu thông máu [43-48]. Ở Việt Nam, loài *E. floribundus* được sử dụng điều trị một số bệnh như kiết lỵ, tiểu đường, viêm nướu, sát trùng và điều trị nhiễm trùng [49].

1.2.3. Thành phần hóa học

Việc nghiên cứu hóa học về chi *Elaeocarpus* được thực hiện từ những năm 60 (1969), cho đến năm 2022 đã có hơn 90 hợp chất, bao gồm terpenoid, flavonoid, alkaloid, phenol các hợp chất khác được tìm thấy từ 16 loài của chi này.

❖ Terpenoid

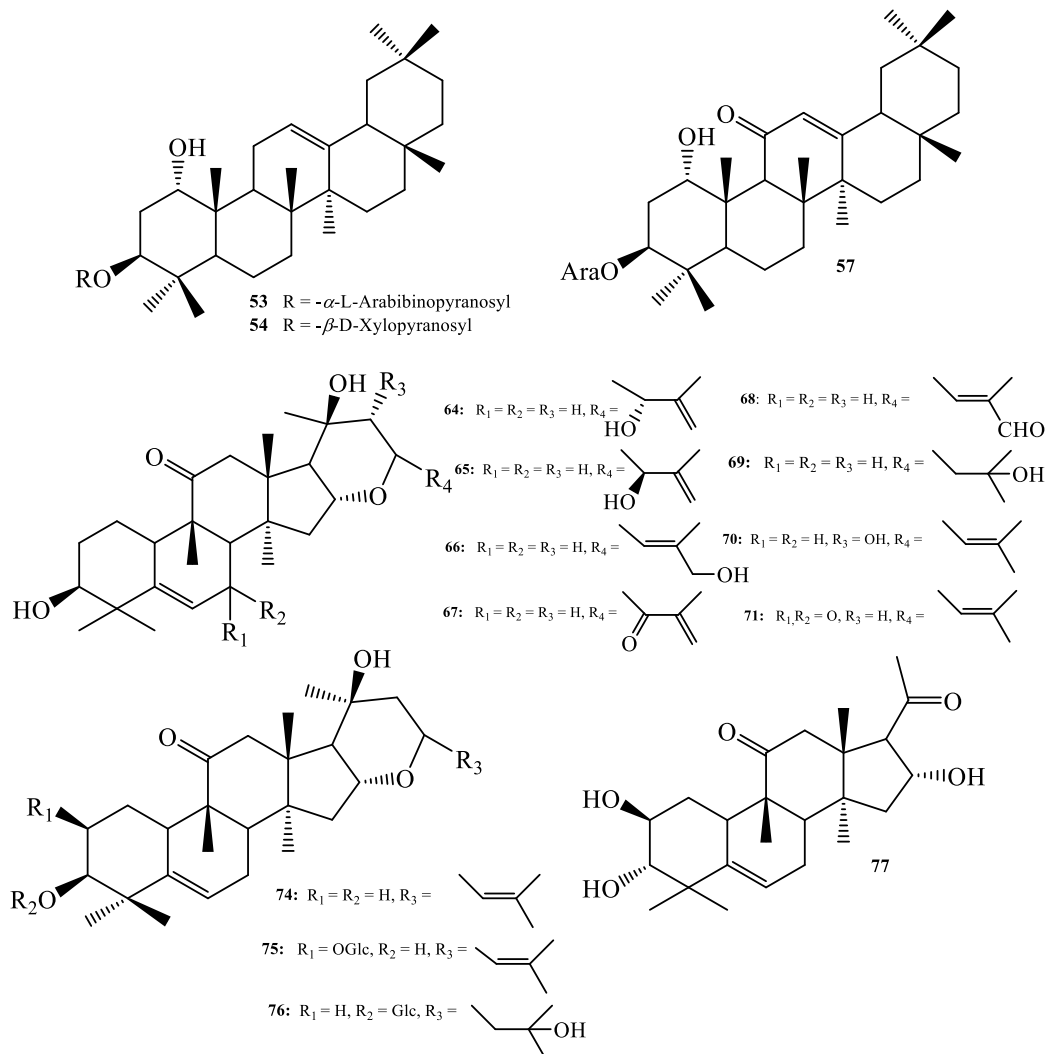
Terpenoid được đánh giá là nhóm chất chính trong chi và cho nhiều hoạt tính quan trọng. Hiện tại, đã có 39 hợp chất terpenoid (**47-84**) được tìm thấy từ chi *Elaeocarpus*. Các hợp chất này thuộc các phân nhóm như sesquiterpenoid (**47**), diterpenoid (**48-50**), triterpenoid (**51-83**) và steroid (**84**). Trong đó, triterpenoid là phân nhóm chính với các khung điển hình như oleanane, cucurbitane và lanostane. Theo đó, 15 triterpenoid mới tìm thấy từ chi *Elaeocarpus* gồm 3 triterpenoid glycoside khung oleanane: (**53**), (**54**), (**55**) [12, 13]; và 12 triterpenoid khung cucurbitane: (**64-71**), (**74**), (**75**), (**76**), (**77**); 4 chất petiolaticins A-D (**79-82**) [11, 50 - 52].

Bảng 1.6. Các terpenoid được tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
<i>Sesquiterpenoid</i>			
47	α -Tocopherolquinone	Lá <i>E. floribundus</i>	[53]
<i>Diterpenoid</i>			
48	Phytol	Lá <i>E. floribundus</i>	[53]
49	Rel-(2 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i>)-3,4,4 <i>a</i> ,8 <i>a</i> -Tetrahydro-4 <i>a</i> -hydroxy-2,6,7,8 <i>a</i> -tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-chromene-5,8-dione	Lá <i>E. floribundus</i>	
50	Tanacetene	Lá <i>E. floribundus</i>	
<i>Triterpenoid khung oleanane</i>			
51	Epifriedelanol	Lá và thân cành <i>E. floribundus</i>	[54]
52	Friedelin	Lá và thân cành <i>E. floribundus</i>	
53	1 <i>a</i> -Hydroxy-olean-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside	Cành <i>E. hainanensis</i>	[13]
54	1 <i>a</i> -Hydroxy-olean-12-en-3- β -D-xylopyranoside	Cành <i>E. hainanensis</i>	
55	1 <i>a</i> -Hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- β -L-arabinopyranoside	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[12]
<i>Triterpenoid khung cucurbitane</i>			
56	25-O-acetylcucurbitacin F	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	[51]
57	Cucurbitacin D	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i> , phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i> , cành <i>E. hainanensis</i>	[11, 13, 51]

58	Cucurbitacin F	Thân cành <i>E. dolichostylus</i> , phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i> , cành <i>E. hainanensis</i>	[11, 13, 50]
59	Cucurbitacin G	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[11]
60	Cucurbitacin H	Cành <i>E. hainanensis</i>	[13]
61	Cucurbitacin I	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i> , phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i> , cành <i>E. hainanensis</i>	[11, 13, 51]
62	Cucurbitacin O	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[11]
63	23,24-Dihydrocucurbitacin	Thân cành <i>E. dolichostylus</i>	[50]
64	Elaeocarpucin A	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	[51]
65	Elaeocarpucin B	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
66	Elaeocarpucin C	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
67	Elaeocarpucin D	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
68	Elaeocarpucin E	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
69	Elaeocarpucin F	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i> , lá <i>E. petiolatus</i>	[51, 52]
70	Elaeocarpucin G	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	[51]
71	Elaeocarpucin H	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
72	3- <i>epi</i> -Isocucurbitacin D	Quả và thân cành <i>E. chinensis</i>	
73	3- <i>epi</i> -Isocucurbitacin G	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[11]
74	16 α ,23 α -Epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one	Quả và phần trên mặt đất <i>E. chinensis</i> , phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i> , lá <i>E. petiolatus</i>	[11, 51, 52,]
75	16 α ,23 α -Epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one 2- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[11]

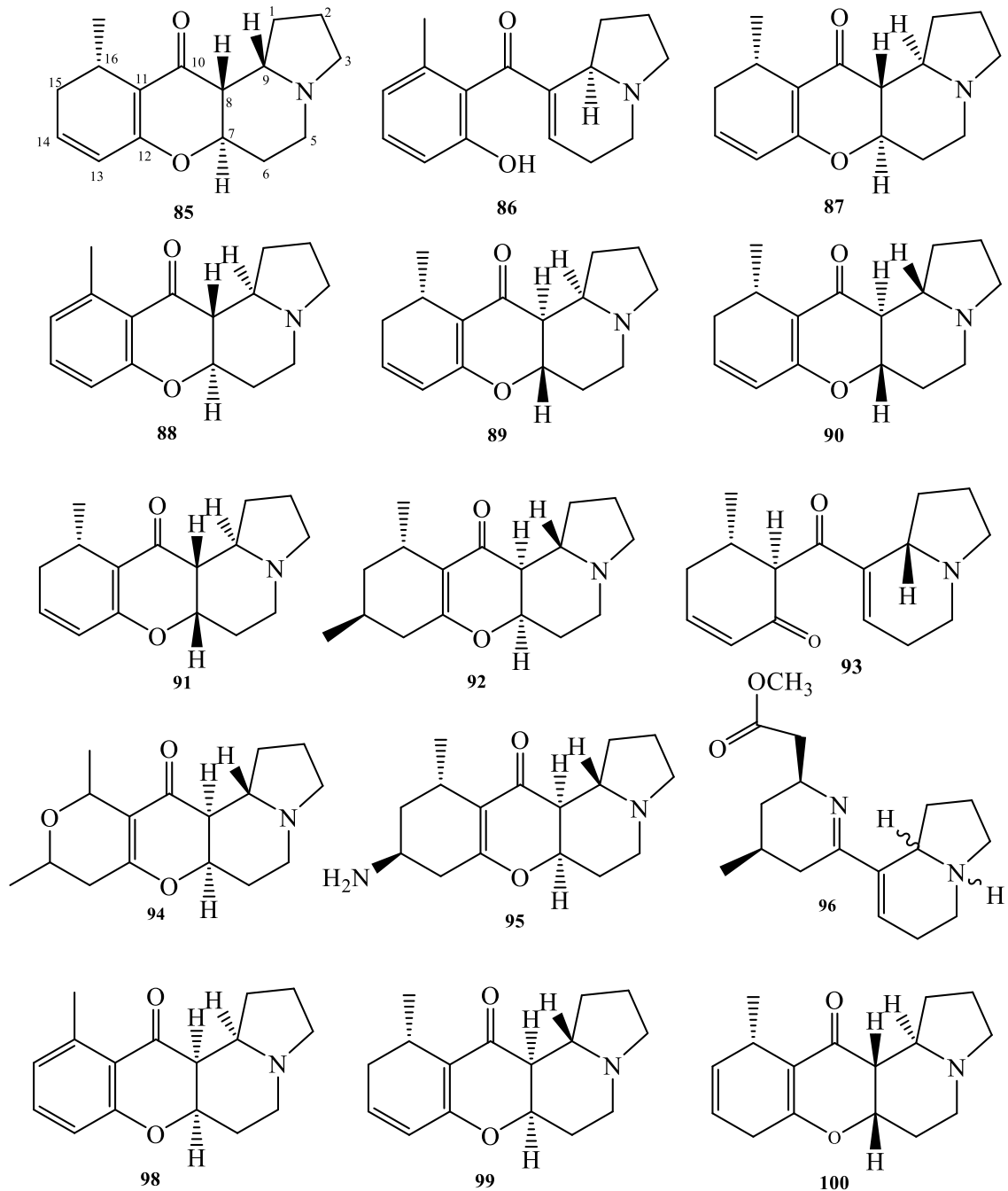
76	16 α ,23 α -Epoxy-20 β ,25-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5-ene-11-one 3-O- β -D-glucopyranoside	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i> , lá <i>E. petiolatus</i>	[11, 52]
77	Hexanorcucurbitacin F	Thân cành <i>E. dolichostylus</i> , lá <i>E. petiolatus</i>	[50, 52]
78	19-Norlanosta-5,24-dien-11-one	Phần trên mặt đất <i>E. hainanensis</i>	[11]
79	Petiolicins A	Lá <i>E. petiolatus</i>	[52]
80	Petiolicins B	Lá <i>E. petiolatus</i>	
81	Petiolicins C	Lá <i>E. petiolatus</i>	
82	Petiolicins D	Lá <i>E. petiolatus</i>	
<i>Triterpenoid khung lanostane</i>			
83	Euphorbol	Lá <i>E. floribundus</i>	[53]
<i>Steroid</i>			
84	β -Sitosterol	Lá và quả <i>E. floribundus</i> , lá và thân cành <i>E. floribundus</i>	[53 – 55]



Hình 1.9. Cấu trúc một số terpenoid tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

❖ *Alkaloid*

Nhóm chất alkaloid chỉ được tìm thấy trong 5 loài của chi gồm *E. sphaericus*, *E. fuscooides*, *E. ganitrus*, *E. grandis*, và *E. densiflorus*. 18 alkaloid (**85-102**), được tìm thấy trong chi *Elaeocarpus*, trong đó có 15 chất mới. Ngoại trừ hợp chất elaeocarpidine (**101**) thuộc phân nhóm indol alkaloid, và eustifoline B (**102**) thuộc phân nhóm carbazole alkaloid, còn lại 16 hợp chất thuộc phân nhóm indolizidine alkaloid. Đáng chú ý là alkaloid chỉ được tìm thấy trong lá của các loài *Elaeocarpus* [56 – 58].



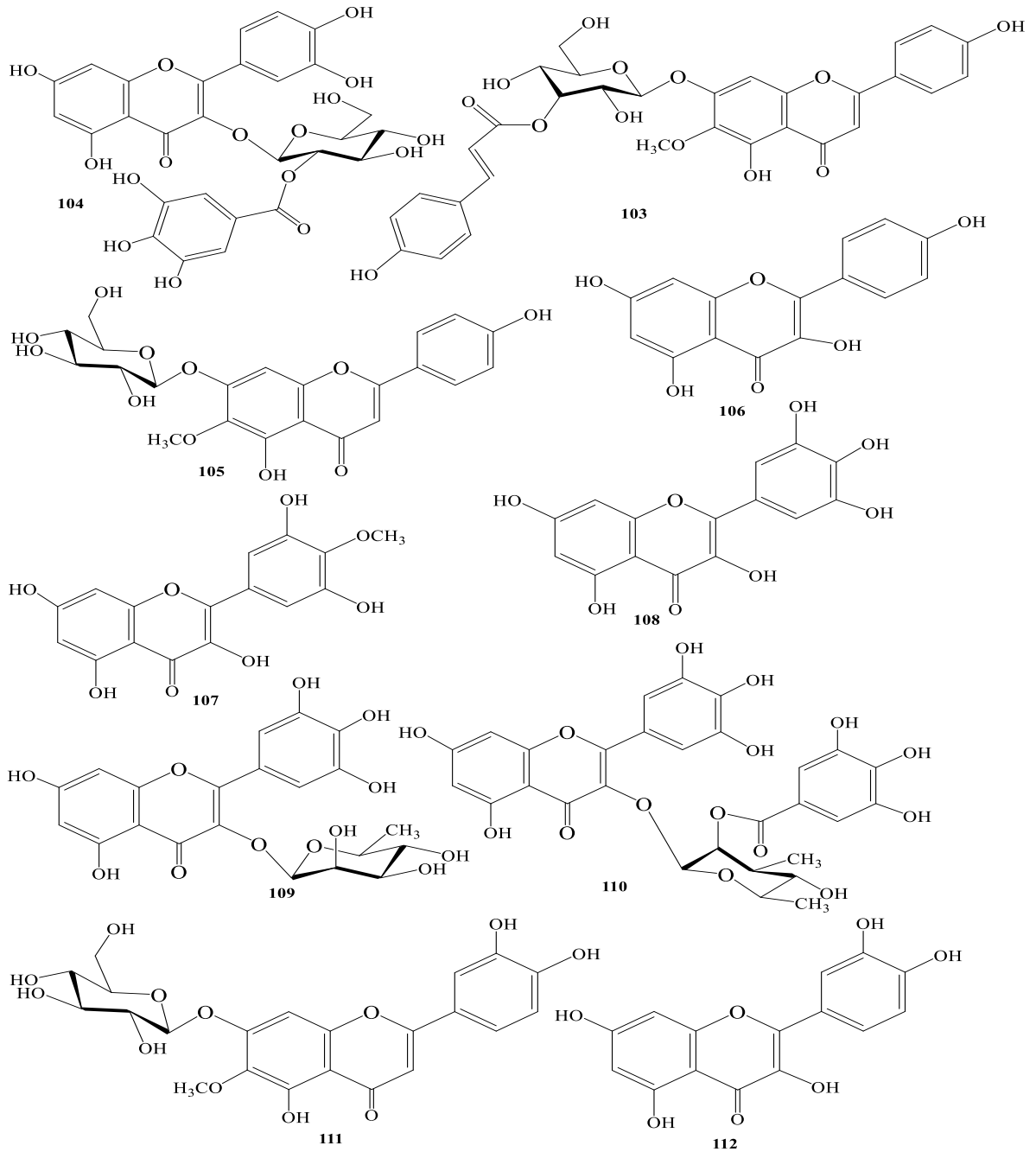
Hình 1.10. Cấu trúc một số alkaloid tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

Bảng 1.7. Các alkaloid được tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
<i>Indolizidine alkaloid</i>			
85	(-)-Alloelneocarpiline	Lá <i>E. sphaericus</i>	[57]
86	Elaeocarpenine	Lá <i>E. fuscoides</i>	[58]
87	(+)-Elaeocarpiline	Lá <i>E. sphaericus</i>	[57]
88	(±)-Elaeocarpine	Lá <i>E. fuscoide</i> , lá <i>E. ganitrus</i>	[56, 58]
89	(+)-Epialloelaeocarpiline	Lá <i>E. sphaericus</i>	[57]
90	(-)-Epielaeocarpililze	Lá <i>E. sphaericus</i>	
91	(-)-Epiisoelaeocarpiline	Lá <i>E. sphaericus</i>	
92	Grandisine C	Lá <i>E. grandis</i>	[59]
93	Grandisine D	Lá <i>E. grandis</i>	
94	Grandisine E	Lá <i>E. grandis</i>	
95	Grandisine F	Lá <i>E. grandis</i>	
96	Grandisine G	Lá <i>E. grandis</i>	
97	Isoelaeocarpicine	Lá <i>E. fuscoides</i>	[58]
98	(±)-Isoelaeocarpine	Lá <i>E. fuscoides</i> , lá <i>E. ganitrus</i>	[56, 58,]
99	(-)-Isoelaeocarpiline	Lá <i>E. grandis</i> , lá <i>E. sphaericus</i>	[57, 59]
100	(+)-Pseudoepiisoelaeocarpilin	Lá <i>E. sphaericus</i>	[57]
<i>Indol alkaloid</i>			
101	Elaeocarpidine	Lá <i>E. densiflorus</i>	[57]
<i>Carbazole alkaloid</i>			
102	Eustifoline B	Lá <i>E. floribundus</i>	[60]

❖ *Flavonoid*

Từ chi *Elaeocarpus* có 10 flavone và dẫn xuất gắn với đường glucose và rhamnose (**103-112**) được xác định [56, 61]. Trong đó, flavone mearnsetin (**107**), myricetin (**108**), myricitrin (**109**) và quercetin (**112**) là những flavone phổ biến trong chi và được phát hiện ở nhiều loài khác nhau như *E. oblong*, *E. floribundus*, *E. serratus* và *E. tuberculatus* [56].



Hình 1.11. Cấu trúc các flavonoid được tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

Bảng 1.8. Các flavonoid được tìm thấy ở chi *Elaeocarpus*

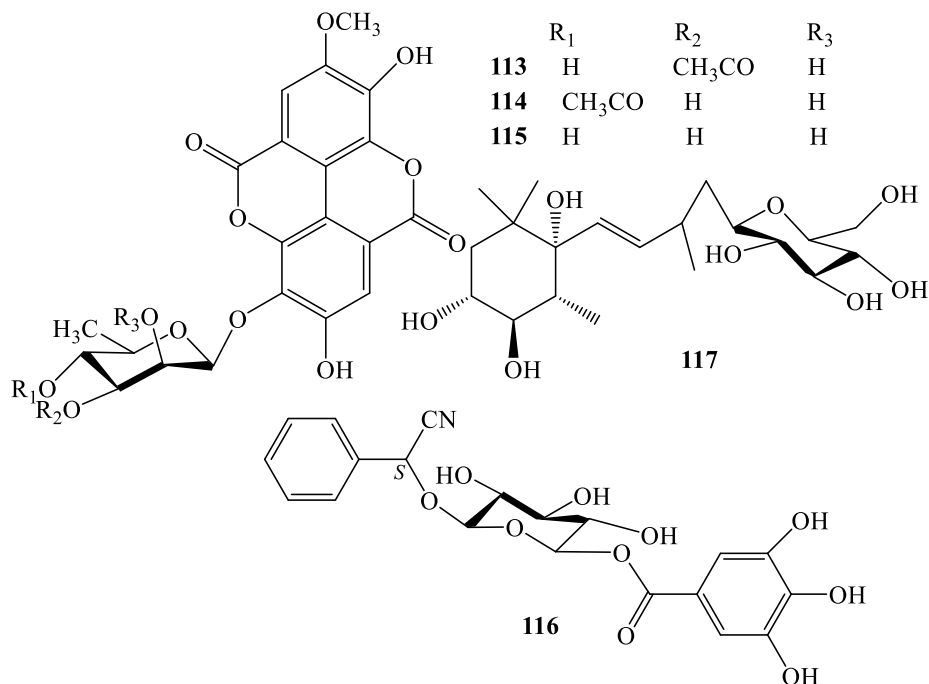
STT (chất)	Tên chất	Loài/bộ phận	TLTK
103	Apigenin 7-O-(3''-O-p-E-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	Hạt <i>E. floribundus</i>	[60]
104	2''-O-Galloylhyperin	Cành <i>E. sylvestris</i>	[61]
105	Homoplantagin	Cành <i>E. sylvestris</i>	
106	Kaempferol	Lá <i>E. tuberculatus</i>	[56]

107	Mearnsetin	Lá <i>E. oblong</i> , lá <i>E. floribundus</i> , lá <i>E. serratus</i>	
108	Myricetin	Lá <i>E. oblong</i> , lá <i>E. floribundus</i> , lá <i>E. serratus</i>	
109	Myricitrin	Lá <i>E. floribundus</i> , lá <i>E. serratus</i>	
110	Myricitrin 2''-O-gallate	Cành <i>E. sylvestris</i>	[61]
111	Nepitrin	Cành <i>E. sylvestris</i>	
112	Quercetin	Lá <i>E. ganitrus</i> , lá <i>E. tuberculatus</i>	[56]

❖ *Phenol và nhóm chất khác*

Ngoài các nhóm chất chính là terpenoid, alkaloid, flavonoid, các nghiên cứu cho thấy rằng các loài trong chi này còn có hợp chất phenol, trong số 17 chất có 3 polyphenol mới là 4-*O*-methylgallagic acid 3'-(3''-*O*-acetyl)- α -rhamnoside (**113**), 4-*O*-methylgallagic acid 3'-(4''-*O*-acetyl)- α -rhamnoside (**114**), và 4-*O*-Methylgallagic acid 3'- α -rhamnoside (**115**) đều được phân lập từ thân cành loài *E. parvifolius* [62].

Ngoài ra, còn có 24 hợp chất thuộc nhiều nhóm khác còn được tìm thấy trong chi Côm. Trong đó, hai hợp chất lần đầu tiên được phát hiện 6'-*O*-galloylsambunigrin (**116**) và từ lá *E. sericopetalus* [63] và elaeocarpionoside (**117**) phân lập từ lá *E. japonicus* [64].



Hình 1.12. Cấu trúc các chất khác tìm được ở chi *Elaeocarpus*

1.2.4. Hoạt tính sinh học

Nghiên cứu đã công bố cho thấy các nhóm chất flavonoid, alkaloid, terpenoid, phenol trong chi này đều có hoạt tính sinh học phong phú, như tác dụng chống oxy hóa, kháng vi sinh vật, kháng virus, kháng viêm, kháng nấm, chống tiểu đường và hoạt tính chống ung thư. Đáng chú ý, hầu hết công bố về hoạt tính chống ung thư của các chất tách từ chi này đều thuộc nhóm chất cucurbitane.

Ba triterpene khung cucurbitane gồm cucurbitacin F (**58**), 23,24-dihydrocucurbitacin F (**63**) và hexanorcucurbitacin F (**77**) được phân lập từ thân cành loài *E. dolichostylus* có hoạt tính gây độc lên tế bào ung thư biểu mô (KB) và ung thư bạch cầu kháng thuốc (P388). Trong đó, cucurbitacin F (**58**) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh lên cả hai tế bào ung thư KB và P388 với giá trị ED₅₀ tương ứng là 0,074 và 0,04 µg/mL [50]. Nghiên cứu sau này công bố cucurbitacin D (**57**) và cucurbitacin I (**61**) có khả năng ức chế lên các tế bào ung thư phổi (A549/ATCC) và ung thư gan (BEL-7402) với giá trị IC₅₀ < 1 µM [11].

Kết quả thử nghiệm 13 hợp chất phân lập từ loài *E. chinensis* cho thấy triterpene cucurbitacin D (**57**), 3-*epi*-isocucurbitacin D (**72**), 25-*O*-acetylcucurbitacin F (**56**), cucurbitacin I (**61**) có hoạt tính ức chế tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng (HT-29) mạnh với IC₅₀ từ 0,039 đến 0,54 µM, trong khi elaeocarpucin C (**66**) (IC₅₀ = 0,41 µM) [51].

Theo Sukari và cộng sự năm (2013) đã công bố cặn chiết chloroform lá *E. floribundus* có tác dụng ức chế khá mạnh lên tế bào ung thư bạch cầu cấp tính (CEM-SS) với IC₅₀ = 25,6 ± 0,06 µg/mL, trong khi hợp chất friedelin (**52**) phân lập từ dịch chiết này lại cho hoạt tính mạnh chống lại tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung (HeLa) với IC₅₀ = 3,54 ± 0,30 µg/mL [54].

Hoạt tính chống ung thư của petiolaticin A, B, và D (**79-82**) phân lập từ lá *E. petiolatus* cho thấy petiolaticin A (**79**) có tác dụng gây độc tế bào mạnh nhất đối với dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 và ung thư đại trực tràng SW48 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 7,4; 9,2; 9,3, và 4,6 µM [52].

Dưới đây tổng quan chi tiết hơn về loài *Elaeocarpus hainanensis* là loài được nghiên cứu trong luận văn này.

1.2.5. Tổng quan về loài *Elaeocarpus hainanensis*

1.2.5.1. Đặc điểm thực vật

Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*), hay Rì rì, Nang tai, Mành tang thuộc chi Côm (*Elaeocarpus*), họ Côm (*Elaeocarpaceae*) là cây đại mộc nhỏ, nhánh gần như không lông. Lá chụm ở ngọn, phiến thon hẹp, dài 10-14 cm, bìa có răng nhọn, lâu rụng lúc khô, cuống 11-15 mm. Chùm có lá hoa rộng, bìa có răng, hoa trắng thơm, cánh hoa dài 1,5 cm, quả nhân cứng hình thoi dài 2,5 cm. Cây phân bố chủ yếu ở Việt Nam và Trung quốc. Ở Việt Nam, cây này thường phân bố bên suối vùng Cao lạng, Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng [65, 66].

1.2.5.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

Loài *E. hainanensis* mới được tìm thấy ở Trung Quốc và Việt Nam. Loài này chưa có nhiều công bố, từ năm 2008 đến nay có một công bố về thành phần hóa học và hoạt tính chống ung thư của các chất từ các phần trên mặt đất của cây phân bố ở Trung Quốc, và hai công bố ở Việt Nam về thành phần hóa học. Về thành phần hóa học đã tìm thấy ở loài *E. hainanensis* 16 chất đều thuộc nhóm terpenoid. Trong đó, có 1 diterpenoid, 3 triterpen-oleane và còn lại là các triterpen cucurbitane.

Meng và cộng sự đã công bố mười hợp chất đã được phân lập từ loài *E. hainanensis*, trong đó có 3 chất mới là 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one (74), 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one 2-O- β -D-glucopyranoside (75), 16 α ,23 α -epoxy-20 β ,25-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5-ene-11-one 3-O- β -D-glucopyranoside (76) và bảy chất đã biết là 19-norlanosta-5,24-dien-11-one (78), cucurbitacin D (57), cucurbitacin F (58), cucurbitacin G (59), cucurbitacin I (61), cucurbitacin O (62), 3-*epi*-isocucurbitacin G (73) [11].

Cũng trong nghiên cứu này, tác giả đã công bố hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 và ung thư gan BEL-7042 của các chất đã phân lập được. Đáng chú ý, cucurbitacin D (57) và cucurbitacin I (61) có hoạt tính khá mạnh thể hiện ở giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 1 μ M [11].

Năm 2018, Nga và cộng sự đã công bố hai chất mới thuộc khung triterpenoid oleane 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside (53), là 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside (54), cùng với 6 chất trong đó có một chất

thuộc khung diterpenoid và 5 chất thuộc khung triterpene cucurbitacin đó là cucurbitacin D (**58**), cucurbitacin F (**58**), cucurbitacin I (**61**), 3-*epi*-isocucurbitacin D (**72**), cucurbitacin H (**60**) được phân lập từ cành của *E. hainanensis* [13].

Năm 2020, Tung và cộng sự đã tiếp tục nghiên cứu và đã công bố thêm một chất mới cũng thuộc khung triterpenoid oleane đó là 1 α -hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- β -L-arabinopyranoside (**55**) [12].

Bảng 1.9. Các chất được tìm thấy từ loài *E.hainanensis*

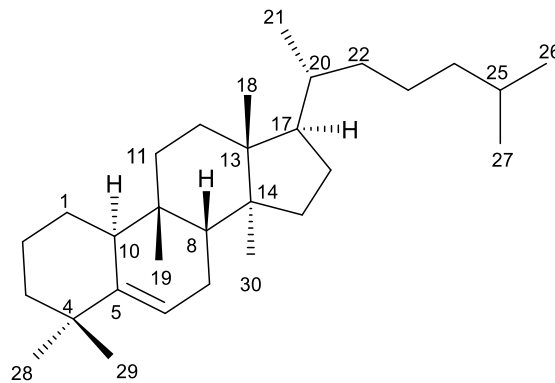
Tên chất	Bộ phận/cận chiết	TLTK
Sesquiterpenoid		
Blumenol A	Phần trên mặt đất/Diclomethane	[13]
Triterpen - oleane		
1 α -Hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside (54)	Phần trên mặt đất/Butanol	[13]
1 α -Hydroxy-olean-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside (53)	Phần trên mặt đất/Butanol	
1 α -Hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- β -L-arabinopyranoside (55)	Phần trên mặt đất/Butanol	[12]
Triterpen-cucurbitan		
16 α ,23 α -Epoxy-20 β ,25-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5-ene-11-one 3-O- β -D-glucopyranoside (76)	Phần trên mặt đất/Butanol.	[11]
16 α ,23 α -Epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one 2-O- β -D-glucopyranosid (75)	Phần trên mặt đất/Butanol	
16 α ,23 α -Epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one (74)	Phần trên mặt đất/Ethylacetat	
19-Norlanosta-5,24- dien-11-one (78)	Phần trên mặt đất/Ethylacetat	
Cucurbitacin D (57)	Phần trên mặt đất/Ethylacetat	[11, 13]
Cucurbitacin F (58)	Phần trên mặt đất/Diclomethane	[11, 13]
Cucurbitacin G (59)		[11]
Cucurbitacin I (61)	Phần trên mặt đất/Diclomethane	[13]

Cucurbitacin O (62)	Phân trên mặt đất/Butanol	[11]
3- <i>epi</i> -isocucurbitacin G (73)	Phân trên mặt đất/Butanol	
Cucurbitacin H (60)	Phân trên mặt đất/Diclomethane	[13]
3- <i>epi</i> -isocucurbitacin D (72)	Phân trên mặt đất/Diclomethane	

1.5. Về hoạt tính chống ung thư của các cucurbitane

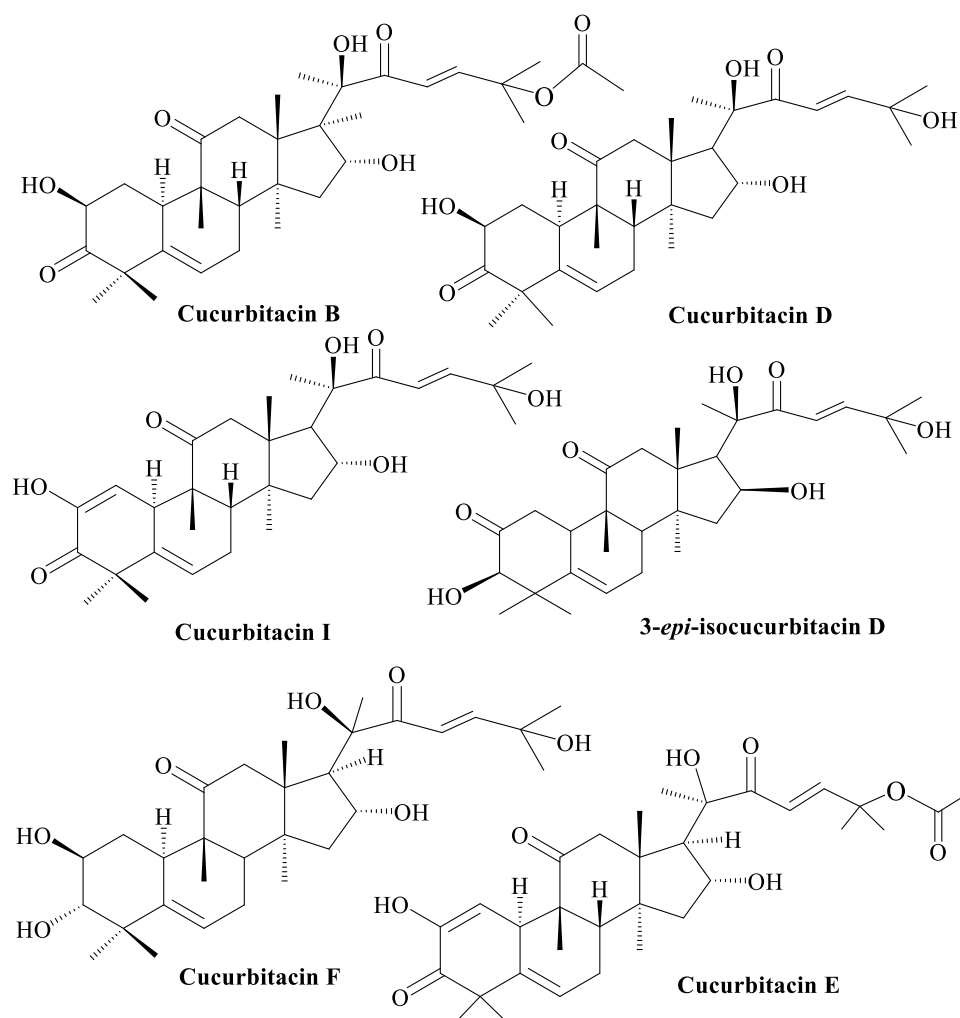
Triterpenoid thực vật là một lớp chất tự nhiên lớn, đa dạng về cấu trúc và phổ tác dụng sinh học rộng. Trong đó chống ung thư là hoạt tính được quan tâm nhiều nhất đặc biệt là các cucurbitacin.

Cucurbitane là triterpenoid bốn vòng, có nhiều trong các cây thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae) như dưa chuột, bí ngô, và dưa hấu. Cho đến nay, hơn 100 cucurbitacine và các dẫn xuất của chúng đã được phân lập từ khoảng 30 chi thuộc họ Cucurbitaceae, Elaeocarpaceae, Euphorbiaceae [67].



Hình 1.13. Cấu trúc hóa học khung cucurbitane

Nghiên cứu cho thấy có khoảng 17 cucurbitacin chính được ký hiệu từ A đến T. Trong đó có cucurbitacin B, -D, -E, -I và các dẫn chất của chúng có hoạt tính chống ung thư mạnh nhất, sau đó là cucurbitacin F, -O, -P, -Q và các dẫn chất của chúng đều có hoạt tính độc tế bào ung thư ở mức trung bình. Hoạt tính chống ung thư của các cucurbitacin này trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau như: tiền liệt tuyến, vú, phổi, da, gan, não, ruột kết, tử cung, vòm họng... [68].



Hình 1.14. Cấu trúc hóa học của cucurbitacin có tác dụng gây độc tế bào ung thư

Cơ chế gây độc tế bào ung thư ở mức độ phân tử của các cucurbitacin đã được nghiên cứu khá sâu, như ức chế phân chia tế bào ở pha phân bào G1/M và G2/M, ức chế các tín hiệu kích hoạt phiên mã như JAK/STAT3, làm gián đoạn tổng hợp F-actin (làm thay đổi hình dạng tế bào trong phân bào) [67].

Cucurbitacin B và -I được báo cáo có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ruột kết HCT116, SW480, DLD1 với giá trị IC_{50} từ 0,5 – 7,8 μ M. Cả cucurbitacin B và -I đều tác động vào pha phân bào G2/M và gây hiện tượng tế bào chết theo chương trình (*apoptosis*), đồng thời ức chế sự hình thành khối tế bào gốc ung thư (CSC). Thêm nữa cucurbitacin B và -I điều khiển giảm các tín hiệu liên quan đến sự phát triển CSC đó là DCLK1, CD44, LGR5 và Notch [69].

Cucurbitacin D có khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung CaSki và SiHa với IC_{50} khá thấp là 400 nM và 500 nM, đồng thời cũng có khả năng ngăn chặn sự xâm lấn và di căn của các tế bào này [70]. Cucurbitacin D, -I và dẫn xuất của cucurbitacin D (3-*epi-isocucurbitacin D*) có hoạt tính kháng dòng tế bào ung thư ruột kết HT-29 với

IC₅₀ 0,12 và 0,19 μM còn 3-*epi*-isocucurbitacin D mạnh hơn với giá trị IC₅₀ là 0,039 μM [51]. Cucurbitacin D và -I có hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi (A549) và ung thư gan (BEL-7042) khá mạnh với giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 1 μM [11].

Các cucurbitacin còn có tác dụng hiệp đồng khi kết hợp với các tác nhân hóa trị liệu như: imatinib mesylate, paclitaxel, docetaxel, và gemcitabine [71]. Cucurbitacin B được thử nghiệm tác dụng hiệp đồng với cisplatin trên dòng tế bào ung thư biểu mô bàng quang (MB49). Kết quả cho thấy giá trị IC₅₀ của cisplatin sau 48 giờ xử lý với tế bào là 20 μM , còn cucurbitacin B là 0,25 μM , trong khi ở liều kết hợp IC₅₀ là 10 μM cisplatin và 0,1 μM cucurbitacin B [72].

Cucurbitacin B, -E, -D, -I cũng được nghiên cứu tác dụng hiệp đồng với các phân tử thuốc nhỏ làm tăng hiệu quả và giảm tế bào kháng thuốc đồng thời ức chế sự xâm lấn, di căn của tế bào ung thư [73]. Cucurbitacin B được Yuang và cộng sự báo cáo về hoạt tính chống ung thư phổi NSCLC theo cơ chế gây chết pyrotoxis (cũng là một chương trình chết của tế bào). Cucurbitacin B còn được thử nghiệm tác dụng chống khối u trên chuột ở liều 0,75 mg/kg cho hiệu quả tốt hơn so với chất đối chiếu gefitinib ở liều 40 mg/kg [74, 75]. Cucurbitacin có tác dụng chống ung thư thông qua nhiều cơ chế, bao gồm ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư, thúc đẩy quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào và quá trình làm chết tế bào theo chương trình (*apoptosis*), ức chế sự xâm lấn và di căn, đồng thời phá hủy bộ xương protein. Cucurbitacin kích hoạt mitogen (STAT và MAPK kinase protein) và ức chế di căn của các tế bào ung thư [73].

So với các nhóm chất tự nhiên khác, cucurbitacin thường có độc tính mạnh hơn. Ngưỡng gây độc của chúng là từ 2-12,5 mg/kg, cucurbitacin D, -E, -C, -I có tính độc mạnh hơn các cucurbitacin còn lại. Độc tính của các cucurbitacin tăng khi có sự liên kết đôi xuất hiện ở C-23 và nhóm acetyl ở C-25. Tuy có độc nhưng cucurbitacin có nhiều ưu thế như có hoạt tính ở nồng độ khá thấp và thấp hơn nhiều so với ngưỡng gây độc [67].

Ngoài hoạt tính chống ung thư, các cucurbitacin còn thể hiện hoạt tính kháng viêm, chống vi rút, bảo vệ gan. Bên cạnh đó, các cucurbitacin còn có tác dụng hiệp đồng khi kết hợp với các hợp chất điều trị ung thư khác, nên gần đây chúng được quan tâm nghiên cứu nhiều [73].

Tổng quan về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học ở trên với định hướng mục tiêu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính ung thư, luận án lựa chọn nghiên cứu về hóa

học của loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) và Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*) và đánh giá tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được. Chất có hoạt tính tốt, sẽ tập trung nghiên cứu sâu tác dụng ở mức độ phân tử.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. MẪU THỰC VẬT

* *Cây Xương quạt*

Mẫu cây Xương quạt (*Dianella ensifolia*) được Thạc sỹ Trần Thái Vinh, Viện nghiên cứu khoa học Tây Nguyên thu hái và định danh vào tháng 5 năm 2017, mẫu lưu tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Hà nội.



Hình 2.1. Ảnh tiêu bản cây Xương quạt (*D. ensifolia*)

* *Cây Côm hải nam*

Mẫu cây thân cành và lá được thu thập tại Hà Tĩnh, tháng 11 năm 2019. Tên cây *Elaeocarpus hainanensis* Oliv. do Tiến sỹ Đỗ Ngọc Đại, khoa Lâm nghiệp, trường Đại học kinh tế Nghệ An xác định; tiêu bản (ký hiệu là 40TN/EH) được lưu giữ tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KHCNVN.



Hình 2.2. Ảnh loài Côm hải nam (*E. hainanensis*).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp phân lập các chất

* Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Tiến hành sắc ký bản mỏng trên bản mỏng nhôm chuẩn bị sẵn silica gel Merck 60 F254, độ dày 0,2mm. Đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm được sử dụng để phát hiện các hợp chất hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanilin/H₂SO₄ 10% pha với ethanol, nung nóng ở khoảng 110⁰C cho đến khi hiện vết.

* Sắc ký cột (CC)

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel 60 pha thường với kích thước hạt 0,06-0,2 mm và 0,040-0,063 mm (Merck) , và sephadex LH-20, sắc ký cột pha đảo RP-18.

* Sắc ký lớp mỏng điều chế

Sắc ký lớp mỏng điều chế được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel 60G F₂₅₄ (Merck), phát hiện các hợp chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm. Hoặc cắt hai mép ngoài của bản mỏng để phun thuốc thử vanilin/H₂SO₄ gia nhiệt khoảng 110⁰C đến khi phát hiện vết, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất phân bố, sau đó cạo lớp silica gel đã hấp phụ chất, giải hấp phụ chất bằng dung môi phù hợp.

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Sử dụng các phương pháp phân tích thông số vật lý và phân tích phổ hiện đại kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo để chứng minh cấu trúc hóa học của các chất sạch phân lập được.

Sử dụng các phương pháp và thiết bị sau:

* Độ quay cực ($[\alpha]_D$)

Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm KHCNVN.

* Phổ hồng ngoại (IR)

Phổ hồng ngoại được đo trên máy Bruker TENSOR 37 FT-IR của Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Viện Hàn lâm KHCNVN.

* Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối lượng phun mù điện tử ESI-MS được đo trên máy Agilent 1260 của Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm KHCNVN.

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS đo trên máy Q-TOF LC/MS tại Viện Hóa học và Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KHCNVN.

** Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)*

Phổ NMR được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz, và Bruker NEO 600 MHz, tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Viện Hàn lâm KHCNVN.

Các kỹ thuật NMR được sử dụng bao gồm:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, và DEPT.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMQC, COSY và NOESY.

Dung môi được sử dụng bao gồm: DMSO- d_6 , CD_3OD , CDCl_3 . Chất nội chuẩn là tetramethylsilane (TMS) hoặc tín hiệu dung môi.

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học

2.2.3.1. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

** Phương pháp dùng thuốc nhuộm Sulforhodamine B (SRB)*

Nguyên lý của phương pháp:

Xác định khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp của pháp Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI). Xác định khả năng sống sót của tế bào bằng xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào phép đo mật độ quang học (OD – Optical Density) khi nhuộm tế bào với SRB. Giá trị OD đo được sẽ tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein. Lượng tế bào sống càng nhiều thì lượng protein càng nhiều thì giá trị OD sẽ càng lớn.

Tế bào và các bước tiến hành:

A549, T24, Huh-7, 8505, SNU-1, được mua từ ngân hàng tế bào ATCC và được tặng bởi GS. John M Pezzuto, trường đại học Long-Island (Hoa Kỳ).

Thu tế bào bằng phương pháp trypsin hóa và đếm tế bào bằng buồng đếm để xác định số lượng tế bào và gieo tế bào vào giếng với mật độ nhất định. Chuẩn bị chất thử thành một dãy các nồng độ vào đĩa 96 giếng. Giếng đối chứng ngày 0 là giếng chỉ có 190 μL tế bào ung thư thử nghiệm và không có chất thử. Giếng đối chứng ngày 0 sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid – TCA 20% sau 1 giờ. Đĩa thí nghiệm tiếp tục được nuôi trong điều kiện 37°C, 5% CO_2 , 72 giờ. Sau đó cố định bằng Trichloroacetic acid – TCA 20% trong 1 giờ, nhuộm SRB 30 phút ở điều kiện 37°C. Rửa acetic acid 3 lần, để khô ở điều kiện phòng thí nghiệm. Hòa tan SRB bằng

unbuffered Tris base 10 mM, lắc nhẹ 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek) [76].

Xử lý kết quả:

Xác định % ức chế sự phát triển của tế bào khi xử lý với chất thử bằng công thức dưới đây:

$$\% \text{ Ức chế} = \left[1 - \frac{\text{OD(mẫu)} - \text{OD (ngày 0)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (ngày 0)}} \right] \times 100$$

Lặp lại thí nghiệm 3 lần để đảm bảo độ tin cậy. Đối chứng dương được sử dụng là ellipticine với nồng độ là 10; 2; 0,4; 0,08 $\mu\text{g/mL}$.

Sử dụng phần mềm TableCurve 2Dv4 để tính toán giá trị IC_{50} .

* Phương pháp dùng thuốc thử MTT

Nguyên lý của phương pháp:

Phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) là phương pháp so màu. MTT bị chuyển hóa thành các tinh thể formazan bởi các enzym oxy hóa khử trong ty thể. Có thể dùng một số dung môi hữu cơ (isopropanol) để vừa phá hủy màng tế bào và hoà tan các tinh thể formazan, sau đó đo đọc kết quả OD ở 570 nm.

Tế bào và các bước tiến hành:

Các dòng tế bào ung thư A549, Hep3B, Hela, MCF-7 được cung cấp bởi GS. Jeong-Hyung Lee, trường Đại học quốc gia Kangwon, Hàn Quốc. Tế bào ung thư được nuôi cấy *in vitro* theo phương pháp Mosmann và cộng sự [77].

Các dòng tế bào này được duy trì ở 37°C trong môi trường RPMI 1640 hoặc DMEM có bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100U/mL penicillin và 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 5% CO_2 , 37°C trong 48 giờ. Tiếp tục chuyển sang đĩa 96 giếng 200 μl dung dịch tế bào, mật độ 2-5 x 10⁵ tế bào/giếng (tùy từng loại tế bào). Sau 24 giờ, thêm chất thử được pha ở nồng độ thích hợp, DMSO thêm vào giếng đối chứng với nồng độ bằng với giếng thử. Sau 72 giờ, thêm 0,5 mg/mL MTT, ủ 4 giờ ở 37°C và 5% CO_2 , rút hết môi trường, sử dụng isopropanol để hòa tan kết tủa formazan. Đo độ hấp thụ (OD) tại bước sóng 570 nm. Đối chứng dương được sử dụng trong phép thử này là camptothecin.

Xử lý số liệu:

Xác định giá trị CS % (% tế bào sống sót)

Giá trị CS: là khả năng sống sót của tế bào ở nồng độ ban đầu của mẫu thử, mẫu nào cho giá trị CS $\leq 50\%$ thì được cho là có hoạt tính.

Giá trị CS(%) được tính theo công thức:

$$CS\% = \left[\frac{OD(\text{mẫu thử}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Trong đó: OD: mật độ quang σ : độ lệch tiêu chuẩn

σ được tính theo công thức:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i : giá trị OD tại giếng i

\bar{x} : giá trị OD trung bình

n: số giếng thử lặp lại

Các mẫu có hoạt tính ($CS \leq 50\% \pm \sigma$) sẽ được lựa chọn thử nghiệm tiếp theo hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ (OD) được đo ở 570 nm.

2.2.3.2. Phương pháp phân tích số lượng tế bào, chu trình tế bào, xác định cảm ứng tế bào chết theo chương trình apoptosis.

* Nuôi tế bào OCI-AML3

Dòng tế bào ung thư tủy xương cấp OCI-AML3 được nuôi trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% huyết thanh thai bò và hỗn hợp 100 μ /ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin ở điều kiện 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$. Tế bào đang phát triển ở pha logarith được chuyển sang đĩa 24 giếng với nồng độ tế bào 2x10 5 tế bào/ml. DMSO được thêm vào sao cho nồng độ tương đương với nồng độ pha chất thử nghiệm, chất thử nghiệm được pha sao cho đạt được nồng độ mong muốn bằng DMSO và môi trường nuôi cấy [78]. Xác định số lượng tế bào bằng buồng đếm tế bào theo phương pháp buồng đếm.

Tính tỉ lệ tế bào sống theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{\text{Tổng số tế bào sống sót giếng thử nghiệm}}{\text{Số lượng tế bào trong 1 ml}} \times 100$$

Phân tích số lượng tế bào, tế bào chết theo chương trình apoptosis và chu trình tế bào.

Phân tích chu trình tế bào bằng kỹ thuật phân tích dòng chảy để xác định hàm lượng DNA trong nhân được nhuộm bằng PI (propidium iodide). Tế bào được thu thập bằng phương pháp ly tâm và rửa lại bằng đệm PBS (phosphate-buffered saline). DNA được nhuộm bằng PI 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pha trong PBS trong thời gian 30 phút, ở 4°C . Đo huỳnh quang trên máy phân tích dòng chảy sử dụng Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), phân tích bằng phần mềm FlowJo [79].

2.2.3.3. Phương pháp xác định biểu hiện một số gen liên quan đến ung thư bằng phương pháp Real-time PCR

* Thu nhận mARN từ mẫu (Qiagen RNeasy Plus Micro kit)

Dòng tế bào OCI-AML3 được xử lý với chất thử, và không xử lý với chất thử sau 24 giờ (nồng độ tối đa 5×10^5 tế bào). Ly tâm thu tế bào, thêm 350 μL đệm RLT plus (đệm ly giải mARN). Đệm RLT plus được pha từ 1ml đệm RLT thêm 10 μl β -mercaptoethanol (β -ME) hoặc 20 μL 2 M dithiothreitol (DTT) cho 1 ml RLT.

Chuyển dịch ly giải sang cột gDNA, ly tâm 30 giây trên 10.000 vòng/phút, loại bỏ cột giữ lại dịch. Bổ sung thêm 350 μL ethanol 70% trộn đều sau đó chuyển sang cột Rneasy MinElute, ly tâm ở >8000 vòng/phút, 15 giây, loại bỏ dịch và giữ cột.

Bổ sung 700 μl đệm RW1 vào cột Rneasy MinElute, ly tâm >8000 vòng/phút 15 giây, loại dịch giữ cột. Bổ sung 500 μL đệm RPE vào cột Rneasy MinElute, ly tâm 15 giây ở >8000 vòng/phút, loại dịch thu cột. Tiếp tục thêm 500 μL ethanol 80% vào cột Rneasy MinElute, ly tâm 2 phút ở >8000 vòng/phút, bỏ dịch thu cột. Ly tâm tốc độ tối đa trong 5 phút, bỏ dịch thu cột. Thêm 14 μL nước khử RNase, ly tâm 1 phút, tốc độ tối đa thu ARN.

* Tổng hợp cDNA (ADN phiên mã ngược) theo QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen).

Loại ADN của bộ gen bao gồm: 2 μL đệm loại ADN, ARN (mẫu) tương đương 1 μg , nước không có Rnase, tổng thể tích 14 μL . Ủ 40°C trong 2 phút, sau đó ủ trên đá. Phản ứng sao mã ngược gồm: 1 μL (Quantiscript Reverse Transcriptase), 4 μL đệm RT 1 μL môi RT, 14 μL ARN mẫu. Ủ 15 phút ở 42°C , ủ 3 phút ở 95°C . Được sản phẩm cDNA, để dùng cho phản ứng RT-PCR tiếp theo.

* Phản ứng RT-PCR (theo TagMan assay): Tổng thể tích 20 μL bao gồm 1 μL TagMan Gene Expression assay, 10 μL TagMan Gene Expression Master Mix (mã Hs00998133m1 của TGF- β , Hs00919915_m1 của ZNF-217, Hs00174128 m1

của TNF- α và hs00187848_m1 của Bcl-2 cung cấp bởi Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) 4 μ L AND sao mã ngược của mẫu, 5 μ L nước khử RNase. Trộn đều và ly tâm, đặt phản ứng lên máy RT-PCR ABI-7300 Real-Time Cyclor (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States). Sử dụng phương pháp $\Delta\Delta$ Ct để xác định mức độ biểu hiện của các gen TGF- β , ZNF-217, TNF- α , Bcl-2 [80 – 82].

CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM

3.1. Loài Xương quạt (*D. ensifolia*)

3.1.1. Chiết phân lớp các hoạt chất

Phần trên mặt đất của cây Xương quạt được thái nhỏ, sấy khô, nghiền thô được 3 kg. Bột này được ngâm chiết với EtOH (4 lần x 10 lít/lần) ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Các dịch chiết được gom lại, lọc lấy dịch trong, cất thu hồi dung môi dưới điều kiện áp suất giảm thu được cặn EtOH. Cặn này được hòa với 2 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt bằng n-hexan, dicloromethan, ethyl acetat và butanol thu được các dịch tương ứng. Lần lượt cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết n-hexan ký hiệu **DNH** (19 g), cặn chiết dicloromethan ký hiệu **DNC** (46 g), cặn chiết ethyl acetat ký hiệu **DNE** (9 g), cặn chiết butanol ký hiệu **DNB** (62 g).

3.1.2. Chiết, tách các hợp chất

Cao chiết n-hexane của cây Xương quạt (DNH) 19g được chuyển lên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient n-hexane/EtOAc (97/3 đến 85/15, v/v) thu được 5 phân đoạn DNH1 – DNH5.

Phân đoạn DNH3 (3,05 g) sẽ phân tách bằng cột sephadex (LH-20) bằng MeOH thu nhận 2 phân đoạn DNH3.1 và DNH3.2. DNH3.2 (425 mg) tiếp tục phân tách bằng cột sắc ký silica gel với hệ dung môi n-hexane/EtOAc/MeOH (20/1/0,5, v/v/v) thu được 3 phân đoạn DNH3.2.1- DNH3.2.3. Phân đoạn DNH3.2.3 (152 mg) được tinh chế bằng cột sắc ký silica gel với hệ dung môi n-hexane/EtOAc/MeOH (20/1/1, v/v/v) thu được chất sạch **DN3** (5mg).

Phân đoạn DNH4 (2,62 g) được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải n-hexane/EtOAc (8/2, v/v) thu được 4 phân đoạn DNH4.1-DNH4.4. Phân đoạn DNH4.2 (310 mg) tiếp tục được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải n-hexane/Aceton (95/5, v/v) thu được 2 phân đoạn DNH4.2.1 và DNH4.2.2. Phân đoạn DNH4.2.2 (178 mg) được tinh chế bằng cột sephadex LH-20 rửa giải với MeOH thu được chất sạch **DN9** (10 mg).

Cao chiết DCM của cây Xương quạt DNC (46 g) chuyển lên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi gradient n-hexane/DCM (95/5 – 0/100, v/v) thu được 10 phân đoạn ký hiệu từ DNC1 đến DNC10.

Phân đoạn DNC4 (2,13 g) được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi n-hexane/EtOAc/MeOH (8/1/0,5, v/v/v) thu được 3 phân đoạn ký hiệu DNC4.1 – DNC4.3. Phân đoạn DNC4.1 (212 mg) kết tinh bằng hệ dung môi n-hexane/EtOAc (9/1, v/v) thu được chất **DN10** (21 mg). Phân đoạn DNC4.3 (157 mg) tiếp tục được tinh chế bằng cột sephadex (LH-20) dung môi rửa giải là MeOH thu được chất **DN6** (10 mg).

Phân đoạn DNC7 (1,91 g) được phân tách bằng cột silica gel với hệ dung môi n-hexane/EtOAc/MeOH (8/2/1, v/v/v) thu được 3 phân đoạn DNC7.1 – DNC7.3. Phân đoạn DNC7.3 (361 mg) phân tách tiếp trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi n-hexane/acetone (80/20, v/v) thu được 2 phân đoạn DNC7.3.1 và DNC7.3.2. Phân đoạn DNC7.3.1 (80 mg) tiếp tục được tinh chế bằng cột sephadex (LH-20) rửa giải với MeOH thu được chất **DN4** (10 mg).

Cao chiết ethyl acetat của cây Xương quạt DNE (9 g) được chuyển lên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải n-hexane/EtOAc (95/5 – 0/100, v/v) thu được 10 phân đoạn ký hiệu DNE1-DNE10.

Phân đoạn DNE2 (3,24 g) được phân lập bằng cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (95/5 – 85/15, v/v) thu được 4 phân đoạn DNE2.1 – DNE2.4. Phân đoạn DNE2.2 (478 mg) tiếp tục được tinh sạch bằng cột sephadex (HL-20) rửa giải với MeOH thu được chất **DN8** (18 mg).

Phân đoạn DNE4 (809 mg) được phân lập trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải n-hexane/EtOAc/MeOH (8/2/1, v/v/v) thu được 3 phân đoạn DNE4.1 – DNE4.3. Phân đoạn DNE4.2 (215 mg) tiếp tục được phân lập bằng cột sephadex LH-20 rửa giải với MeOH thu được chất **DN2** (10 mg).

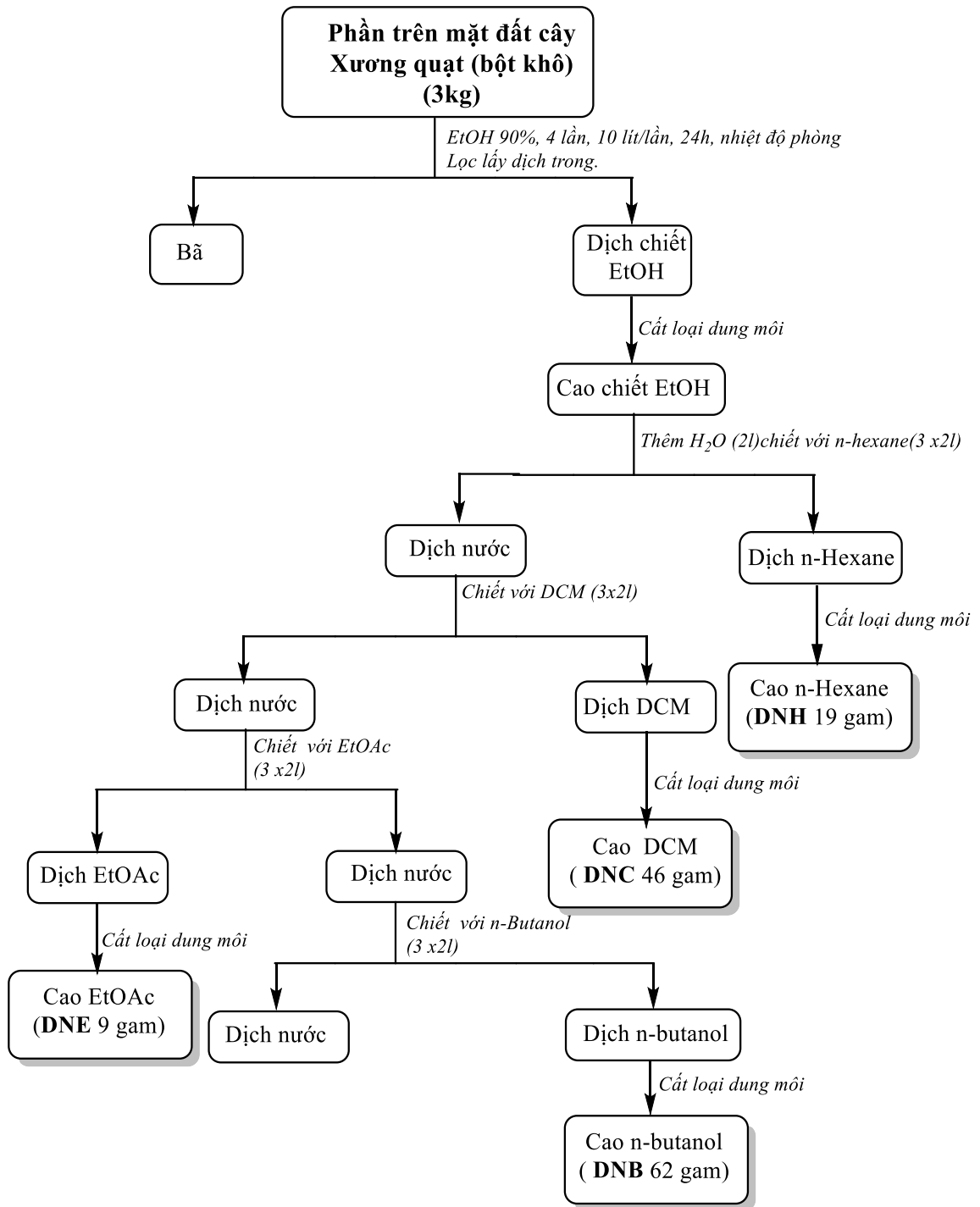
Phân đoạn DNE5 (877 mg) được phân lập trên cột sephadex HL-20 với MeOH thu được 2 phân đoạn DNE5.1 và DNE5.2. Phân đoạn DNE5.2 (25 mg) được làm sạch bằng sắc ký lớp mỏng điều chế với hệ dung môi rửa giải n-hexane/EtOAc/MeOH (8/2/1, v/v/v) thu được chất **DN1** (5 mg).

Phân đoạn DNE6 (347 mg) được phân lập bằng cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải n-hexane/EtOAc/MeOH (50/20/2, v/v/v) thu được 3 phân đoạn DNE6.1 – DNE6.3. Phân đoạn DNE6.3 (179 mg) tiếp tục được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi n-hexane/EtOAc/MeOH (50/30/2, v/v/v) thu được 3

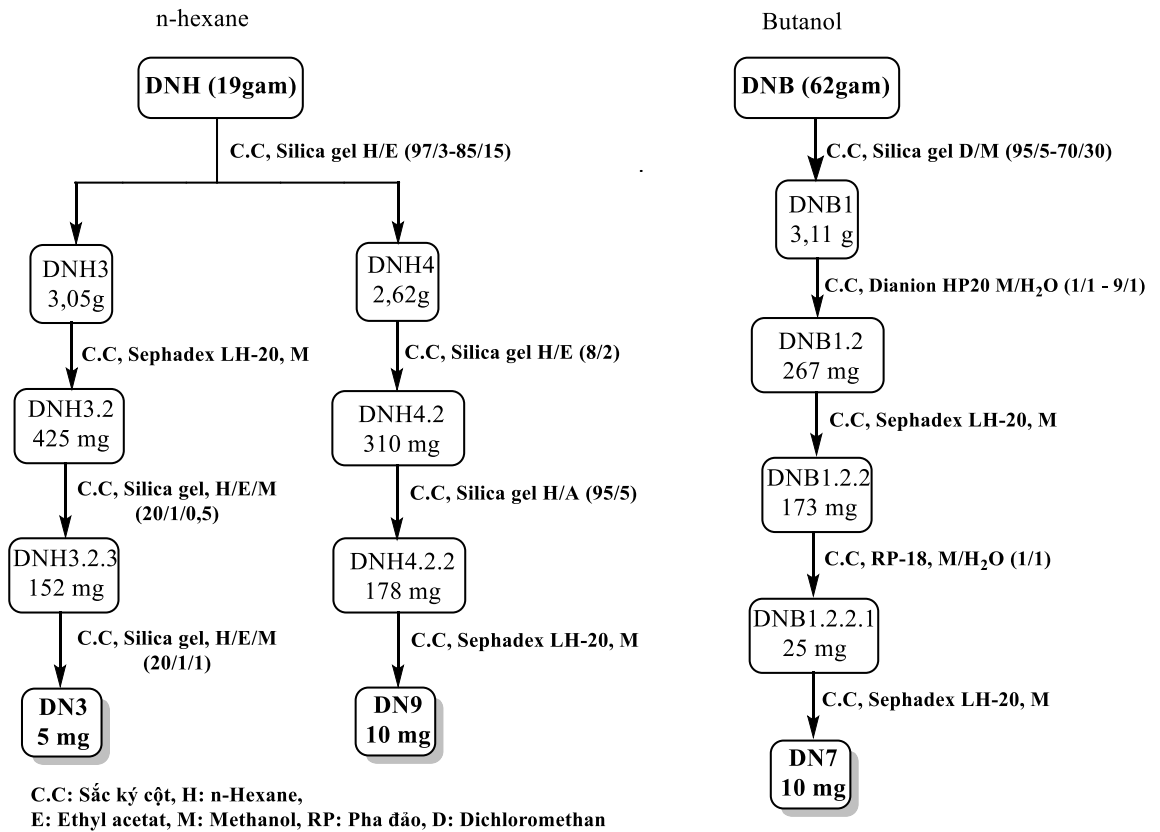
phân đoạn DNE6.3.1 – DNE6.3.3. Phân đoạn DNE6.3.2 (50 mg) được tinh chế bằng cột sephadex (HL-20) rửa giải với MeOH thu được chất **DN5** (7 mg).

Cao chiết butanol của cây Xương quạt DNB (62 g) hòa tan trong MeOH chuyển lên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5 – 70/30, v/v), thu được 7 phân đoạn DNB1-DNB7.

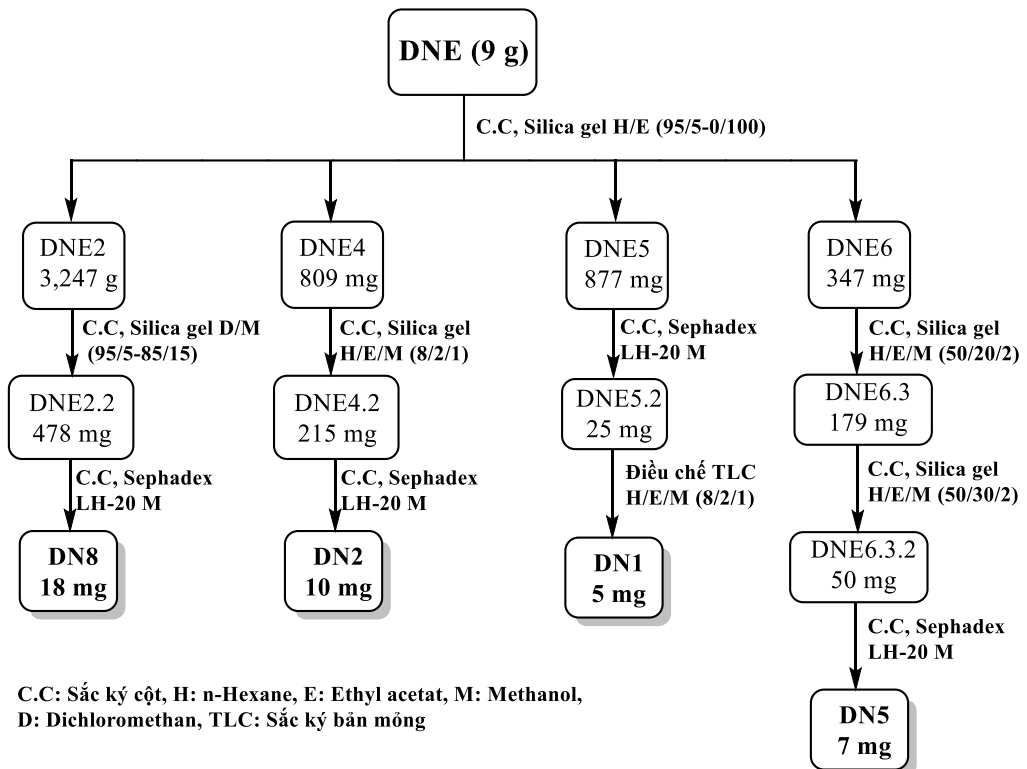
Phân đoạn DNB1 (3,11 g) được tiến hành sắc ký cột dianion (HP-20) với hệ dung môi $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1 – 9/1, v/v) thu được 6 phân đoạn DNB1.1 – DNB1.6. Phân đoạn DNB1.2 (267 mg) được tinh chế tiếp bằng cột sephadex (LH-20) rửa giải với MeOH thu được 3 phân đoạn. Phân đoạn DNB1.2.2 (173 mg) được tinh chế trên cột sắc ký pha đảo RP-18, hệ dung môi $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) thu được phân đoạn DNB1.2.2.1 (25 mg). Phân đoạn này được tiếp tục tinh chế bằng cột sephadex (LH-20) rửa giải với MeOH thu được chất **DN7** (10 mg).



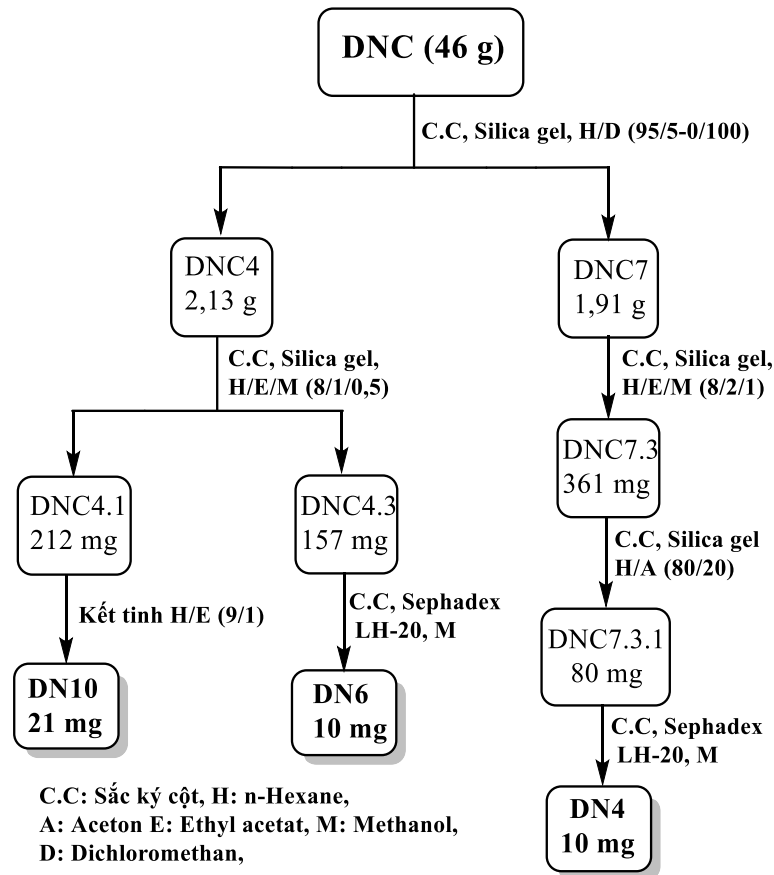
Hình 3.1. Sơ đồ tạo cao chiết từ loài Xương quạt (*D. ensifolia*)



Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết n-hexane và butanol của loài Xương quạt



Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết ethyl acetat của loài Xương quạt



Hình 3.4. Sơ đồ phân lập chất từ cặn chiết dichloromethan của loài Xương quạt

3.1.3. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ

❖ Hợp chất **DN1**: 7-acetyl-4R, 8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (hợp chất mới)

Dạng rắn màu vàng. Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = -17$ ($c = 0.1, \text{CHCl}_3$). CTPT: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$, $M = 234$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): Bảng 4.1. HR-ESI-MS m/z : 233,0814 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

❖ Hợp chất **DN2**: 2(S)-2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (hợp chất mới)

Dạng lỏng màu vàng. Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = -21$ ($c = 0.1, \text{MeOH}$). CTPT: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$, $M = 272$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): Bảng 4.2. HR-ESI-MS: m/z 271,0976 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

❖ Hợp chất **DN3**: 2(S)-7,4'-dimethoxy flavan (lần đầu tiên tách từ thiên nhiên)

Dạng rắn màu trắng. Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = -21$ ($c = 0.1, \text{CHCl}_3$). Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): Bảng 4.3

❖ Hợp chất **DN4**: Diaensi-biflavan (hợp chất mới)

Dạng rắn màu trắng. Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +29$ ($c = 0.1, \text{CHCl}_3$)

CTPT: $C_{35}H_{36}O_8$, $M = 584$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.4. HR-ESI-MS: m/z 585,2477 $[M + H]^+$.

❖ Hợp chất **DN5**: Diaensi-biflavan A (hợp chất mới)

Dạng rắn màu trắng. CTPT: $C_{34}H_{34}O_8$, $M = 570$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.5. ESI MS m/z : 569,2187 $[M-H]^-$

❖ Hợp chất **DN6**: Methyl β -orcinolcarboxylate

Dạng rắn màu vàng. CTPT: $C_{10}H_{12}O_4$, $M = 196$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.6. ESI MS m/z : 197,09 $[M+H]^+$

❖ Hợp chất **DN7**: Dianellose

Dạng rắn màu vàng. CTPT: $C_{24}H_{30}O_{12}$, $M = 510$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.7. ESI MS m/z : 511,18 $[M+H]^+$.

❖ Hợp chất **DN8**: Amentoflavone

Dạng rắn màu vàng sáng. CTPT: $C_{30}H_{18}O_{10}$, $M = 538$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.8. ESI MS m/z : 539,0928 $[M+H]^+$.

❖ Hợp chất **DN9**: Sitosterone

Dạng rắn màu trắng. CTPT: $C_{29}H_{48}O$, $M = 412$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.9.

❖ Hợp chất **DN10**: β -sitosterol

Dạng tinh thể hình kim màu trắng. CTPT: $C_{29}H_{50}O$, $M = 414$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$).

3.2. Loài Côm hải nam (*E. hainanensis*)

3.2.1. Chiết phân lớp các hoạt chất

Lá và cành cây Côm hải nam được thu hái về chặt nhỏ, sấy khô, nghiền thành bột thô được 5 kg. Bột này được ngâm chiết với MeOH (3 lần x 15 lít/lần), ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, dịch chiết được gom lại, lọc lấy dịch trong, cất thu hồi dung môi dưới điều kiện áp suất giảm thu được cặn MeOH. Cặn được hòa tan với 2 lít nước cất, chiết phân bố lần lượt với n-hexane, dicloromethan, thu được các dịch chiết tương ứng. Các dịch được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn tương ứng ký hiệu **EH**, **ED** (60 g). Phần nước còn lại sau khi chiết phân bố, cất loại nước

đến khô được cặn nước, hòa tan cặn nước này với MeOH, sau đó cất loại dung môi thu được cặn chiết MeOH của cây Côm hải nam ký hiệu **EM** (20 g).

3.2.2. Chiết, tách các chất

Cặn chiết DCM của cây Côm hải nam ED (60 g) được chuyển lên cột silica gel bằng hệ dung môi rửa giải gradient DCM/MeOH (9/1 – 5/5, v/v), thu được 10 phân đoạn ED1-ED10.

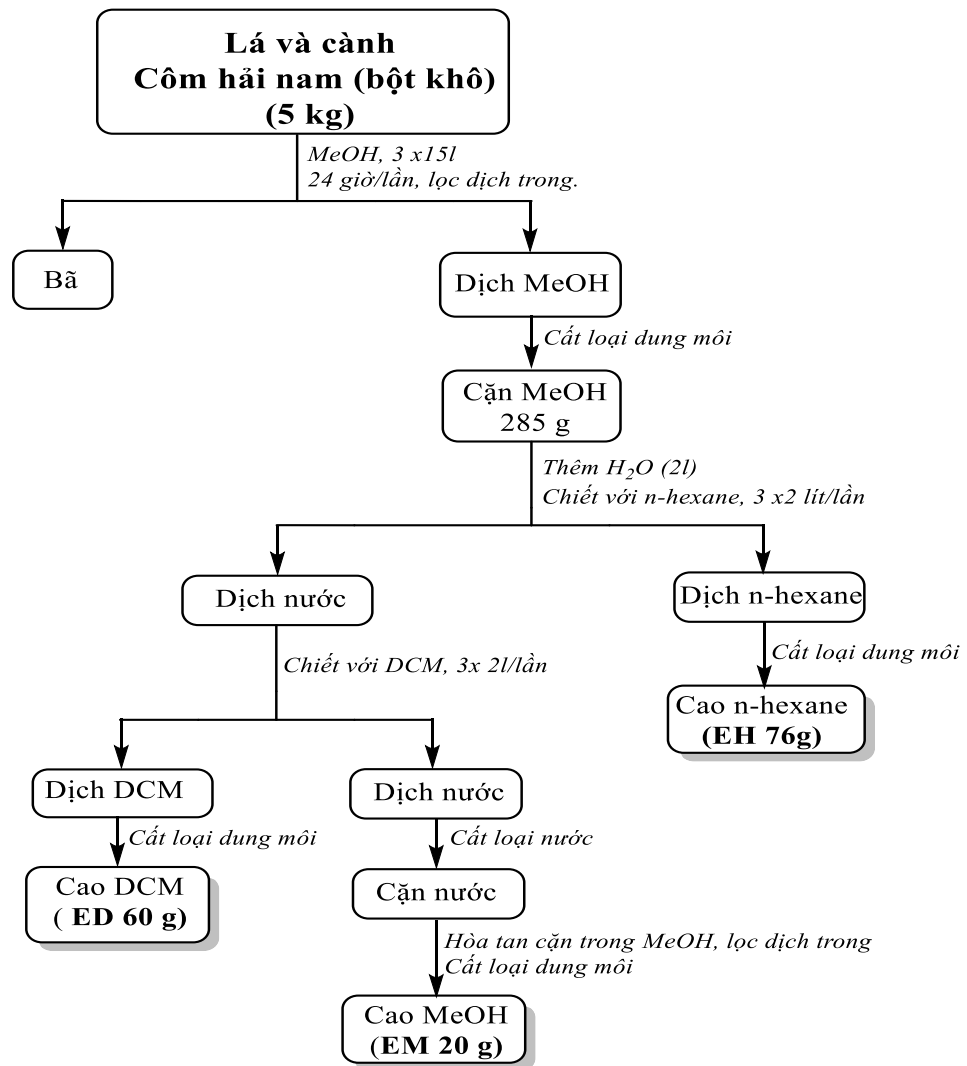
Phân đoạn ED4 (10 g) được tiến hành sắc ký cột silica gel bằng hệ dung môi rửa giải gradient DCM/Acetone (9/1 – 5/5, v/v) thu được 4 phân đoạn ED4.1- ED4.4. Phân đoạn ED4.2 (1,15 g) tiếp tục được phân tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi gradient DCM/Acetone (9/1 – 5/5, v/v) thu được các chất **EH14** (12 mg), **EH15** (10 mg), **EH1** (21 mg).

Phân đoạn ED5 (12 g) được tiến hành sắc ký cột silica gel bằng hệ dung môi gradient DCM/acetone (9/1 – 0/10, v/v) thu được 6 phân đoạn nhỏ ED5.1 – ED5.6. Phân đoạn ED5.1 (1,3 g), ED5.2 (320 mg), ED5.3 (350 mg), ED5.4 (230 mg) tiếp tục được tinh chế bằng cột sephadex (LH-20) bằng hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (1/9, v/v) thu được chất **EH5** (15 mg) và **EH4** (3,5 mg), **EH2a** (10 mg), **EH3** (12 mg).

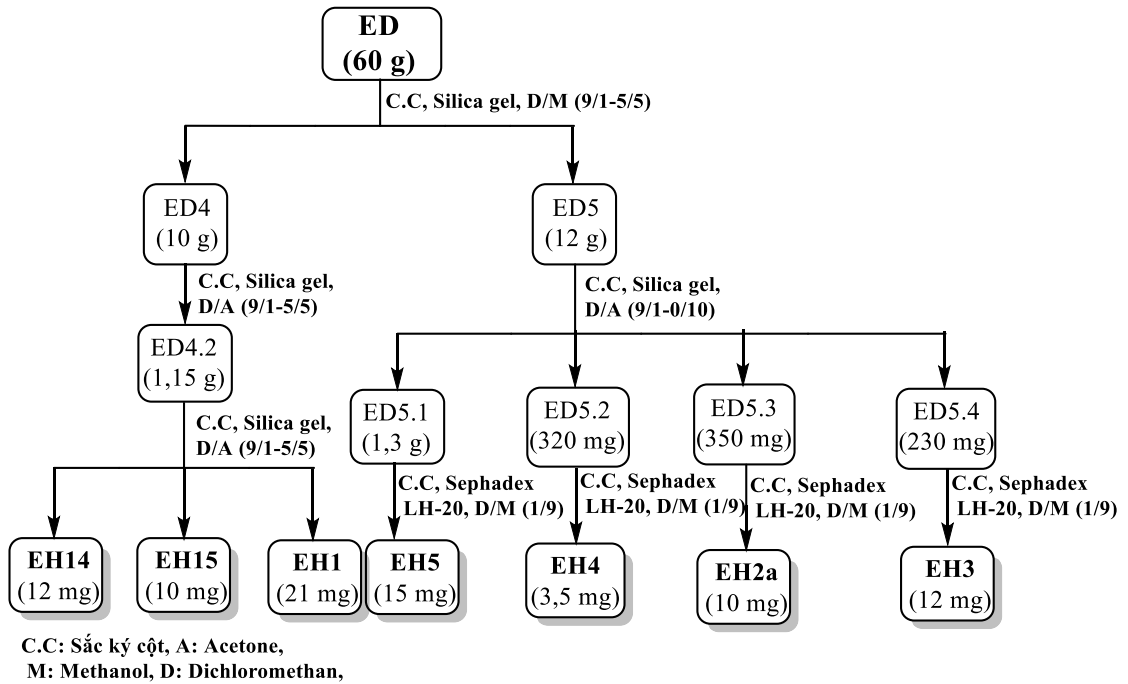
Cao chiết EM (20 g) được chuyển lên cột silica gel với hệ dung môi gradient EtoAc/MeOH (9/1 – 5/5, v/v), thu được 4 phân đoạn EM1- EM4.

Phân đoạn EM3 (8,2 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel bằng hệ dung môi rửa giải DCM/Acetone (9/1-5/5, v/v), thu được 5 phân đoạn EM3.1-EM3.5. Phân đoạn EM3.1 (254 mg) được phân tách tiếp trên cột sephadex (LH-20) bằng hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (1/9, v/v), kết hợp với sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi DCM/MeOH (9/1, v/v) thu được chất **EH6** (6 mg). Phân đoạn EM3.3 (1,98 g) được phân tách tiếp trên cột silica gel bằng hệ dung môi gradient DCM/Acetone (95/5 – 85/15, v/v) thu được 6 phân đoạn. Các phân đoạn EM3.3.4 (214 mg) và EM3.3.6 (195 mg) được tinh sạch tiếp trên cột sephadex (LH-20) bằng hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (1/9, v/v) thu được hai chất tương ứng là **EH13** (7 mg) và **EH9** (6 mg). Phân đoạn EM3.4 (1,34 g) được phân lập trên cột sắc ký silica gel bằng hệ dung môi gradient DCM/MeOH (9/1-7/3, v/v), thu được 4 phân đoạn EM3.4.1-EN3.4.4. Các phân đoạn EM3.4.2 (196 mg) và EM3.4.3 (214 mg) được tinh sạch tiếp trên cột sephadex (LH-20) với hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (1/9, v/v) thu được hai chất tương ứng là **EH8** (7 mg) và **EH7** (6 mg).

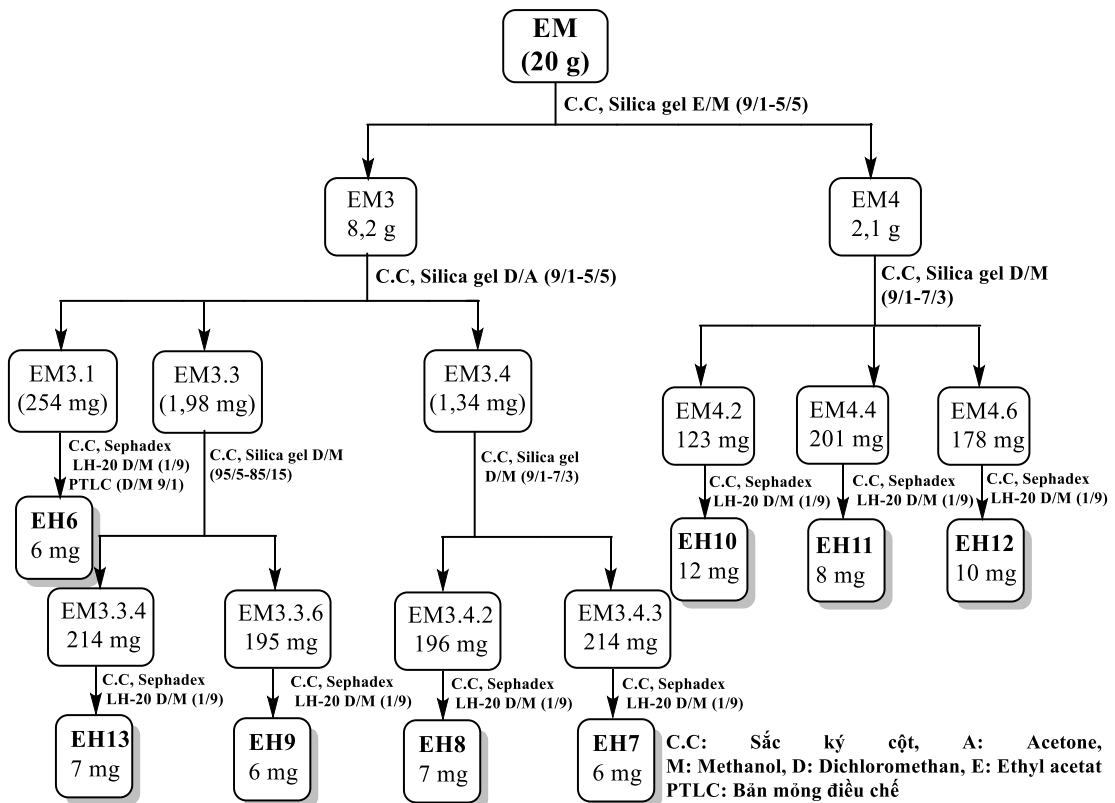
Phân đoạn EM4 (2,1 g) được phân lập trên cột sắc ký silica gel bằng hệ dung môi gradient DCM/MeOH (9/1-7/3, v/v) thu được 7 phân đoạn EM4.1-EM4.7. Các phân đoạn EM4.2 (123 mg), EM4.4 (201 mg), EM4.6 (178 mg) được tinh sạch tiếp trên cột sephadex (LH-20) với hệ dung môi rửa giải DCM/MeOH (1/9, v/v) thu được các chất tương ứng là **EH10** (12 mg), **EH11** (8 mg), **EH12** (10 mg).



Hình 3.5. Sơ đồ tạo cao chiết từ loài Côm hải nam (*E. hainanensis*)



Hình 3.6. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết DCM của loài Côm hải nam



Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các chất từ cặn chiết methanol của loài Côm hải nam

3.2.3. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ

❖ Hợp chất **EH1**: Cucurbitacin D

Dạng rắn, màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{44}O_7$, M = 516. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.11. ESI-MS m/z : 539,3 $[M+Na]^+$,

❖ Hợp chất **EH2**: trong hỗn hợp **EH2a** (cucurbitacin D + cucurbitacin I (**EH2**))

Dạng bột, màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{44}O_7$, $M = 516$. 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.12.

❖ Hợp chất **EH3**: 3-*epi*-isocucurbitacin D

Dạng rắn, màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{44}O_7$, $M = 516$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.13

❖ Hợp chất **EH4**: Cucurbitacin F

Dạng rắn, màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{46}O_7$, $M = 518$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.14.

❖ Hợp chất **EH5**: Cucurbitacin H

Dạng rắn, màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{46}O_8$, $M = 534$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): Bảng 4.15.

❖ Hợp chất **EH6**: 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20*R*-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one

Dạng rắn màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{46}O_4$, $M = 470$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.16. HR-ESI-MS m/z : 471,3469 $[M + H]^+$.

❖ Hợp chất **EH7**: 16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside.

Dạng bột màu trắng. CTPT: $C_{36}H_{56}O_9$, $M = 632$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.17. HR-ESI-MS m/z : 655,3796 $[M+Na]^+$.

❖ Hợp chất **EH8**: Elaeohainencin A (16 α ,23 α -epoxy-cucurbit-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H 24-hydroperoxy-5,25-dien-11-one) (Hợp chất mới).

Dạng rắn màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{46}O_6$, $M = 502$. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): Bảng 4.18. ESI-MS m/z : 503,3358 $[M + H]^+$, tính toán lý thuyết, 503,3367 và 537,2989 $[M+Cl]^-$.

❖ Hợp chất **EH9**: 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-12-ene -1-sulfate (Hợp chất mới).

Dạng rắn màu trắng. CTPT: $C_{30}H_{50}O_5S$, $M = 522$. Phổ 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) Bảng 4.19. HR-ESI-MS: m/z 521,3308 $[M - H]^-$. HR-ESI-MS: m/z 441,3736 $[M + H - SO_3H]^+$.

❖ Hợp chất **EH10**: 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside

Dạng rắn màu trắng. CTPT: C₃₅H₅₈O₆, M = 574. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD + CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD + CDCl₃): Bảng 4.20. HR-ESI-MS m/z: 619,4207 [M + HCOO]⁻.

❖ Hợp chất **EH11**: 1 α -hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- β -L-arabinopyranoside

Dạng rắn màu trắng. CTPT: C₃₅H₅₆O₇, M = 588. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Bảng 4.21. HR-ESI-MS m/z: [M + H]⁺, 589,4132.

❖ Hợp chất **EH12**: 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside

Dạng bột màu trắng. CTPT: C₃₅H₅₈O₆, M = 574. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Bảng 4.21. HR-ESI-MS m/z: 619,4212, [M + HCOO]⁻.

❖ Hợp chất **EH13**: 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-18-ene 1- sulfate (Hợp chất mới)

Dạng rắn màu trắng. CTPT: C₃₀H₅₀O₅S, M = 522. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Bảng 4.22. HR ESI MS: m/z 521,3296 [M - H]⁻. m/z 545,3274 [M + Na]⁺.

❖ Hợp chất **EH14**: 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde

Dạng rắn màu trắng. CTPT: C₆H₅O₃, M = 125. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): Bảng 4.23. HR-ESI-MS m/z: 126,0317 [M+H]⁺.

❖ Hợp chất **EH15**: Blumenol A

Dạng rắn, màu trắng. CTPT: C₁₃H₂₀O₃, M = 224. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 4.24.

3.3. Thử hoạt tính chống ung thư

3.3.1 Các hợp chất phân lập từ loài *Xuong quạt*

Các hợp chất **DN1**, **DN2**, **DN3**, **DN4** được tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế tăng sinh lên bốn dòng tế bào ung thư người đó là: A549, Hep3B, Hela, MCF-7. Bằng phương pháp thử nghiệm MTT được mô tả ở mục 2.4.1.2, các hợp chất trên được xử lý với các dòng tế bào ung thư ở hai nồng độ 100 μ M, và 30 μ M,

camptothecin được sử dụng trong phép thử này là chất đối chứng dương được thử ở 2 nồng độ 5 và 10 µg/mL.

3.3.2. Các hợp chất phân lập từ loài *Côm hải nam*

❖ *Hoạt tính gây độc tế bào ung thư*

Các hợp chất **EH6**, **EH7**, **EH8** được lựa chọn để thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào đối với năm dòng tế bào ung thư ở người đó là: A549, T24, Huh-7, 8505, SNU-1. Bằng phương pháp nhuộm Sulforhodamine B (SRB) được mô tả ở mục 2.4.1.1, các hợp chất này được xử lý với các dòng tế bào ung thư ở một dãy các nồng độ pha loãng từ 0,8 đến 100 µg/mL, chất đối chứng dương ellipticine được pha loãng ở các nồng độ từ 0,08 đến 10 µg/mL.

❖ *Hoạt tính gây độc tế bào ung thư dòng OCI-AML3*

Các hợp chất **EH2a**, **EH3**, **EH10** được thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dòng OCI-AML3 bằng phương pháp mô tả ở mục 2.4.2. Các hợp chất được xử lý với tế bào ở các nồng độ khác nhau như: **EH2a** (0,1; 1; 10 µg/mL), **EH3** (0,05; 0,5; 5 µg/mL) **EH10** (5, 10,15 µg/mL).

❖ *Phân tích ảnh hưởng của các hợp chất đến chu trình tế bào*

Các hợp chất **EH1**, **EH2a**, **EH3**, **EH10** được thử nghiệm phân tích ảnh hưởng đến chu trình tế bào dòng OCI-AML3 được mô tả ở mục 2.4.2. Các hợp chất này được xử lý tế bào ở các nồng độ khác nhau như: **EH1** (0,03; 0,3; 3 µg/mL), **EH2** (0,1; 1; 10 µg/mL), **EH3** (0,05; 0,5; 5 µg/mL), **EH10** (5; 10; 15 µg/mL). Đối chứng được sử dụng trong phép thử này là DMSO.

❖ *Hoạt tính gây cảm ứng apoptosis*

Hai hợp chất **EH1** và **EH3** được thử nghiệm hoạt tính gây cảm ứng *apoptosis* đối với dòng tế bào ung thư OCI-AML3 theo phương pháp được mô tả ở mục 2.4.2. **EH1** được thử nghiệm ở các nồng độ 0,03; 0,3 và 3 µg/mL, **EH3** ở nồng độ 0,05; 0,5 và 5 µg/mL.

❖ *Nghiên cứu tác động đến biểu hiện gen của các cucurbitacin*

Hai hợp chất **EH1** và **EH3** được thử nghiệm hoạt tính gây biểu hiện giảm các gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 bằng phương pháp mô tả ở mục 2.4.3. **EH1** được thử nghiệm ở nồng độ 0,3 và **EH3** là 0,5 µg/mL.

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

4.1.1. Xác định cấu trúc hóa học của các chất phân lập từ loài *Xương quạt* (*Dianella ensifolia*)

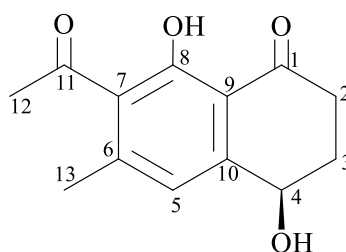
Từ phần trên mặt đất của loài *Xương quạt*, sử dụng phương pháp sắc ký cột, sắc ký bản mỏng điều chế đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 10 hợp chất, bao gồm 4 phenolic mới: 7-acetyl-4*R*,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (**DN1**); (2*S*)-2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (**DN2**); diaensi-biflavan (5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-(6,6''-methylene)-biflavan) (**DN4**); diaensi-biflavan A (5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6,6''-methylene-(5,4'-dihydroxy-7-methoxy) (**DN5**); chất lần đầu tách từ thiên nhiên (2*S*)-7,4'-dimethoxyflavan (**DN3**) và 5 chất đã biết (**DN6–DN10**), bao gồm methyl β -orcinolcarboxylate (**DN6**), dianellose (**DN7**), amentoflavone (**DN8**), sitosterone (**DN9**) và β -sitosterol (**DN10**).

❖ Hợp chất 7-acetyl-4*R*,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (**DN1**)

Hợp chất **DN1** được phân lập ở dạng bột, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **DN1** xuất hiện pic ion giả phân tử ở $m/z = 233,0814$ $[M-H]^-$ cho phép xác định được CTPT của **DN1** là $C_{13}H_{14}O_4$ (tính toán $C_{13}H_{13}O_4$, 233,0814).

Phổ 1H -NMR của **DN1** cho thấy tín hiệu của một nhóm hydroxy ở δ_H 12,85 ppm (OH-8, s), một tín hiệu proton thơm ở δ_H 6,90 (H-5, s), một proton oxymethine ở δ_H 4,87 (H-4, dd; 4,0, 7,0), hai nhóm methyl ở δ_H 2,31 (CH_3 -6, s) và 2,56 (CH_3 -CO-7, s) và bốn proton methylene ở 2,17–2,98 ppm. Phổ ^{13}C -NMR, có 13 tín hiệu carbon bao gồm hai nhóm carbonyl ở δ_C 203,5 (C-1) và δ_C 203,7 (C=O, C-11), hai nhóm methyl ở δ_C 20,5 (CH_3 -6) và 32,0 (C-12), một carbinol ở δ_C 67,6 ppm (C-4), hai carbon methylene ở δ_C 31,3 (C-3) và 34,7 (C-2), và sáu tín hiệu carbon vòng thơm. Từ các tín hiệu phổ NMR ở trên và so sánh với phổ của chất 3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-6-methoxy-7-methyl-1(2H)-naphthalenone [83] và 7-acetyl-3, 6-dihydroxy-8-methyl-1-tetralone [84], chất **DN1** được dự đoán có khung tetralone. Tín hiệu nhóm hydroxy ở trường thấp (δ_H 12,85) do tạo liên kết hydro nội phân tử với nhóm carbonyl và carbon thơm ở δ_C 160,2 giúp xác nhận được có nhóm thế hydroxy ở C-8. Tương tác trên phổ HMBC giữa tín hiệu proton ở δ_H 2,56 (CH_3 -C=O) với carbon ở δ_C 128,8

(C-7), 203,7 (C=O), cho biết nhóm acetyl gắn với C-7. Các nhóm thế của **DN1** rất giống với chất 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl-1-tetralone [84], nhưng khác nhau ở vị trí của chúng và được xác định qua tương tác ở phổ HMBC. Nhóm hydroxy gắn với C-4 và methyl ở C-6 được xác định dựa trên tương tác giữa H-5 (δ_H 6,90 s) và CH₃-6 (δ_C 20,5, C-13), C-4 (δ_C 67,6), C-9 (δ_C 113,6), C-7 (δ_C 128,8), C-10 (δ_C 145,6); giữa C-4 (δ_C 67,6) và H-5 (δ_H 6,90 s), H-2 (δ_H 2,98, 2,65), H-3 (δ_H 2,17); và giữa CH₃-6 (δ_H 2,31, H-13) và C-5 (δ_C 119,7), C-6 (δ_C 145,2), C-7 (δ_C 128,8), C-8 (160,2) trong phổ HMBC. Cấu hình tuyệt đối *R* ở C-4 được xác định từ hiệu ứng Cotton dương ở 260–270 nm trong phổ CD và so sánh với cấu hình của các chất tương tự shinanolone [85, 86]. Từ số liệu phổ phân tích ở trên, cấu trúc của **DN1** được xác định là 7-acetyl-4*R*,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone, một hợp chất mới.



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của chất **DN1**

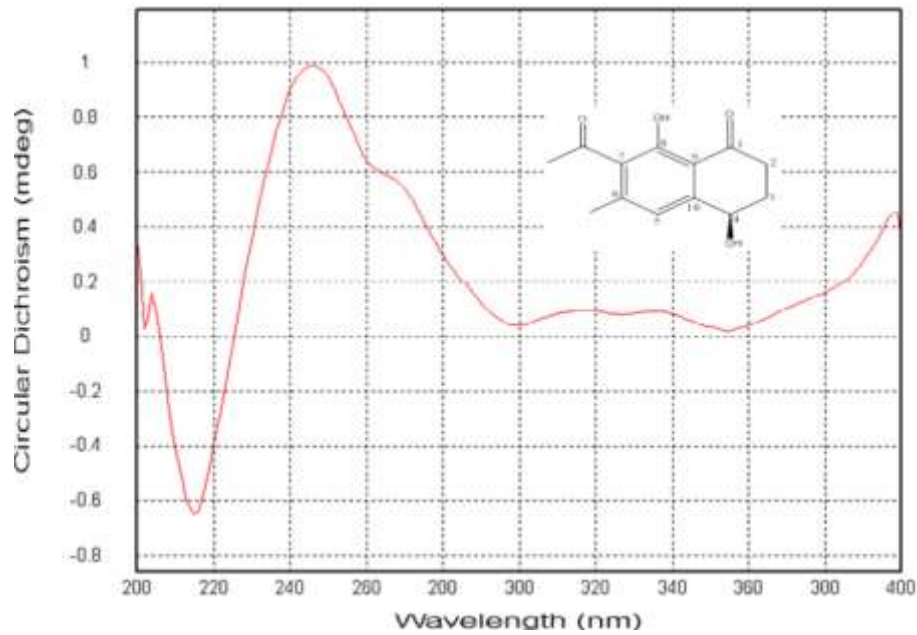
Bảng 4.1. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của chất **DN1**

	δ_C^a	δ_H^b
1	203,5	-
2	34,7	2,98, m, 2,65, m
3	31,3	2,35, m, 2,17, m
4	67,6	4,87, dd (7,0, 4,0)
5	119,7	6,90, s
6	145,2	-
7	128,8	-
8	160,2 nd	-
9	113,8	-
10	145,6	-
11	203,7	-
12	32,0	2,56, s

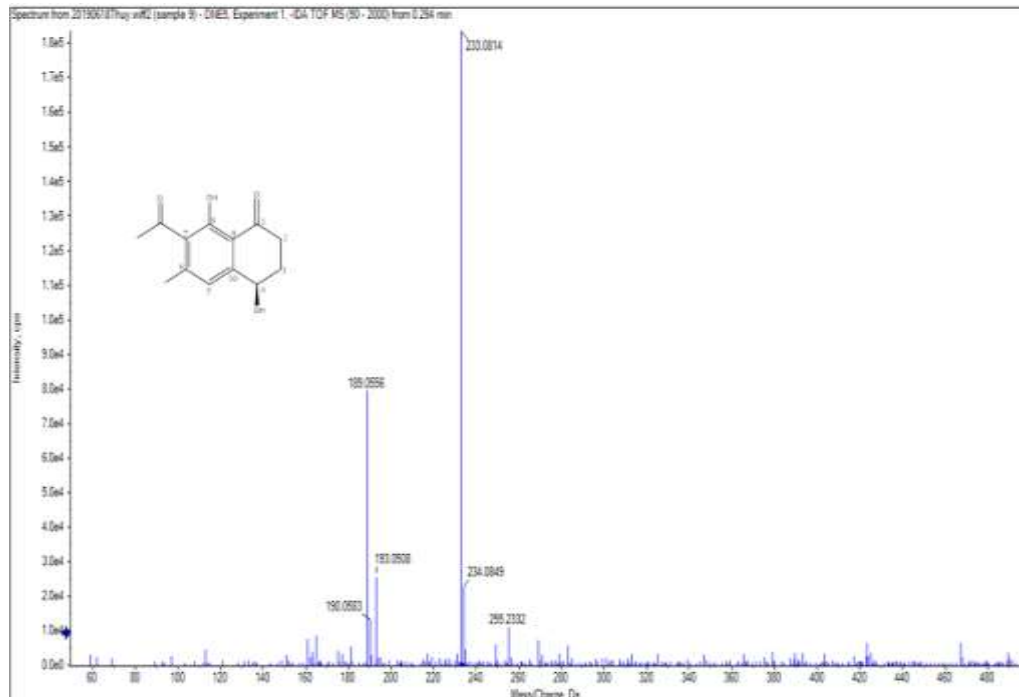
13	20,5	2,31, s
OH-8	-	12,85

a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃

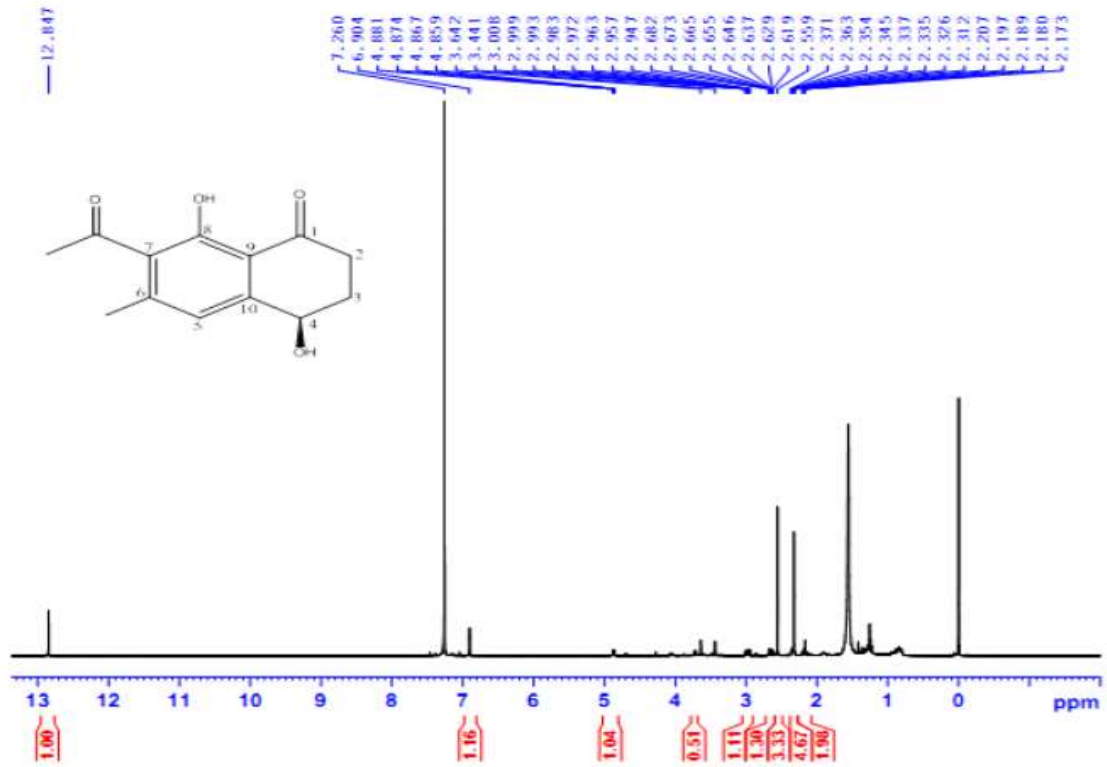
nd Tín hiệu ghi nhận được trong phổ HMBC, không ghi nhận được trong phổ ¹³C NMR.



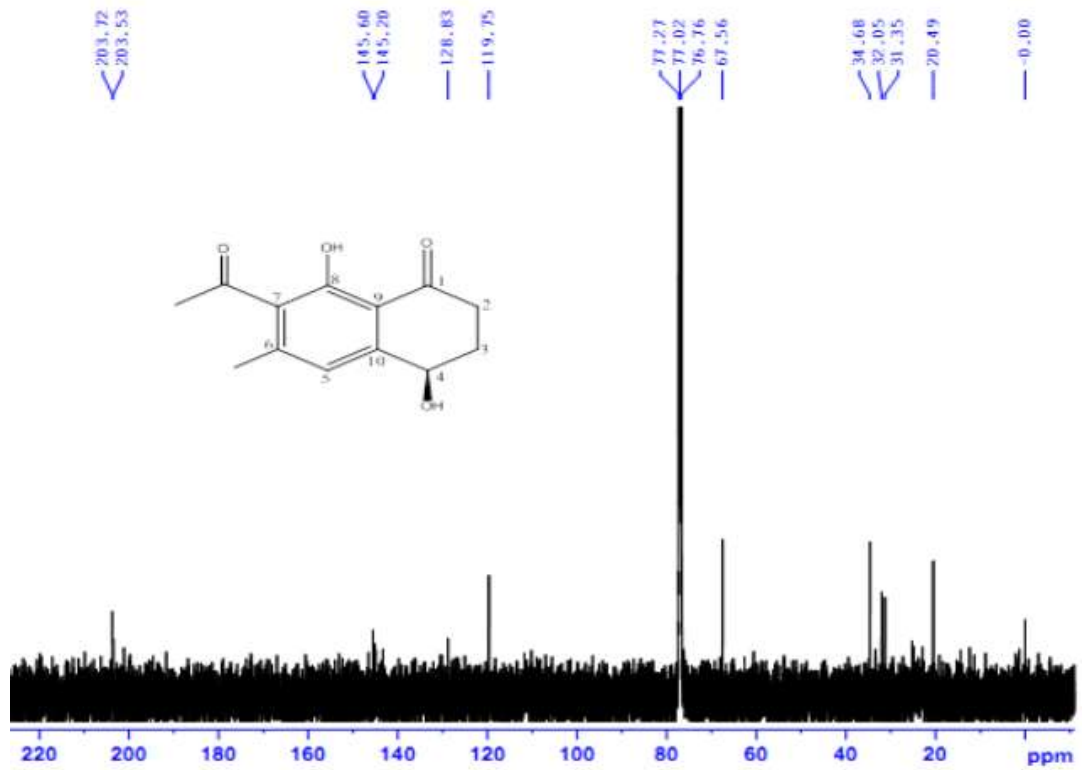
Hình 4.2. Phổ CD của hợp chất **DN1**



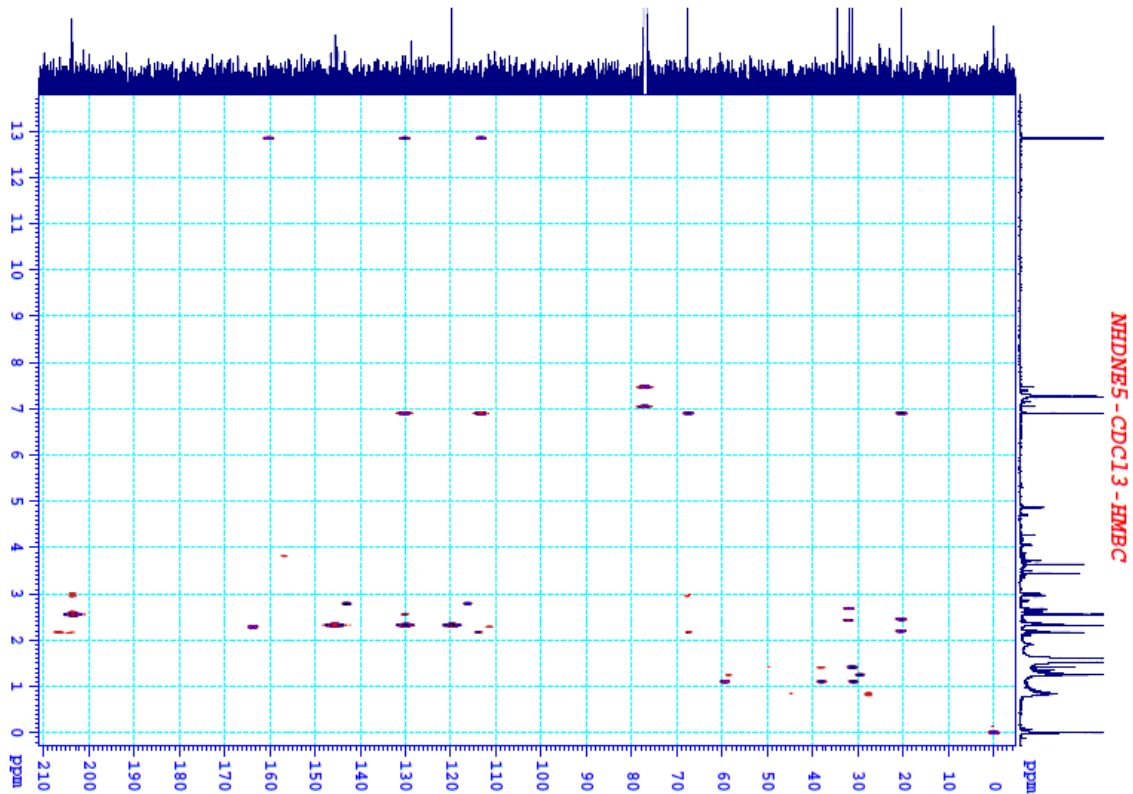
Hình 4.3. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất **DN1**



Hình 4.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) của hợp chất DN1

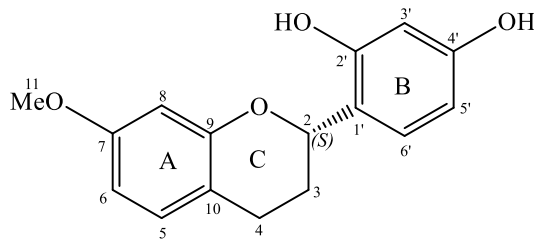


Hình 4.5. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) của hợp chất DN1



Hình 4.6. Phổ HMBC của hợp chất DN1

❖ Hợp chất (2*S*) -2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (DN2)



Hình 4.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN2

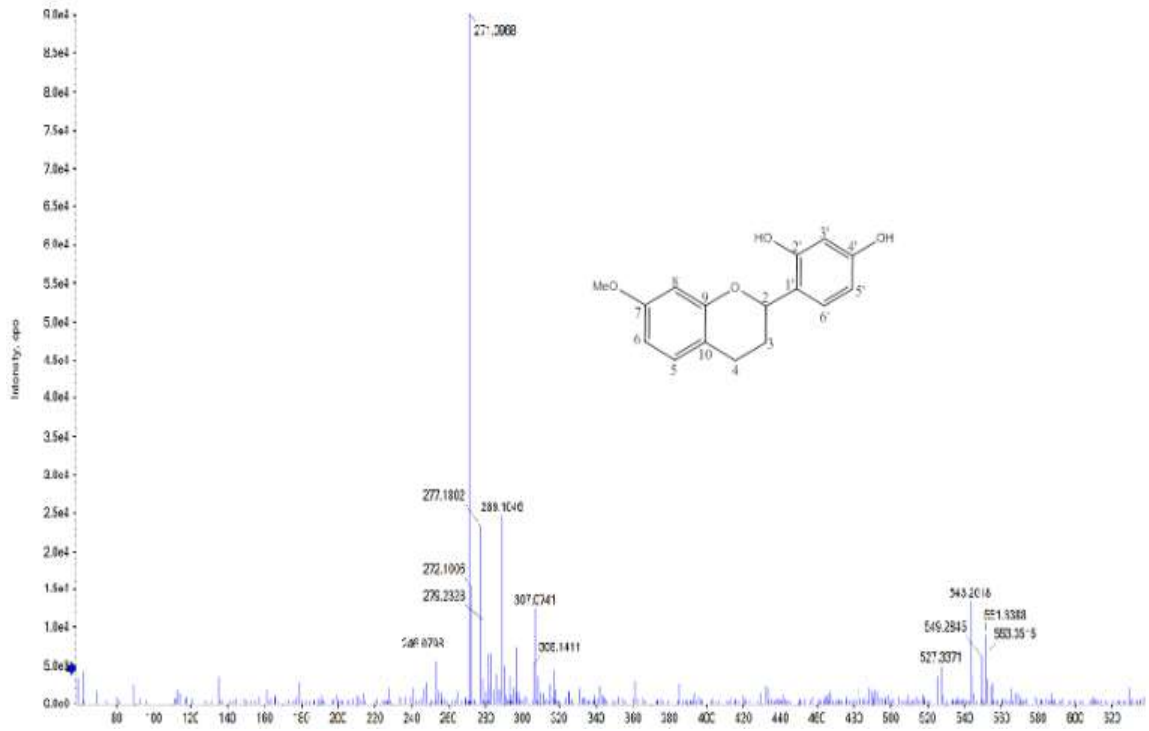
Hợp chất **DN2** có góc quay cực là $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$ (CH_3OH , $c = 0,1$), được phân lập ở dạng lỏng màu vàng. CTPT của **DN2** được xác định là $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$, dựa trên pic ion giả phân tử ở m/z 271,0976 $[\text{M}-\text{H}]^-$ trong phổ HR-ESI-MS (tính toán $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4$, 271,0970). Phổ ^1H - và ^{13}C -NMR cho thấy các tín hiệu điển hình của khung flavan, bao gồm 12 tín hiệu aromatic carbon ở δ_C 102,6–160,5; 2 nhóm methylene ở δ_C 29,9 và 25,6 và nhóm oxymethine ở δ_H 5,27 (dd, $J=10,0$; 2,5 Hz) và δ_C 74,3. Sự xuất hiện của ba tín hiệu proton thơm ở δ_H 6,96 (d, $J=8,5$ Hz, H-5), 6,44 (dd, $J=8,0$; 2,5 Hz, H-6) và 6,40 (d, $J=2,5$ Hz, H-8) đặc trưng cho hệ spin ABX. Tương tác giữa proton ở δ_H 6,33 (H-3') với δ_C 120,8 (C-1'), 156,3 (C-2'), 158,8 (C-4'), 107,6 (C-5'); giữa proton ở 7,14 (H-6') với các carbon δ_C 74,3 (C-2), 156,3 (C-2') và 158,8 (C-4') trên

phổ HMBC chứng tỏ hai nhóm hydroxy thế tại C-2' (δ_C 156,3) và C-4' (δ_C 158,8). Sự hiện diện của một nhóm methoxy được khẳng định qua các tín hiệu ở δ_H 3,75 và δ_C 55,7 ppm. Ba proton thơm ở δ_C 6,96 ppm (H-5, d, 8,5), 6,44 (H-6, dd, 8,0, 2,5) và 6,40 (H-8, d, 2,5) ở vòng A và các tương tác trên phổ HMBC giữa proton H-6 (δ_H 6,44) với các carbon C-8 (δ_C 102,6), C-10 (δ_C 115,6), C-7 (δ_C 160,5); giữa H-5 (δ_H 6,96) với C-4 (δ_C 25,6), C-9 (δ_C 157,6), C-7 (δ_C 160,5); giữa H-8 (δ_H 6,40) và C-6 (δ_C 107,9), C-10 (δ_C 115,6), C-9 (δ_C 157,6), C-7 (δ_C 160,5); và giữa proton methoxy (δ_H 3,75) và C-7 (δ_C 160,5) khẳng định vòng A có nhóm methoxy ở C-7 (Hình 4.11). Các flavan đơn giản thường có góc quay cực âm nếu chúng có cấu hình tuyệt đối 2S [87]. Chất (2S)-3',4'-dihydroxy-7-methoxy flavan đã được phân lập từ củ *Crinum bulbispermum* [88] và *Bauhinia manca* [89] có $[\alpha]_D^{25} = -16,7^\circ$ (CH₃OH, $c = 0,7$). Chất **DN2** chỉ khác chất trên ở vị trí của nhóm hydroxy thứ hai và có cùng góc quay cực âm ($[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$ (CH₃OH, $c = 0,1$)). Do vậy, cấu hình của C-2 là S. Từ việc phân tích phổ trên, cấu trúc của **DN2** được xác định là (2S)-2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan, một hợp chất mới.

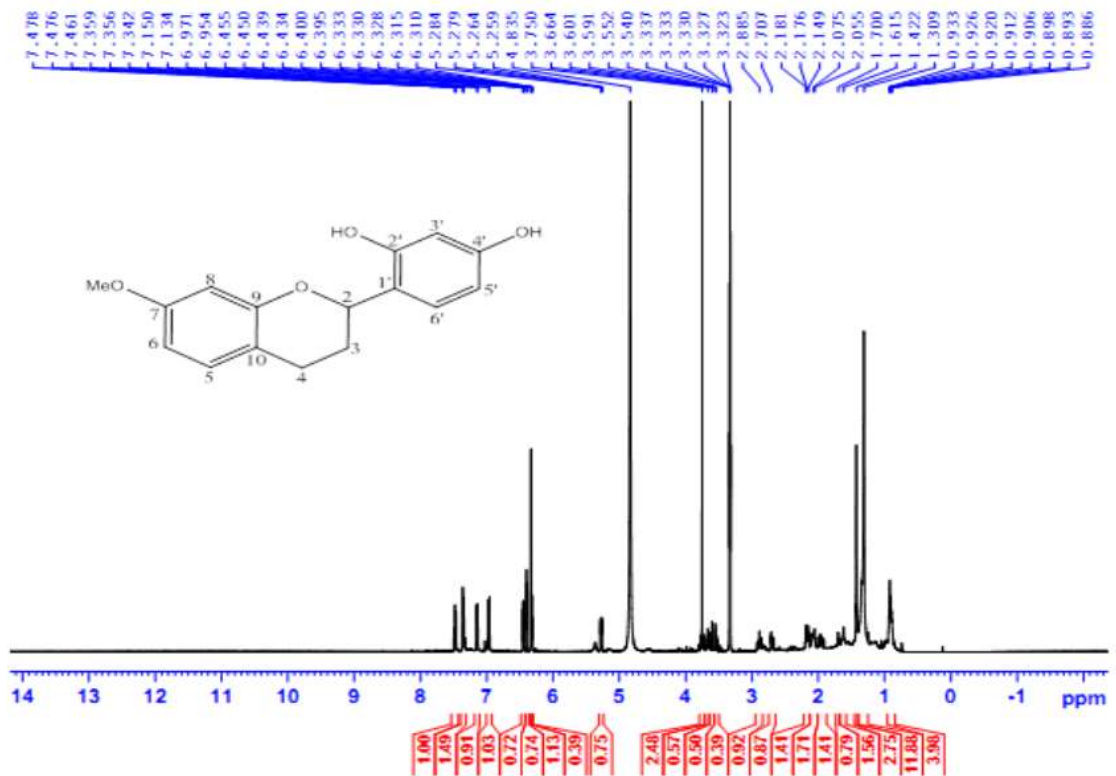
Bảng 4.2. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR và HMBC của hợp chất **DN2**

C	δ_C^a	δ_H^b	HMBC (H/C)
2	74,3 CH	5,27, dd (2,5, 10,0) 1H	C-4, C-1', C-6', C-9
3	29,9 CH ₂	2,17, m, 1H 1,96, m, 1H	C-4, C-2
4	25,6 CH ₂	2,88, m, 1H 2,69, m, 1H	C-3, C-2, C-10, C-5, C-9
5	130,9 CH	6,96, d (8,5) 1H	C-4, C-9, C-7
6	107,9 CH	6,44, dd (2,5, 8,0) 1H	C-8, C-10, C-7
7	160,5 C		
8	102,6 CH	6,40, d (2,5) 1H	C-6, C-10, C-9, C-7
9	157,6 C		
10	115,6 C		
MeO-7	55,7 CH ₃	3,75, s, 3H	C-7
1'	120,8 C		
2'	156,3 C		
3'	103,4 CH	6,33, d (2,5) 1H	C-1', C-2', C-4', C-5'
4'	158,8 C		
5'	107,6 CH	6,32, dd (2,5, 8,0) 1H	C-1', C-3', C-4'
6'	128,3 CH	7,14, d (8,0) 1H	C-2, C3' (w), C-2', C4'

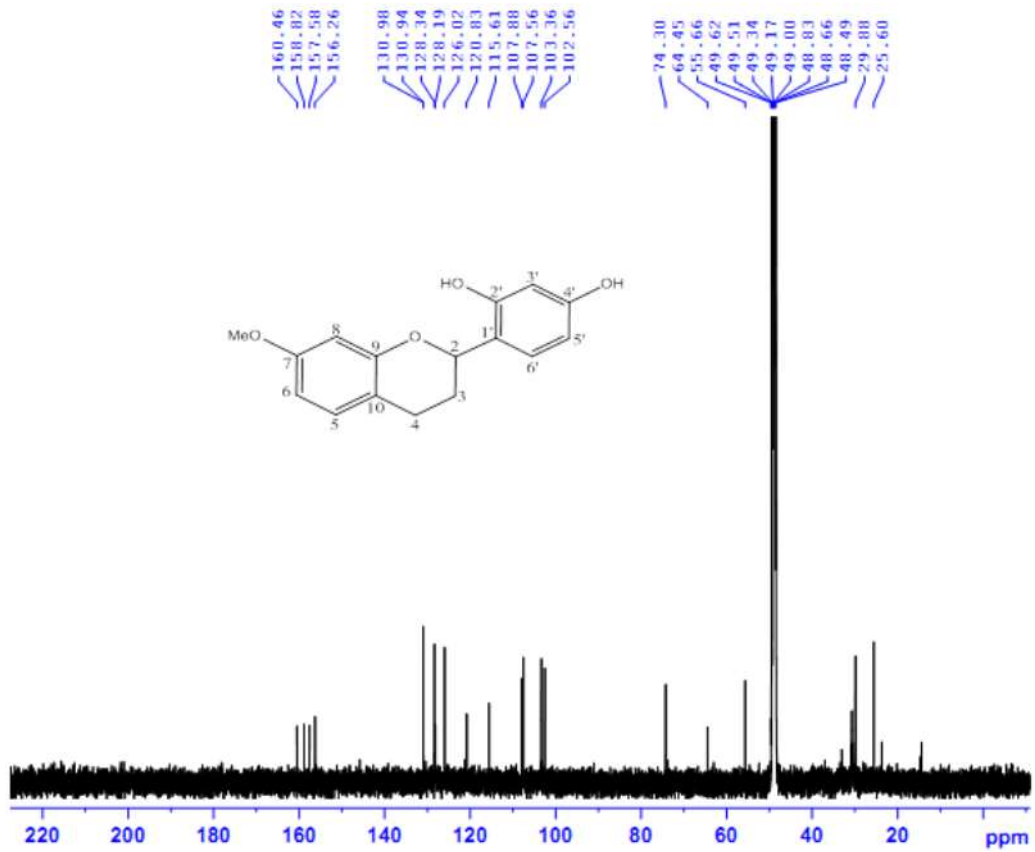
a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD



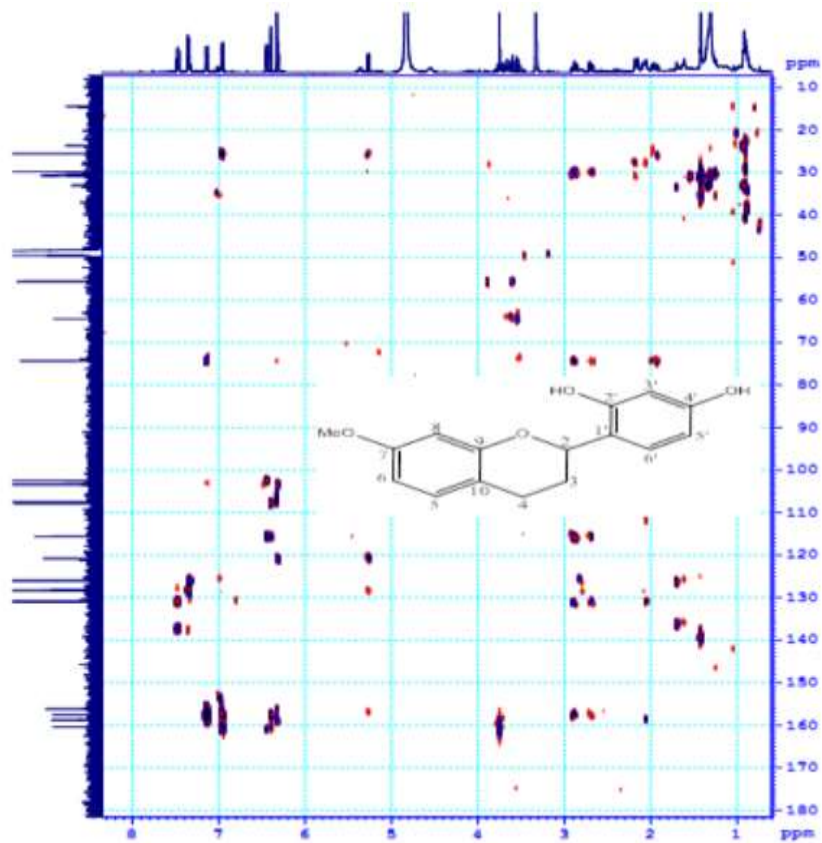
Hình 4.8. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất DN2



Hình 4.9. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất DN2

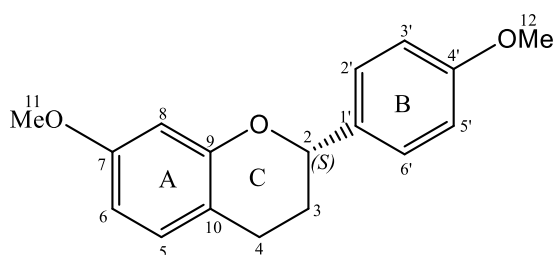


Hình 4.10. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất DN2



Hình 4.11. Phổ HMBC của hợp chất DN2

❖ Hợp chất (2*S*)-7,4'-dimethoxyflavan (**DN3**)



Hình 4.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN3**

Hợp chất **DN3** thu được ở dạng rắn màu trắng. Phổ NMR của chất **DN3** có các tín hiệu đặc trưng cho cấu trúc khung flavan với sự hiện diện của 2 vòng thơm A và B, bao gồm 12 tín hiệu carbon thơm ở δ_C 101,6 -159,1. Vòng C có một proton oxymethine ở δ_H 4,98 (H-2, dd, $J=2,0; 10,0$ Hz; δ_C 77,7) và 2 nhóm methylen ở δ_H 2,15 và 2,10 (H-3, m; δ_C 30,0), và δ_H 2,91 và 2,74 (H-4, m; δ_C 24,6). Sự xuất hiện của ba tín hiệu proton thơm ở δ_H 6,97 (d, $J=8,5$ Hz, H-5), 6,48 (dd, $J=8,0; 2,5$ Hz, H-6) và 6,46 (s, H-8) đặc trưng cho hệ spin ABX. Ngoài ra, sự xuất hiện tín hiệu methyl singlet ở δ_H 3,76 và 3,81 (CH₃, s) trên phổ ¹H-NMR, và carbon ở δ_C 55,3/55,4 trên phổ ¹³C-NMR chứng tỏ sự hiện diện của hai nhóm thế methoxy. Vị trí của hai nhóm methoxy lần lượt gắn ở C-7 và C-4' được xác định dựa trên tương tác giữa proton ở δ_H 3,82 (H-11) với carbon δ_C 159,1 (C-7); giữa proton δ_H 3,76 ppm (H-12) với carbon δ_C 159,4 (C-4') trong phổ HMBC. Chất **DN3** có góc quay cực $[\alpha]_D^{25} = -17$ (CHCl₃, c 0,1). Từ việc phân tích dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu [90], đã xác định được chất **DN3** là (2*S*)-7,4'-dimethoxyflavan. Đây là lần đầu tiên chất này được phân lập từ nguồn thực vật và được coi là chất mới.

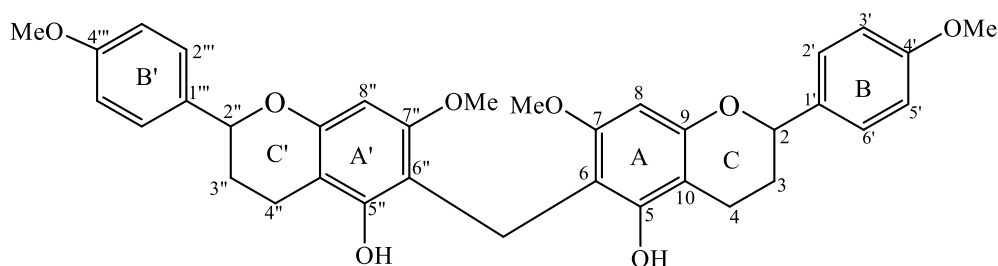
Bảng 4.3. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **DN3** và 7,4'-dimethoxyflavan

C	DN3		7,4'-Dimethoxyflavan ^[90]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^a	δ_H^b
1		-		-
2	77,7 CH	4,98, dd (2,0, 10,0) 1H	77,7	5,02, dd (2,43, 10,23)
3	30,0 CH ₂	2,15, m, 1H 2,10, m, 1H	30,0	2,14, m, 1H 2,10, m, 1H
4	24,6 CH ₂	2,91, m, 1H 2,74, m, 1H	24,6	2,94, m, 1H 2,77, ddd, (16,08, 5,19, 3,14)
5	129,9 CH	6,97, d (8,5) 1H	130,0	7,01, m
6	107,4 CH	6,48, d (2,5)	107,4	6,52, m

7	159,1 C	-	159,1	-
8	101,6 CH	6,46, s, 1H	101,6	6,50, m
9	155,9 C	-	156,0	-
10	113,9 C	-	113,9	-
1'	133,8 C	-	133,8	-
2', 6'	127,4	7,34, d (8,0) 2H	127,4	7,38, d (8,48)
3', 5'	114,0	6,92, d (8,0) 2H	114,0	6,93, m
4'	159,0 C	-	159,4	-
11	55,3 CH ₃	3,82, s, 3H	55,3	3,85, s, 3H
12	55,3 CH ₃	3,76, s, 3H	55,4	3,79, s, 3H

a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃

❖ *Hợp chất diaensi-biflavan (5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-(6,6''-metylen)-biflavan) (DN4)*



Hình 4.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN4**

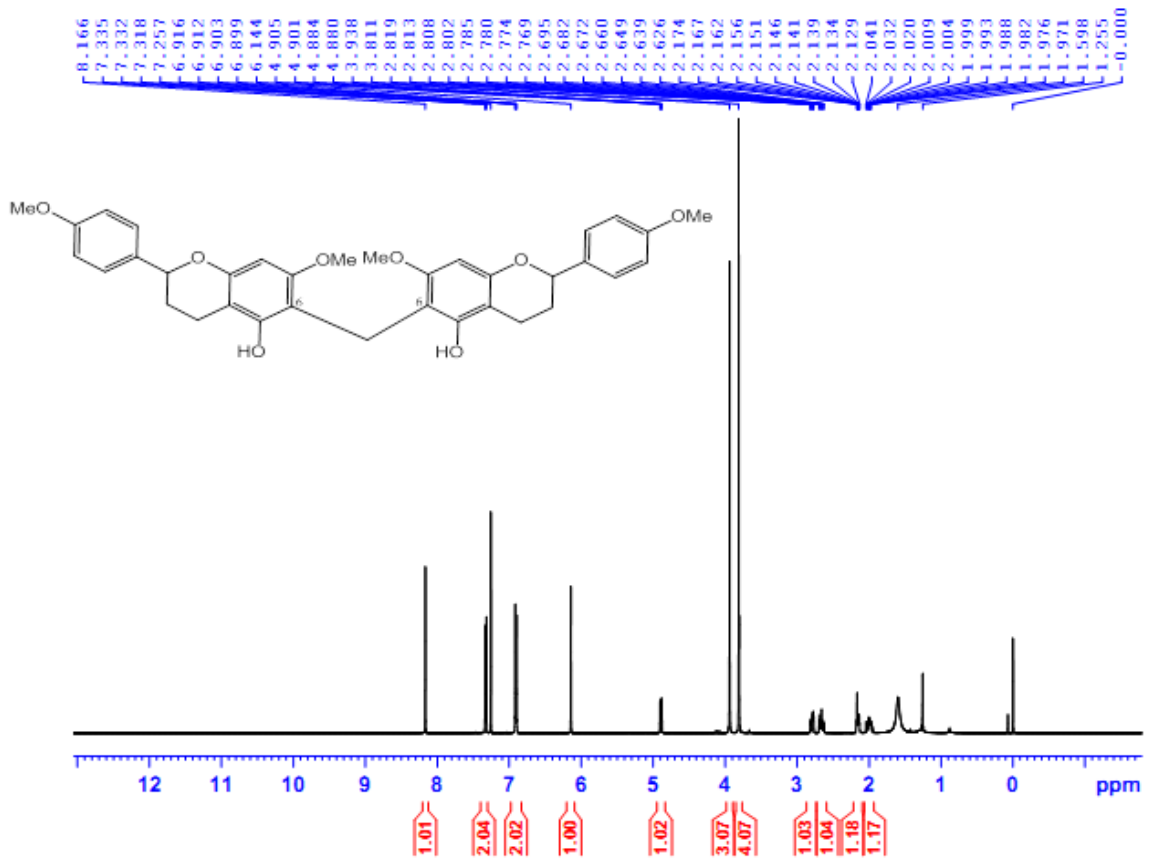
Hợp chất **DN4** thu được ở dạng bột màu trắng, có góc quay cực $[\alpha]_D^{25} = +29$ (CHCl₃, *c* 0,1). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR cho thấy các tín hiệu điển hình của khung biflavan qua cầu nối methylen (C₁₇H₁₈O₄), và tín hiệu của một nhóm methylene ở δ_H 3,80 và δ_C 16,2. Trên phổ ¹³C-NMR có tín hiệu carbon thơm của 2 vòng thơm A và B xuất hiện ở δ_C 92,0 đến 159,3. Vòng C có một tín hiệu oxymethine ở δ_H 4,89 (H-2, dd, 2,0, 10,0; δ_C 77,7) và 2 nhóm methylene ở δ_H 2,15 và 1,99 (H₂-3, m; δ_C 29,5), và ở δ_H 2,79 và 2,66 (H₂-4, m; δ_C 19,8). Hai cặp doublet ở δ_H 7,33 (H-2'/H-6', dd, 2,0; 8,0) và 6,91 (H-3'/H-5', dd, 2,0; 8,0) đặc trưng cho nhân benzen có nhóm thế ở C-1' và C-4'. Sự hiện diện của nhóm hydroxy (δ_H 8,17) và hai nhóm methoxy của mỗi đơn vị được khẳng định bằng các tín hiệu ở δ_H 3,81 (δ_C 56,1) và δ_H 3,94 (δ_C 55,3). CTPT của **DN4** được xác định là C₃₅H₃₆O₈ qua pic ion giả phân tử ở *m/z* 585,2477 [M + H]⁺ (tính toán [C₃₅H₃₇O₈]⁺, 585,2483) trong phổ (+)-HR-ESI-MS. Từ dữ liệu phổ MS và NMR cho thấy chất **DN4** bao gồm hai đơn vị flavan giống nhau được liên kết với nhau qua cầu nối là nhóm methylen.

Cấu trúc của mỗi đơn vị được khẳng định là 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy flavan dựa trên các liên kết giữa proton H-8 (δ_H 6,14) và C-6 (δ_C 106,0), C-7 (δ_C 155,1), C-9 (δ_C 154,5), C-10 (δ_C 104,2); giữa proton OH-8 (δ_H 8,17) và C-5 (δ_C 154,1), C-6 (δ_C 106,0), C-10 (δ_C 104,2); giữa H-4 (δ_H 2,66) và C-3 (δ_C 29,5), C-5 (δ_C 154,1), C-10 (δ_C 104,2); và giữa H-2 (δ_H 4,89) và C-4 (δ_C 19,8), C-10 (δ_C 133,8), C-2', C-6' (δ_C 127,4) trong phổ HMBC. Hai đơn vị flavan kết nối ở C-6 thông qua một nhóm methylene được xác định dựa trên tương tác của CH₂ (δ_H 3,80) với C-5 (δ_C 154,1), C-6 (δ_C 106,0) và C-7 (δ_C 155,1) trong phổ HMBC. Từ việc phân tích phổ trên, cấu trúc của chất **DN4** được xác định là 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-(6,6''-metylen)-biflavan, một chất mới, được đặt tên là diaensi-biflavan.

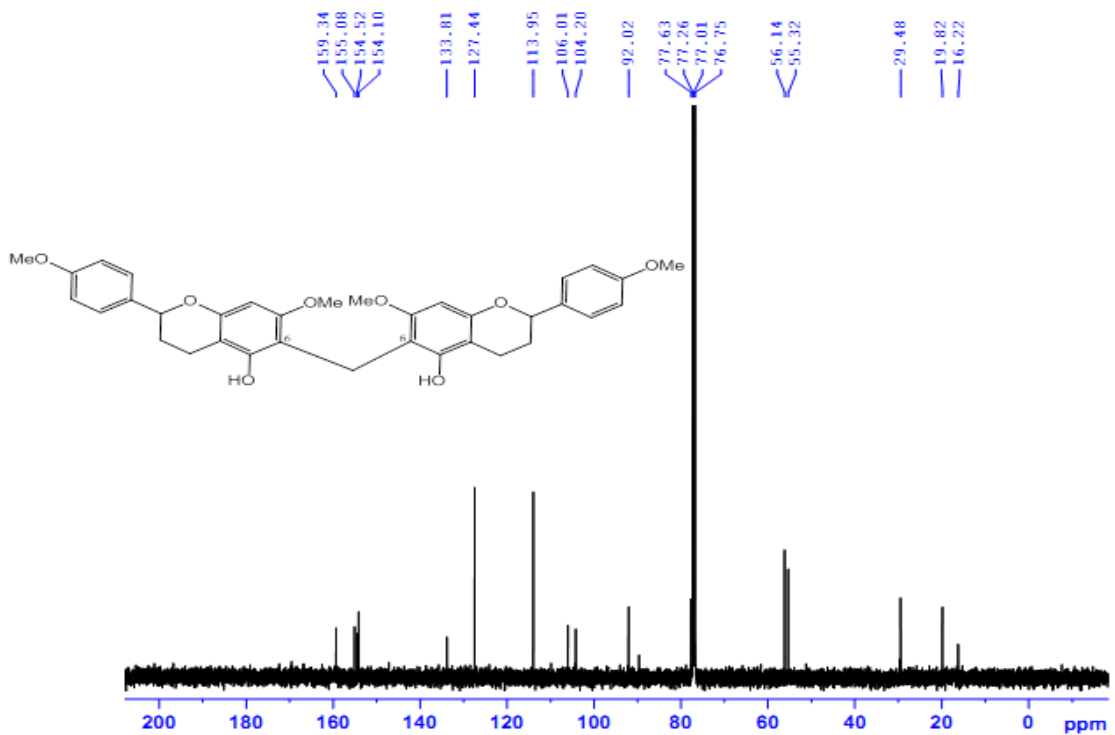
Bảng 4.4. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **DN4** và 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy flavan

C	DN4		5-hydroxy-7,4'- dimethoxy flavan ^[91]
	δ_C^a	δ_H^b	δ_H^c
2	77,6 CH	4,89, dd (2,0, 10,0) 1H	4,91 dd (2,5, 10)
3	29,5 CH ₂	2,15, m, 1H; 1,99, m, 1H	2,15 m; 2,00 m
4	19,8 CH ₂	2,79, m, 1H; 2,66, m, 1H	2,75 m; 2,00 m
5	154,1 C	-	
6	106,0 C	-	
7	155,1 C	-	
8	92,0 CH	6,14, s, 1H	6,10 d (2,3)
9	154,5 C	-	
10	104,2 C	-	
1'	133,8 C	-	
2'	127,4 CH (x2)	7,33, dd (2,0, 8,0) 2H	7,30 d (8,7)
3'	113,9 CH (x2)	6,91, dd (2,0, 8,0) 2H	6,84 d (8,4)
4'	159,3 C	-	
5'	113,9 CH (x2)	6,91, dd (2,0, 8,0) 2H	6,84 d (8,4)
6'	127,4 CH (x2)	7,33, dd (2,0, 8,0) 2H	7,30 d (8,7)
5-OH	-	8,17, s, 1H	
7-OMe	55,3 CH ₃	3,94, s, 3H	3,79 s
4'-OMe	56,1 CH ₃	3,81, s, 3H	3,75 s
CH ₂	16,2 CH ₂	3,80, s, 2H	

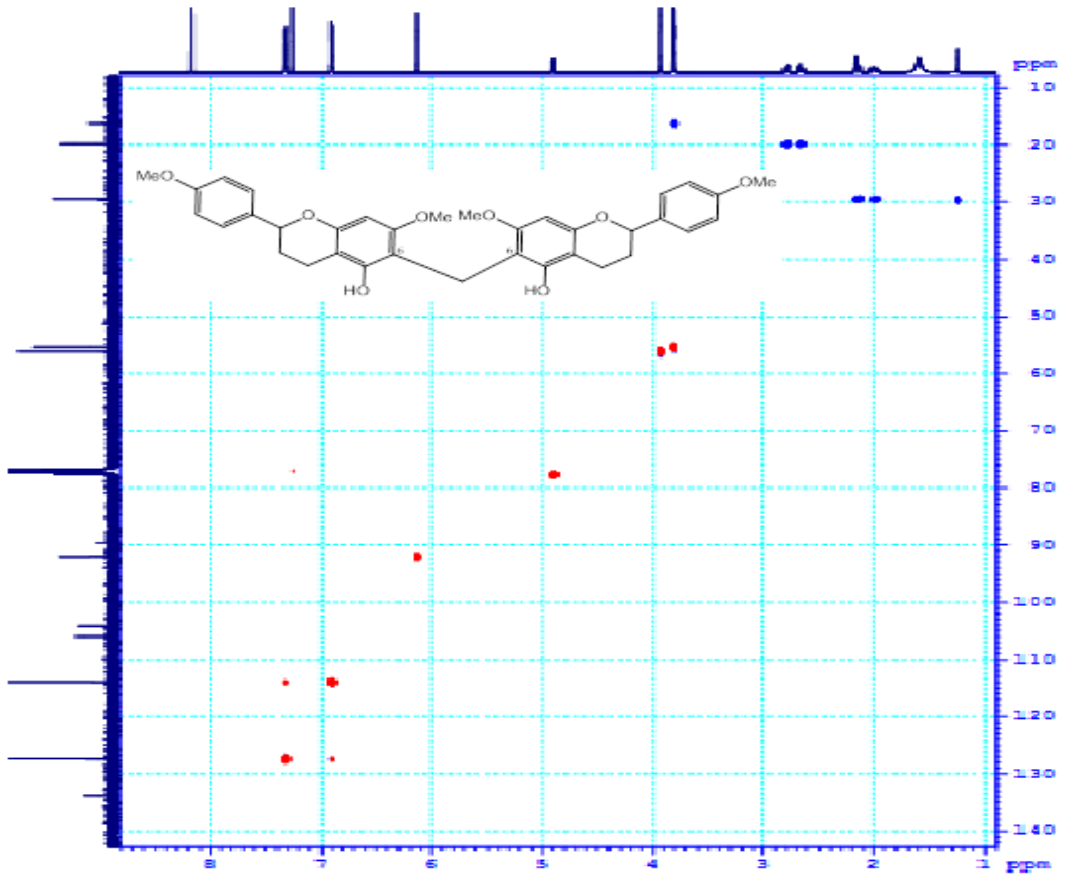
a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃; c: 200 MHz, CDCl₃, 50 MHz, CDCl₃



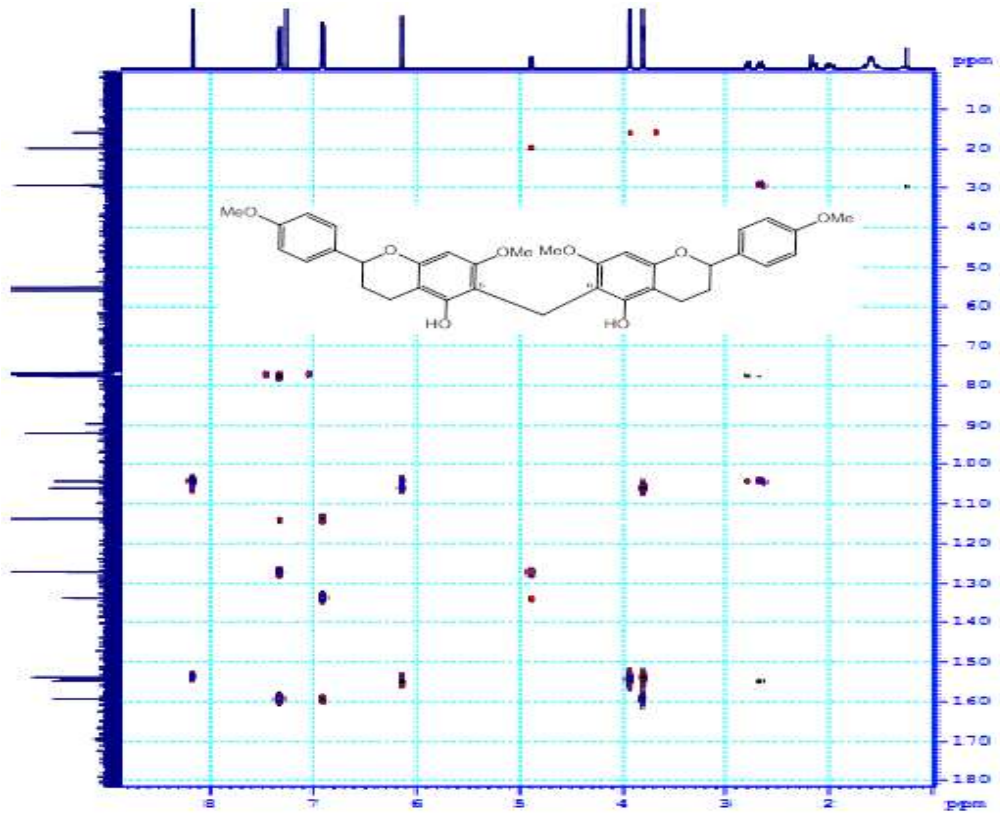
Hình 4.14. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) của hợp chất DN4



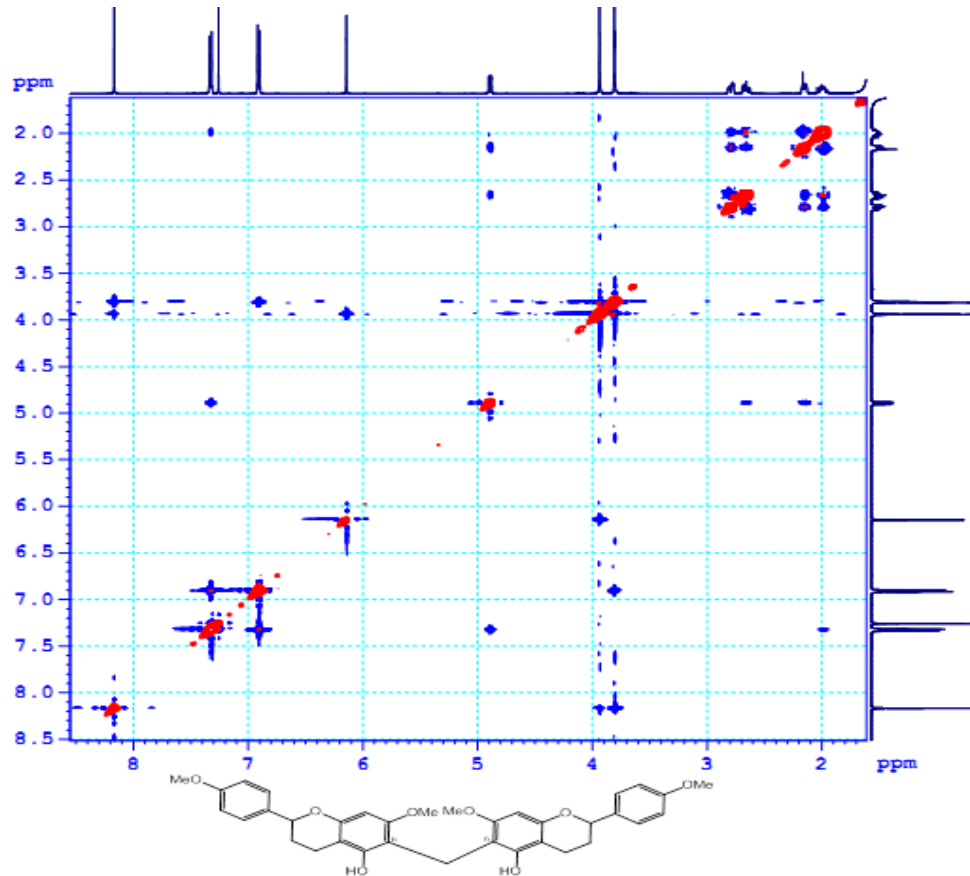
Hình 4.15. Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) hợp chất DN4



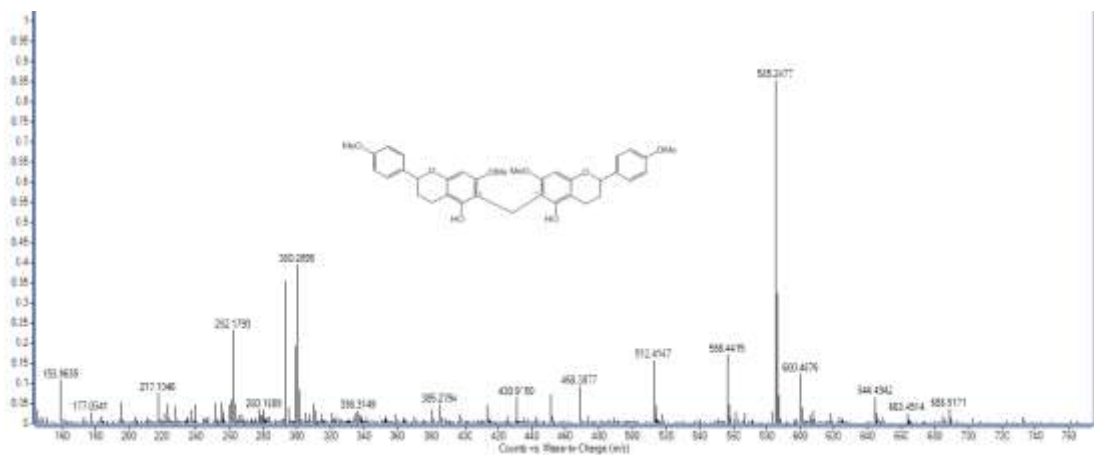
Hình 4.16. Phổ HSQC của hợp chất DN4



Hình 4.17. Phổ HMBC của hợp chất DN4



Hình 4.18. Phổ NOESY của hợp chất **DN4**

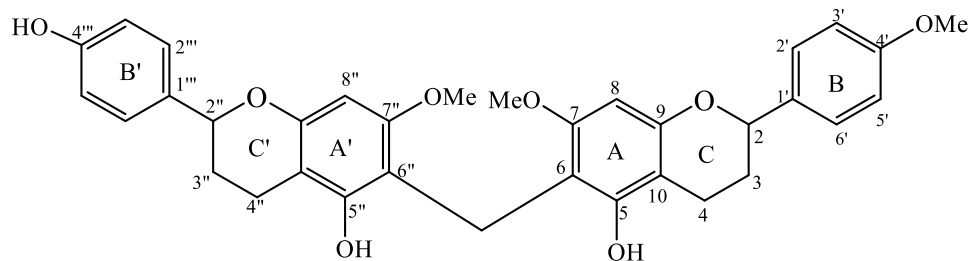


Hình 4.19. Phổ khối (+)-HR ESI MS của hợp chất **DN4**

❖ Hợp chất *diaensi-biflavan A* (5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6,6''-methylene-(5'',4''-dihydroxy-7''-methoxy) flavane) (**DN5**)

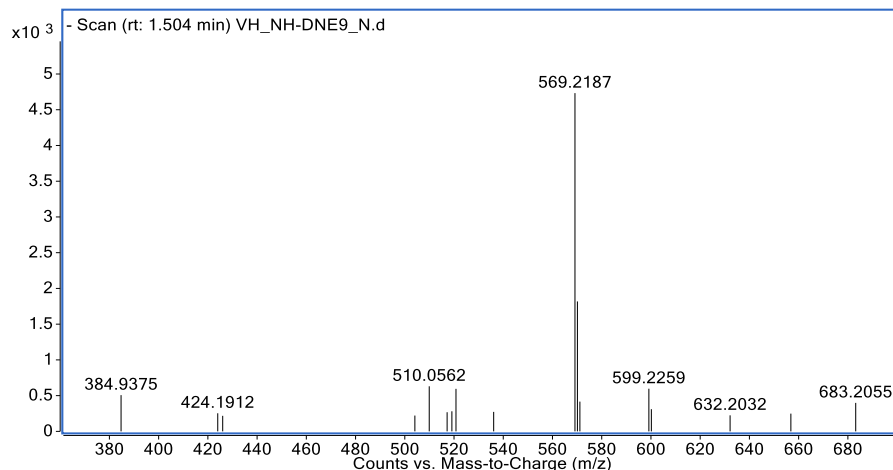
Hợp chất **DN5** được phân lập ở dạng bột màu trắng. So sánh phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của chất **DN5** với **DN4**, cho thấy các tín hiệu khá giống nhau, chỉ khác chất **DN5** có ít hơn một nhóm methoxy và không đối xứng hoàn toàn. Điều này được khẳng định qua pic ion giả phân tử ở m/z 569,2187 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (tính toán $[\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{O}_8]^-$, 569,2181) trong

phổ khối (-)-HR-ESI-MS, và nhỏ hơn 14 đơn vị so với **DN4**. Kết hợp dữ liệu phổ MS và ^1H - và ^{13}C -NMR gợi ý cho thấy chất này là một biflavan cho có CTPT là $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_8$. Phổ ^1H -NMR có hai hệ spin AA'BB' có các cặp hằng số tương tác giống nhau ở δ_{H} 7,32 (2H, d, $J=9$ Hz, H-2', H-6') và 6,91 (2H, dd, $J=2,0, 7,0$ Hz, H-3', H-5') và δ_{H} 7,27 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2''', H-6''') và 6,82 (2H, dd, $J=2,0, 7,0$ Hz, H-3''', H-5''') cho thấy hai vòng B/B' có nhóm thế ở C-4'.

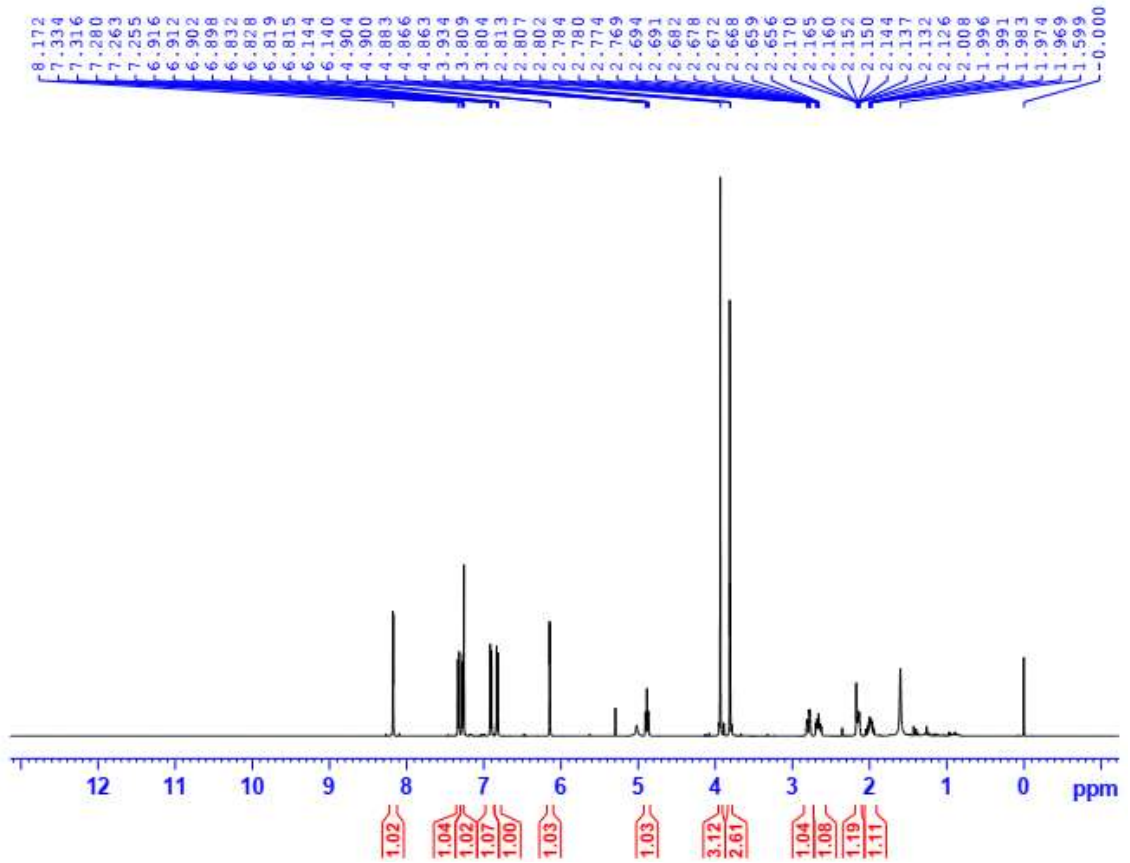


Hình 4.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN5**

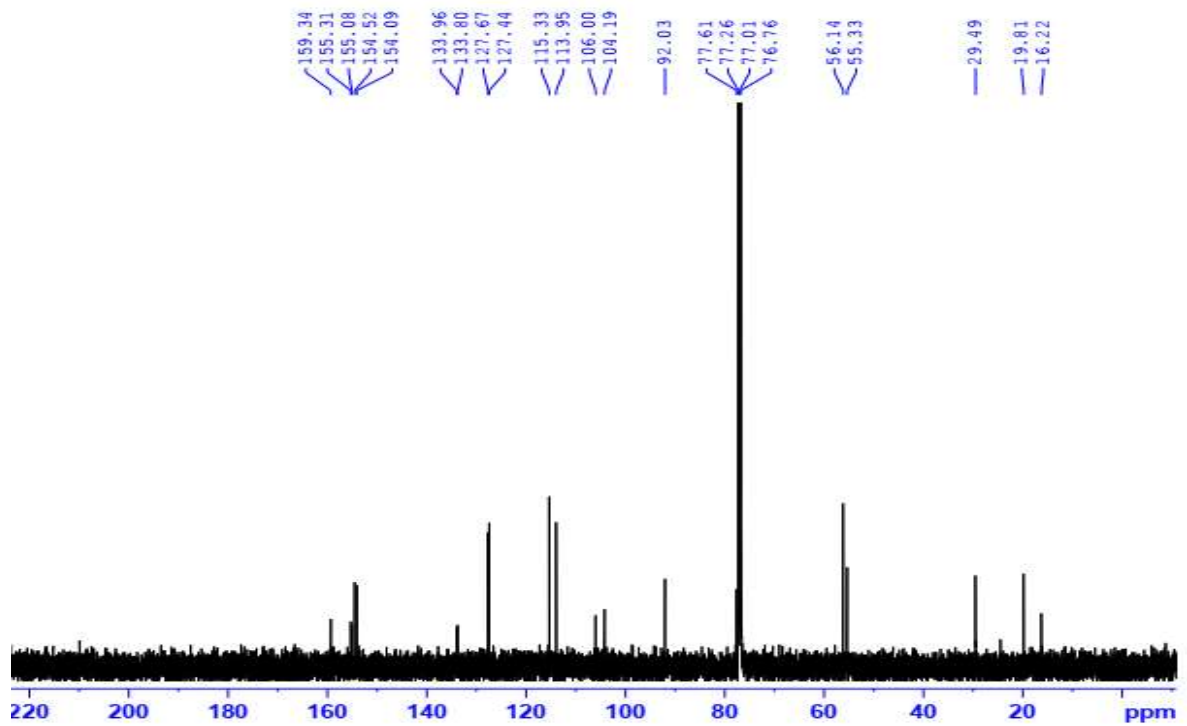
Tương tác HMBC giữa các proton methoxy (δ_{H} 3,93) và C-7 (δ_{C} 155,1) cho biết nhóm OMe gắn ở C-7. Ngoài ra, tương tác của hai nhóm methoxy ở δ_{H} 3,93 với C-7 (δ_{C} 155,1) và nhóm còn lại δ_{H} 3,81 (δ_{C} 56,1) với C-4' (δ_{C} 159,3) cho thấy có nhóm methoxy gắn ở C-7, C-4', suy ra nhóm hydroxy gắn ở C-4'''. Dữ liệu một đơn vị flavan phù hợp với phổ của 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavan, trong khi đơn vị flavan thứ hai là 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavan [92]. Tương quan HMBC giữa các tín hiệu tại δ_{H} 3,81 (s, CH_2), δ_{C} 154,5 (C-5), 106,0 (C-6) và δ_{C} 155,1 (C-7) cho thấy hai phân tử flavan liên kết với nhau qua nhóm methylen (C6- CH_2 -C6''). Như vậy cấu trúc của **DN5** được xác định là 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6,6''-metylen-(5'',4'''-dihydroxy-7''-methoxy) flavane, một biflavan mới, được đặt tên là diaensi-biflavan A. Cấu hình tuyệt đối **DN4** và **DN5** chưa xác định được.



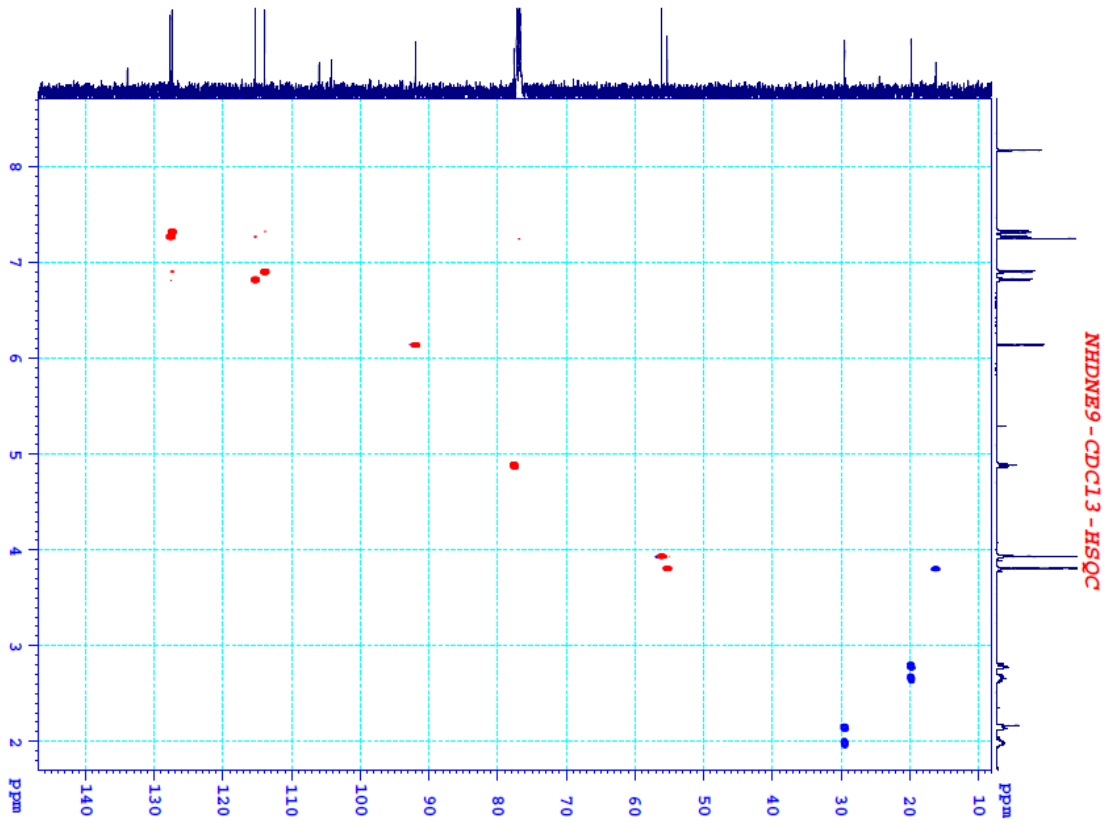
Hình 4.21. Phổ khối (-)-HR-ESI-MS của hợp chất **DN5**



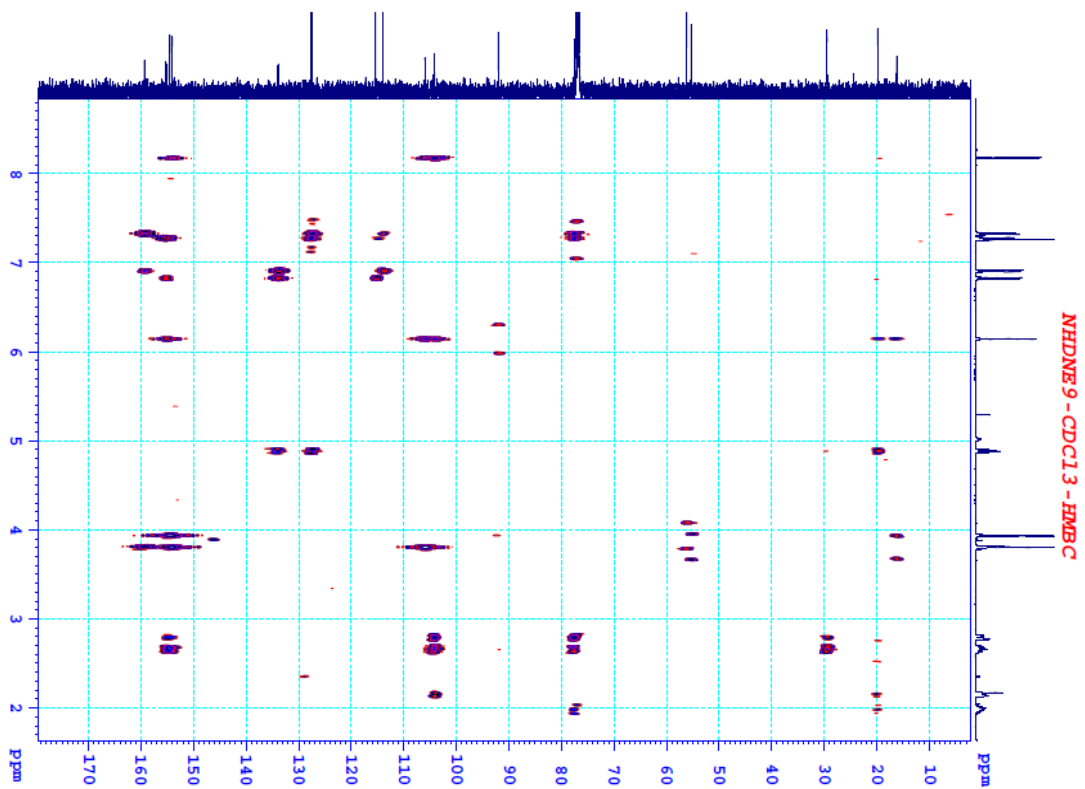
Hình 4.22. Phổ ^1H -NMR (CDCl_3 , 500MHz) của hợp chất **DN5**



Hình 4.23. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125MHz) của hợp chất **DN5**



Hình 4.24. Phổ HSQC của hợp chất DN5



Hình 4.25. Phổ HMBC của hợp chất DN5

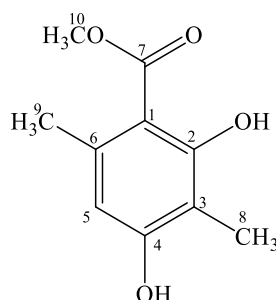
Bảng 4.5. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của chất DN5 và DN4

C	DN5			DN4		
	δ^a	δ_H^b (mult.)	HMBC (H→C)	δ^a	δ_H^b (mult.)	HMBC (H→C)
2/2"	77,6 CH	4,88, dt (2,0, 5,0)	H-2→ C-1'/ C-2'/ C-4	77,6 CH	4,89, dd (2,0, 10,0)	H-2→ C-1'/ C-2'/ C-4
3/3"	29,5 CH ₂	2,15 m 1,99 m		29,5 CH ₂	2,15 m 1,99 m	
4/4"	19,8 CH ₂	2,80 m 2,66 m	H-4a→ C-3/ C-10/ C-9 H-4b→ C-2/ C-10	19,8 CH ₂	2,79 m 2,66 m	H-4a→ C-3/ C-10/ C-9 H-4b→ C-2/ C-10
5/5"	154,1 C	-		154,1 C		-
6/6"	106,0 C	-		106,0 C	-	-
7/7"	155,1 C			155,1 C	-	-
8/8"	92,0 CH	6,140 s 6,144 s	H-8→ C-7/ C-9/ C-6/ C-10	92,0 CH	6,14 s	H-8→ C-7/ C-9/ C-6/ C-10
9/9"	154,5 C	-		154,5 C	-	
10/10'	104,2 C	-		104,2 C	-	
1' 1'''	133,8 C 134,0 C	-		133,8 C	-	
2'	127,4 CH	7,32, d (9,0)	H-2'→ C-4'/ C-2	127,4 (CH x2)	7,33, dd (2,0, 8,0)	H-2'→ C-4'/ C-2
2'''	127,7 CH	7,27, d (8,5)	H-2'''→ C-3'''/C-6'''			
3'	113,9 CH	6,91, dd (2,0, 7,0)	H-3'→ C-4'/ C-1'/C-5'	113,9 (CH x2)	6,91, dd (2,0, 8,0)	H-3'→ C-4'/ C-1'
3'''	115,3 CH	6,82, dd (2,0, 7,0)	H-3'''→C-1'''/C-5'''			
4/4'''	159,3 C	-	-	159,3 C	-	-
5'	113,9 CH	6,91, dd (2,0, 7,0)	-	113,9 (CH x2)	6,91, dd (2,0, 8,0)	-
5'''	115,3 CH	6,82, dd (2,0, 7,0)				

6'	127,4 CH	7,32, dd (2,0, 7,0)				
6'''	127,7 CH	7,27, dd (2,0, 7,0)	-	127,4 (CH x2)	7,33, dd (2,0, 8,0)	-
7- OMe/ 7''- OMe	56,1 CH ₃	3,93 s	OMe → C- 5/ C-6/ C-7	55,3 CH ₃	3,94 s	OMe → C-7
5- OH/5' '-OH	-	8,17 s 8,18 s	OH → C-6/ C-10	-	8,17 s	OH → C-5/ C-10/C-6
4'- OMe	55,3 CH ₃	3,81 s		56,1 CH ₃	3,81 s	OMe → C-4'
CH ₂	16,2 CH ₂	3,80 s	CH ₂ → C- 5/ C-6/ C-7	16,2 CH ₂	3,80 s	CH ₂ → C-5/ C-7/C-6

a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃

❖ Hợp chất methyl β -orcinolcarboxylate (**DN6**)



Hình 4.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN6**

Công thức phân tử của chất **DN6** là C₁₀H₁₂O₄ được xác định qua pic ion giả phân tử m/z 197,09 [M+H]⁺ trong phổ khối ESI-MS (positive ions) kết hợp với các dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR. Phổ ¹H-NMR của chất **DN6** chỉ có tín hiệu một proton thơm (δ_H 6,23) và 3 methyl singlet (δ_H 2,02; 2,44 và 3,91, mỗi tín hiệu 3H, s). Phổ ¹³C-NMR xuất hiện mười tín hiệu carbon (6xCq, 1 CH, 3xCH₃), có một nhóm carbonyl (δ_C 174,0), sáu carbon thơm ở δ_C 105,5-164,2 ppm, một nhóm methoxy ở δ_C 52,0 và hai nhóm methyl ở δ_C 7,9 (3-CH₃) và 24,3 (6-CH₃). Tương tác xa của tín hiệu methyl ở δ_H 2,02 (H₃, s, H-9) với C-3 (δ_C 109,9), C-2 (δ_C 161,5); và δ_H 2,44 (3H, s) với C-8 (δ_C 7,9), C-1 (δ_C 105,5), C-5 (δ_C 111,6), C-6 (δ_C 140,9) trên phổ HMBC cho thấy hai nhóm methyl gắn với vòng thơm ở C-3 và C-6. Proton của nhóm methoxy (δ_H 3,91, s, 3H) có tương tác với C-7 và H-5 (δ_H 6,23) với C-1, C-3, C-9 cho phép khẳng định các nhóm thế còn lại. Kết hợp dữ liệu phổ MS, ¹H-, ¹³C-NMR và so

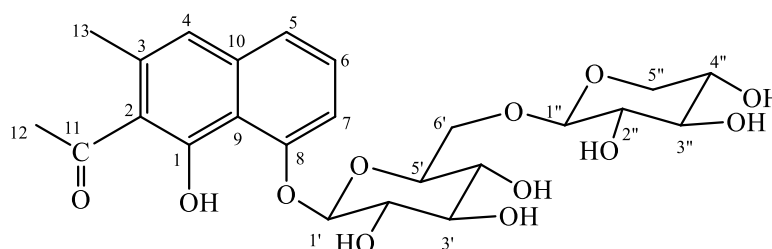
sánh với dữ liệu đã công bố [93], cấu trúc của chất **DN6** được xác định được là methyl β -orcinolcarboxylate. Theo Karunaratne 2014, chất này có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với giá trị $IC_{50} = 140 \pm 0,6 \mu M$, trong khi đó chất đối chiếu acarbose có $IC_{50} = 700 \pm 10,4 \mu M$ [94]. Ngoài ra methyl β -orcinolcarboxylate còn có khả năng kháng nấm đối với các chủng *Trichophyton longifusus*, *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis*, *Candida glabrata*, *Fusarium solami*. Tuy nhiên chất này có tính độc khi thử nghiệm trên tôm có giá trị $LD_{50} = 17,07 \mu g/mL$, so với chất đối chứng etoposide $LD_{50} = 7,43 \mu g/mL$ [95].

Bảng 4.6. Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của **DN6** và chất so sánh

C	DN6		Methyl β -orcinolcarboxylate [93]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	105,5	-	105,2	-
2	161,5	-	158,1	-
3	109,9	-	108,6	-
4	164,2	-	163,1	-
5	111,6	6,23 s	110,6	6,21, s
6	140,9	-	140,1	-
8	7,9	2,02 s	7,6	2,11, s
9	24,3	2,44 s	24,1	2,46, s
7-OCH ₃	52,0	3,91 s	51,8	3,93, s
C=O	174,0		172,6	

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD; c: 150 MHz, CDCl₃; d: 600 MHz, CDCl₃

❖ Hợp chất dianellose (**DN7**)



Hình 4.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN7**

Hợp chất **DN7** thu được ở dạng vô định hình màu vàng. Kết hợp số liệu phổ ^{13}C -NMR và phổ HSQC cho thấy chất **DN7** có tín hiệu của 24 carbon, bao gồm 7 carbon bậc 4, có mặt của một carbon nhóm keton tại δ_C 208,3 và 6 carbon không liên

kết với hidro của vòng thơm; 13 nhóm methine (CH); 2 nhóm methylene (CH₂) và 2 nhóm methyl (CH₃). Kết hợp phổ ¹H- và ¹³C-NMR cho thấy chất này có 4 nhóm methine vòng thơm tại δ_H 7,43 (1H, m, H-5), 7,42 (1H, m, H-6), 7,41 (1H, m, H-7) và 7,17 (1H, s, H-4). CTPT của chất **DN7** là C₂₄H₃₀O₁₂ được xác định bằng dữ liệu phổ khối ESI-MS (m/z 511,08 [M+H]⁺) kết hợp với các dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR. Nhóm methyl gắn với vòng thơm tại δ_H 2,33 (3H, s, H-13)/ δ_C 19,9 và một nhóm ketone (δ_C 208,3) liên kết với nhóm methyl (δ_H 2,62, H-12)/ δ_C 32,4. Tín hiệu tại δ_C 152,8 là carbon vòng thơm liên kết trực tiếp với nhóm hydroxy (C-1). Phần aglycon của chất **DN7** được so sánh với giá trị phổ ¹H- và ¹³C-NMR của dianellin. Dianellose và dianellin chỉ khác nhau ở phần đường (glycone). Dianellin gồm một đường β -D-glucopyranose và một đường α -L-rhamnopyranose, trong khi dianellose (**DN7**) gồm một đường β -D-xylopyranose gắn với đường β -D-glucopyranose được xác định bằng các tín hiệu đặc trưng ở phổ ¹H- và ¹³C-NMR (Bảng 4.7). Bằng các số liệu phổ ¹H-, ¹³C-NMR và kết hợp so sánh với dữ liệu phổ đã công bố, cấu trúc của hợp chất **DN7** được xác định là dianellose [35]. Chất này đã được tìm thấy từ loài *D. callicarpam*, và cho đến bây giờ mới được tinh sạch từ loài Xương quạt (*D. ensifolia*). Dianellose có khả năng kìm hãm sự phát triển tế bào khối u ở mức trung bình [35].

Bảng 4.7. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **DN7** và dianellose

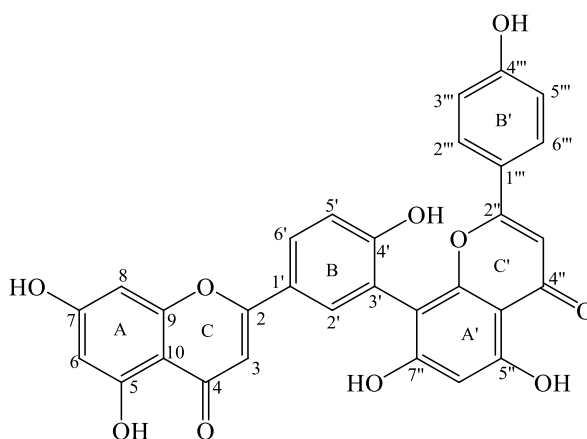
C	DN7		Dianellose ^[35]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	152,8	-	150,4	-
2	126,1	-	125,4	-
3	134,6	-	132,9	-
4	121,0	7,22, s	119,6	7,19, s
5	123,9	7,46, m	122,4	7,44, m
6	128,8	7,43, m	128,1	7,42, m
7	112,2	7,42, m	111,3	7,41, m
8	156,0	-	154,4	-
9	114,9	-	113,2	-
10	138,1	-	135,9	-
11	208,3	-	204,9	-
12	32,4	2,53, s	32,2	2,51, s
13	19,9	2,26, s	19,3	2,24, s
1'	104,2	5,04, d (9,5), 1H	102,7	5,01, d (8,5), 1H
2'	75,0	3,39, m	73,4	3,37, m
3'	78,1	3,10, m	76,6	3,08, m
4'	71,4	3,20, m	70,0	3,18, m
5'	77,9	3,33, m	76,7	3,33, m

6'a	70,0	4,04, d (10,5), 2H	68,5	4,02, d (11,0), 2H
6'b	-	3,60, m		3,59, m
1''	105,5	4,24, d (7,5), 1H	104,2	4,23, d (8,0), 1H
2''	75,0	3,01, m	73,5	3,00, m
3''	77,7	3,63, m	76,2	3,62, m
4''	71,2	3,27, m	69,7	3,27, m
5''a	66,9	2,98, m	65,8	2,97, m
5''b	-	3,68, dd (5,0, 11,0), 1H	-	3,67, dd (5,5, 11,5), 1H
1'	-	-	-	9,55, brs
2'	-	-	-	5,87, brs
3'	-	4,98, br s	-	5,02, d, (5,0), 1H
4'	-	5,26, br s	-	5,27, d (6,0), 1H
2''	-	-	-	5,08, d (4,5), 1H
3''	-	5,38, br s	-	5,29, d (4,5), 1H
4''	-	4,93, br s	-	4,96, d (5,0), 1H

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD; c: 125 MHz, DMSO-*d*₆; d: 500 MHz, DMSO-*d*₆.

❖ Hợp chất amentoflavone (DN8)

Hợp chất **DN8** dạng vô định hình, màu vàng. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR và HSQC của chất **DN8** có tín hiệu của 12 nhóm methine sp², 16 carbon bậc 4, trong đó có 2 nhóm carbonyl (δ_C 181,7 và 181,9) và 6 carbon liên kết trực tiếp với oxy (C–OH) ở vùng trường thấp. Phổ khối (+)-HR-ESI-MS của chất **DN8** có pic ion giả phân tử ở *m/z* 539,0928 [M+H]⁺ (tính toán cho công thức [C₃₀H₁₉O₁₀]⁺, 539,0973). Kết hợp dữ liệu phổ MS, ¹H- và ¹³C-NMR và HSQC, xác định được CTPT của **DN8** là C₃₀H₁₈O₁₀, và cho phép suy luận chất này là một biflavone. Sự có mặt của 12 nhóm CH thuộc vòng thơm và 2 nhóm cacbonyl liên hợp cho thấy hai đơn vị flavone liên kết với nhau qua cầu nối C-C.



Hình 4.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN8**

Cặp doublet proton ở δ_H 6,17 và 6,41 (mỗi tín hiệu d, $J=1,5$ Hz) cho thấy vòng A có 2 proton thơm ở vị trí *meta* với nhau (H-6 và H-8), trong khi vòng A' chỉ có 1 proton ở δ_H 6,29. Ba proton thơm ở vòng B có hằng số tương tác dạng ABX tại δ_H 7,07 (1H, d, $J=9,0$ Hz, H-5'); 7,96 (1H, dd, $J=2,5$ và 8,5 Hz, H-6') và 8,07 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H-2'). Cặp proton thơm đối xứng với nhau từng đôi một tại δ_H 6,67 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-3'''/H-5''') và δ_H 7,59 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2'''/H-6''') cho thấy vòng B' có nhóm thế ở vị trí *para*. Phổ ^{13}C NMR và HSQC khẳng định thêm qua tín hiệu có cường độ lớn gấp đôi tại δ_C 128,1 (C-2'''/C-6''') và 115,7 (C-3'''/C-5''') (Bảng 4.8). Tương tác giữa H-2' (δ_H 8,07) và C-8'' (δ_C 104,8) ở phổ HMBC cho thấy hai flavone (I và II) gắn với nhau qua liên kết C-C (C3' – C8''). Kết hợp dữ liệu phổ MS, ^1H - và ^{13}C -NMR phân tích ở trên và so sánh với phổ của amentoflavone ở từng vị trí tương ứng (Bảng 4.8), cho xác định cấu trúc của chất **DN8** là amentoflavone [96]. Amentoflavone là một biflavone có nhiều tác dụng sinh học tốt như: giảm đau kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, chống vi rút, chống trầm cảm, chống oxy hóa, chống loét, phóng xạ và hoạt tính gây độc tế bào, chống đường huyết, chống lão hóa..... [97, 98]. Gần đây, nghiên cứu của Xiong và cộng sự cho rằng amentoflavone còn có hoạt tính kháng SARS-CoV-2 [99].

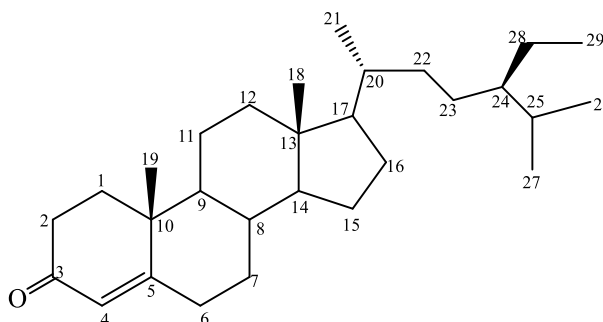
Bảng 4.8. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **DN8** và amentoflavone

C	DN8		Amentoflavone ^[96]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
2	164,0	-	164,1	-
3	102,6	6,80, s	103,2	6,82, s
4	181,7	-	181,9	-
5	161,4	-	161,6	-
6	98,8	6,17, d (1,5), 1H	98,8	6,18, d (2,0), 1H
7	163,4	-	163,9	-
8	94,0	6,41, d (1,5), 1H	94,2	6,45, d (2,0), 1H
9	157,3	-	157,6	-
10	103,6	-	104,0	-
1'	120,0	-	120,3	-
2'	131,3	8,07, d (2,5), 1H	131,6	7,99, d (2,0), 2H
3'	121,0	-	121,7	-
4'	160,8	-	159,6	-
5'	117,1	7,07, d (9,0), 1H	116,4	7,15, d (9,3), 1H
6'	127,4	7,96, dd (2,5, 8,5), 1H	127,9	8,01, dd (2,0, 6,9), 1H
2''	163,9	-	163,9	-
3''	102,5	6,74, s	102,8	6,78, s
4''	181,9	-	182,2	-

5''	160,4	-	160,8	-
6''	99,0	6,29, s	99,1	6,39, s
7''	161,0	-	161,9	-
8''	104,8	-	104,1	-
9''	154,8	-	154,7	-
10''	103,0	-	104,0	-
1'''	121,5	-	121,4	-
2'''	128,1	7,59, d (8,5), 2H	128,3	7,58, d (8,7), 2H
3'''	115,7	6,67, d (8,5), 2H	116,0	6,72, d (8,7), 2H
4'''	161,0	-	161,1	-
5'''	115,7	6,67, d (8,5), 2H	116,0	6,72, d (8,7), 2H
6'''	128,1	7,59, d (8,5), 2H	128,3	7,58, d (8,7), 2H
5-OH	-	12,99, s	-	13,09, s
7-OH	-	-	-	10,82, s
4'-OH	-	-	-	10,55, br s
5''-OH	-	13,11, s	-	12,96, s
7''-OH	-	-	-	10,28, s
4'''-OH	-	-	-	10,55, brs

a: 125 MHz, DMSO- d_6 ; 500 MHz, DMSO- d_6 ; c:100 MHz, DMSO- d_6 ; d: 400 MHz, DMSO- d_6 .

❖ *Hợp chất sitosterone (DN9)*



Hình 4.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất **DN9**

Chất **DN9** ở dạng rắn màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất **DN9** cho thấy tín hiệu của một proton olefin ở δ_{H} 5,72 (H-4, s) và sáu tín hiệu proton methyl, trong đó có một methyl triplet ở 0,71 ppm (CH_3 -29), hai methyl doublet ở δ_{H} 0,86 (CH_3 -26, d) và 0,81 (CH_3 -27, d) cùng các tín hiệu proton methine và methylene ở trường cao (δ_{H} 1,00-2,45 ppm). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ HSQC cho thấy chất **DN9** có 29 carbon (4x C , 8x CH , 11x CH_2 , 6x CH_3), trong đó có một carbon ketone ở δ_{C} 199,6 (C-3) và hai carbon olefin ở δ_{C} 123,7 (C-4) và 171,7 (C-5). Số liệu phổ của chất **DN9** hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ của sitosterone trong tài liệu [100], từ đó xác định chất **DN9** chính là sitosterone.

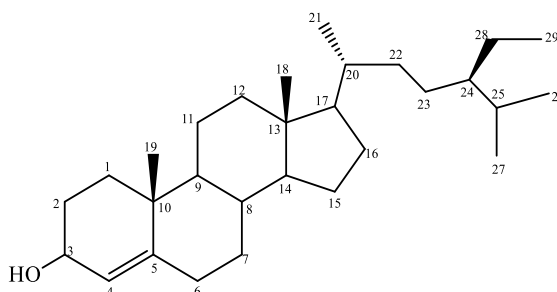
Bảng 4.9. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **DN9** và sitosterone

C	DN9		Sitosterone ^[100]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$
1	35,7 CH ₂		35,7	
2	34,0 CH ₂		33,9	
3	199,6 C	-	199,6	
4	123,7 CH	5,72, s, 1H	123,7	5,74, d (2,2)
5	171,7 C	-	171,7	
6	33,0 CH ₂		32,9	
7	32,1 CH ₂		32,1	
8	35,7 CH		35,7	
9	53,8 CH		53,8	
10	38,6 C		38,6	
11	21,0 CH ₂		21,1	
12	39,6 CH ₂		39,6	
13	42,4 C		42,4	
14	55,9 CH		55,9	
15	24,2 CH ₂		24,2	
16	28,2 CH ₂		28,2	
17	56,0, CH		56,0	
18	12,0 CH ₃	0,84, s, 3H	11,9	0,73, s
19	17,4 CH ₃	1,18, s, 3H	17,4	1,19, s
20	36,1 CH		36,1	
21	18,7 CH ₃	0,95, d (6,5), 3H	18,7	0,93, d (6,6)
22	33,9 CH ₂	1,32, m, 1H 1,01, m, 1H	34,0	
23	26,1 CH ₂	1,44, m, 1H 1,15, m, 1H	26,1	
24	45,9 CH	0,93, m, 1H	45,9	
25	29,2 CH	1,69, m, 1H	29,2	
26	19,8 CH ₃	0,86, d (6,6), 3H	19,8	0,84, d (6,1)
27	19,0 CH ₃	0,81, d (6,6), 3H	19,0	0,82, d (6,8)
28	23,1 CH ₂	1,26, m, 1H	23,1	

		1,25, m, 1H		
29	11,9 CH ₃	0,71, t (7,2), 3H	11,9	0,85, d (7,2)

a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃; c: 125 MHz, CDCl₃; 500 MHz, CDCl₃

❖ Hợp chất β -sitosterol (DN10)



Hình 4.30. Cấu trúc hóa học của hợp chất DN10

Chất DN10 ở dạng rắn màu trắng. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của chất DN10 cho thấy có sự giống nhau với phổ ¹H- và ¹³C-NMR của chất DN9, chúng chỉ khác nhau ở nhóm thế hydroxyl ở C-3 thay vì nhóm ketone. So sánh số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của DN10 với DN9 và tài liệu [100], xác định được cấu trúc chất DN10 là β -sitosterol, có CTPT là C₂₉H₅₀O. Sitosterone và β -sitosterol là hai sterol tồn tại khá phổ biến trong các loài thực vật.

Bảng 4.10. Tổng hợp các chất được phân lập và xác định của loài Xương quạt

STT	Ký hiệu chất	Tên chất	Ghi chú
1	DN1	7-Acetyl-4R, 8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone	Chất mới
2	DN2	(2S)-2',4'-Dihydroxy-7-methoxyflavan	Chất mới
3	DN3	(2S)-7,4'-Dimethoxy flavan	Lần đầu tiên tìm thấy trong tự nhiên (chất mới)
4	DN4	Diaensi-biflavan (5-Hydroxy-7,4'-dimethoxy-(6,6''-metylen)-biflavan)	Chất mới
5	DN5	Diaensi-biflavan A [5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6,6''-metylen-(5'',4'''-dihydroxy-7''-methoxy) flavan]	Chất mới
6	DN6	Methyl β -orcinolcarboxylate	
7	DN7	Dianellose	
8	DN8	Amentoflavone	Lần đầu tiên tìm thấy trong chi
9	DN9	Sitosterone	

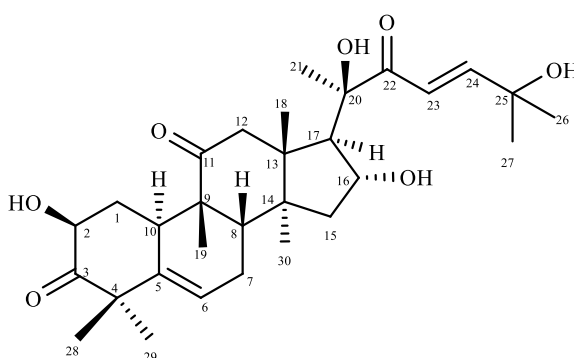
10	DN10	β -Sitosterol	
----	------	---------------------	--

4.1.2. Xác định cấu trúc hóa học các chất từ loài *Côm hải nam* (*Elaeocarpus hainanensis*)

Từ bộ phận lá và cành cây *Côm hải nam*, 15 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc đó là: 13 triterpen, trong đó có 8 hợp chất khung cucurbitacin (**EH1-EH8**) và 5 triterpen có khung oleanen (**EH9-EH13**), 1 furfural (**EH14**) và 1 megastigman (**EH15**). Trong đó, ba chất **EH8**, **EH9** và **EH13** là các chất mới.

4.1.2.1. Các hợp chất cucurbitacin

❖ Hợp chất cucurbitacin D (**EH1**)



Hình 4.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH1**

Kết hợp phổ NMR và pic ion giả phân tử $[M+Na]^+$ ở m/z 539,3 trong phổ ESI-MS đã xác định được CTPT của **EH1** là $C_{30}H_{44}O_7$ (Hình 4.31). Phổ 1H -NMR của hợp chất **EH1** cho thấy các tín hiệu của tám nhóm methyl từ δ_H 0,98 đến 1,39 và hai proton carbinol ở δ_H 4,34 và 4,45 (H-16 và H-2). Ngoài ra, phổ 1H -NMR còn có một tín hiệu của proton olefin ở δ_H 5,78 (H-6) và hai tín hiệu *trans*-olefin ở δ_H 6,63 và 7,13 (H-23 và H-24, d, $J=15,5$ Hz). Các tín hiệu proton methine và methylene xuất hiện ở trường cao trong khoảng δ_H 1,22 đến 2,56; trong khi các tín hiệu gần nhóm carbonyl chuyển dịch sang trường thấp hơn, cụ thể δ_H 3,31 (H-12a, d, $J=14,5$ Hz) và 2,69 (H-12b, d, $J=14,5$ Hz) và δ_H 2,78 (H-10, br d, $J=13,0$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR của chất **EH1** cho thấy có 30 carbon gồm tám nhóm methyl (δ_C 19,3 đến 29,5); bốn carbon carbinol ở δ_C 71,6 (C-2), 71,5 (C-16), 78,1 (C-20) và 71,2 (C-25) và ba carbon carbonyl ở δ_C 202,5 (C-22), 212,2 (C-11) và 213,0 (C-3), cho thấy chất **EH1** là một triterpene thuộc nhóm cucurbitacin. Từ số liệu phổ và so sánh với tài liệu [101] (Bảng 4.11), cấu trúc của chất **EH1** được khẳng định là cucurbitacin D.

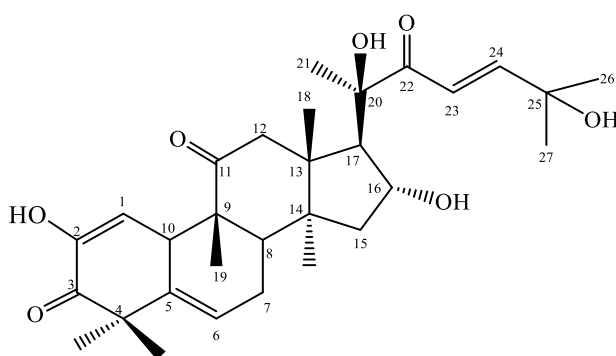
Bảng 4.11. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất **EH1** và cucurbitacin D

C	EH1		Cucurbitacin D ^[101]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1a	36,0	2,32, ddd (3,5, 6,0, 12,5)	36,0	2,31, ddd (3,4, 6,3, 12,7)
1b	-	1,22, m	-	1,21 ddd (12,7, 12,7, 12,7)
2	71,6	4,45, dd (6,0, 13,0)	71,6	4,43, ddd (3,4, 6,3, 12,7)
3	213,0	-	213,0	-
4	50,3	-	50,2	-
5	140,5	-	140,4	-
6	120,3	5,78, br d (6,0)	120,2	5,77, br d (5,8)
7a	23,9	1,95, m	23,8	1,94, ddd (19,8, 5,8, 1,4)
7b	-	2,40, ddd (17,0, 5,5, 2,5)	-	2,39, ddd (19,8, 8,3, 2,9)
8	42,4	1,97, m	42,3	1,96, br d (8,3)
9	48,3	-	48,3	-
10	33,8	2,78, br d (13,0)	33,7	2,76, br d (12,7)
11	212,2	-	212,2	-
12a	48,7	3,31, d (14,5)	48,6	3,29, d (14,5)
12b	-	2,69, d (14,5)	-	2,69, d (14,5)
13	50,8		50,8	-
14	48,4		48,3	-
15a	45,5	1,37, m	45,5	1,35, dd (13,6, 3,9)
15b	-	1,87, dd (13,0, 8,5)	-	1,84, dd (13,6, 8,7)
16	71,5	4,34, t (7,3)	71,5	4,33, br m
17	57,3	2,56, d (7,3)	57,3	2,54, d (6,8)
18	20,0	0,98, s	20,0	0,97, s
19	20,1	1,08, s	20,1	1,07, s
20	78,1	-	78,1	-
21	24,0	1,39, s	23,9	1,39, s
22	202,5	-	202,5	-
23	119,0	6,63, d (15,3)	118,9	6,62, d (15,0)
24	155,9	7,13, d (15,3)	155,9	7,12, d (15,0)
25	71,2	-	71,1	-
26	29,5	1,35, s	29,5	1,35, s
27	29,3	1,35, s	29,3	1,35, s
28	28,9	1,30, s	28,8	1,28, s
29	21,3	1,34, s	21,2	1,33, s
30	19,3	1,34, s	19,2	1,31, s

a: 125 MHz, CDCl_3 ; b: 500 MHz, CDCl_3 ❖ Hỗn hợp **EH2a** (cucurbitacin D (**EH1**) và cucurbitacin I (**EH2**))

Phổ ^1H - và ^{13}C -NMR xác định **EH2a** là hỗn hợp 2 chất với tỷ lệ 1:1, được xác định qua cường độ đường integral (proton H-6). Dựa trên sự so sánh với phổ chất **EH1**, xác định hỗn hợp có chứa hợp chất cucurbitacin D (**EH1**).

Hợp chất còn lại (chất **EH2**) trong hỗn hợp **EH2a** cho thấy có tín hiệu của tám nhóm methyl từ δ_{H} 0,95 đến 1,39, một tín hiệu proton carbinol ở δ_{H} 4,50 (H-16, m) và bốn tín hiệu proton olefin ở δ_{H} 5,82 (H-6, m), 6,85 (H-23, m), 7,00 (H-24, m) và δ_{H} 5,99 (H-1, m). Ở trường cao, các tín hiệu proton methine và methylene xuất hiện trong khoảng δ_{H} 1,41 đến 3,42 ppm. Ngoài ra, so với chất **EH1**, phổ ^1H -NMR của chất **EH2** có tín hiệu proton olefin ở δ_{H} 5,99 (H-1, m) thay cho tín hiệu proton carbinol của **EH1**.



Hình 4.32. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH2** (cucurbitacin I)

Điều này cũng được khẳng định ở phổ ^{13}C -NMR của chất **EH2** với sự xuất hiện của các tín hiệu carbon olefin ở δ_{C} 116,7 (C-1) và 146,8 (C-2). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **EH2** cũng có tín hiệu của 30 carbon bao gồm tám nhóm methyl δ_{C} từ 18,9 đến 29,3 ppm; tám nhóm methine trong đó có một oxymethine ở δ_{C} 71,7 (C-16) và ba carbon olefin ở δ_{C} 121,3 (C-6), 121,7 (C-23) và 155,4 (C-24); mười một carbon bậc bốn trong đó có ba carbon carbonyl ở δ_{C} 204,9 (C-22), 212,0 (C-11) và 216,1 (C-3), ba carbon carbinol δ_{C} 79,9 (C-20) và 71,7 (C-25); và ba carbon methylene. Điều này gợi ý hợp chất **EH2** là một triterpene thuộc cucurbitacin và có cấu tạo tương tự cucurbitacin D, chỉ có sự khác biệt hợp chất **EH2** có thêm một nối đôi ở C1=C2. Kết hợp so sánh số liệu phổ của **EH2** với tài liệu [102] (Bảng 4.12), khẳng định **EH2** là cucurbitacin I.

Bảng 4.12. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất **EH2** với cucurbitacin I

C	EH2		Cucurbitacin I ^[102]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$
1	116,7	5,99, d (2,5)	114,9	5,97, d (2,7)
2	146,8	-	144,5	-
3	216,1	-	198,7	-
4	47,4	-	47,5	-

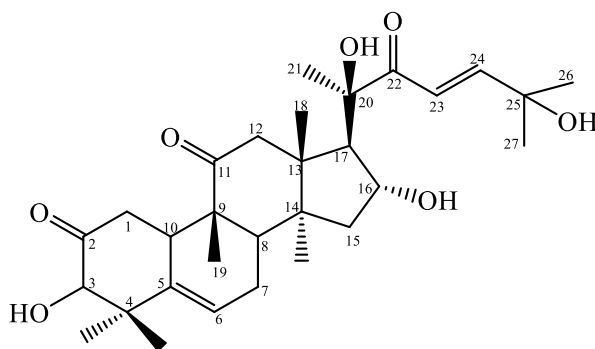
5	140,0	-	136,9	-
6	121,3	5,82, m	120,6	5,76, br s
7a	24,6	1,94, m	23,6	2,38, m
7b	-	2,40, m	-	1,99, m
8	43,3	2,07, m	41,6	2,03, m
9	48,8	-	48,8	-
10	35,9	2,86, m	34,7	3,53, br s
11	212,0	-	212,8	-
12a	48,6	3,42, d (14,5)	48,8	3,25, d (14,5)
12b	-	2,67, d (14,5)	-	2,73, d (14,5)
13	50,2	-	50,8	-
14	48,3	-	48,3	-
15a	46,6	1,41, m	45,6	1,87, dd (13,3; 9,7)
15b	-	1,89, m	-	1,42, m
16	71,7	4,50, m	71,5	4,40, m
17	59,5	2,50, d (6,0)	57,4	2,54, d (6,0)
18	20,3	0,95, s	20,0	1,00, s
19	20,7	1,01, s	20,1	1,03, s
20	79,9	-	78,1	-
21	24,7	1,40, s	23,9	1,41, s
22	204,9	-	202,7	-
23	121,7	6,85, d (15,2)	119,0	6,64, d (15,2)
24	155,4	7,00, d (15,2)	155,8	7,11, d (15,2)
25	71,7	-	71,3	-
26	29,3	1,39, s	29,5	1,37, s
27	29,1	1,33, s	29,1	1,37, s
28	28,3	1,34, s	27,9	1,36, s
29	21,6	1,29, s	20,2	1,25, s
30	18,9	1,34, s	18,5	1,38, s

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD; c: 75 MHz, CDCl₃; d: 300 MHz, CDCl₃

❖ Hợp chất 3-*epi*-isocucurbitacin D (**EH3**)

Phổ ¹³C-NMR và DEPT của chất **EH3** cũng có tín hiệu của 30 carbon, trong đó có tám nhóm -CH₃, tám nhóm -CH, bốn nhóm -CH₂ và 10 carbon bậc bốn. So sánh số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **EH3** và **EH1** cho thấy nhiều sự tương đồng (Bảng 4.13, bảng 4.11) và chất này được dự đoán là một triterpene thuộc nhóm cucurbitacin, được khẳng định thêm khi có tín hiệu ở δ_H 4,10 (H-3, s)/δ_C 79,9 (C-3) ở chất **EH3**, thay cho các tín hiệu ở δ_H 4,45 (H-2, dd, *J*=13,0; 6,0 Hz)/δ_C 71,6 (C-2) ở chất **EH1**. Phổ chất **EH3** chỉ có sự khác biệt so với **EH1** ở sự xuất hiện của nhóm carbonyl ở C-2 và nhóm hydroxy ở C-3, thay cho nhóm carbonyl ở C-3 và hydroxy

ở C-2 của chất **EH1**. Từ việc phân tích dữ liệu phổ trên kết hợp so sánh với **EH1** và tài liệu, **EH3** được khẳng định là 3-*epi*-isocucurbitacin D [103].



Hình 4.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH3**

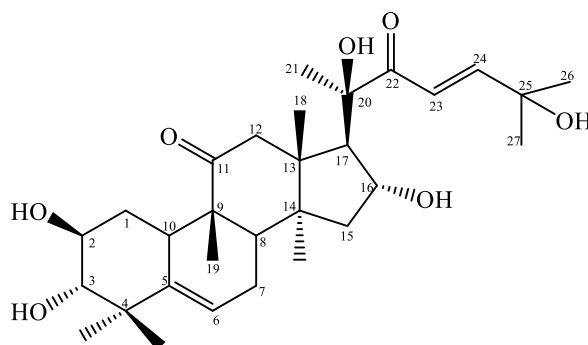
Bảng 4.13. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C - NMR của chất **EH3** và 3-*epi*-isocucurbitacin D

C	EH3		3-<i>epi</i>-isocucurbitacin D [103]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1	38,0	2,25, m/2,21, m	38,15	2,21/2,25
2	213,0	-	213,20	-
3	81,2	4,10, s	81,32	4,08, s
4	42,5	-	42,61	-
5	141,1	-	141,34	-
6	122,9	5,92, t (5,2)	123,05	5,90, d (5,1)
7	24,8	2,05, m	24,89	1,99 - 2,05 m
8	44,2	2,01, m	44,38	2,01
9	49,5	-	49,50	-
10	34,1	3,13, m	34,23	3,09
11	215,7	-	215,91	-
12	49,9	2,59, m/3,33, d (13,8)	50,03	2,59/3,34, d (14,0)
13	51,7	-	51,87	-
14	49,3	-	49,40	-
15	46,8	1,46/1,87, dd (12,0, 9,0)	46,94	1,56/1,85, dd (13,3, 9,5)
16	71,5	4,50, t (7,5)	71,64	4,48, t (8,5)
17	59,5	2,57, m	59,68	2,57, d (6,6)
18	20,7	0,92, s	20,89	0,90, s
19	19,4	1,09, s	19,56	1,04, s
20	79,9	-	80,09	-
21	25,4	1,40, s	25,57	1,38, s
22	205,0	-	205,20	-
23	121,3	6,84, d (15,5)	121,43	6,84, d (15,5)
24	155,3	6,98, d (15,5)	155,49	6,95, d (15,5)
25	71,7	-	71,85	-
26	29,2	1,34, s	29,38	1,32, s
27	29,2	1,35, s	29,38	1,33, s
28	19,0	1,41, s	19,20	1,39, s
29	24,7	0,96, s	24,90	0,94, s

30	27,6	1,24, s	27,76	1,22, s
----	------	---------	-------	---------

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD

❖ Hợp chất cucurbitacin F (**EH4**)



Hình 4.34. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH4**

Phổ ¹H-NMR của chất **EH4** cho thấy các tín hiệu của tám nhóm methyl từ δ_H 0,91 đến 1,34, ba proton carbinol ở δ_H 4,48 (H-16, t, $J=8,0$ Hz), 3,54 (H-2, m) và 2,87 (H-3, d, $J=9,5$ Hz). Ở trường thấp, xuất hiện các tín hiệu của proton olefin ở δ_H 5,76 (d, $J=5,5$ Hz) và hai tín hiệu *trans*-olefin ở δ_H 6,83 (H-23, d, $J=15,5$ Hz) và 6,98 (H-24, d, $J=15,5$ Hz). Ở trường cao hơn xuất hiện các tín hiệu proton methylene ở δ_H 3,30 (H-12a, m) và 2,57 (H-12b, d, $J=14,5$ Hz), do ảnh hưởng của nhóm carbonyl gần đó. Phía trường cao trong khoảng δ_H 1,42-2,49, tương tự chất **EH1**, xuất hiện tín hiệu của các proton trong nhóm methylene và methine.

Phổ ¹³C-NMR và DEPT của chất **EH4** có 30 tín hiệu carbon, trong đó có tám nhóm -CH₃, chín nhóm -CH, bốn nhóm -CH₂ và chín carbon bậc bốn. Cụ thể, tám carbon methyl từ δ_C 19,8 đến 29,2; năm carbon carbinol ở δ_C 71,6 (C-2), 81,9 (C-3), 71,7 (C-16), 79,9 (C-20) và 71,5 (C-25) và hai carbon carbonyl ở 204,9 (C-22), 216,1 (C-11). So sánh với phổ của chất **EH1**, cho thấy chất **EH4** có nhóm hydroxy tại C-3 (δ_C 81,9/ δ_H 2,87) thay thế cho nhóm carbonyl (δ_C 213,0) trong hợp chất **EH1**. Điều này chứng tỏ chất **EH4** là một cucurbitacin triterpene có hai nối đôi, năm nhóm carbinol và hai nhóm carbonyl. Kết hợp số liệu phổ ¹H-, ¹³C-NMR và so sánh số liệu phổ với tài liệu [104, 105] (Bảng 4.14), cấu trúc của chất **EH4** được khẳng định là cucurbitacin F.

Bảng 4.14. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C- NMR của hợp chất **EH4** và cucurbitacin F

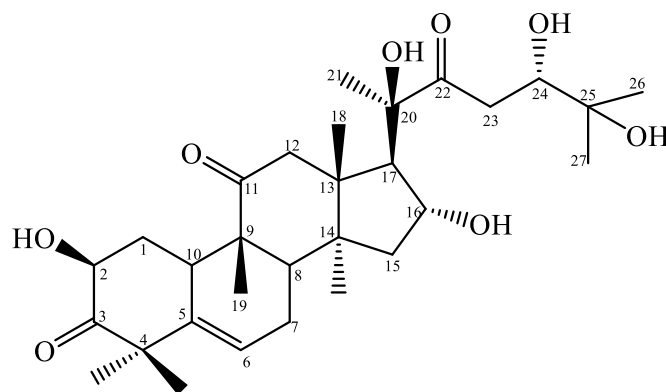
C	EH4		Cucurbitacin F	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c [104]	δ_H^d [105]

1a	34,8	1,82, m	34,8	1,80, dt (12,3, 4,2)
1b		1,03, brs	-	1,02, q (12,3)
2	71,6	3,54, m	71,7	3,54, ddd (11,5, 9,4, 4,2)
3	81,9	2,87, d (9,5)	81,9	2,85, d (9,4)
4	43,4	-	43,3	-
5	142,7	-	142,7	-
6	121,3	5,76, d (5,5)	121,2	5,75, d (5,9)
7a	24,7	1,97, m	24,7	1,97, ddd (19,1, 5,9)
7b		2,41, dd (19,0, 7,5)	-	2,40, dd (19,1, 8,1)
8	44,3	1,93, m	44,3	1,93, d (8,1)
9	49,5	-	49,7	-
10	35,0	2,49, brd (13,0)	34,9	2,48, m
11	216,1	-	216,0	-
12a	49,8	3,30, m	49,9	3,31 m
12b		2,57, d (14,5)	-	2,55, d (14,6)
13	48,5	-	49,4	-
14	51,9	-	51,9	-
15a	46,6	1,42, m	46,6	1,39, d (13,3)
15b		1,83, m	-	1,84, dd (13,3, 9,0)
16	71,7	4,48, t (8,0)	71,6	4,46, ddd (9,0, 7,5, 1,3)
17	59,4	2,61, d (7,5)	59,4	2,60, d (7,2)
18	20,5	0,91, s	20,6	0,90, s
19	19,8	1,09, s	19,8	1,07, s
20	79,9	-	79,9	-
21	25,3	1,34, s	25,4	1,38, s
22	204,9	-	204,9	-
23	120,0	6,83, d (15,5)	120,0	6,82, d (15,5)
24	155,3	6,98, d (15,5)	155,3	6,97, d (15,5)
25	71,5	-	71,5	-
26	29,2	1,32, s	29,2	1,32, s
27	29,2	1,34, s	29,4	1,33, s
28	22,3	0,98, s	22,3	0,96, s

29	25,4	1,19, s	25,4	1,17, s
30	20,6	1,31, s	20,7	1,30, s

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD; c: 150 MHz, CD₃OD; d: 600 MHz, CD₃OD.

❖ Hợp chất cucurbitacin H (**EH5**)



Hình 4.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH5**

Phổ ¹H-NMR của chất **EH5** cho thấy ba tín hiệu proton carbinol ở δ_H 4,42 (H-2 và H-16, m) và 3,97 (H-24, d, $J=9,0$ Hz) và một tín hiệu proton olefin ở δ_H 5,78 (H-6, d, $J=5,5$ Hz). Ở trường cao, các tín hiệu của tám nhóm methyl xuất hiện trong khoảng δ_H 0,98 đến 1,44 và các tín hiệu methylene, methine trong khoảng δ_H 1,20 đến 2,40. Ngoài ra, chúng tôi nhận thấy sự xuất hiện của proton methylene ở δ_H 3,26 (H-12a, d, $J=14,5$ Hz) và 2,68 (H-12b, d, $J=14,5$ Hz); δ_H 2,57 (H-23a, d, $J=16,0$ Hz) và 3,00 (H-23b, dd, $J=16,5$; 9,5 Hz) và proton methine ở δ_H 2,74 (H-10, br d, $J=13,0$ Hz); 2,63 (H-17, d, $J=7,0$ Hz) do ảnh hưởng của nhóm carbonyl, olefin và carbinol gần đó nên chuyển dịch sang trường thấp hơn.

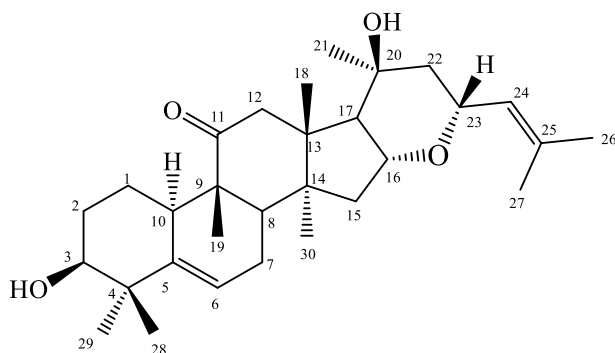
Phổ ¹³C-NMR và DEPT của chất **EH5** cho thấy 30 tín hiệu carbon trong đó có tám nhóm methyl từ 18,9 đến 29,3 ppm; sáu nhóm methine trong đó có ba carbon carbinol ở δ_C 71,6 (C-2), 71,7 (C-16) và 74,4 (C-24), một carbon olefin ở δ_C 120,3 (C-6); mười carbon bậc bốn trong đó có ba carbon carbonyl ở δ_C 212,9 (C-3), 212,0 (C-11) và 213,9 (C-22), hai carbon carbinol ở δ_C 79,9 (C-20) và 71,7 (C-25); và còn lại là carbon methylene. Điều này chứng tỏ chất **EH5** là một triterpene thuộc nhóm cucurbitacin và so với cucurbitacin D, chất **EH5** có thêm một nhóm carbinol ở carbon C-24 đồng thời mất đi một nhóm olefin ở carbon C-23 và C-24. Số liệu phổ của chất **EH5** được so sánh với tài liệu [106], chất **EH5** được khẳng định là cucurbitacin H.

Bảng 4.15. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH5** và cucurbitacin H

C	EH5		Cucurbitacin H ^[106]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$
1a	35,9	2,28, m	35,6	2,25, m
1b		1,20, m	-	1,18, m
2	71,6	4,42, m	71,5	4,40, dd (11,3, 5,9)
3	212,9	-	212,9	-
4	50,3	-	50,2	-
5	140,5	-	140,3	-
6	120,3	5,78, d (5,5)	120,2	5,76, br s
7a	23,9	1,94, m	23,8	1,93, m
7b	-	2,40, m	-	2,38, m
8	42,4	1,96, m	42,3	1,93, m
9	48,4	-	48,3	-
10	33,7	2,74, br d (13,0)	33,6	2,72, br d (12,9)
11	212,0	-	212,2	-
12a	48,6	3,26, d (14,5)	48,5	3,24, d (14,4)
12b	-	2,68, d (14,5)	-	2,65, d (14,4)
13	50,8	-	50,7	-
14	48,4	-	48,3	-
15a	45,3	1,40, m	45,2	1,37, m
15b	-	1,86, dd (13,0, 8,5)	-	1,83, dd (12,9, 8,8)
16	71,5	4,42, m	71,3	4,33, m
17	55,9	2,63, d (7,0)	55,8	2,60, br d (6,8)
18	19,7	0,98, s	19,8	0,95, s
19	20,0	1,08, s	20,0	1,04, s
20	79,3	-	79,3	-
21	23,5	1,44, s	23,4	1,41, s
22	213,9	-	213,9	-
23a	39,3	2,57, d (16,0)	39,3	2,54, br d (16,6)
23b	-	3,00, dd (16,5, 9,5)	-	2,97, dd (16,6, 9,0)
24	74,4	3,97, d (9,0)	74,3	3,94, br d (9,0)
25	72,1	-	72,1	-
26	24,8	1,36, s	24,5	1,32, s
27	25,7	1,28, s	25,6	1,16, s
28	21,2	1,24, s	21,2	1,25, s
29	29,3	1,20, s	29,3	1,20, s
30	18,9	1,34, s	18,9	1,30, s

a: 125 MHz, CDCl_3 ; b: 500 MHz, CDCl_3 ; c: 125 MHz, CDCl_3 ; d: 500 MHz, CDCl_3

❖ Hợp chất 16 α , 23 α -epoxy-3 β , 20*R*-dihydroxy-10 α H, 23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one (**EH6**)



Hình 4.36. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH6**

CTPT $C_{30}H_{46}O_4$ của hợp chất **EH6** được xác định dựa trên pic ion giả phân tử trong phổ (+) HR-ESI-MS tại m/z 471,3469 $[M+H]^+$ (tính toán $C_{30}H_{47}O_4$, 471,3474). Phổ 1H -NMR cho thấy sáu methyl singlet, hai methyl doublet, hai olefin proton ở δ_H 5,66 (H-6, d, $J=6,6$ Hz) và 5,15 (H-24, dt, $J=7,5; 1,2$ Hz) đặc trưng cho khung cucurbitacin [107]. Thêm nữa, trên 1H -NMR còn cho thấy tín hiệu của một proton ở δ_H 3,45 (H-3, br s) cho thấy có nhóm hydroxy ở vòng A, hai proton oxymethine ở δ_H 4,42 (H-16, dt, $J=10,0; 3,5$ Hz), 4,61 (H-23, ddd, $J=12,0; 8,5; 4,0$ Hz). Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC cho thấy phân tử có 30 nguyên tử carbon (8xCq, 8xCH, 6xCH₂, 8xCH₃), trong đó có 2 carbon sp^2 bậc 4 (δ_C 141,5 C-5 và 137,0 C-25), một nhóm carbonyl (δ_C 216,6, C-11). Số liệu phổ NMR gợi ý **EH6** là một tetracyclic triterpenoid chứa bốn nhóm hydroxy và hai liên kết đôi, trong đó có tín hiệu đặc trưng cho liên kết đôi ở hầu hết các cucurbitacine tại δ_C 141,5 và 120,6 (C₅=C₆). Trong khi, liên kết đôi thứ hai được xác nhận bởi tín hiệu của C-24 (δ_C 126,5) và C-25 (δ_C 137,0); sp^2 methine ở δ_H 5,15 (H-24, dt, $J=1,2; 7,5$ Hz) và hai nhóm methyl δ_H 1,74/ δ_C 25,8 và δ_H 1,72/ δ_C 18,4 (Bảng 4.16). Phổ ^{13}C -NMR, ở trường thấp có một tín hiệu carbon ketone ở δ_C 216,6 (C-11) và methylene ở δ_C 49,3 (C-12). Năm trong số sáu carbon methylene có thể gán cho C-1 (δ_C 21,6), C-2 (δ_C 29,8), C-7 (δ_C 24,9), C-12 (δ_C 49,3), và C-15 (δ_C 41,7), gợi ý tín hiệu carbon methylene còn lại (δ_C 49,8) gán cho C-22 [107].

Cấu trúc của mạch nhánh được xác định bởi phổ 1H - 1H COSY, qua tương tác giữa proton olefin ở δ_H 5,15 (H-24, dt, 7,5, 1,2) với proton carbinol ở δ_H 4,61 (H-23, ddd, 12,0, 8,5, 4,0) và hai methyl doublet ở δ_H 1,74 và 1,72 (CH₃-26 và CH₃-27, d, 1,2). Phổ HMBC cũng cho thấy tương tác của H-23 với C-24, C-25 (δ_C 126,5, 137,0); H-24 với C-26, C-27 (δ_C 18,4, 25,8). Phân tích kỹ hơn phổ 1H - 1H COSY và HMBC, đã xác định được các chuỗi liên kết -C10-C1-C2-C3; -C15-C16-C17 và -C23-C24-C25-C27 trong cấu trúc phân tử.

Phổ NOESY cho thấy tương tác giữa các tín hiệu proton ở δ_H 4,42 (H-16) và 0,95 (CH₃-18, s); 4,61 (H-23), suy ra cấu hình tương đối của nhóm OH là 16 α và 20 β . Đây cũng là cấu hình điển hình của H-16 và H-23 của cucurbitacin triterpene. Cùng với việc phân tích phổ và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **EH6** được xác định là 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one [11].

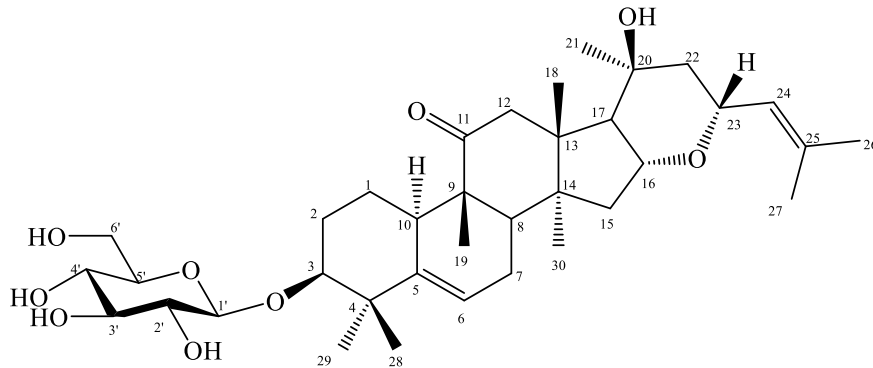
Bảng 4.16. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **EH6** và chất so sánh

C	EH6		16 α , 23 α -epoxy-3 β ,20 R -dihydroxy-10 α H, 23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one [11]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	21,6	α : 1,57 dd (13,0, 3,0) β : 1,40 m	20,4	1,42, m
2	29, 8	α : 1,85 m β : 1,63 m	28,5	1,71, m 1,62, m
3	76,9	3,45 br s	76,0	3,42, brs
4	42,3	-	41,6	-
5	141,5	-	139,5	-
6	120,4	5,66 d (6,0)	120,3	5,64, d (6,2)
7	24,9	α : 1,92 m β : 2,46 m	23,9	1,86, m 2,37, m
8	44,3	1,96 m	42,7	1,90, m
9	49,0*	-	49,3	
10	36,4	2,39 m	35,1	2,22, m
11	216,6	-	213,0	
12	49,3 ^b	α : 3,16 d (15,0) β : 2,38 d (15,0)	48,2	2,98, d (14,6) 2,40, d (14,6)
13	49,2 ^b	-	48,2	
14	50,8	-	47,9	
15	41,7	α : 1,44 m β : 1,86 m	40,6	1,48, m 1,70, m
16	77,7	4,42 ddd (3,5, 10,0, 11,5)	76,2	4,34, ddd (10,2, 10,2, 3,4)
17	56,4	1,99 d (7,5)	54,9	1,95, d (10,2)
18	20,1	0,95 s	19,8	0,92, s
19	20,5	1,14 s	20,3	1,10, s
20	72,6	-	72,2	
21	29,0	1,30 s	29,2	1,28, s
22	49,8 ^b	2,0 m	50,0	1,37, m
23	74,5	4,61 m	72,8	4,48, ddd (11,7, 9,1, 3,0)
24	126,5	5,15 dt (1,2, 7,5)	125,1	5,12, d (8,4)
25	137,0	-	136,1	
26	18,4	1,74 d (1,2)	18,4	1,68, s
27	25,8	1,72 d (1,2)	25,8	1,69, s
28	28,2	1,17 s	27,1	0,99, s

29	25,8	1,05 s	25,3	1,15, s
30	21,6	1,27 s	21,0	1,18, s

a: 125 MHz, CD₃OD, b: 500 MHz, CD₃OD, c: 100MHz, CDCl₃; d: 400 MHz, CDCl₃

❖ Hợp chất 16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**EH7**)



Hình 4.37. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH7**

Hợp chất **EH7** chất rắn, màu trắng. CTPT là C₃₆H₅₆O₉, được xác định qua pic ion dương giả phân tử ở m/z 655,3796 [M+Na]⁺ (tính toán, C₃₆H₅₆O₉Na, 655,3822) và pic ion âm giả phân tử ở m/z 667,3648 [M+Cl]⁻ (tính toán C₃₆H₅₆ClO₉, 667,3613) ở phổ HR-ESI-MS.

So sánh số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **EH7** với **EH6** cho thấy có sự giống nhau, chỉ thay đổi **EH7** có thêm các tín hiệu của một đường 6 carbon (δ_H 4,3 - 3,2 và δ_C 106,6; 78,3; 77,7; 75,6; 71,7 và 62,9 ppm) (Bảng 4.17). Vì vậy, **EH7** được xác định là dẫn xuất mono-glycoside của **EH6**. Bên cạnh các tín hiệu của gốc glycoside (Bảng 4.17), các tín hiệu của phần aglycone phù hợp với chất **EH6** (δ_C 88,0, 77,7, 74,5 và 72,5 ppm, tương ứng C-3, C-16, C-23 và C-20).

Phổ HSQC cũng cho các tương tác trực tiếp giữa carbon và proton, theo đó C-3 (δ_C 88,0) với H-3 (δ_H 3,45), C-16 (δ_C 77,7) với H-16 (δ_H 4,41), C-23 (δ_C 74,5) với H-23 (δ_H 4,61). Sự dịch chuyển tín hiệu carbon C-3 về phía trường thấp hơn (δ_C 88,0, + Δ_C 11,06 ppm so với δ_C 76,9 của **EH6**), gợi ý nhóm glycosyl gắn với C-3. Kết luận này được khẳng định thêm qua tương tác xa ¹H-¹³C của proton anomeric (δ_H 4,29, dd, $J=3,0, 7,5$ Hz, H-1') với C-3 (δ_C 88,0) và H-3 (δ_H 3,45) với C-1' (δ_C 106,6) trong phổ HMBC. Hằng số tương tác của proton anomeric ($J=7,5$ Hz) cho biết cấu hình của đường β -glucopyranosyl. Hơn nữa, cấu hình tương đối của phần aglycone 16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one cũng được khẳng

định thêm qua các tương tác trên phổ NOESY. Theo đó, tương tác của H-16 (δ_H 4,41) và H-23 (δ_H 4,60) cho phép xác cấu hình của C-16 và C-23. Từ việc phân tích dữ liệu phổ ở trên và so sánh với tài liệu tham khảo [108], cấu trúc của chất **EH7** được xác định là 16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one-3-O- β -D-glucopyranoside (Hình 4.37). Hợp chất **EH6** và **EH7** trước đây được phân lập từ loài *E. hainanensis* và *W. ebracteata* [11, 107].

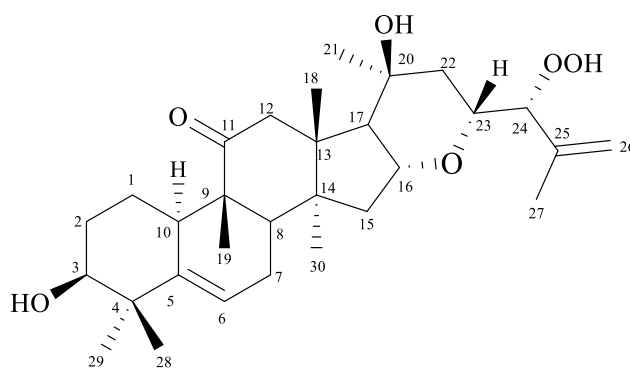
Bảng 4.17. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH7** và chất so sánh

C	EH7		16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one-3-O- β -D-glucopyranoside ^[108]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	22,4	α : 1,59 br d (13,0) β : 1,32 d (13,0)	24,2	1,43, m
2	28,9	2,05, br	25,8	1,35, m
3	88,0	3,44, br s	81,3	3,42, brs
4	42,7	-	41,1	-
5	142,1	-	142,2	
6	119,6	5,64, br s	117,5	5,61, d (5,5)
7	24,9	α : 1,93 m β : 2,39 m	23,5	1,75, m 2,30, m
8	44,2	1,97 m	41,9	1,80, m
9	49,0	-	48,4	
10	36,5	2,38 br d (10,5)	34,0	2,18, m
11	216,5	-	212,7	
12	49,3*	α : 3,16 d (15,0) β : 2,37 d (15,0)	48,2	3,10, d (14,6) 2,16, d (14,6)
13	49,2 *	-	47,6	
14	50,8	-	47,4	
15	41,7	α : 1,44 m β : 1,88 dd (13,0, 11,5)	39,8	1,70, m 1,20, m
16	77,7	4,41 br ddd (3,5, 10,0, 11,5)	75,3	4,22, dt (10,4, 3,6)
17	56,4	2,04 br dq (10,5, 3,0)	54,6	1,75, d (10,4)
18	20,1	0,94, br s	19,3	0,78, s
19	20,5	1,10, br s	19,9	0,89, s
20	72,5	-	70,2	
21	29,0	1,29, s	28,7	1,13, s
22	49,8*	1,43, m	48,4	1,15, s
23	74,5	4,60, m	72,1	4,40, dt (8,4, 3,7)
24	126,5	5,16, dd (1,2, 8,2)	126,3	5,02, br d (8,3)
25	136,9		133,0	
26	18,4	1,72, d (1,0)	18,0	1,56 s

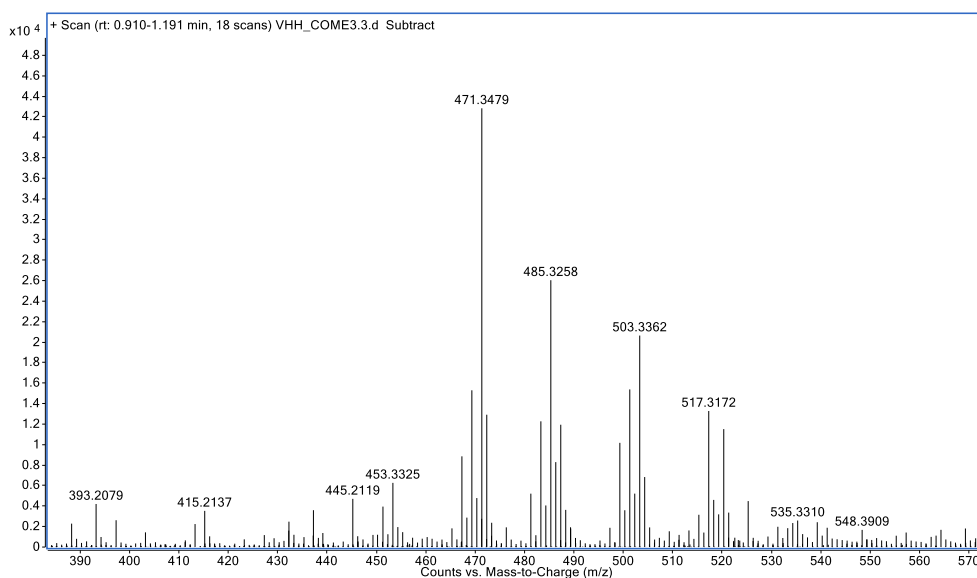
27	26,0	1,74, br d (1,0)	25,2	1,61 s
28	28,6	1,07, s	24,5	0,85, s
29	25,8*	1,10, s	21,4	1,13, s
30	25,8*	1,27, s	20,6	1,08, s
1'	106,6	4,30, d (7,5)	100,4	4,12, d (7,7)
2'	75,6	3,19, d (8,5)	73,5	2,85, dd (9,0, 7,7)
3'	78,3	3,32, m *	76,9	3,12, m
4'	71,7	3,24, d (3,0)	70,3	3,01, m
5'	77,7	3,21, m	76,6	3,01, m
6'	62,9	3,84, dd (2,5, 12,0) 3,67, dd (2,5, 5,5, 12,5)	61,3	3,65, dd (11,4, 5,5) 3,38, dd (11,4, 1,6)

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD; c: 100 MHz, DMSO-*d*₆; d: 400 MHz, DMSO-*d*₆. *: tín hiệu bị che lấp.

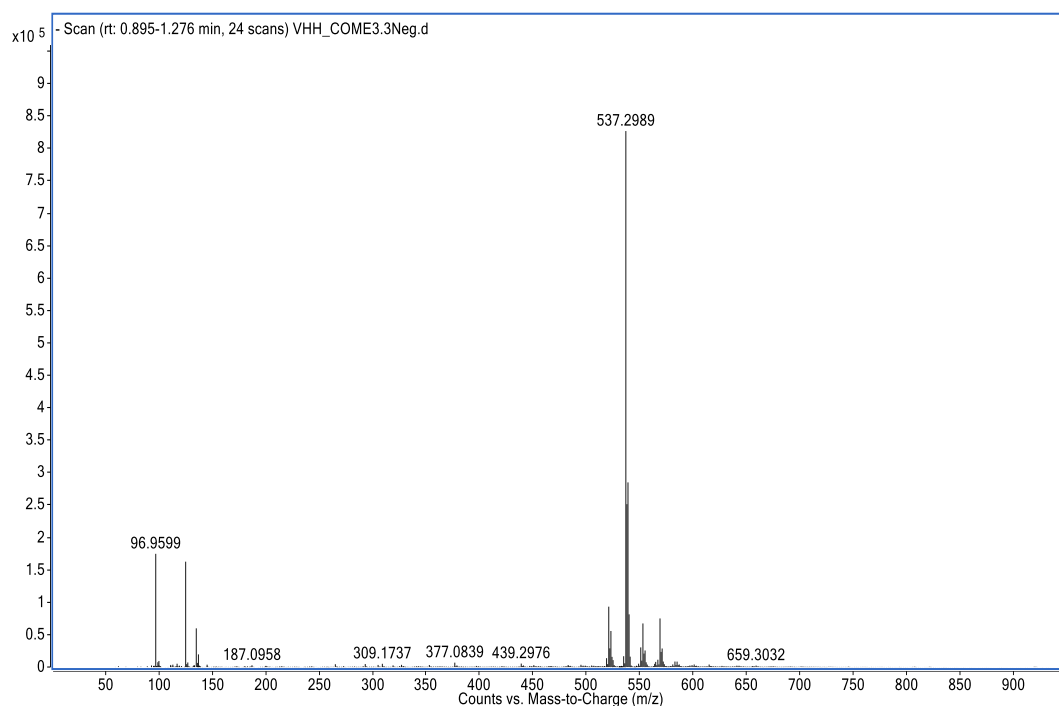
❖ Hợp chất elaeohainensin A (**EH8**: hợp chất mới)



Hình 4.38. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH8**

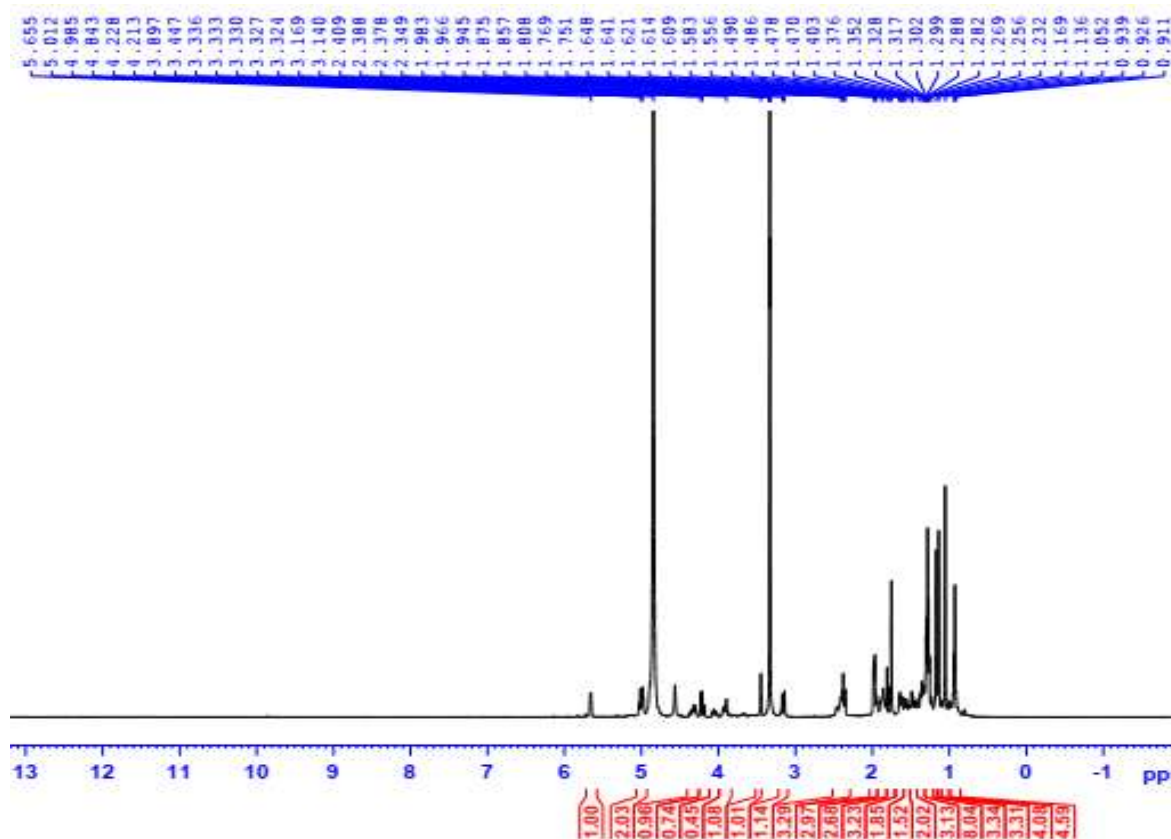


Hình 4.39. Phổ HR-ESI-MS (positive) của hợp chất **EH8**

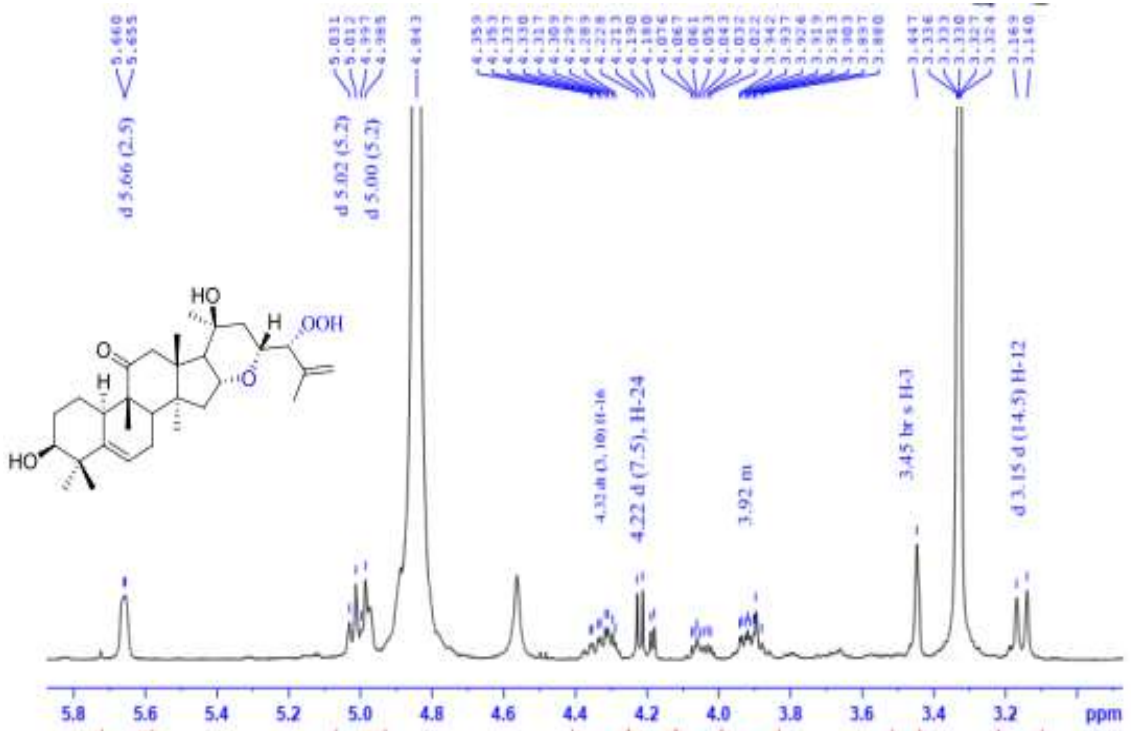


Hình 4.40. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất **EH8**

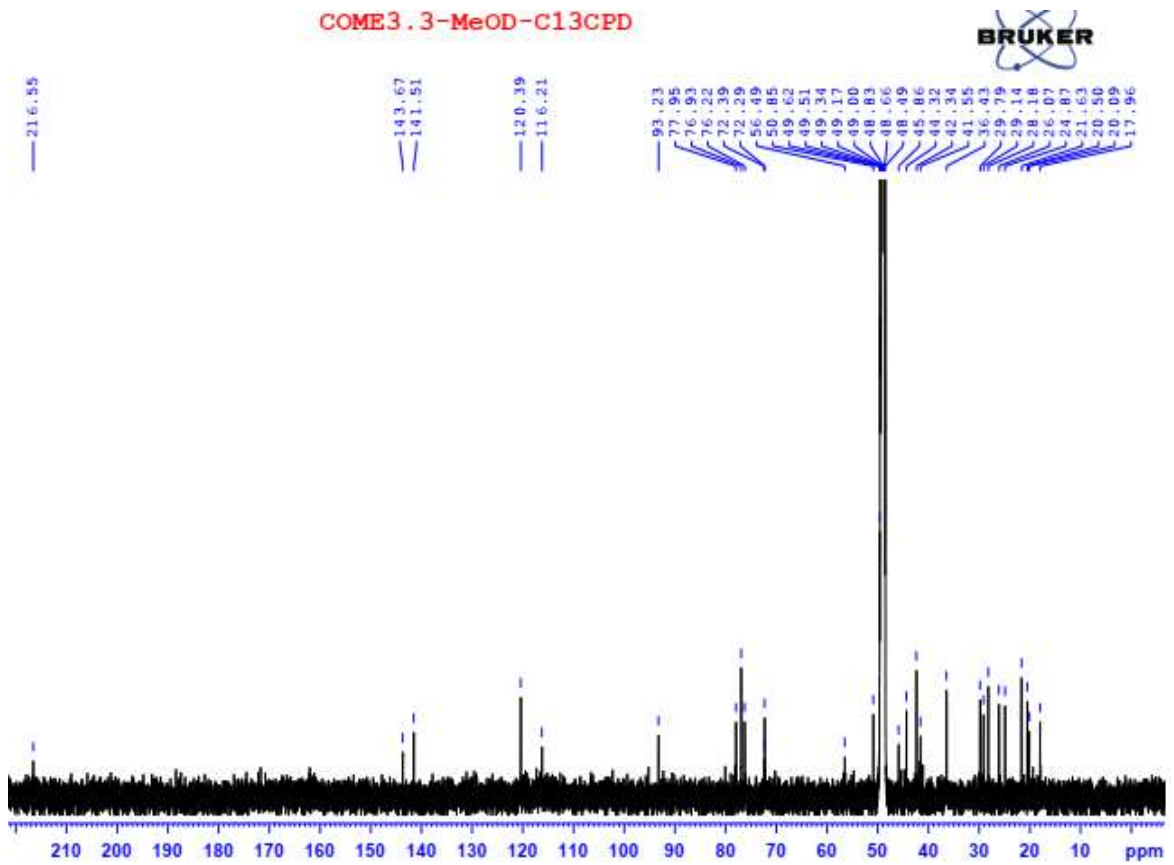
Hợp chất **EH8** là chất rắn, màu trắng. CTPT của **EH8** là $C_{30}H_{46}O_6$ được xác định qua pic ion giả phân tử ở m/z 503,3358 $[M + H]^+$ (tính toán $C_{30}H_{47}O_6$, 503.3367) và 537,2989 $[M + Cl]^-$ (tính toán $C_{30}H_{46}O_6Cl$, 537,2988) ở phổ HR-ESI-MS.



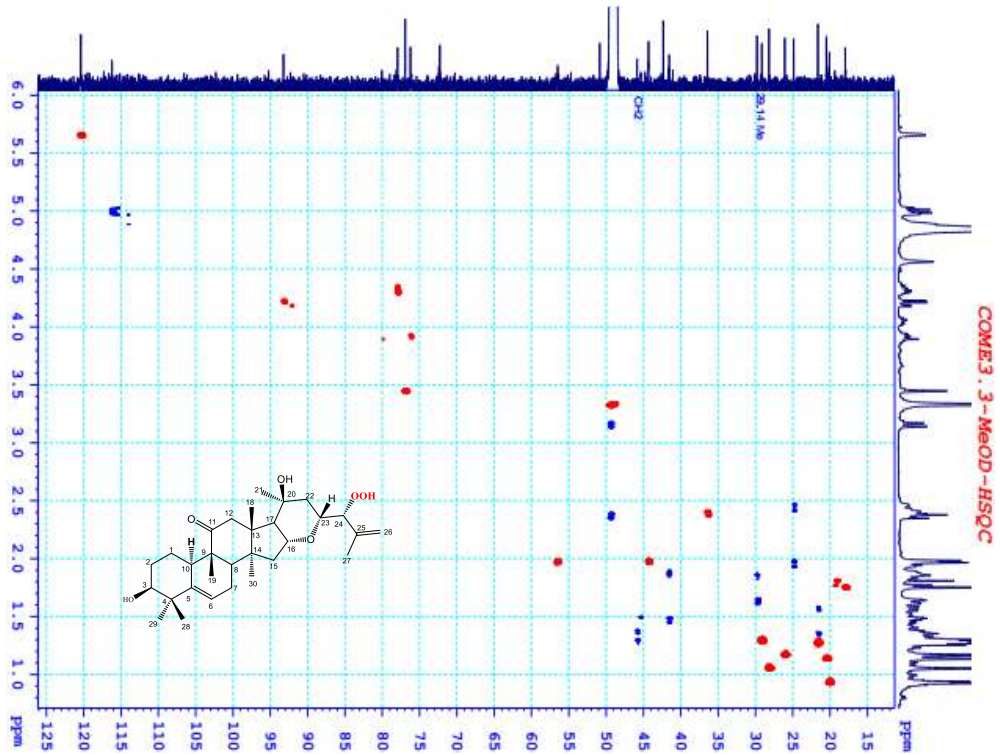
Hình 4.41. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **EH8**



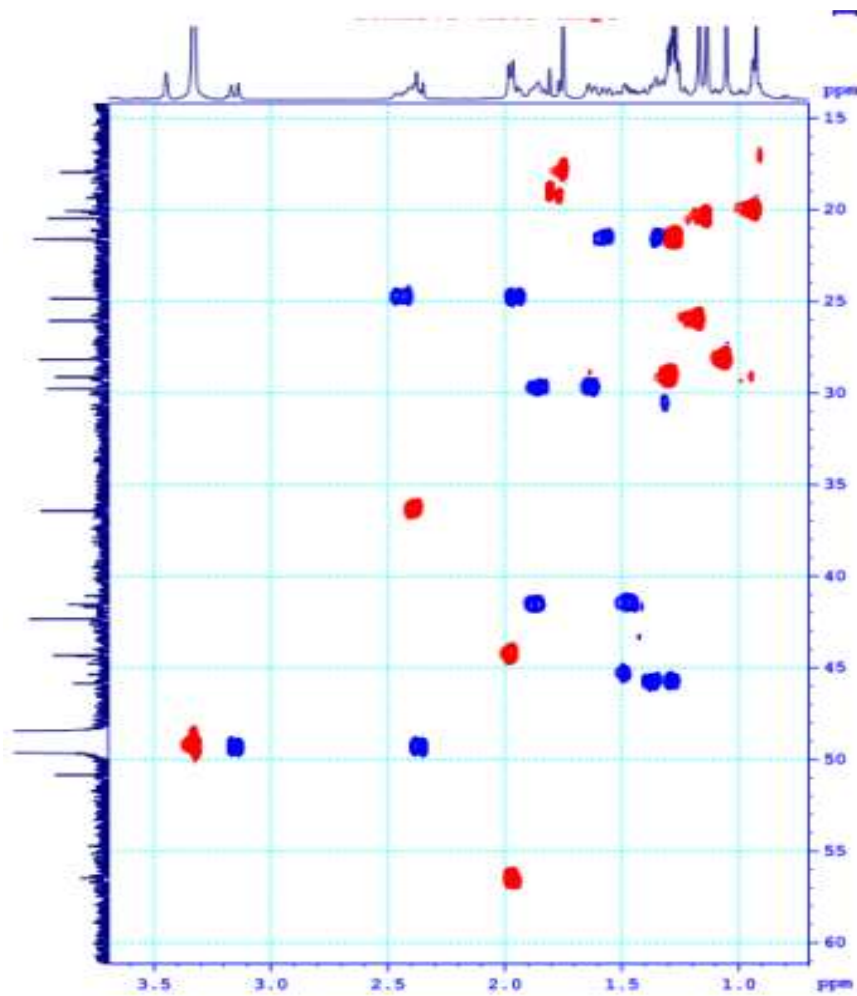
Hình 4.42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn 5,7-3,1 ppm) của hợp chất **EH8**



Hình 4.43. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **EH8**

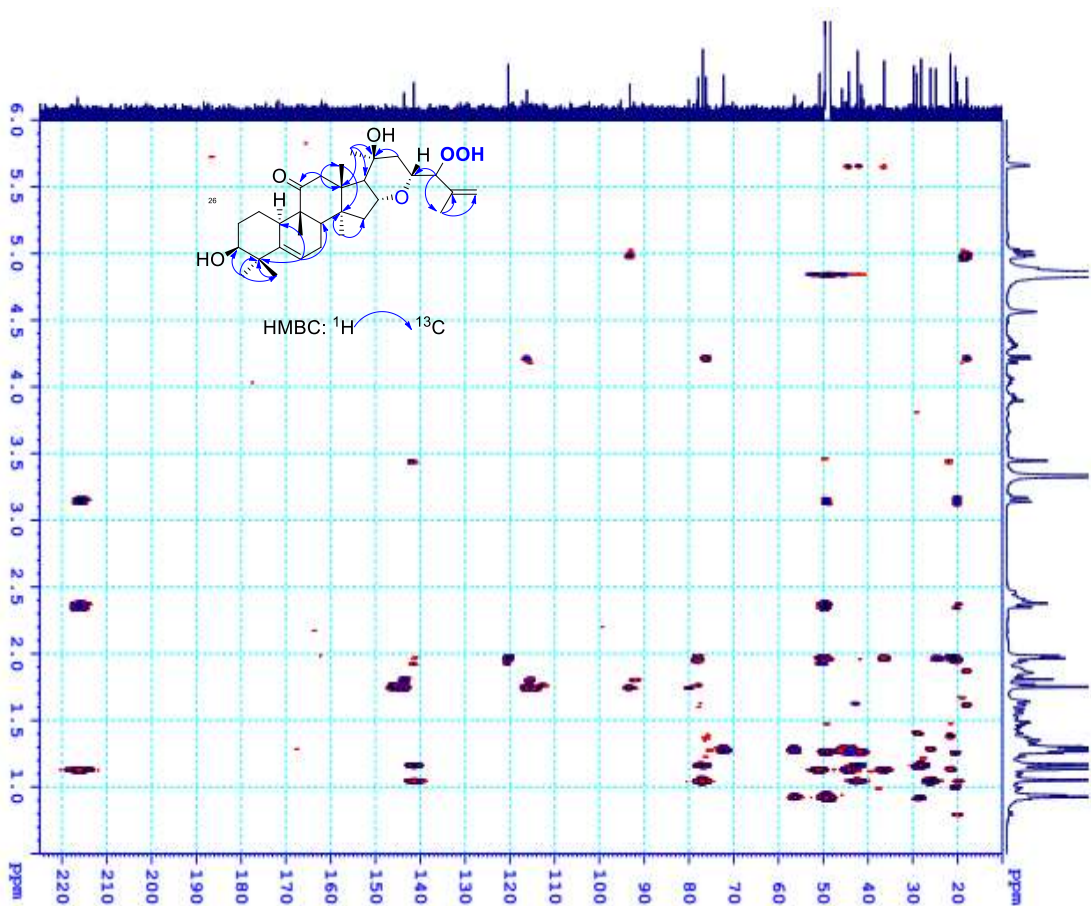


Hình 4.44. Phổ HSQC của hợp chất **EH8**

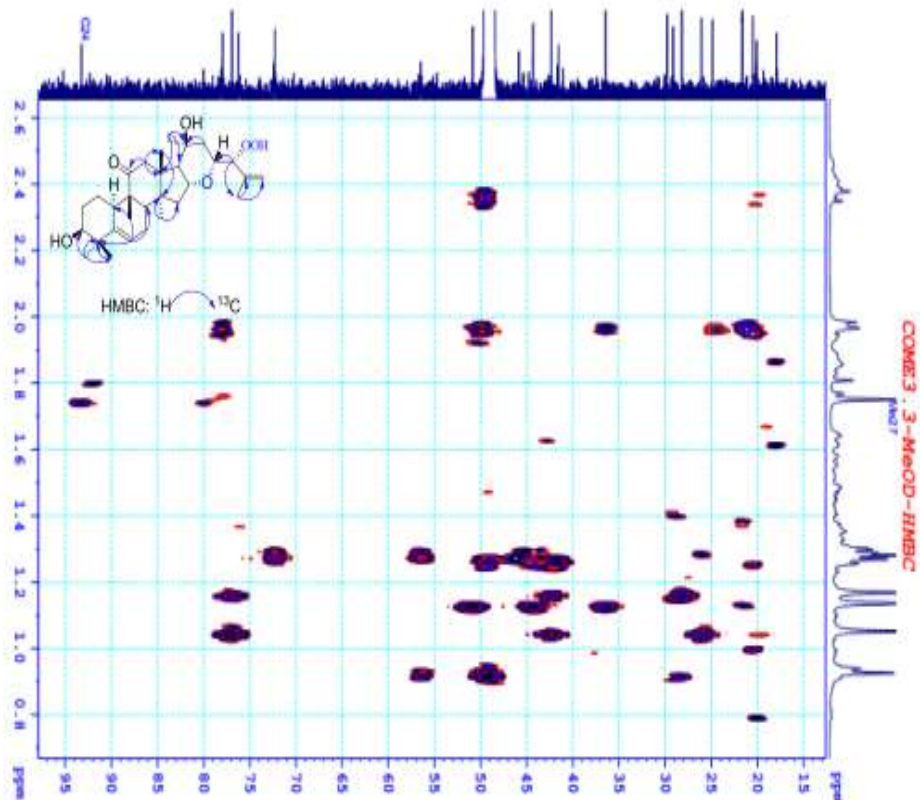


Hình 4.45. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất **EH8**

Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của chất **EH8** có tín hiệu của 30 carbon (8xCq, 8xCH, 7xCH₂, 7xCH₃), trong đó có năm carbon carbinol, một olefin carbon gắn ba nhóm thế, một carbon olefin ở cuối mạch và một nhóm carbonyl (δ_{C} 216,6). Phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR cũng cho thấy sự hiện diện của bảy nhóm methyl trong khoảng δ_{H} 0,93-1,75; một olefin methine ở δ_{H} 5,66 (H-6, brd, $J=6,0$ Hz)/ δ_{C} 120,4; và bốn oxymethine ở δ_{H} 3,45 (H-3, brs)/ δ_{C} 76,9; δ_{H} 4,32 (H-16, ddd, $J=10,5$; 10,5; 3,5 Hz)/ δ_{C} 78,0, 3,92 (H-23, m)/ δ_{C} 76,2 và 4,22 (H-24, d, $J=7,5$ Hz)/ δ_{C} 93,2. Đáng chú ý, các tín hiệu điển hình của một gốc isopropylidene ở δ_{H} 5,02 (H-26a, d, $J=4,5$ Hz) và 5,00 (H-26b, d, $J=4,5$ Hz)/ δ_{C} 116,2, 1,75 (CH₃-27, s)/ δ_{C} 18,0 và 143,7 ppm (C-25). Vì vậy, **EH8** được dự đoán là một triterpene 4 vòng (tetracyclic) có một nhóm carbonyl, một liên kết đôi trong vòng, một liên kết đôi cuối mạch nhánh và liên kết đôi ở -C5=C6- đặc trưng cho nhóm cucurbitacin.



Hình 4.46. Phổ HMBC của hợp chất **EH8**



Hình 4.47. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất **EH8**

Cấu trúc phẳng của **EH8** được thiết lập trên tương quan ^{13}C - ^1H trong phổ HSQC và HMBC. Phân tích tương quan phổ HMBC cho phép xác định ba chuỗi, -C1-C2-C3-C4-, -C14-C15-C16-C17- và -C23-C24-C25-C27-. Cụ thể, phổ HMBC cho thấy tương tác giữa proton H-24 (δ_{H} 4,22) với C-23 (δ_{C} 76,2), H-24 (δ_{H} 4,22) và H-27 (δ_{H} 1,75) với C-26 (δ_{C} 116,2), cũng như các proton methylene olefin cuối mạch của H-26 (δ_{H} 5,00) với C-24 (δ_{C} 93,2), C-25 (δ_{C} 143,7) và C-27 (δ_{C} 18,0); proton H-2 β (δ_{H} 1,61) với C-4 (δ_{C} 42,3), proton H-2 α (δ_{H} 1,88) với C-1 (δ_{C} 21,6), proton H-3 (δ_{H} 3,45) với C-1 (δ_{C} 21,6), C-4 (δ_{C} 42,3); proton H-17 (δ_{H} 1,97) với C-14 (δ_{C} 50,9), C-16 (δ_{C} 78,0). Ngoài ra, so sánh số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR đặc trưng của chất **EH8** với số liệu phổ của chất **EH6** có nhiều sự tương đồng, ngoại trừ các tín hiệu của mạch nhánh, với sự dịch chuyển sang trường mạnh hơn ở C-24 từ δ_{C} 126,5 sang 93,2 ppm. Hơn nữa, dữ liệu ^{13}C -NMR của **EH8** phù hợp với dữ liệu của elaeocarpucin A và B [64], ngoại trừ có sự khác biệt của carbinol C-24 dịch chuyển về phía trường thấp hơn ở δ_{C} 93,2 ppm ($\Delta\delta_{\text{C}} > 25$ ppm), gợi ý cho thấy phân tử có thể có nhóm hydroperoxide. Dự đoán trên cũng được xác nhận bởi sự xuất hiện của pic ion tại m/z 471,3479 $[\text{M} + \text{H}-\text{O}_2]^+$ (tính toán $[\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4]^+$, 471,3469) trong phổ HR-ESI-MS do mất đi hai nguyên tử oxy (2O) đặc trưng cho sự hiện diện của một nhóm

hydroperoxide trong hợp chất ban đầu. Các tương tác chính trên phổ HMBC của H-24 (δ_H 4,22) và H-27 (δ_H 1,75) với C-26 (δ_C 116,2), cũng như proton methylene olefin cuối mạch của H-26 với C-24 (δ_C 93,2), C-25 (δ_C 143,7) và C-27 (δ_C 18,0) khẳng định thêm cấu trúc phân tử của mạch nhánh (Hình 4.46). Do đó, cấu hình tương đối ở tất cả các nguyên tử carbon bất đối của **EH8**, ngoại trừ C-24, được xác định là $16\alpha,23\alpha$ -epoxy- $3\beta,20\beta$ -dihydroxy- $10\alpha H,23\beta H$ [54, 64]. Dựa vào phổ NOESY không thể xác định được cấu hình tuyệt đối tại C-24 gắn nhóm hydroperoxide do sự quay tự do trong phân tử. Tuy nhiên, giá trị của hằng số tương tác giữa H-23 và H-24 ($J_{H-23/H-24} = 7,5$ Hz) gợi ý cho biết cấu hình tương đối của C-23 và C-24 (Hình 4.38). Trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ, cấu trúc của **EH8** được xác định là $16\alpha,23\alpha$ -epoxy- $3\beta,20\beta$ -dihydroxy- 24α -hydroperoxy- $10\alpha H,23\beta H$ -cucurbit-5,25-dien-11-one, một cucurbitacin mới, và được đặt tên là elaeohainensin A.

Sự xuất hiện đồng thời ba chất 16,23-epoxycucurbitacin **EH6**, **EH7** và **EH8** trong cùng một nguyên liệu thực vật cho thấy chất **EH8** có thể được sinh tổng hợp thông qua quá trình đồng phân hóa liên kết đôi C24=C25, kết hợp với peroxy hóa [109]. Theo tra cứu, elaeohainensin A là một đại diện đầu tiên của cucurbitacin có nhóm hydroperoxide.

Bảng 4.18. Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C - NMR của hợp chất **EH8**

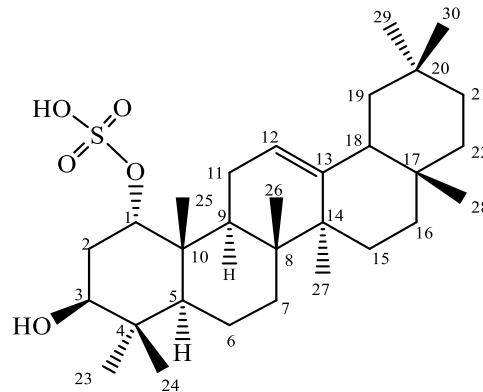
C	δ_C^a	δ_H^b	Tương tác HMBC (H→C)
1	21,6	α : 1,62, dd (8,5, 7,5) β : 1,33, m	-
2	29,8	α : 1,88, m β : 1,61, dd (8,5, 7,5)	C-4, C-1
3	76,9	3,45, br s	C-5, C-1
4	42,3	-	
5	141,5	-	
6	120,4	5,66, br d (6,0)	C-8, C-4, C-10
7	24,9	α : 1,92, m β : 2,46, m	-
8	44,3	1,94, m	-
9	49,0 ^b	-	-
10	36,4	2,37, br d (9,5)	-
11	216,6	-	-
12	49,6 ^b	α : 3,15, d (14,5) β : 2,36, d (14,5)	C-11, C-13, C-18
13	49,2 ^b	-	-
14	50,9	-	-

15	41,6	α : 1,48, m β : 1,86, m	-
16	78,0	4,32, ddd (3,5, 10,5, 10,5)	-
17	56,5	1,97, br d (8,5)	C-14, C-16
18	20,1	0,93, s	C-14
19	20,5	1,14, s	-
20	72,4	-	-
21	29,1	1,30, s	C-20, C-17, C-13
22	45,9	α : 1,34, m β : 1,36, m	C-20
23	76,2	3,92, m	-
24	93,2	4,22, d (7,5)	C-26, C-23, C-27
25	143,7	-	-
26	116,2	5,02, d (5,2) 5,00, d (5,2)	C-24, C-27
27	18,0	1,75, s	C-24, C-25, C-26
28	28,2	1,17, s	C-3, C-4, C-29
29	26,1	1,05, s	C-3, C-4, C-28
30	26,1	1,27, s	C-14, C-15

a: 125 MHz, CD₃OD; b: 500 MHz, CD₃OD

4.1.2.2. Các hợp chất olean triterpene

❖ Hợp chất 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-12-ene 1-sulfate (**EH9**: chất mới)



Hình 4.48. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH9**

Hợp chất **EH9** ở dạng rắn, màu trắng. CTPT (C₃₀H₅₀O₅S) của **EH9** được xác định dựa trên pic ion giả phân tử ở m/z 521,3308 [M - H]⁻ (tính toán [C₃₀H₄₉O₅S]⁻, 521,3306) trong phổ HR-ESI-MS (negative ion). Phổ ¹³C-NMR và HSQC của **EH9** có tín hiệu của 30 nguyên tử carbon, bao gồm bảy carbon bậc bốn, sáu carbon methine, chín carbon methylene và tám carbon methyl. Phổ ¹H-NMR có tín hiệu của tám methyl singlet ở δ_H 0,83, 0,88, 0,89, 0,89, 0,99, 1,03, 1,04, và 1,23; một proton carbinol ở δ_H 3,74 (H-3, dd, $J=10,0$; 3,5 Hz) và một proton olefin ở δ_H 5,19 (H-12, t,

$J=7,0$ Hz) đặc trưng cho một triterpenoid năm vòng. Dựa trên tín hiệu phổ HSQC, cho phép gán tín hiệu của tám nhóm methyl tương ứng ở δ_C 16,3 (C-23), 29,0 (C-28), 16,4 (C-25), 33,8 (C-30), 24,1 (C-29), 17,7 (C-26), 28,8 (C-24), 26,6 (C-27); hai tín hiệu carbon carbinol ở δ_C 73,8 (C-3) và 81,8 (C-1); và hai tín hiệu carbon olefin tại δ_C 123,8 (C-12) và 145,2 (C-13) (Bảng 4.19). Các tín hiệu trên đặc trưng cho triterpene pentacyclic với một nhóm thế hydroxy, một nhóm sulfate và một nối đôi.

Nhóm sulfate gắn ở C-1 được xác định dựa trên phân tích phổ HR-ESI-MS và sự dịch chuyển về trường thấp hơn nhiều của C-1 (δ_C 81,8; δ_H 4,26) so với nhóm thế 1-OH (δ_C 71,3). Phổ khối HR ESI MS (positive) có các peak đặc trưng cho phân tử vì mất một nhóm sulfate ở m/z 441,3736 $[M + H - SO_3H]^+$ (tính toán $[C_{30}H_{49}O_2]^+$, 441,3727) và 423,3633 $[M + H - SO_3H - H_2O]^+$ (tính toán $[C_{30}H_{47}O]^+$, 423,3621).

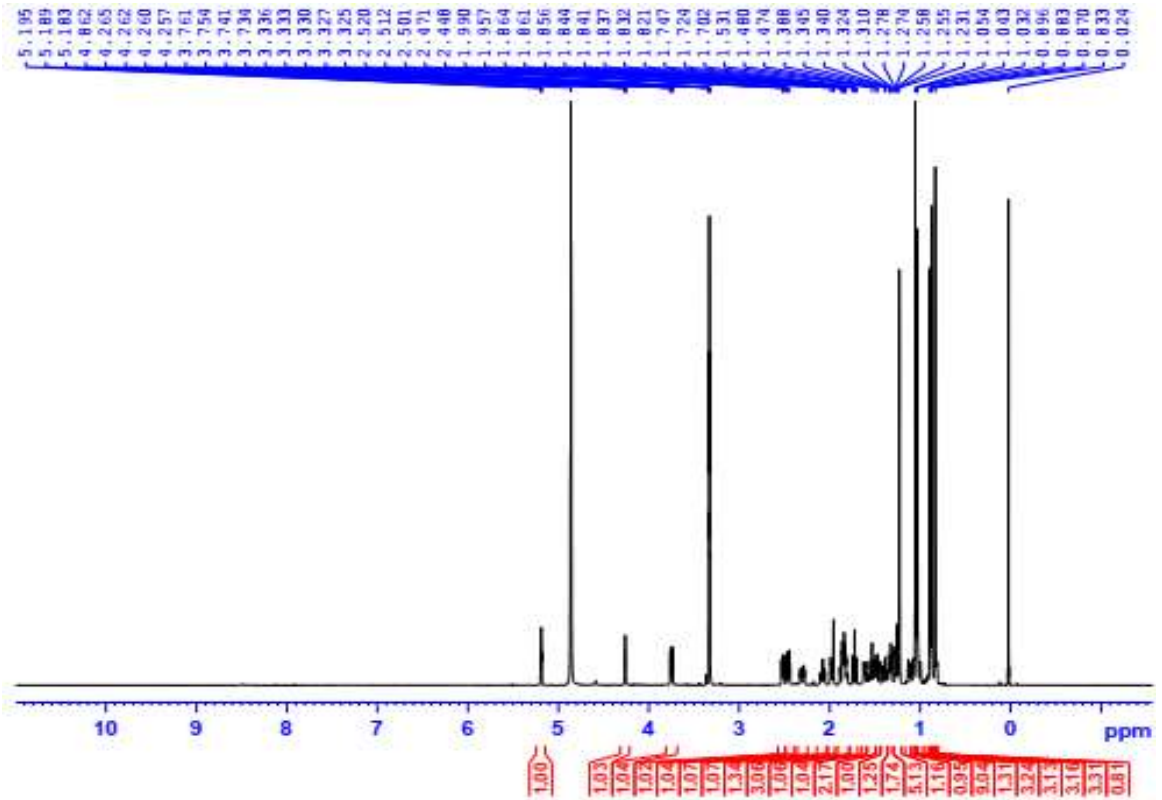
Phổ 1H - 1H COSY cho chuỗi liên kết giữa proton oxymethine H-1 và H-3 (-CH-O-CH₂-CH-OH). Ngoài ra, phổ HMBC cũng ghi nhận liên kết giữa carbon C-3 với các proton H-5 (δ_H 1,27), H3-23 (δ_H 0,83), H3-24 (δ_H 1,04); carbon C-1 (δ_C 81,8) với proton H-9 (δ_H 2,51), H3-25 (δ_H 0,89). Cấu hình tương đối của chất **EH9** được xác định dựa trên sự tương tác của proton H-1 với các proton H3-24, H3-25, H3-26 (δ_H 1,03) và giữa proton H-3 với các proton H-5, H-9, H3-23 trên phổ NOESY, giúp dự đoán cấu hình của H-1 và H-3 lần lượt là 1α -sulfate và 3β -hydroxy. Điều này được khẳng định thêm qua tương tác dạng equatorial giữa H-1 và H-3 ($J=3,0$ Hz). Dựa trên các phân tích dữ liệu phổ ở trên, cấu trúc của hợp chất **EH9** được xác định là $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-12-ene 1-sulfate, một hợp chất mới.

Bảng 4.19. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **EH9**

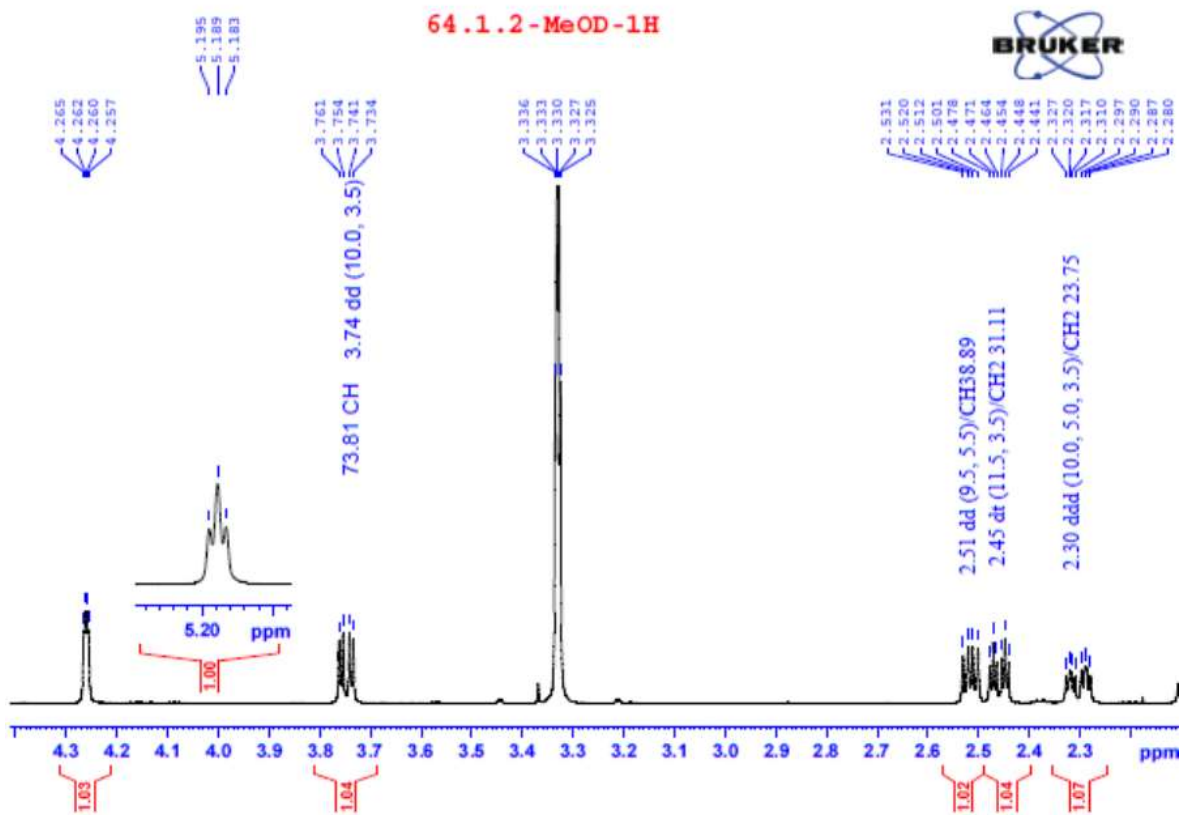
C	δ_C^a	δ_H^b
1	81,8, CH	4,26, dd (3,0, 1,8)
2	33,3, CH ₂	1,56, m 1,35, m
3	73,8, CH	3,75, dd (12,0, 4,2)
4	39,7, C	-
5	49,9, CH	1,27, dd (11,7, 2,1)
6	28,1, CH ₂	2,07, dd (13,4, 4,2) 0,82, m
7	27,3, CH ₂	1,82, m

		1,02, m
8	43,3, C	-
9	38,9, CH	2,51, dd (11,4, 6,6)
10	42,3, C	-
11	23,8, CH ₂	2,30, ddd (12,0, 6,0, 4,2) 1,83, m
12	123,8, CH	5,19, t (7,2)
13	145,4, C	-
14	40,9, C	-
15	31,1, CH ₂	2,46, dt (13,8, 4,2) 1,82, m
16	19,5, CH ₂	1,62, m 1,51, m
17	33,5, C	-
18	49,0 ^e , CH	1,97 (m) ^e
19	48,0, CH ₂	1,73, t (13,5) 1,05, m ^e
20	31,9, C	-
21	38,4, CH ₂	1,46, dd (13,8, 3,6) 1,27, dd (12, 0, 2,4)
22	35,8, CH ₂	1,40, dt (13,6, 3,0) 1,12, dd (13,2, 3,6)
23	16,3, CH ₃	0,83, s
24	28,8, CH ₃	1,04, s
25	16,4, CH ₃	1,08, s
26	17,7, CH ₃	1,03, s
27	26,6, CH ₃	1,23, s
28	29,0, CH ₃	0,87, s
29	24,1, CH ₃	0,90, s
30	33,8, CH ₃	0,88, s

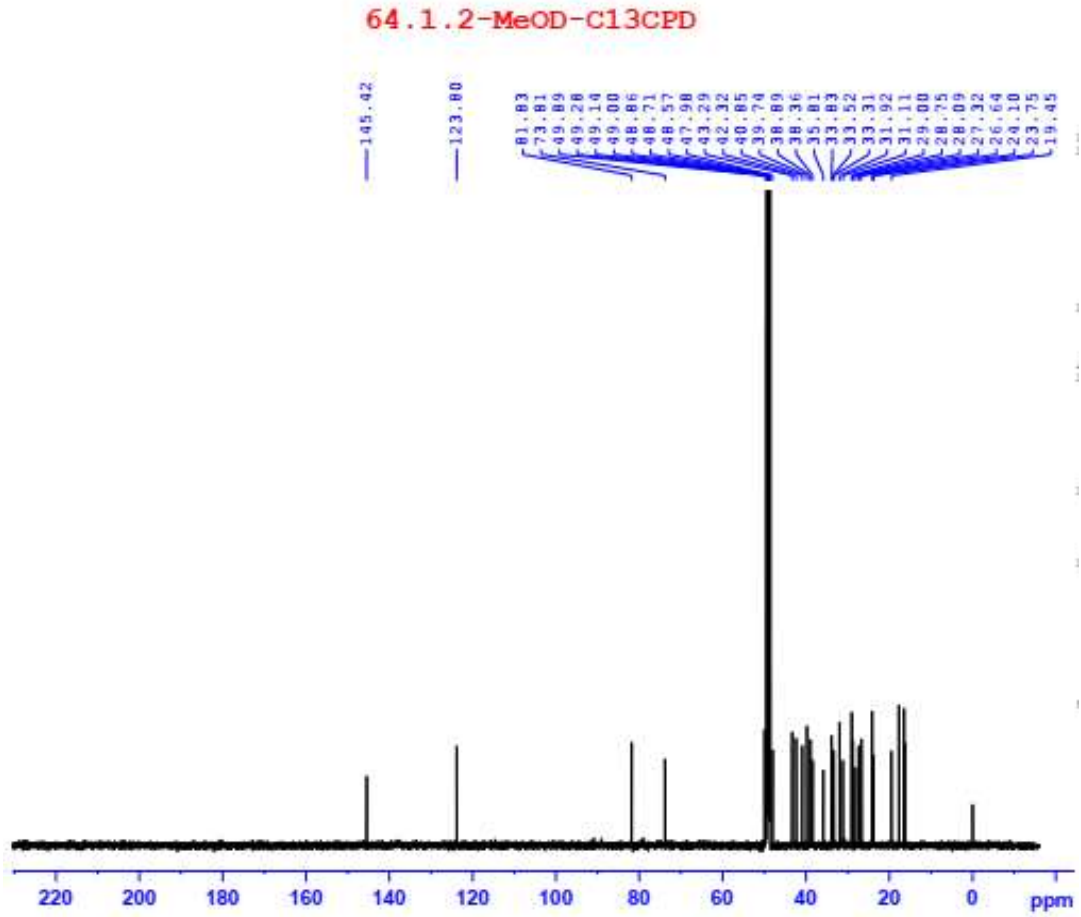
a: 150 MHz, CD₃OD; b: 600 MHz, CD₃OD.



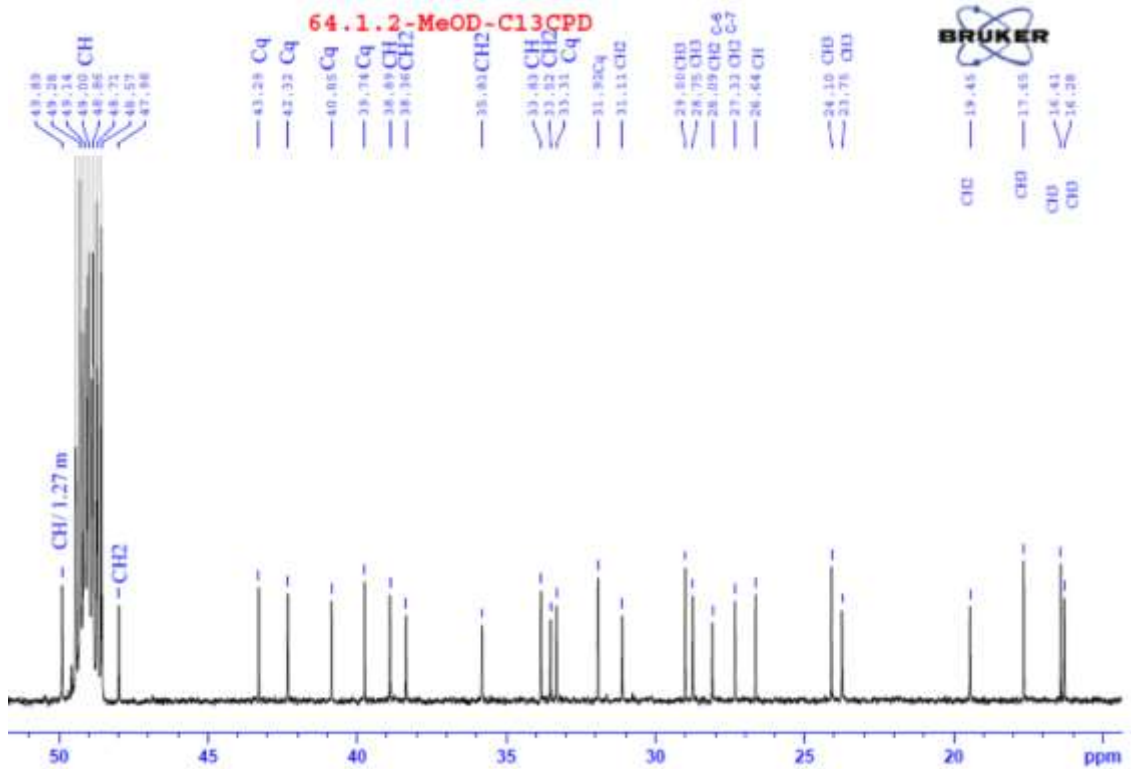
Hình 4.49. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **EH9**



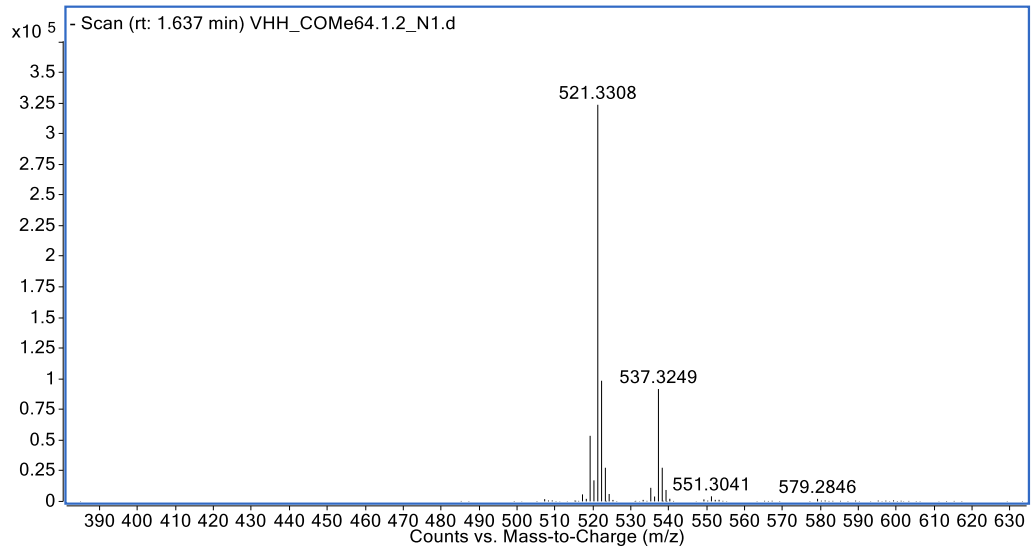
Hình 4.50. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 5,2 đến 2,2 ppm) của hợp chất **EH9**



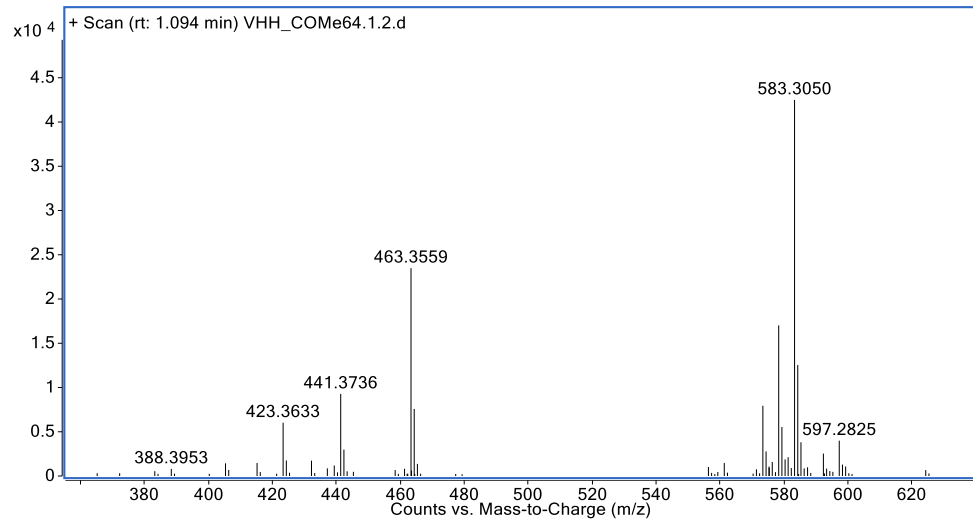
Hình 4.51. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **EH9**



Hình 4.52. Phổ ^{13}C -NMR (giãn từ 52 đến 16 ppm) của hợp chất **EH9**

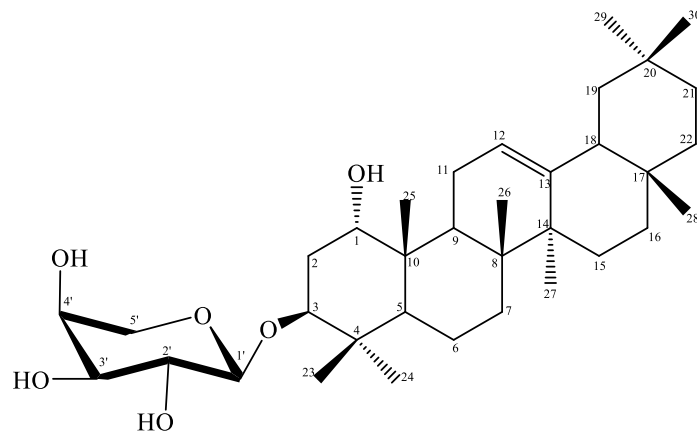


Hình 4.53. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất **EH9**



Hình 4.54. Phổ HR-ESI-MS (positive) của hợp chất **EH9**

❖ Hợp chất 1α -hydroxy-olean-12-en- 3β -O- α -L-arabinopyranoside (**EH10**)



Hình 4.55. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH10**

Hợp chất **EH10** dạng rắn màu trắng. CTPT $C_{35}H_{58}O_6$ của **EH10** được xác định dựa trên pic ion âm giả phân tử ở m/z 619,4207 $[M+HCOO]^-$ (tính toán $C_{36}H_{59}O_8^-$, 619,4215) trong phổ HR-ESI-MS và phổ ^{13}C -NMR (Bảng 4.20).

Cấu trúc của chất **EH10**, bao gồm phần aglycone và gốc đường, được xác định dựa trên dữ liệu phổ NMR 1D và 2D. Gốc đường được xác định bằng cách thủy phân hợp chất **EH10** bằng acid HCl 1M. Dựa trên kết quả thủy phân và phân tích sắc ký khí (GC), cho biết gốc đường là L-arabinose. Đơn vị đường L-arabinopyranose trong hợp chất **EH10** (Bảng 4.20) được khẳng định thêm dựa trên các liên kết giữa proton δ_H 4,37 (H-1', d, 6,0), 3,63 (H-2', br t, 7,5), 3,56 (H-3', m), 3,92 (H-4', H-5a', m), 3,54 (H-5b', m) trong phổ 1H -NMR với carbon tương ứng δ_C 106,4, 72,2, 73,7, 68,6 và 65,5 trong phổ ^{13}C -DEPT-NMR, và phổ HSQC [110].

Phổ 1H -NMR cho thấy các tín hiệu proton bao gồm một olefin proton ở δ_H 5,19 (H-12, br s); và tám nhóm methyl ở δ_H 0,88 (CH₃-23, s), 1,08 (CH₃-24, s), 0,98 (CH₃-25, s), 1,01 (CH₃-26, s), 1,20 (CH₃-27, s), 0,85 (CH₃-28, s), 0,87 (CH₃-29, s), 0,87 (CH₃-30, s) lần lượt gắn với các carbon tương ứng (δ_C 16,7, 28,3, 16,8, 17,5, 26,5, 28,9, 24,1 và 33,8), dựa trên tương tác ở phổ HSQC. Ngoài năm tín hiệu carbon của đường arabinose, phổ ^{13}C và DEPT-NMR của phần aglycone có tín hiệu 30 carbon bao gồm hai oxymethine ở δ_C 72,7 (C-1) và 85,3 (C-3), hai carbon olefin ở δ_C 122,8 (C-12) và 145,7 (C-13), chín carbon methylene ở δ_C 33,8 (C-2), 27,7 (C-6), 27,0 (C-7), 23,7 (C-11), 33,0 (C-15), 18,8 (C-16), 47,7 (C-19), 37,9 (C-21) và 35,5 (C-22), ba carbon methine δ_C 49,0 (C-5), 38,7 (C-9) và 48,2 (C-18), và sáu carbon bậc bốn ở δ_C 39,8 (C-4), 42,9 (C-8), 41,3 (C-10), 40,4 (C-14), 33,0 (C-17) và 31,6 (C-20). Những tín hiệu trên đặc trưng cho nhóm triterpen pentacyclic và phần aglycone được dự đoán là $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-12-en [111]. So sánh với tài liệu về các triterpen tương tự [112] và dựa trên việc phân tích phổ HMBC và COSY, khẳng định được vị trí của liên kết đôi giữa C-12/C-13 và hai nhóm hydroxyl ở δ_C 72,7 (C-1) và 85,3 (C-3). Hơn nữa, phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa proton anomeric ở δ_H 4,34 (H-1', d, 6,0) với carbon δ_C 85,3 (C-3) khẳng định đường arabinopyranose và gắn với phần aglycone tại C-3. Cấu trúc lập thể của **EH10** được thiết lập dựa vào các tương tác của H-1'/H-3, H-1/H₃-24, và H-1/H-2 trên phổ NOESY, dựa trên các tương tác NOE của H-1'/H-3, H-1/H₃-24, và H-1/H-2. Từ việc phân tích dữ liệu phổ trên và

so sánh với tài liệu tham khảo [13], cấu trúc của **EH10** được xác định là 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-*O*- α -L-arabinopyranoside.

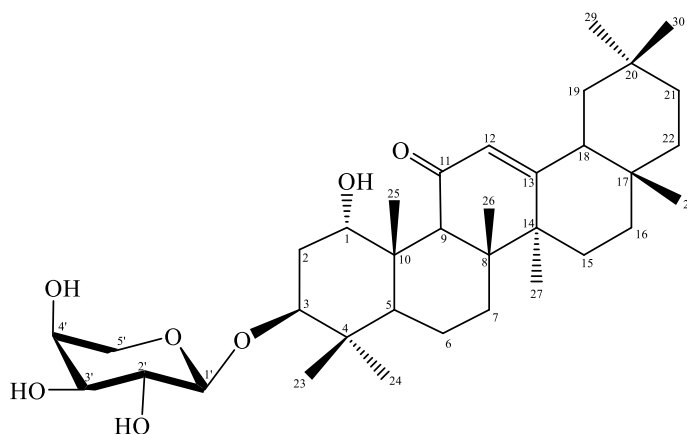
Bảng 4.20. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH10** và chất so sánh

C	EH10		1α-Hydroxy-olean-12-en-3β-<i>O</i>-α-L-arabinopyranoside [13]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1	72,7	3,56, brs, 1H	72,7	3,55, brs, 1H
2	33,8	2,03, m, 2H	33,8	2,03, m, 2H
3	85,4	3,67, dd (10,5, 6,5), 1H	85,3	3,67, dd (10,5, 6,5), 1H
4	39,8	-	39,8	-
5	49,0	1,23, m, 1H,	49,2	1,24, m, 1H
6	27,7	2,02, dd (14,0, 2,5), 1H 0,80, 1H	27,7	2,02, dd (14,0, 2,5), 1H 0,80, 1H
7	27,0	1,80, m, 1H 0,99, m, 1H	27,0	1,80, m, 1H 0,99, m, 1H
8	42,9	-	42,9	-
9	38,7	2,40, t (8,5), 1H	38,8	2,41, t (8,5), 1H
10	41,2	-	41,3	-
11	23,7	1,91, brd (7,0), 2H	23,7	1,91, brd (7,0), 2H
12	122,8	5,19, s, 1H	122,8	5,19, s, 1H
13	145,7	-	145,7	-
14	40,4	-	40,4	-
15	33,0	1,54, m, 1H 1,30, m, 1H	33,0	1,53, m, 1H 1,31, m, 1H
16	18,8	1,59, m, 1H 1,45, m, 1H	18,8	1,59, m, 1H 1,45, m, 1H
17	33,1		33,2	
18	48,2	1,97, m, 1H	48,2	1,97, m, 1H
19	47,7	1,71, brt (13,5), 1H 0,99, 1H	47,7	1,71, brt (13,5) 1H, 0,99, 1H
20	31,6	-	31,6	-
21	37,9	1,45, m, 1H 1,21, m, 1H	37,9	1,44, m, 1H 1,20, m, 1H
22	35,5	1,37, m, 1H 1,12, m, 1H	35,6	1,37, m, 1H 1,12, m, 1H
23	16,6	0,88, s, 3H	16,6	0,88, s, 3H
24	28,3	1,08, s, 3H	28,3	1,08, s, 3H
25	16,8	0,98, s, 3H	16,8	0,98, s, 3H
26	17,4	1,01, s, 3H	17,4	1,01, s, 3H
27	26,4	1,20, s, 3H	26,4	1,20, s, 3H
28	28,8	0,85, s, 3H	28,8	0,85, s, 3H
29	24,0	0,87, s	24,0	0,87, s
30	33,7	0,87, s	33,7	0,87, s
1'	106,4	4,34, d (6,0)	106,4	4,34, d (6,0)
2'	72,2	3,61, brt (7,5)	72,2	3,61, brt (7,5)

3'	73,8	3,54	73,7	3,54
4'	68,6	3,84	68,6	3,84
5'	65,5	3,84 3,51	65,5	3,83 3,52

a: 125 MHz, CD₃OD + CDCl₃; b: 500 MHz, CD₃OD + CDCl₃;

❖ Hợp chất 1 α -hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside
(**EH11**)



Hình 4.56. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH11**

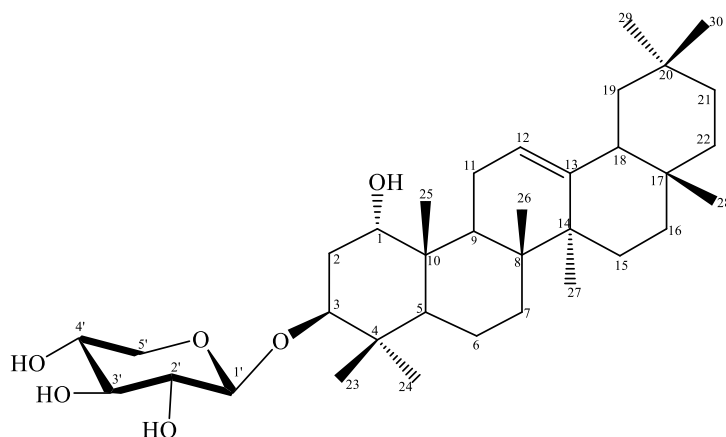
Hợp chất **EH11** ở dạng rắn màu trắng. Phổ HR-ESI-MS của **EH11** có pic ion giả phân tử ở m/z 589,4132 [M+H]⁺ (tính toán C₃₅H₅₇O₇, 589,4104), tương ứng với CTPT là C₃₅H₅₆O₇.

Phổ ¹H-NMR của **EH11** xuất hiện các tín hiệu proton đặc trưng cho nhóm triterpene khung oleanane với một proton olefinic ở 5,55 ppm (H-12, br s); và tám proton methyl ở δ_H 0,89, 1,10, 1,17, 1,18, 1,44, 0,92, 0,96, 0,95 ppm (s, tương ứng CH₃-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) tương ứng với các tín hiệu carbon δ_C 16,6, 28,3, 18,2, 19,5, 24,0, 29,3, 24,0 và 33,5 trong phổ HSQC.

Phổ ¹³C và DEPT-NMR của phần aglycone có tín hiệu của 30 carbon khung olean, bao gồm hai oxymethine ở δ_C 73,6 (C-1) và 85,1 (C-3), một carbon carbonyl ở δ_C 203,5 (C-11), hai carbon olefin ở δ_C 128,7 (C-12) và 173,8 (C-13), tám carbon methylene [δ_C 33,7 (C-2), 27,6 (C-6), 27,4 (C-7), 33,5 (C-15), 18,2 (C-16), 46,4 (C-19), 37,6 (C-21) và 32,0 (C-22)], ba carbon methine [δ_C 48,5 (C-5), 54,6 (C-9) và 49,0 (C-18)], và sáu carbon bậc bốn [δ_C 40,5 (C-4), 46,5 (C-8), 42,3 (C-10), 45,2 (C-14), 32,0 (C-17) và 32,0 (C-20)]. Điều đáng chú ý trên phổ ¹³C-NMR của hợp chất **EH11** có sự dịch chuyển về phía trường thấp hơn của hai nguyên tử carbon olefin [δ_C 128,7 (C-12) và 173,8 (C-13)] so với các triterpen olenane-12-en, cùng với sự xuất

hiện của carbon carbonyl ở δ_C 203,5 đặc trưng cho nhóm carbon ketone α,β -không no, tương tự như acid hydroxyglycyrrhetic, một hợp chất được biết đến có nhiều trong Cam thảo (*Glycyrrhiza* spp.) [113 - 115]. Do đó, phần aglycone của **EH11** được xác định là $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-11-oxo-12-en [111, 113 - 115], Phổ HMBC của **EH11** có tương tác giữa proton H-1' (δ_H 4,31) và C-3 (δ_C 85,1), cho thấy gốc đường arabinose liên kết với C-3. Cấu hình tuyệt đối của hợp chất **EH11** đã được xác định thông qua các tương tác của H-1'/H-3, H-1/H-24 và H-1/H-25 trong phổ NOESY. Dựa vào việc phân tích phổ trên và so sánh với dữ liệu phổ của **EH10**, cấu trúc hợp chất **EH11** được xác định là 1α -hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside [12].

❖ Hợp chất 1α -hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside (**EH12**)



Hình 4.57. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH12**

Hợp chất **EH12** dạng rắn màu trắng. CTPT của **EH12** được xác định là $C_{35}H_{58}O_6$ dựa trên pic ion giả phân tử ở m/z 619,4212 ($[M+HCOO]^-$ (tính toán $C_{36}H_{59}O_8^-$, 619,4215) trong phổ HR-ESI-MS và phổ ^{13}C -NMR (Bảng 4.21). Thủy phân hợp chất **EH12** bằng acid thu được đường D-xylose-xác định thông qua sắc ký khí (GC). So sánh dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR (Bảng 4.20 và 4.21) của hợp chất **EH12** và **EH10** cho thấy sự tương đồng của gốc aglycone và chúng chỉ khác nhau ở gốc đường D-xylopyranosyl thay vì gốc đường L-arabinopyranosyl như trong hợp chất **EH10**. Ngoài ra, gốc xylopyranosyl được xác định dựa vào các tín hiệu trên phổ HSQC giữa các proton ở δ_H 4,31 (H-1', d, $J=7,5$), 3,23 (H-2', m), 3,33 (H-3', m), 3,49 (H-4', dd, $J=15,0, 9,0$), 3,85 (H-5a', $J=dd, 11,5; 5,0$), 3,23 (H-5b', m) liên kết với các carbon tương ứng ở δ_C 107,0, 74,9, 77,5, 70,8 và 66,3 [110]. Cấu hình của đường

được xác định là β dựa trên hằng số tương tác $J=7,5$ Hz của proton anomeric ở δ_H 4,31 trong phổ 1H -NMR.

Phổ 1H -NMR của phần aglycone cho thấy các tín hiệu bao gồm một proton olefinic ở δ_H 5,19 (1H, br s, H-12) và tám methyl proton bậc ba ở δ_H 0,88, 1,08, 0,97, 1,00, 1,19, 0,85, 0,87, 0,87 ppm (s, CH₃-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) tương ứng với các tín hiệu carbon trong phổ HSQC ở δ_C 16,7, 28,3, 16,8, 17,5, 26,5, 28,9, 24,1 và 33,8. Ngoài năm tín hiệu carbon của phần glycone, phổ ^{13}C và DEPT-NMR của phần aglycone có tín hiệu của 30 carbon bao gồm hai carbon methine oxy hóa ở δ_C 72,8 (C-1) và 85,5 (C-3), hai carbon olefin (δ_C 122,9 (C-12) và 145,9 (C-13)), chín carbon methylene (δ_C 34,0 (C-2), 27,8 (C-6), 27,1 (C-7), 23,8 (C-11), 33,1 (C-15), 18,9 (C-16), 47,8 (C-19), 38,0 (C-21) và 35,6 (C-22)), ba carbon methine (δ_C 49,0 (C-5), 38,8 (C-9) và 48,3 (C-18)), và sáu carbon bậc bốn (δ_C 39,9 (C-4), 43,0 (C-8), 41,4 (C-10), 40,5 (C-14), 33,3 (C-17) và 31,7 (C-20)). Do đó, phần aglycone được xác định có bộ khung là $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-12-en [111]. Sự phù hợp với tài liệu về các triterpene tương tự [112], phân tích về phổ HMBC và COSY đã xác nhận các vị trí của liên kết đôi giữa C-12/C-13 và hai nhóm hydroxyl ở δ_C 72,8 (C-1) và 85,5 (C-3). Phổ HMBC có tương tác của proton anomeric ở δ_H 4,31 (H-1') với tín hiệu carbon ở δ_C 85,5 (C-3), xác định được đường xylopyranose liên kết với C-3. Hóa học lập thể của **EH12** được khẳng định thêm qua các tương tác của H-1'/H-3, H-1/CH₃-24, và H-1/H-26 trong phổ NOESY. Kết hợp việc phân tích phổ trên và so sánh với dữ liệu phổ [13], cấu trúc của **EH12** được xác định là 1α -hydroxy-olean-12-en-3-*O*- β -D-xylopyranoside.

Bảng 4.21. Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH11** và **EH12**

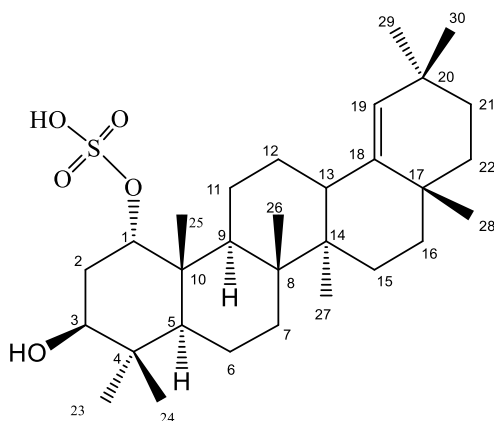
C	EH11		EH12	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	73,6	4,61, brs	72,8	3,54, brs, 1H
2	33,7	2,05, m	34,0	1,96, m, 2H
3	85,1	3,65, dd (11,5, 5,5)	85,5	3,67, dd (11,0, 5,0), 1H
4	40,5	-	39,9	-
5	48,5	1,23, m	49,0	1,23, 1H
6	27,6	2,18, dd (10,5, 5,5) 1,91, m	27,8	2,02, dd (14,0, 2.5), 1H 0,80, 1H

7	27,4	1,23, m, 1H 1,01, m, 1H	27,1	1,80, brt (13,5), 1H 0,99, 1H
8	46,5	-	43,0	-
9	54,6	3,39, s	38,8	2,40, t (8,5), 1H
10	42,3	-	41,4	-
11	203,5	-	23,8	1,91, brd (6,0) 2H
12	128,7	5,55, s, 1H	122,9	5,19, brs, 1H
13	173,8	-	145,9	-
14	45,2	-	40,5	-
15	33,5	1,68, m, 1H 1,48, m, 1H	33,1	1,53, m, 1H 1,29, m, 1H
16	18,2	1,65, m, 1H 1,54, m, 1H	18,9	1,59, m, 1H 1,47, m, 1H
17	31,9		33,3	-
18	49,0	2,22, dd (14,0, 4,0), 1H 1,90, m	48,3	2,00, dd (14,0, 2,5), 1H
19	46,4	1,80, m 1,07, m	47,8	1,72, br t (14,0), 1H 1,00, 1H
20	32,0	-	31,7	-
21	37,6	1,51, m, 1H 1,34, m, 1H	38,0	1,44, m, 1H 1,22, m, 1H
22	35,5	1,46, m, 1H 1,19, m, 1H	35,6	1,36, m, 1H 1,09, m, 1H
23	16,5	0,89, s, 3H	16,7	0,88, s, 3H
24	28,3	1,10, s, 3H	28,3	1,08, s, 3H
25	16,5	1,17, s, 3H	16,8	0,97, s, 3H
26	19,5	1,18, s, 3H	17,5	1,00, s, 3H
27	24,0	1,44, s, 3H	26,5	1,19, s, 3H
28	29,3	0,92, s, 3H	28,9	0,85, s, 3H
29	24,0	0,96, s	24,1	0,87, s, 3H,
30	33,5	0,95, s	33,8	0,87, s, 3H
1'	107,2	4,31, d (7,0)	107,0	4,31, d (7,5), 1H
2'	74,4	3,59, t (7,0)	74,9	3,23, 1H
3'	72,9	3,52, m	77,5	3,33, m, 1H

4'	69,5	3,82, m	70,8	3,49, dd (15,0, 9,0), 1H
5'	66,4	3,86, dd (12,5, 3,5) 3,52, m	66,3	3,85, dd (11,5, 5,0), 1H 3,23, 1H

a: 125 MHz, CD₃OD + CDCl₃; b: 500 MHz, CD₃OD + CDCl₃; c: 125 MHz, CD₃OD; d: 500 MHz, CD₃OD

❖ Hợp chất 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate (**EH13**: Hợp chất mới)



Hình 4.58. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH13**

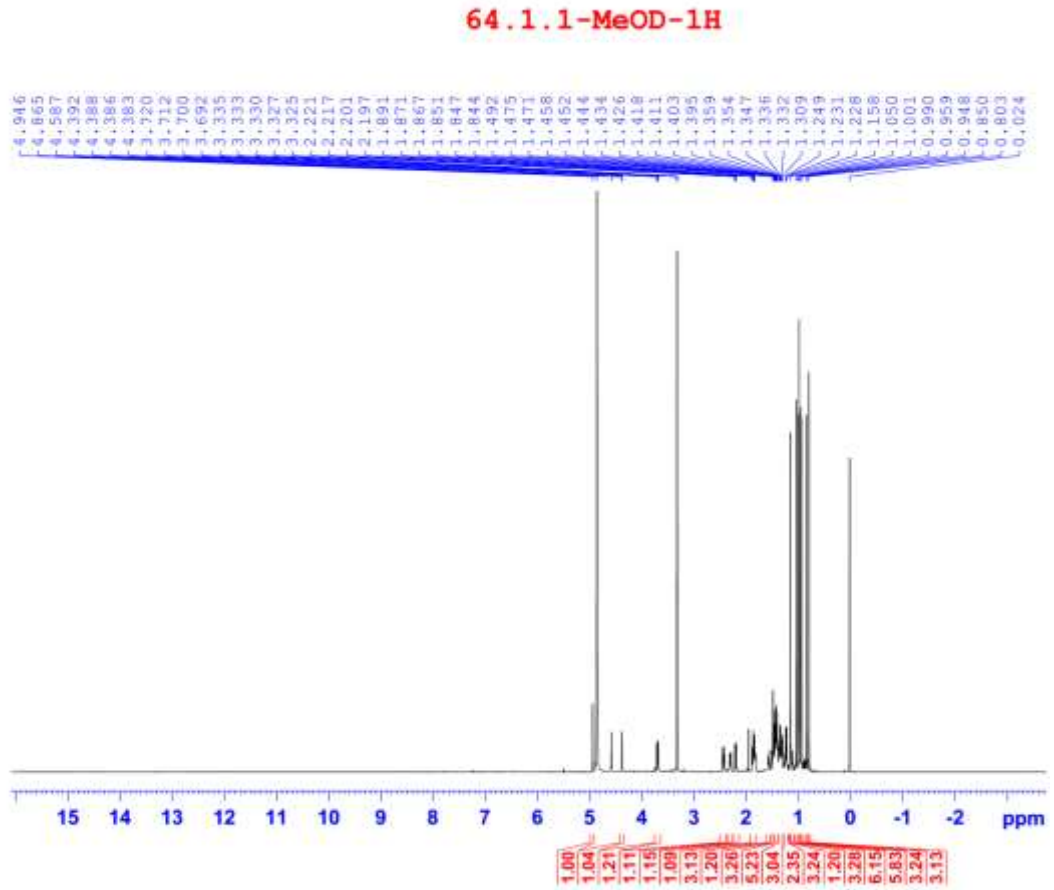
Hợp chất **EH13** phân lập ở dạng rắn, màu trắng. CTPT của **EH13** được xác định là C₃₀H₅₀O₅S, dựa trên pic ion giả phân tử [M-H]⁻ ở *m/z* 521,3296 (tính toán [C₃₀H₄₉O₅S]⁻, 521,3306) và pic ion giả phân tử [M + Na]⁺ ở *m/z* 545,3274 (tính toán [C₃₀H₅₀NaO₅S]⁺, 545,3271) trong phổ HR-ESI-MS. Phổ ¹³C-NMR, DEPT và HSQC của hợp chất **EH13** cho thấy 30 tín hiệu carbon, bao gồm bảy carbon bậc bốn, sáu carbon methine, chín carbon methylene và tám carbon methyl. So sánh với phổ của chất **EH9**, sự khác biệt duy nhất là sự dịch chuyển hóa học ở δ_C 144,3 (C-18) và 130,8 (C-19) đặc trưng cho Δ^{18} -oleanane [116] thay vì Δ^{12} -12-oleanane như chất **EH9**. Ngoài ra, sự xuất hiện của tín hiệu carbon thế hydroxy ở δ_C 74,0 (C-3) và carbon thế 1-sulfate ở δ_C 81,8 (C-1) tương tự như hợp chất **EH9** (Bảng 4.19). Vị trí của các nhóm thế này được khẳng định qua các liên kết giữa δ_H 0,85 (CH₃-25) với δ_C 81,8 (C-1), δ_H 3,71 (H-3, dd, *J*=4,0; 10,0) với δ_C 15,3 (C-23) và 28,5 (C-24) trên phổ HMBC. Phổ NOESY có các tương tác giữa δ_H 4,39 (H-1) với δ_H 1,04 (CH₃-24), 0,80 (CH₃-25), 2,31 (H-9); tương tác giữa δ_H 3,71 (H-3) với δ_H 1,67 (H-5), 1,29 (CH₃-23) và δ_H 2,31 (H-9) cho thấy cấu hình của H-1 và H-3 lần lượt là 1- α -sulfate và 3- β -hydroxyl. Với việc phân tích phổ trên và so sánh dữ liệu phổ của chất **EH9**, hợp chất **EH13** được xác định là 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate, là một hợp chất mới. Gần đây

Anh và cộng sự 2021, đã báo cáo một số triterpene sulfate là có hoạt tính ức chế mạnh α -glucosidase [117].

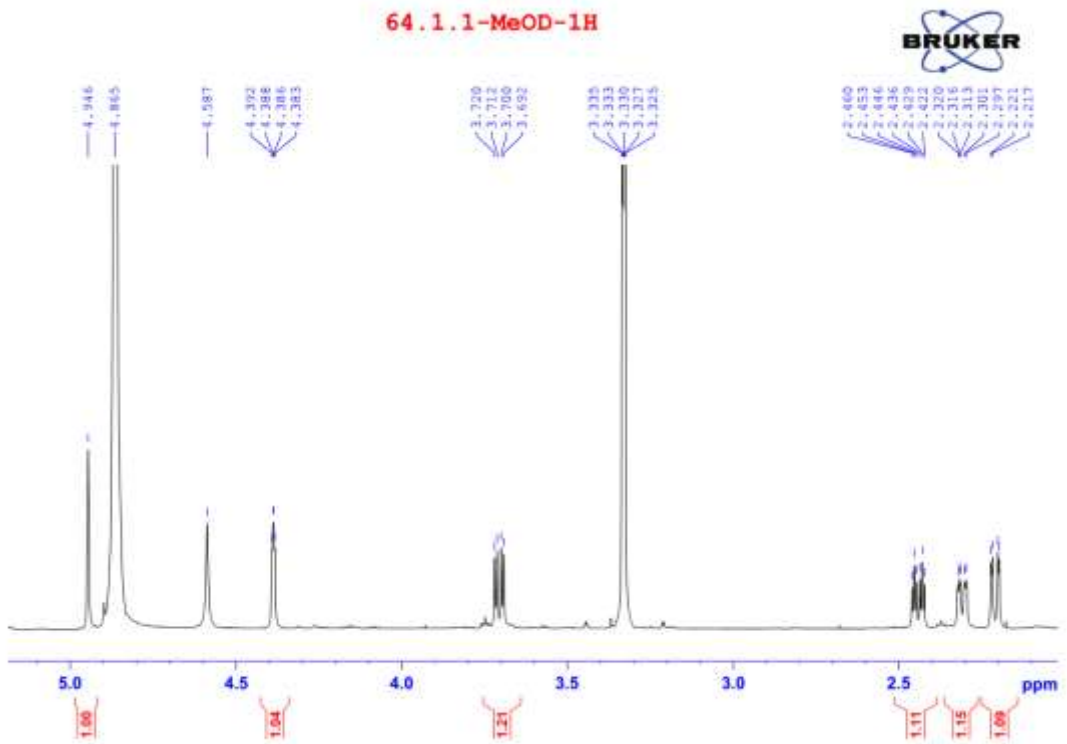
Bảng 4.22. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH13**

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1	81,8	4,39, dd (3,6, 2,1)
2	31,4	2,45, m 1,85, m
3	74,0	3,71, dd (12,0, 4,8)
4	39,8	-
5	49,8	1,24, m
6	19,2	1,58, m 1,42, m
7	35,3	1,50, m 1,35, m
8	41,8	-
9	42,2	2,22, d (2,4)
10	42,7	-
11	21,9	1,82, m 1,23, m
12	27,1	1,42, m
13	40,0	2,31, dd (9,0, 2,4)
14	45,0	-
15	28,7	1,83, m 1,12, m
16	38,6	1,50, m
17	35,4	-
18	144,3	-
19	130,8	4,95, br s
20	33,3	-
21	34,5	1,45, m 1,33, m
22	39,0	1,43, m 1,33, m
23	28,5	1,00, s
24	16,2	0,80, s
25	17,2	0,99, s
26	16,8	1,16, s
27	15,3	0,85, s
28	25,7	1,05, s
29	31,8	0,95, s
30	29,6	0,96, s

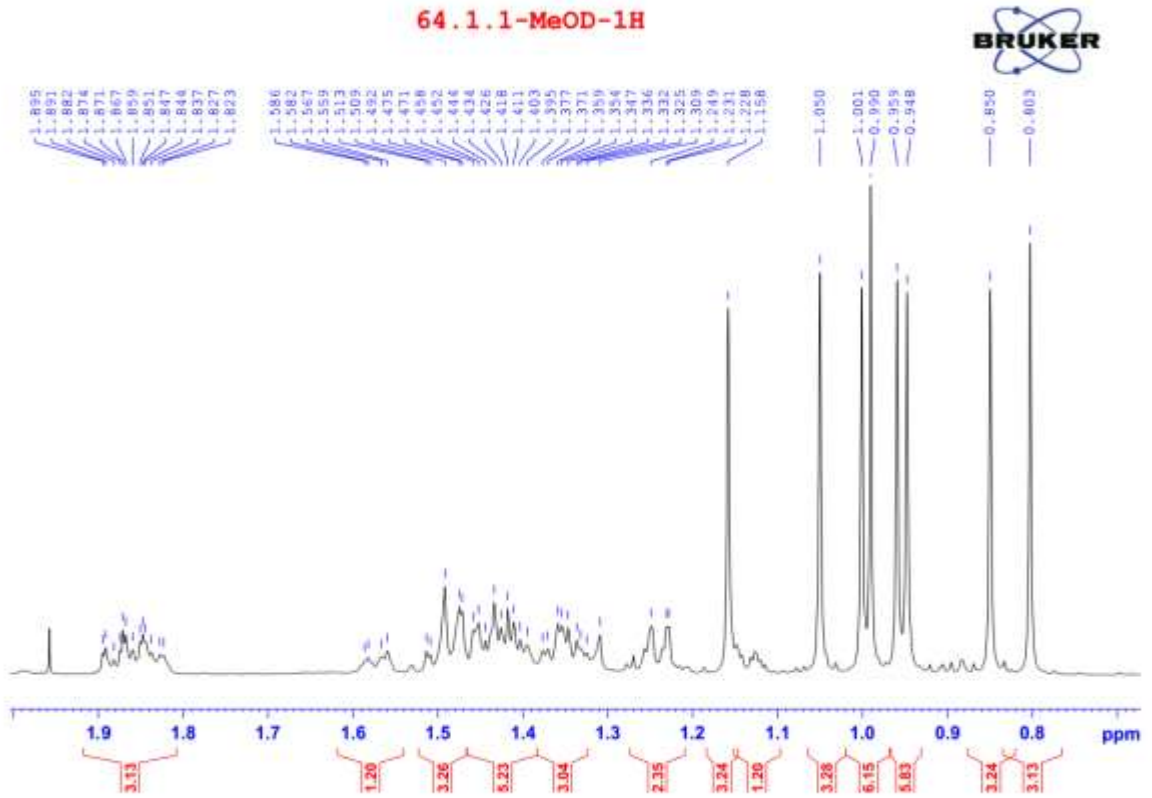
a: 150 MHz, CD_3OD ; b: 600 MHz, CD_3OD



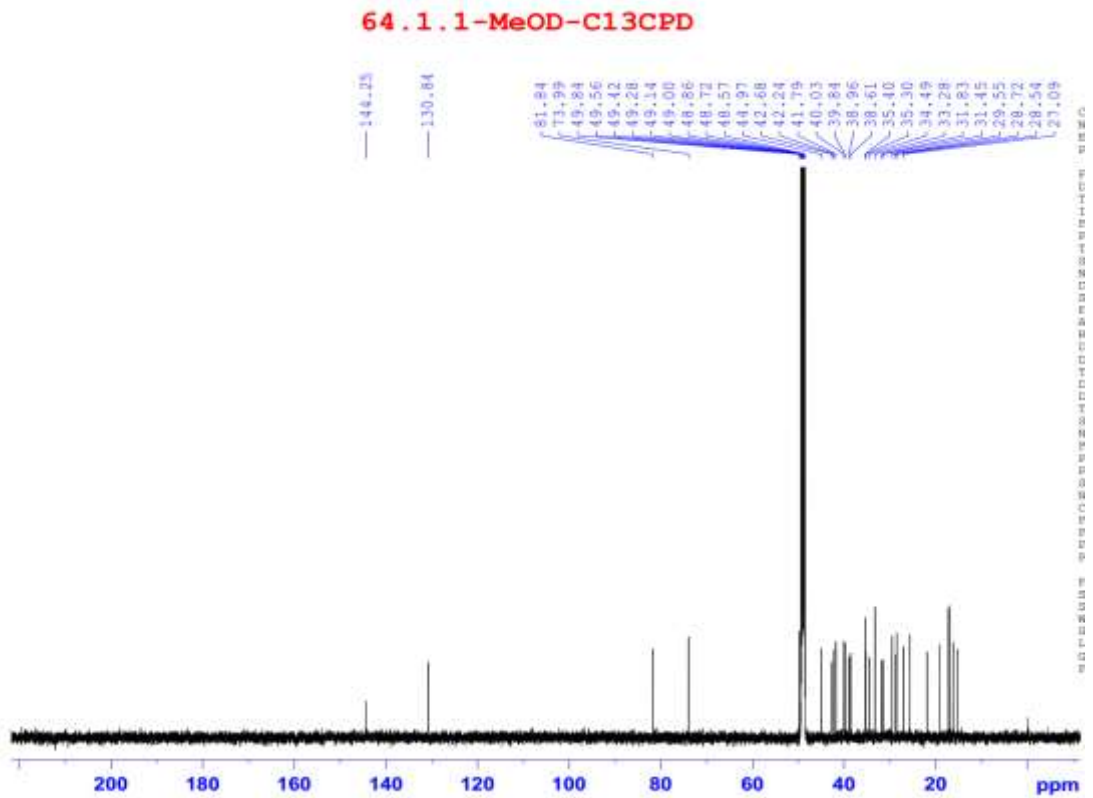
Hình 4.59. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **EH13**



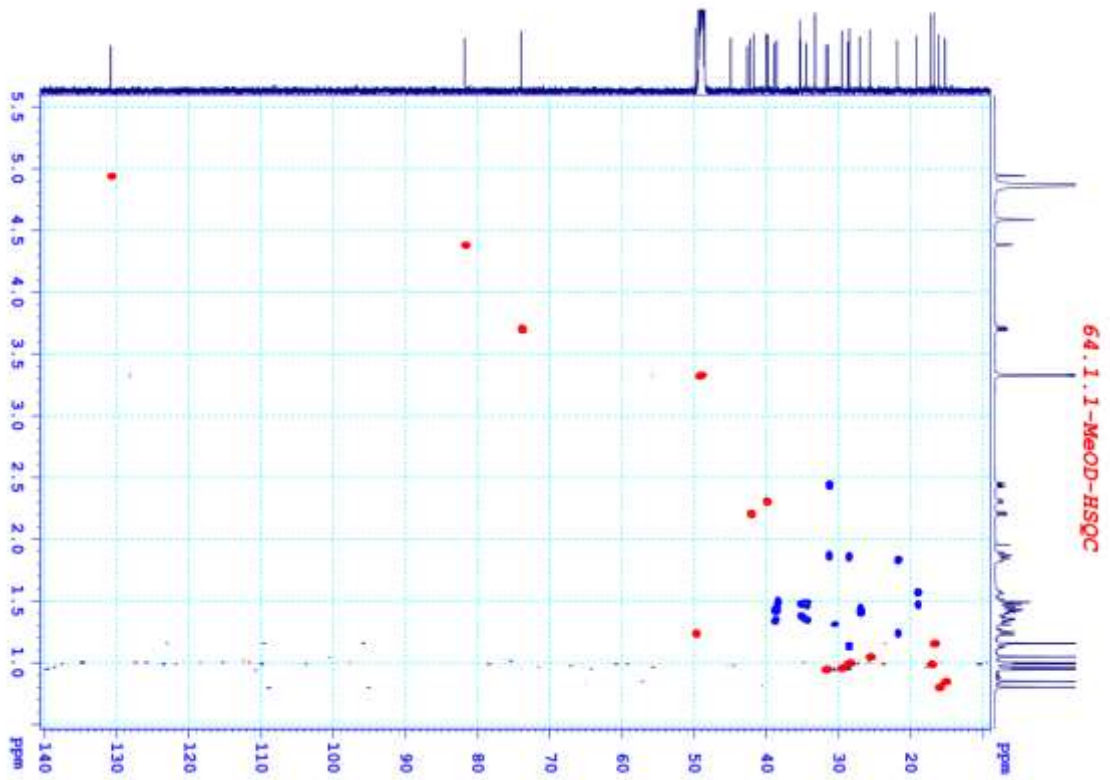
Hình 4.60. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 5,0 đến 2,5 ppm) của hợp chất **EH13**



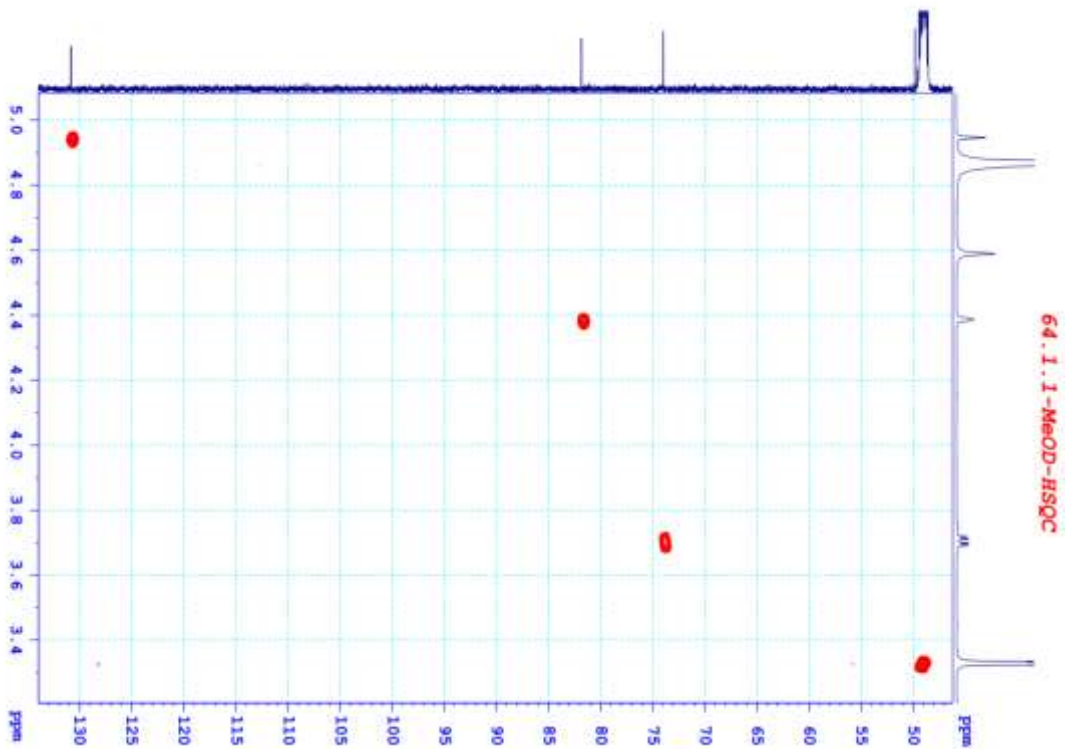
Hình 4.61. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (giãn từ 1,9 đến 0,8 ppm) của hợp chất **EH13**



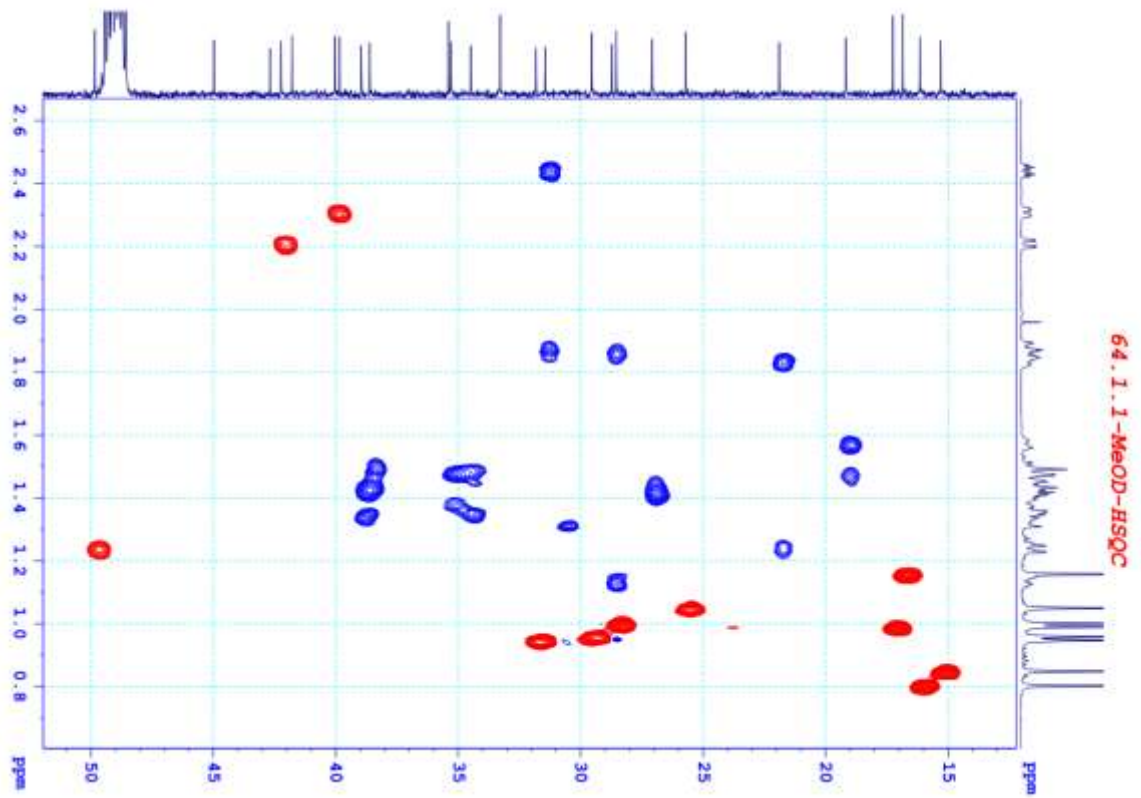
Hình 4.62. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **EH13**



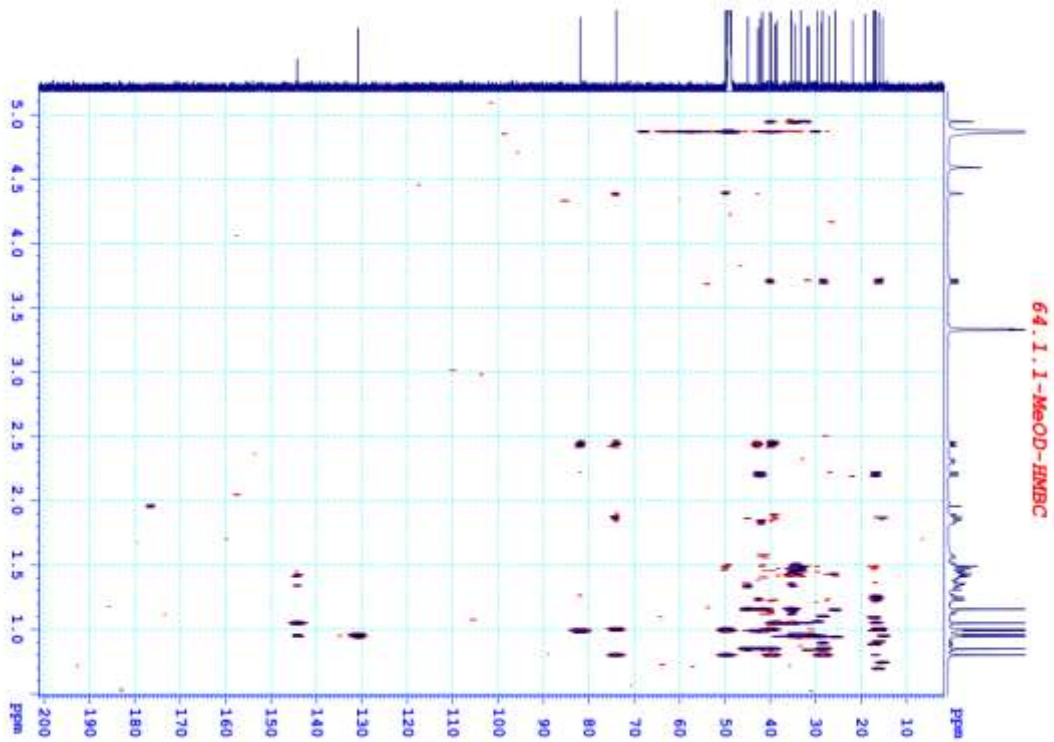
Hình 4.65. Phổ HSQC của hợp chất **EH13**



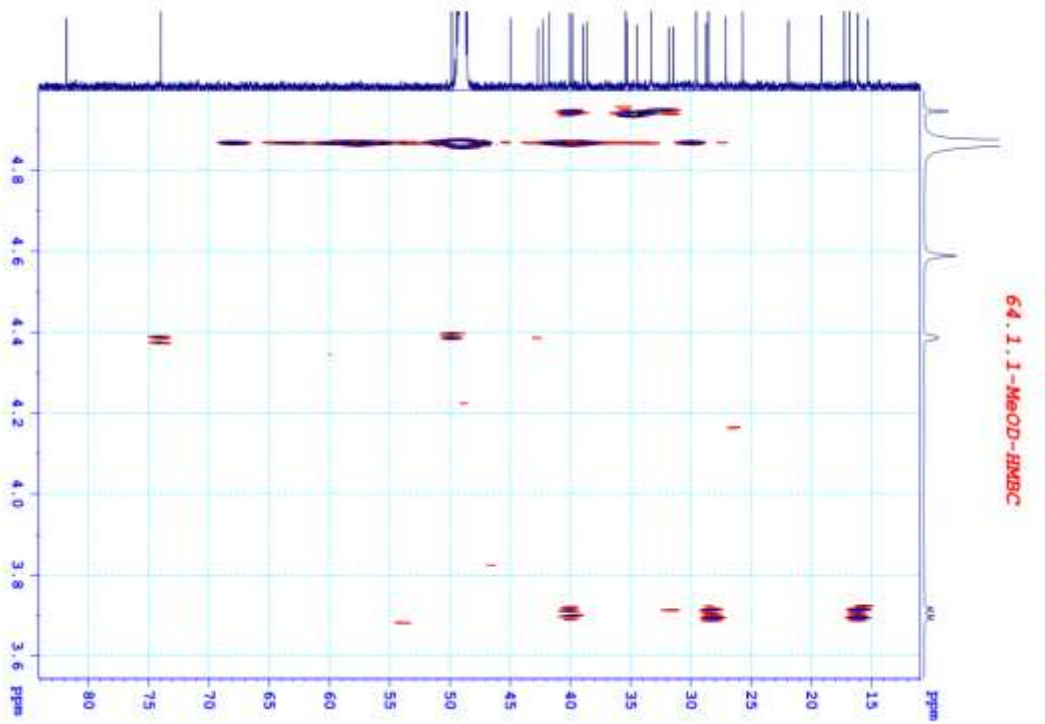
Hình 4.66. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất **EH13**



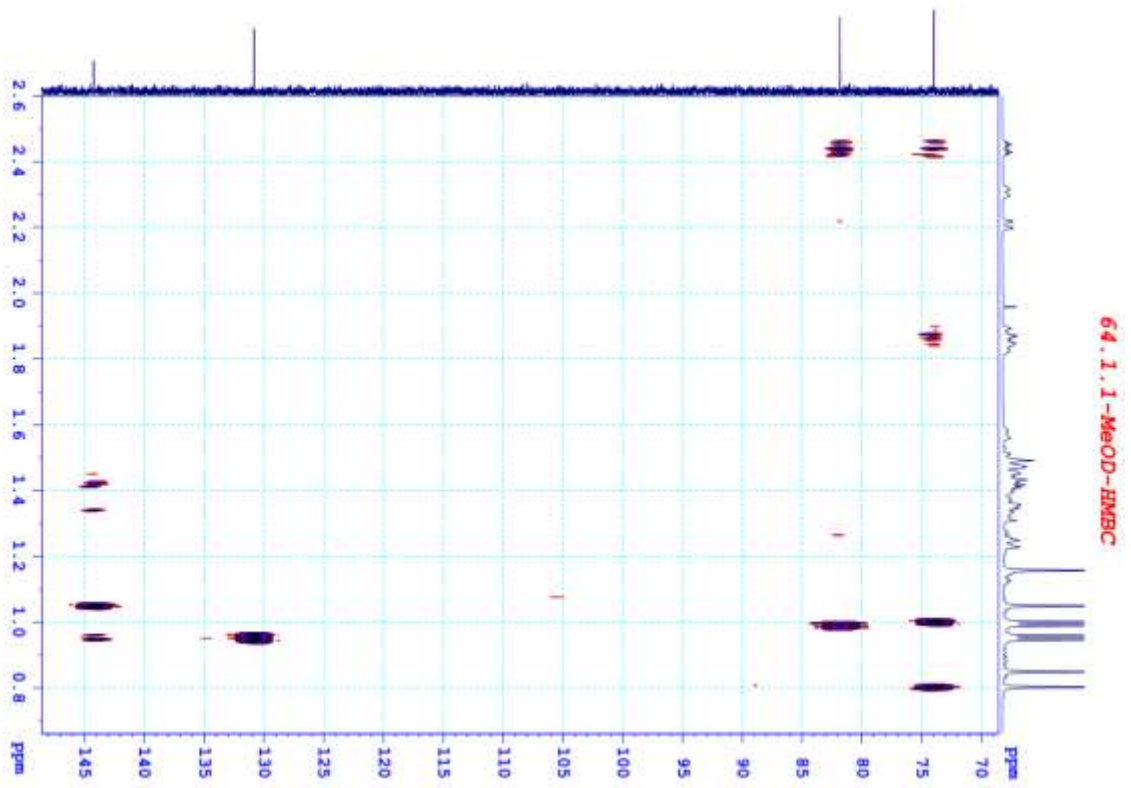
Hình 4.67. Phổ HSQC (giãn) của hợp chất **EH13**



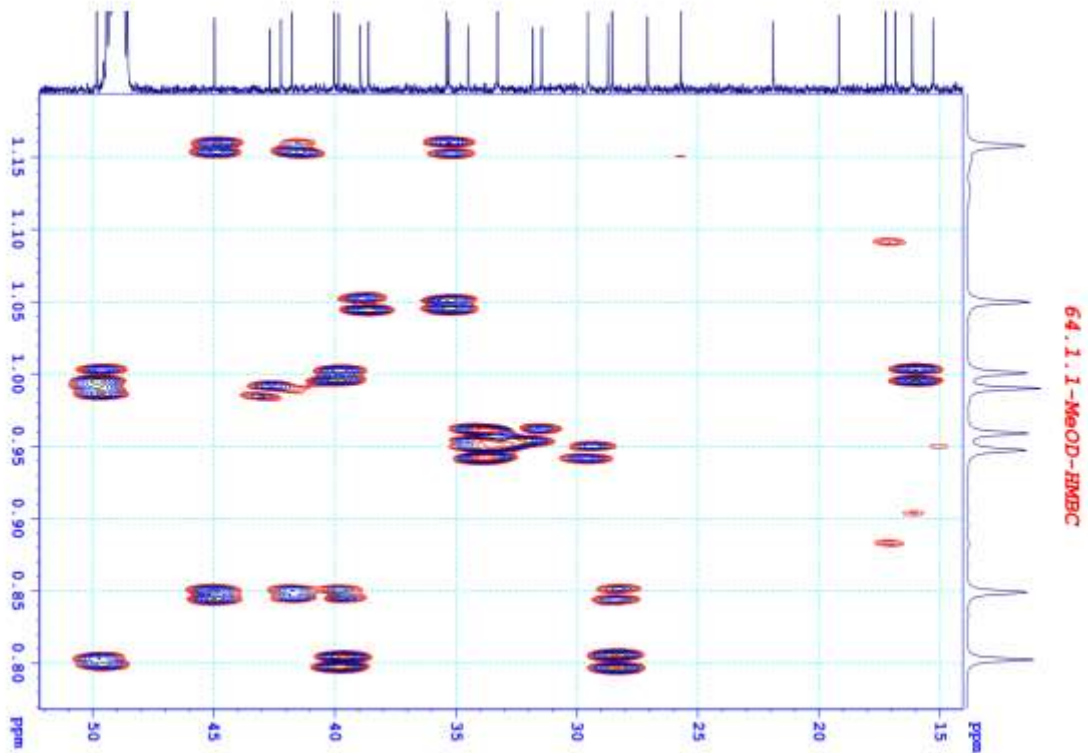
Hình 4.68. Phổ HMBC của hợp chất **EH13**



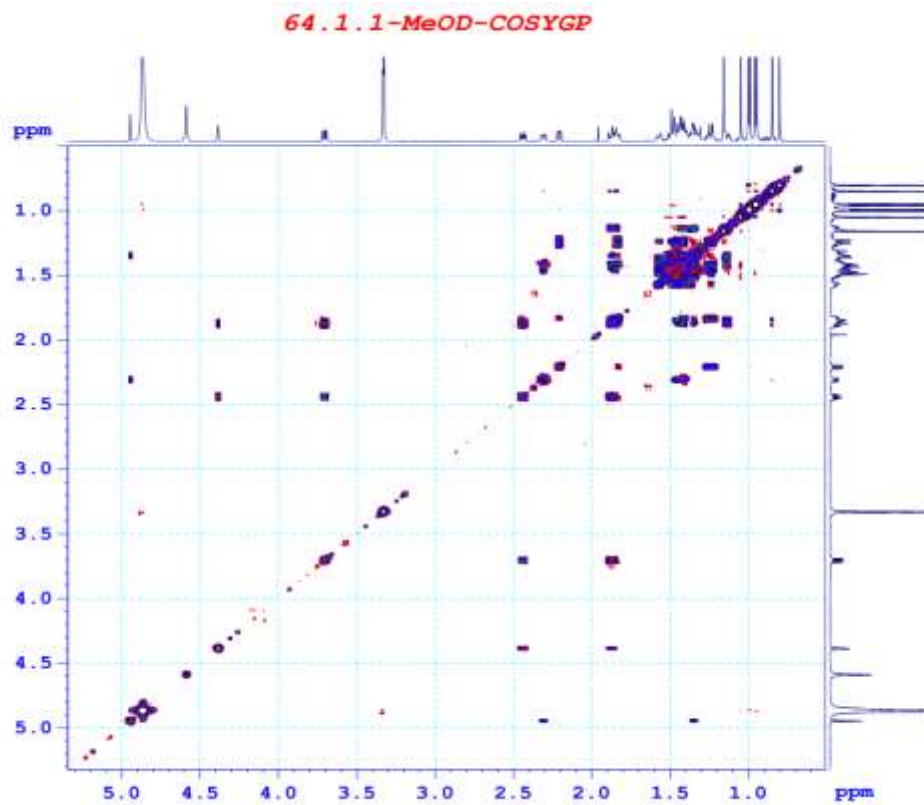
Hình 4.69. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất **EH13**



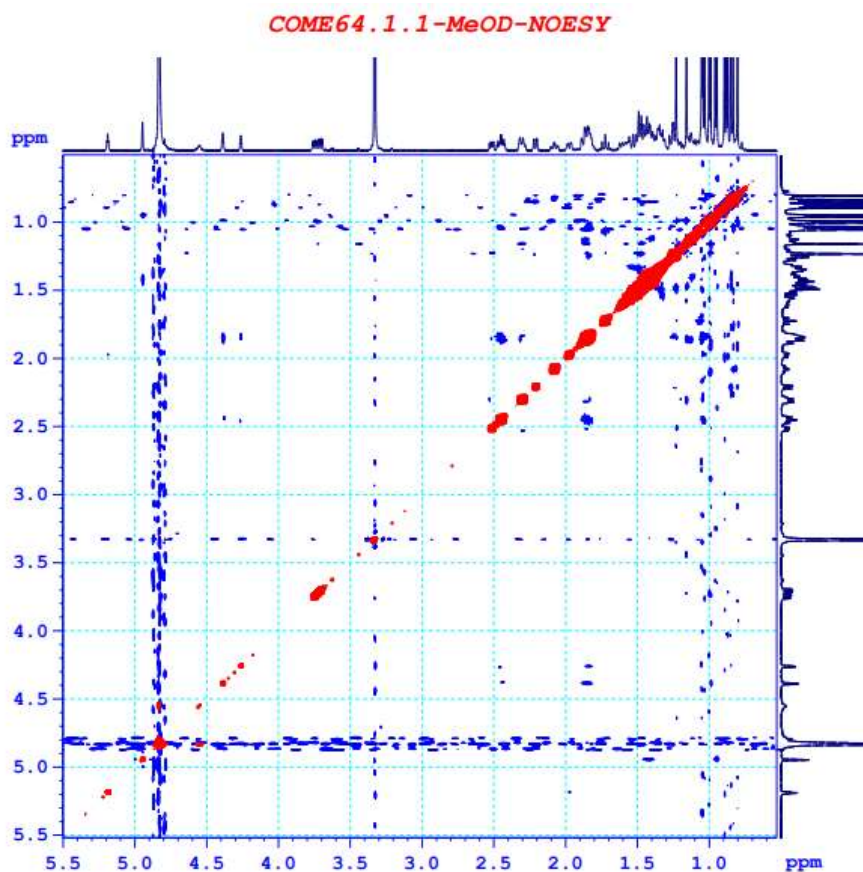
Hình 4.70. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất **EH13**



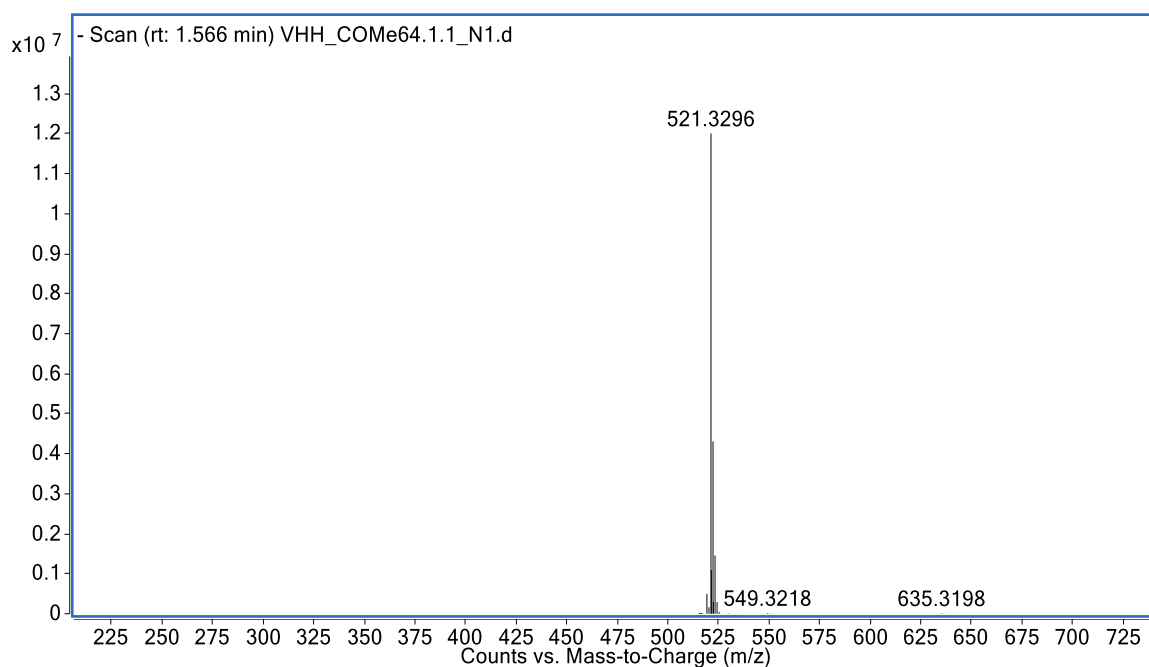
Hình 4.71. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất **EH13**



Hình 4.72. Phổ COSY của hợp chất **EH13**



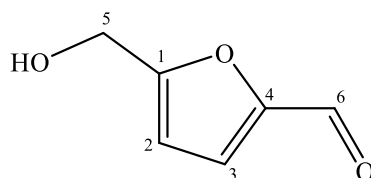
Hình 4.73. Phổ NOESY của hợp chất **EH13**



Hình 4.74. Phổ HR-ESI-MS (negative) của hợp chất **EH13**

4.1.2.3. Các hợp chất khác

- ❖ Hợp chất 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde (**EH14**)



Hình 4.75. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH14**

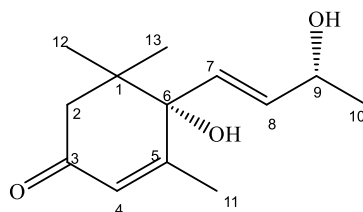
Phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất **EH14** khá đơn giản, theo đó phổ ^1H -NMR có một tín hiệu proton aldehyde ở δ_{H} 9,55 ppm (H-6, s), hai tín hiệu proton β -furan ở δ_{H} 6,60 (H-4, d, 3,5) và 7,49 (H-3, d, 3,5), một proton methylene ở δ_{H} 4,50 (H-7, s), và một tín hiệu của một proton hydroxy ở δ_{H} 5,55 ppm. Điều này gợi ý hợp chất **EH14** có khung 5-hydroxymethylfurfural. Dữ liệu ^{13}C -NMR của hợp chất **EH14** có bốn tín hiệu carbon đặc trưng của khung furan ở δ_{C} 162,2 (C-1), 109,6 (C-2), 124,9 (C-3) và 151,7 (C-4). Ngoài ra, ở trường thấp, một tín hiệu carbonyl xuất hiện ở 177,9 ppm (C-6). Một tín hiệu carbon hydroxy cũng xuất hiện ở δ_{H} 55,9 ppm (C-5). Trên cơ sở phân tích trên và so sánh với tài liệu [118], cấu trúc của **EH14** được thiết lập là 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde (5-HMF).

Bảng 4.23. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **EH14** và chất so sánh

C	EH14		5-(Hydroxymethyl)-2 furancarboxaldehyde ^[118]	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$
1	162,2	-	162,64	-
2	109,6	6,60, d (3,5)	110,15	6,61, d (3,5)
3	124,9	7,49, d (3,5)	124,91	7,50, d (3,5)
4	151,7	-	152,19	-
5	55,9	4,50, s	56,40	4,51, s
6	177,9	9,55, s	178,44	9,55, s

a: 125 MHz, DMSO- d_6 ; b: 500 MHz, DMSO- d_6 ; c: 100 MHz, DMSO- d_6 ; d: 400 MHz, DMSO- d_6 .

❖ Hợp chất blumenol A (**EH15**)



Hình 4.76. Cấu trúc hóa học của hợp chất **EH15**

Phổ ^1H -NMR của chất **EH15** có một tín hiệu proton olefin ở 5,90 (H-4, s) và hai tín hiệu proton *trans*-olefin ở δ_{H} 5,85 (H-8, dd, $J=15,5; 5,0$ Hz); 5,78 (H-7, d,

$J=15,5$ Hz). Phía trường cao, các tín hiệu proton của nhóm methyl ở khoảng δ_H 1,02-1,90 ppm, trong đó tín hiệu methyl ở δ_H 1,89 (CH₃-11, s) gợi ý nhóm methyl này gắn với hệ carbonyl α,β không no. Ngoài ra, một tín hiệu methylene proton xuất hiện ở δ_H 2,24 và 2,44 (H-2) và một proton gắn trực tiếp với nhóm hydroxyl ở δ_H 4,42 (H-9, s). Từ các dữ liệu trên, chất **EH15** dự đoán là một megastigman.

Phổ ¹³C-NMR và DEPT cho thấy tín hiệu của 13 carbon (4xCq, 4xCH, 1xCH₂, 4xCH₃), trong đó có một tín hiệu carbonyl ở δ_C 197,9 (C-3), một nhóm carbon methylene ở δ_C 49,7 (C-2) và hai carbinol ở δ_C 68,0 (C-9) và 79,0 (C-6). Ở trường cao có tín hiệu của bốn nhóm CH₃ ở trong khoảng δ_C 18,9-24,0. Ngoài ra, phổ ¹³C-NMR còn cho tín hiệu của 2 cặp carbon olefin ở δ_C 135,7 (C-7) và 129,0 (C-8); 126,9 (C-4) và 162,6 (C-5). Từ việc phân tích phổ trên kết hợp với so sánh dữ liệu tham khảo [119], xác định **EH15** là blumenol A.

Bảng 4.24. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **EH15** và chất so sánh

C	EH15		Blumenol A ^[119]	
	δ_C^a	δ_H^b	δ_C^c	δ_H^d
1	41,1	-	41,1	-
2	49,7	2,44, d (17) 2,24, d (17)	49,7	2,41, d (17) 2,20, d (17)
3	197,9	-	198,7	-
4	126,9	5,90, s	126,7	5,89, s
5	162,6	-	163,7	-
6	79,0	-	77,2	-
7	135,7	5,78, d (15,5)	135,6	5,77, d (15)
8	129,0	5,85, dd (15,5, 5,0)	129,0	5,85, d (15)
9	68,0	4,42, m	67,9	4,34, m
10	23,7	1,30, d (6,5)	23,9	1,26, d (6,4)
11	22,9	1,89, s	22,8	1,88, s
12	24,0	1,08, s	23,5	1,05, s
13	18,9	1,02, s	18,9	0,99, s

a: 125 MHz, CDCl₃; b: 500 MHz, CDCl₃; c: 100 MHz, CDCl₃; d: 400 MHz, CDCl₃

Bảng 4.25. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ loài Côm hải nam

STT	Ký hiệu chất	Tên chất	Ghi chú
1	EH1	Cucurbitacin D	
2	EH2	Cucurbitacin I	
3	EH3	3- <i>epi</i> -isocucurbitacin D	
4	EH4	Cucurbitacin F	
5	EH5	Cucurbitacin H	

6	EH6	16 α , 23 α -epoxy-3 β , 20R-dihydroxy-10 α H, 23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one	
7	EH7	16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one-3-O- β -D-glucopyranoside	
8	EH8	Elaeohainensin A	Chất mới
9	EH9	1 α ,3 β -Dihydroxy-olean-12-ene 1-sulfate	Chất mới
10	EH10	1 α -Hydroxy-olean-12-en-3 β -O- α -L-arabinopyranoside	
11	EH11	1 α -Hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside	
12	EH12	1 α -Hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside	
13	EH13	1 α ,3 β -Dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate	Chất mới
14	EH14	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde	
15	EH15	Blumenol A	

Tổng kết các kết quả nghiên cứu về hóa học:

❖ Từ loài Xương quạt, đã phân lập và xác định cấu trúc của 10 hợp chất ký hiệu từ **DN1** đến **DN10**. Trong đó có 4 hợp chất mới đó là các hợp chất: **DN1** (7-acetyl-4R,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone), **DN2** ((2S) -2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan), **DN4** (diaensi-biflavan, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-(6,6''-metylen)-biflavan), **DN5** (diaensi-biflavan A, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-6,6''-metylen-5'',4'''-dihydroxy-7'''-methoxy) flavan, một hợp chất lần đầu tiên phân lập từ tự nhiên là **DN3** ((2S)-7,4'-dimethoxyflavan) và 5 hợp chất đã biết khác.

❖ Từ loài Côm hải nam, đã phân lập và xác định cấu trúc của 15 hợp chất ký hiệu từ **EH1** đến **EH15**. Trong đó có 3 hợp chất mới là các hợp chất **EH8** (16 α ,23 α -Epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,25-dien-11-one), **EH9** (olean triterpen là 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-12-ene 1-sulfate) và **EH13** (1 α ,3 β -dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate) và 12 hợp chất đã biết khác chủ yếu là triterpene khung oleanan và cucurbitacin.

4.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính chống ung thư

4.2.1. Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất phân lập từ cây Xương quạt

Theo các kết quả nghiên cứu trước đây, dịch chiết methanol của cây Xương quạt cũng có hoạt tính gây độc tế bào ung thư ở mức trung bình. Chất mới đã tìm thấy ở loài này là các triterpenoid cũng đã được báo cáo có hoạt tính kháng tế bào ung thư

khá mạnh. Do đó, bốn hợp chất mới **DN1**, **DN2**, **DN3**, **DN4** được phân lập từ loài này được tiến hành nghiên cứu hoạt tính chống ung thư bằng phương pháp nghiên cứu khả năng ức chế tăng sinh của các chất lên bốn dòng tế bào ung thư đó là ung thư A549, Hep3B, Hela, MCF-7.

Kết quả mô tả hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư của các hợp chất **DN1**, **DN2**, **DN3**, **DN4** được biểu thị bằng phần trăm tế bào sống sót khi xử lý các chất thử ở hai nồng độ 100 μM và 30 μM với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Kết quả ở bảng 4.26 cho thấy cả ba hợp chất **DN2**, **DN3**, **DN4** thuộc nhóm flavan đều có hoạt tính ức chế cả bốn dòng tế bào thử nghiệm ở nồng độ 100 μM , còn **DN1** không thuộc nhóm này hầu như không ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Riêng hợp chất diaensi-biflavan (**DN4**) thể hiện hoạt tính mạnh hơn các hợp chất còn lại và ở mức yếu đối với hai dòng tế bào ung thư A549 và MCF-7 với phần trăm tế bào ung thư sống sót thấp hơn dưới 50% ở nồng độ 100 μM .

Bảng 4.26. Kết quả thử nghiệm ức chế tế bào ung thư của các chất từ loài Xương quạt

Tên chất thử	Nồng độ (μM)	% tế bào sống sót (CS%)			
		Hep3B	Hela	A549	MCF-7
7-Acetyl-4R, 8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (DN1)	100	79,29	89,78	82,48	66,68
	30	88,68	96,40	86,56	78,12
2(S)-2',4'-Dihydroxy-7-methoxyflavan (DN2)	100	56,71	50,64	59,31	74,45
	30	93,67	88,45	63,33	89,30
2(S)-7,4'-Dimethoxyflavan (DN3)	100	56,53	66,87	51,63	58,60
	30	63,86	73,09	67,78	63,28
Diaensi-biflavan (DN4)	100	54,99	65,21	42,07	49,49
	30	84,06	90,73	65,34	75,91
Camptothecin*	5 $\mu\text{g/mL}$	37,65	18,61	26,74	28,89
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	69,56	57,06	67,68	56,68

4.2.2. Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất phân lập từ cây Côm hải nam

❖ Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Chi Côm có thành phần hóa học khá đa dạng bao gồm các terpenoid, flavonoid, alkaloid, phenol, các nhóm này đều có hoạt tính chống ung thư. Tuy nhiên các nghiên cứu trước đây chỉ công bố các kết quả nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các chất thuộc nhóm terpenoid hay cụ thể hơn là các triterpenoid. Đặc biệt là các cucurbitacin có hoạt tính mạnh hơn các elaeocarpuin và petiolticin [11, 51, 52]. Còn ở loài Côm hải nam mới chỉ có các nghiên cứu về hoạt tính ức chế tế bào ung thư đối

với các cucurbitacin. Do vậy, các hợp chất cucurbitacin tách được từ cây này là nhóm chất được lựa chọn nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư như A549, T24, Huh-7, 8505, SNU-1.

Số liệu thử nghiệm được thể hiện ở bảng 4.27 là các giá trị IC_{50} của các hợp chất thử trên từng dòng tế bào ung thư. Kết quả trên cho thấy các chất thử đều có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, và các chất đều có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư ở mức trung bình với giá trị IC_{50} từ 63,82 đến 111,17 μM . So với các cucurbitacin khác thì các hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào ung thư yếu hơn, điều này cũng phù hợp với các kết quả đã nghiên cứu trước đây. Kết quả này gợi ý rằng sự hiện diện của nhóm hydroperoxide và vòng epoxide đã làm giảm hoạt tính gây độc tế bào ung thư khi so sánh với cucurbitacin D và 3-*epi*-cucurbitacin D [11, 51].

Bảng 4.27. Kết quả thử nghiệm ức chế tế bào ung thư của các chất từ loài Côm hải nam

Tên chất thử	Nồng độ ức chế 50% dòng tế bào ung thư (IC_{50} μM)				
	A549	T24	Huh-7	8505	SNU-1
EH6	83,49 \pm 4,11	104,49 \pm 4,40	56,19 \pm 3,34	80,19 \pm 6,17	75,96 \pm 3,57
EH7	108,53 \pm 3,72	116,22 \pm 4,22	111,17 \pm 8,23	101,68 \pm 3,80	95,06 \pm 8,62
EH8	100,60 \pm 3,13	101,71 \pm 5,28	63,82 \pm 5,46	114,12 \pm 7,55	98,92 \pm 4,54
Ellipticine	1,87 \pm 0,20	2,11 \pm 0,16	1,58 \pm 0,16	1,54 \pm 0,12	1,58 \pm 0,12

Ghi chú: **EH6:** 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20*R*-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one

EH7: 16 α ,23 α -epoxy- 3 β ,20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H- cucurbit-5,24-dien-11-one-3-*O*- β -D-glucopyranoside

EH8: 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20 β -dihydroxy-24 α -hydroperoxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,25-dien-11-one (elaehainencin A)

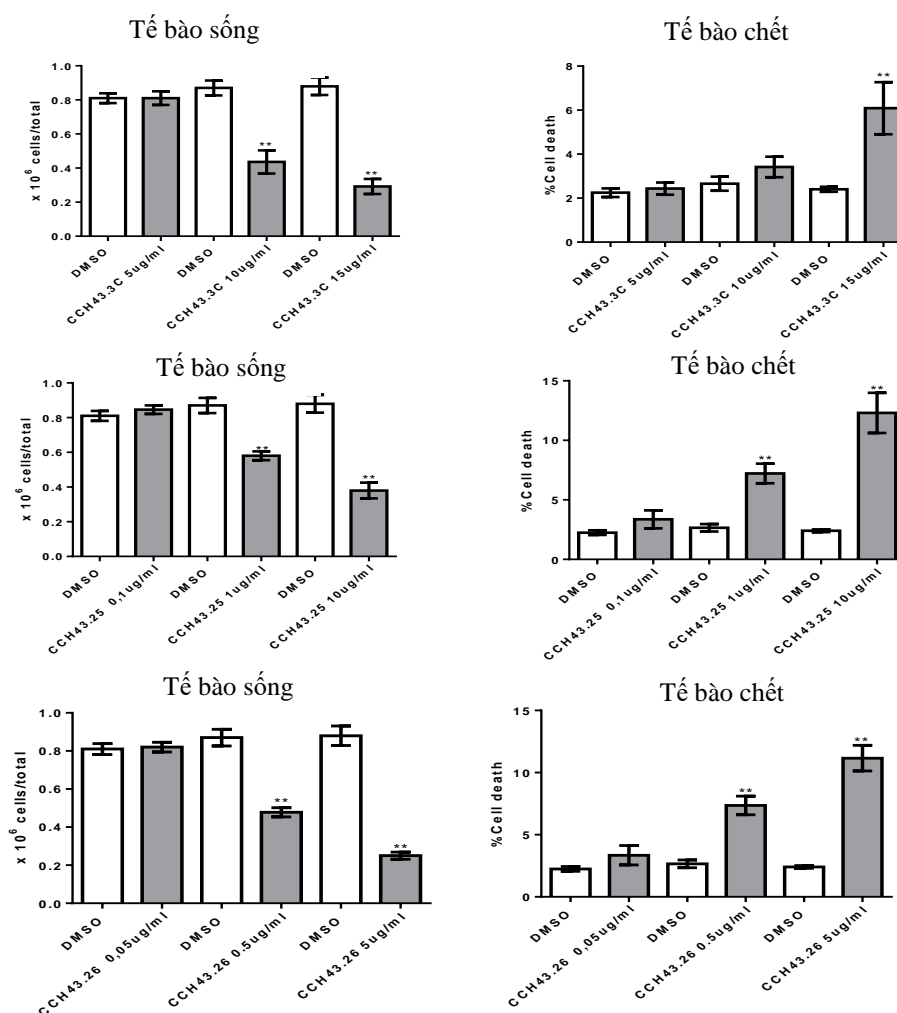
❖ *Hoạt tính ức chế tế bào ung thư OCI-AML3*

Dòng tế bào OCI-AML3 là một bệnh bạch cầu cấp tính phổ biến ở người lớn, được đặc trưng bởi sự tăng sinh vô tính của các tế bào tiền thân tạo máu dẫn đến thâm nhiễm máu và tủy xương, hậu quả là suy tạo máu [120].

Những năm gần đây, tỷ lệ ung thư máu không chỉ là bệnh do bẩm sinh gây ra mà đã xuất hiện với tỷ lệ cao ở người trưởng thành. Nguy hiểm hơn trị liệu hầu như không có triển vọng, không kéo dài tuổi thọ của bệnh nhân. Do vậy, nghiên cứu phát hiện các chất ức chế dòng tế bào ung thư này là mục tiêu nghiên cứu mới được các

nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Các hợp chất triterpenoid phân lập được từ cây Côm hải nam chủ yếu thuộc nhóm cucurbitacin và oleanane đã được công bố có tác dụng chống ung thư khá mạnh và đa cơ chế tác dụng. Hơn nữa, các chất tách được từ cây này chưa từng được nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào dòng OCI-AML3. Do đó, luận án này đã nghiên cứu khả năng ức chế tế bào dòng OCI-AML3 của một số chất triterpenoid đại diện cho các nhóm chất được phân lập từ cây này.

Kết quả ở (Hình 4.77) cho thấy **EH10** có khả năng ức chế tế bào OCI-AML3 ở nồng độ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **EH2a** ức chế ở nồng độ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, còn **EH3** ức chế ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. So với các hợp chất triterpenoid khung olean của loài Côm hải nam, cucurbitacin có khả năng ức chế dòng OCI-AML3 mạnh hơn nhiều.



A: **EH10** (5; 10; 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: **EH2a** (0,1; 1; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: **EH3** (0,05; 0,5; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Hình 4.77. Kết quả hoạt tính ức chế tế bào OCI-AML3 của một số chất từ loài Côm hải nam

❖ *Phân tích ảnh hưởng của các hợp chất đến chu trình tế bào ung thư dòng OCI-AML3*

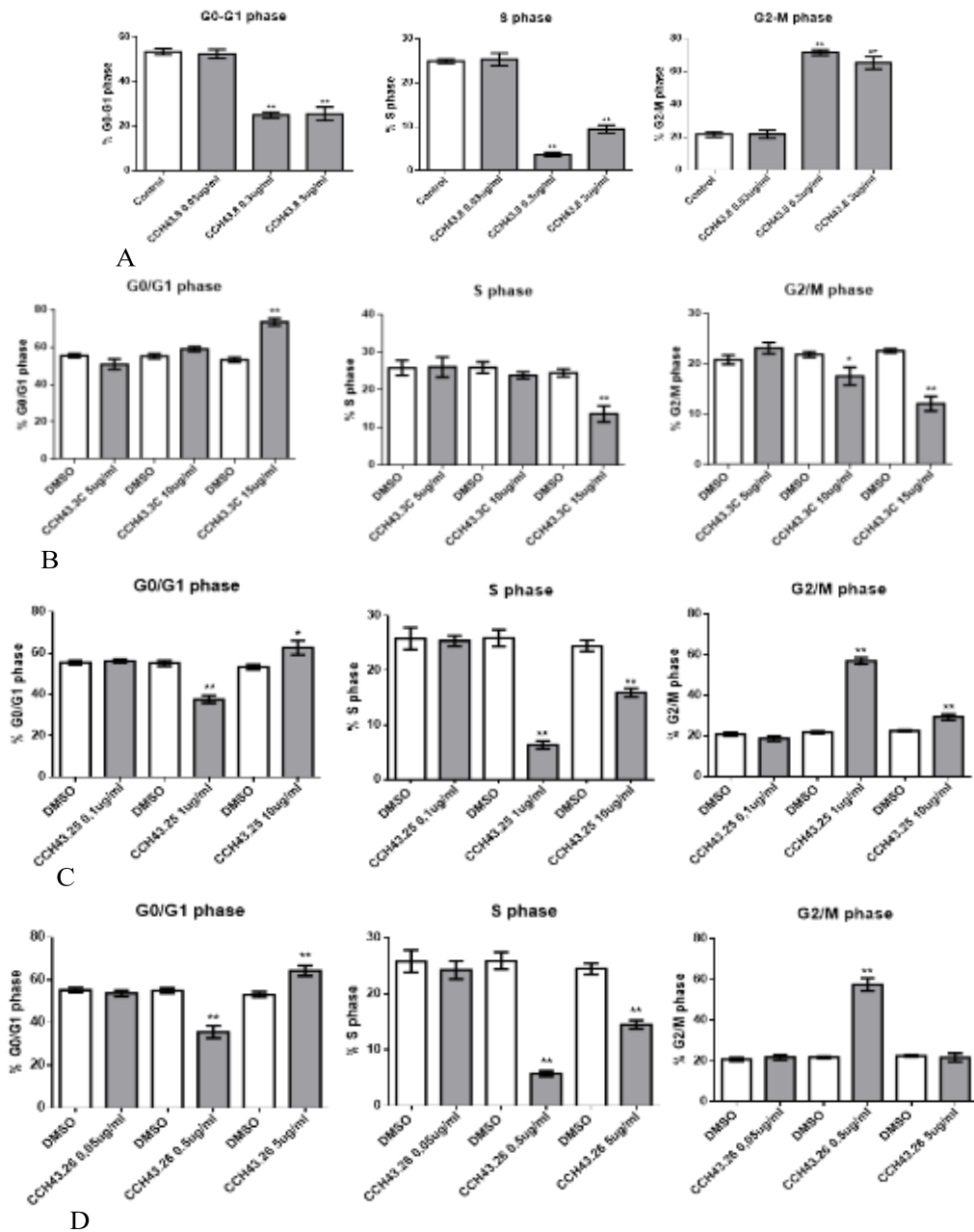
Nghiên cứu về hoạt tính chống ung thư theo tác động gây độc tế bào ung thư đã được phát triển từ rất lâu. Các chất được phát hiện theo tác động này cũng đã và đang được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư hiệu quả. Nhưng cho đến nay nó cũng đã thể hiện khá nhiều nhược điểm do chúng có tác dụng độc đối với cơ thể và gây nhiều tác dụng phụ. Theo thống kê, hiện nay, tỷ lệ thất bại trong điều trị ung thư ngày càng cao do tế bào ung thư kháng thuốc và thay đổi di truyền mà nguyên nhân chính là do tác dụng phụ của hóa trị liệu. Do vậy, việc tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng chống ung thư theo tác động ít gây độc tế bào cũng đang và sẽ được quan tâm nghiên cứu phát triển. Một trong các tác động đó là tương tác của hoạt chất vào các pha phân bào làm trì hoãn sự phân chia của tế bào ung thư, gây cảm ứng *apoptosis* và điều khiển giảm biểu hiện một số gen liên quan đến ung thư. Các nghiên cứu này triển vọng cho việc trị liệu và kết hợp trị liệu ung thư với tỷ lệ thành công cao, giảm các tác dụng phụ của các thuốc trị liệu ung thư trước đây.

Các hợp chất từ cây Côm hải nam thuộc nhóm triterpenoid là nhóm có tác dụng ức chế tế bào ung thư, tác động vào pha phân bào, hay điều hòa một số gen kiểm soát ung thư cũng đã được công bố. Do cấu trúc phức tạp nên các hợp chất này thường thể hiện đa cơ chế tác dụng. Vì vậy, các hợp chất này được tiếp tục nghiên cứu tác dụng ức chế tế bào ung thư theo con đường tác động vào các pha phân chia của tế bào ung thư OCI-AML3.

Kết quả được trình bày theo biểu đồ (Hình 4.78) cho thấy chất **EH10** ở nồng độ 15 µg/mL tỷ lệ tế bào ở pha G0/G1 nhiều hơn đáng kể so với đối chứng DMSO. Còn **EH2a** ở nồng độ 1 µg/mL, **EH3** 0,5 µg/mL, **EH1** ở nồng độ 0,3 và 3 µg/mL đều làm tăng tỷ lệ tế bào ở pha G2/M so với đối chứng DMSO. Còn **EH2a** ở nồng độ cao hơn là 10 µg/mL và **EH3** 5µg/mL thì tỷ lệ tế bào ở pha G0/G1 lại cao hơn so với đối chứng DMSO.

Có thể kết luận rằng các hợp chất triterpenoid từ cây Côm hải nam **EH10** (1α -hydroxy-olean-12-en-3-O- β -L-arabinopyranoside), **EH1** (cucurbitacin D), **EH2a** (cucurbitacin D và cucurbitacin I (**EH2**)), **EH3** (3-*epi*-cucurbitacin D) đều có hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư tủy xương cấp (OCI-AML3) theo cơ chế tác động vào các pha G0/G1 và G2/M của chu trình tế bào. Đáng chú ý các chất

cucurbitacin (**EH2a**, **EH3**) có hoạt tính rất tốt. Công bố trước đây cho thấy tế bào đang ở pha phân bào G2/M và G0/G1 thường nhạy cảm với tác nhân hóa trị liệu, và nhạy cảm hơn nhiều so với tế bào ở pha S [121]. Kết quả này cung cấp thêm cơ sở khoa học cho các công bố trước đây về tác dụng hiệp đồng của các cucurbitacin với các tác nhân hóa trị liệu khác như: imatinib mesylate, paclitaxel, docetaxel và gemcitabine làm tăng hiệu quả trong điều trị ung thư [71].



A: **EH1** (0,03; 0,3; 3 $\mu\text{g/mL}$), B: **EH10** (5; 10; 15 $\mu\text{g/mL}$), C: **EH2a** (0,1; 1; 10 $\mu\text{g/mL}$), D: **EH3** (0,05; 0,5; 5 $\mu\text{g/mL}$)

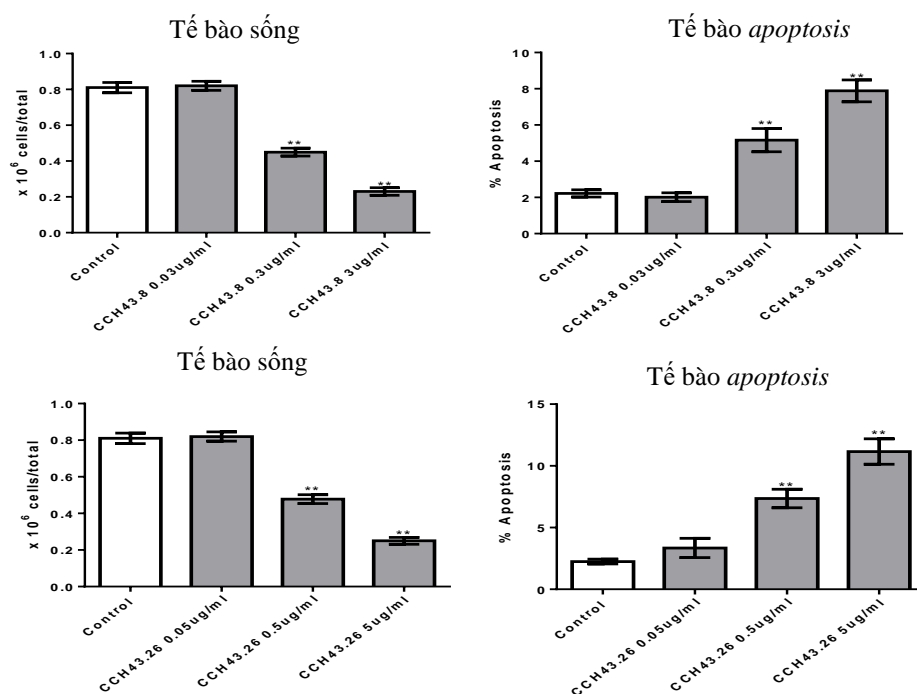
Hình 4.78. Kết quả phân tích chu trình tế bào dòng OCI-AML3 của một số hợp chất triterpenoid từ loài Côm hải nam

❖ *Hoạt tính gây cảm ứng apoptosis*

Apoptosis là một hiện tượng chết của tế bào theo chương trình. Tế bào không tuân theo *apoptosis* làm cho tế bào tồn tại thời gian lâu hơn, để tích lũy các đột biến, tạo điều kiện thuận lợi cho ung thư phát triển. Do vậy, việc tìm kiếm các hoạt chất chống ung thư theo cơ chế cảm ứng *apoptosis* sẽ ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Cucubitacine cũng được công bố là các hợp chất chống ung thư tiềm năng, cả về tác dụng gây độc nhiều dòng tế bào ung thư thường, tế bào gốc ung thư và gây cảm ứng *apoptosis*. Cucurbitacin D đã được công bố là có tác dụng gây cảm ứng *apoptosis* đối với dòng tế bào ung thư tuyến tụy (Capan-1) ở nồng độ $< 1\mu\text{M}$ [122].

Cucurbitacin D (**EH1**) và dẫn xuất 3-*epi*- cucurbitacin D (**EH3**) của loài Côm hải nam là hai hoạt chất có tác dụng chống ung thư mạnh được luận án lựa chọn nghiên cứu hoạt tính gây cảm ứng *apoptosis* trên dòng tế bào ung thư tủy xương cấp tính (OCI-AML3).

Kết quả được trình bày ở hình 4.79 cho thấy cả hai hợp chất **EH1** và **EH3** đều gây cảm ứng *apoptosis* trên dòng tế bào ung thư tủy xương cấp tính (OCI-AML3) ở nồng độ thấp $< 0,5\ \mu\text{g/mL}$.



A: **EH1** (0,03; 0,3; 3 $\mu\text{g/mL}$) B: **EH3** (0,05; 0,5; 5 $\mu\text{g/mL}$)

Hình 4.79. Kết quả hoạt tính gây cảm ứng *apoptosis* dòng OCI-AML3 của một số cucurbitacin từ loài Côm hải nam

❖ *Nghiên cứu tác động đến biểu hiện một số gen liên quan đến ung thư của các cucurbitacin*

Tìm kiếm các hoạt chất chống ung thư từ thảo dược đã và đang được nghiên cứu trên nhiều cơ chế và có nhiều kết quả đáng quan tâm. Ngoài các nghiên cứu về tác dụng gây độc tế bào ung thư, tế bào gốc ung thư, tác động vào các pha phân bào của tế bào ung thư hay hoạt tính gây cảm ứng *apoptosis* thì hoạt tính điều hòa biểu hiện các gen khi hoạt động quá ngưỡng sẽ gây tăng thuộc tính cho tế bào ung thư như: trốn hệ miễn dịch, đổi mới, xâm lấn, di căn và tái phát đã được nghiên cứu nhiều. Ví dụ như khả năng làm giảm biểu hiện các gen Stat3, Akt của cucurbitacin D, các gen này biểu hiện cao gây kích thích phát triển khối u [123].

Cucurbitacin D (**EH1**) và 3-*epi*-cucurbitacin D (**EH3**) phân lập từ loài Côm hải nam được lựa chọn nghiên cứu về hoạt tính điều khiển giảm biểu hiện các gen như: TNF α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 đối với dòng tế bào ung thư OCI-AML3, các gen này nếu hoạt động quá mức gây tiến triển bệnh ung thư hoặc tái phát ung thư. Trong đó Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) là protein ức chế tế bào chết theo chương trình, khi biểu hiện quá mức Bcl-2 sẽ giúp tế bào tránh được hiện tượng *apoptosis* (gây ung thư) [124].

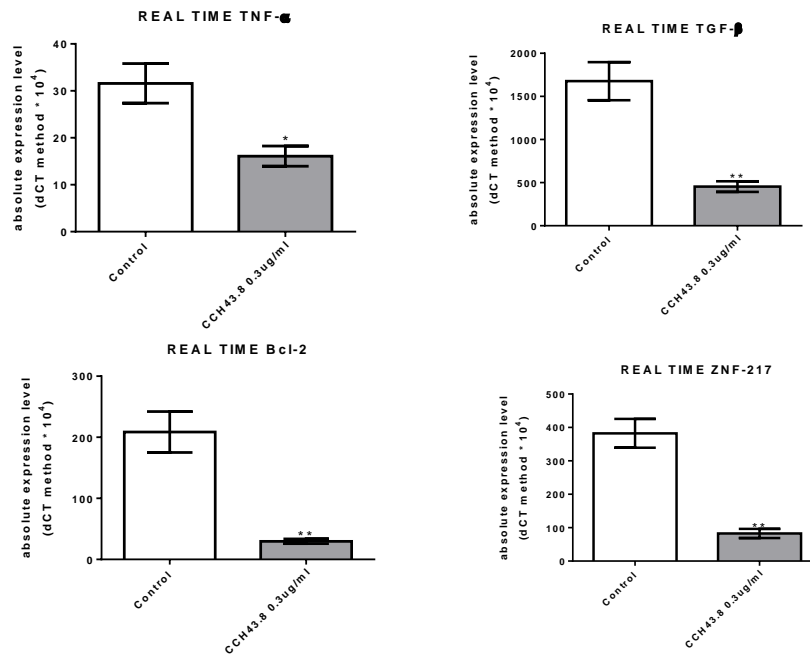
TNF- α (Tumor necrosis factor - α), là yếu tố gây hoại tử khối u, ở nồng độ cao TNF- α có khả năng chống lại khối u, nhưng ngược lại ở nồng độ sinh lý thì làm thúc đẩy khối u, làm tăng tính thấm thành mạch, tiến triển ung thư xâm lấn và di căn [125].

TGF- β (Transforming growth factor beta) là yếu tố biến đổi tăng trưởng tế bào, đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển tăng sinh tế bào, duy trì cân bằng nội môi của mô. Sản xuất quá mức TGF- β sẽ làm tăng đặc tính của CSC (tế bào gốc ung thư) như tự đổi mới, sinh tồn, kháng thuốc, xâm lấn và di căn. TGF- β còn làm giảm độ nhạy đối với hóa xạ trị của tế bào ung thư [126].

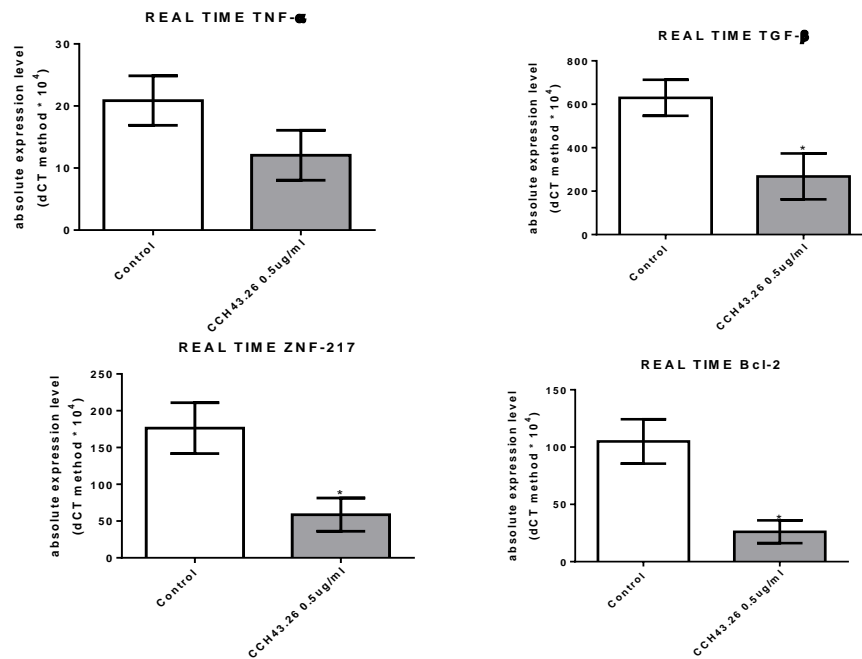
ZNF-217 (Zinc finger protein -217) là một protein kích thích tăng sinh EMT (yếu tố thay đổi biểu mô trung mô), EMT tăng sẽ dẫn đến di căn và phát triển ung thư kháng thuốc [127].

Bằng các phương pháp mô tả ở mục 2.4.3, và phần thực nghiệm ở mục 3.3.2, kết quả nghiên cứu tác động của các hợp chất **EH1** và **EH3** đến sự biểu hiện của các gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 lên dòng bào OCI-AML3 được mô tả dưới dạng biểu đồ ở hình 4.80 và 4.81. Kết quả cho thấy ở nồng độ thử các chất **EH1** và **EH3**

đều có hoạt tính điều khiển giảm đáng kể biểu hiện gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3.



Hình 4.80. Kết quả tác động của **EH1** (0,3 μ g/mL) đến biểu hiện gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3



Hình 4.81. Kết quả tác động của **EH3** (0,5 μ g/mL) đến biểu hiện gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3

Kết luận về kết quả thử hoạt tính chống ung thư

Các hợp chất mới **DN2**, **DN3**, **DN4** được phân lập từ loài Xương quạ thể hiện hoạt tính ức chế bốn dòng tế bào ung thư ở người A549, Hep3B, Hela và MCF7 tuy nhiên ở mức yếu, trong khi hợp chất **DN1** không thể hiện hoạt tính.

Các dẫn xuất cucurbitacin **EH6**, **EH7**, **EH8** từ loài Côm hải nam đều có khả năng ức chế cả 5 dòng tế bào ung thư ở người: A549, T24, Huh-7, 8505, SNU-1 ở mức trung bình với giá trị IC_{50} khoảng từ 56,19 đến 116,22 μ M.

Các chất, **EH10**, **EH2a**, **EH3** có hoạt tính gây độc tế bào ung thư OCI-AML3 ở các nồng độ lần lượt là 15; 10 và 5 μ g/mL.

Các hợp chất **EH1**, **EH10**, **EH2a**, **EH3** ở nồng độ cao 15; 10; 5 μ g/mL tác động đến các pha phân bào, làm tăng đáng kể tỷ lệ tế bào dòng OCI-AML3 ở pha G0/G1, còn **EH2a**, **EH3** ở nồng độ thấp 1; 0,5 μ g/mL tương ứng làm tăng tỷ lệ tế bào OCI-AML3 ở pha G2/M.

Hai hợp chất cucurbitacin D (**EH1**) và 3-*epi*-cucurbitacin D (**EH3**) gây cảm ứng *apoptosis* đối với dòng tế bào OCI-AML3 ở nồng độ thấp < 0,5 μ g/mL.

Đáng chú ý chất **EH1** và **EH3** còn có tác động giảm biểu hiện các gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 liên quan đến ung thư của dòng OCI-AML3.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu về hóa học

❖ Từ loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*) đã phân lập và xác định được cấu trúc 10 hợp chất. Trong đó có:

4 hợp chất mới là các phenolic: 7-acetyl-4R,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (**DN1**), (2S)-2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (**DN2**), diaensi-biflavan (**DN4**) và diaensi-biflavan A (**DN5**).

1 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên là (2S)-7,4'-dimethoxyflavan (**DN3**).

6 hợp chất đã biết là methyl β -orcinolcarboxylate (**DN6**), dianellose (**DN7**), amentoflavone (**DN8**), sitosterone (**DN9**) và β -sitosterol (**DN10**).

❖ Từ loài Côm hải nam (*Elaeocarpus hainanensis*) đã phân lập và xác định được cấu trúc của 15 hợp chất, chủ yếu thuộc các nhóm chất cucurbitacine và oleanane triterpene. Trong đó có:

3 hợp chất mới gồm 1 hợp chất cucurbitacine là elaeohainencin A (**EH8**), và hai hợp chất oleanane triterpen sulfate là 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-12-ene 1- sulfate (**EH9**) và 1 α ,3 β -dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate (**EH13**).

12 hợp chất đã biết cấu trúc gồm 7 cucurbitacin: cucurbitacin D (**EH1**), cucurbitacin I (**EH2**), 3-*epi*-isocucurbitacin D (**EH3**), cucurbitacin F (**EH4**), cucurbitacin H (**EH5**), 16 α ,23 α -epoxy-3 β ,20R-dihydroxy-10 α H,23 β H-cucurbit-5,24-dien-11-one (**EH6**), 16 α , 23 α -epoxy-cucurbit-3 β , 20 β -dihydroxy-10 α H,23 β H-5,24-dien-11-one 3-O- β -D-glucopyranoside (**EH7**); và 3 oleanane triterpene là: 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside (**EH10**), 1 α -hydroxy-olean-11-oxo-12-en-3-O- α -L-arabinopyranoside (**EH11**), 1 α -hydroxy-olean-12-en-3-O- β -D-xylopyranoside (**EH12**), 1 hợp chất furfuran 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde (**EH14**), và 1 hợp chất megastigman là blumenol A (**EH15**).

2. Kết quả nghiên cứu về hoạt tính chống ung thư

❖ Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất từ loài Xương quạt.

Lần đầu tiên bốn hợp chất mới phân lập từ loài Xương quạt **DN1**, **DN2**, **DN3**, **DN4** được thử nghiệm hoạt tính ức chế tế bào ung thư trên bốn dòng ung ở người:

A549, Hep3B, Hela và MCF7. Ba hợp chất thuộc nhóm flavan (**DN2**, **DN3**, và **DN4**) thể hiện hoạt tính ức chế 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm ở mức yếu, trong khi chất **DN1** không thể hiện hoạt tính.

❖ Hoạt tính chống ung thư của các hợp chất từ loài Côm hải nam

➤ Các dẫn xuất của cucurbitacin **EH6**, **EH7** và **EH8** lần đầu tiên được thử nghiệm hoạt tính gây độc 5 dòng tế bào ung thư ở người: A549, T24, Huh, 8505, SNU-1. Kết quả cho thấy chúng đều có khả năng ức chế cả 5 dòng tế bào trên ở mức trung bình với giá trị 56,19 đến 116,22 μM .

➤ Các hợp chất **EH10**, **EH2a** (hỗn hợp cucurbitacin D và cucurbitacin I (**EH2**)) và **EH3** đều có hoạt tính gây độc tế bào ung thư OCI-AML3 ở các nồng độ lần lượt là 15; 10 và 5 $\mu\text{g/mL}$. Đây là lần đầu tiên các chất này được thử nghiệm gây độc tế bào dòng OCI-AML3.

➤ Thử nghiệm tác động đến pha phân bào dòng OCI-AML3 của các chất **EH1**, **EH2a**, **EH3**, **EH10** cho thấy ở nồng độ cao (15; 10; 5 $\mu\text{g/mL}$) có tác động đến các pha phân bào làm tăng đáng kể tỷ lệ tế bào OCI-AML3 ở pha G0/G1, trong khi **EH1**, **EH2a**, **EH3** ở nồng độ thấp (0,3; 1,0; 0,5 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng) làm tăng tỷ lệ tế bào OCI-AML3 ở pha G2/M.

➤ Hai hợp chất **EH1** và **EH3** gây cảm ứng *apoptosis* đối với dòng tế bào ung thư OCI-AML3 ở nồng độ thấp < 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

➤ Kết quả đánh giá tác động của **EH1** và **EH3** đến biểu hiện gen liên quan đến ung thư cho thấy **EH1** (0,3 $\mu\text{g/mL}$) và **EH3** (0,5 $\mu\text{g/mL}$) có tác dụng điều khiển giảm biểu hiện các gen TNF- α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217 của dòng tế bào OCI-AML3.

KIẾN NGHỊ

Từ các nghiên cứu cho thấy các hợp chất cucurbitacin D (**EH1**) và 3-*epi*-cucurbitacin D (**EH3**) có hoạt tính gây độc tế bào, kích thích quá trình cảm ứng *apoptosis*, và có tác động biểu hiện giảm các gen ung thư đối với dòng tế bào ung thư tủy xương cấp (OCI-AML3) tốt. Các chất cucurbitacin này được dự đoán rất có tiềm năng và cần có các nghiên cứu sâu thêm về dược lý nhằm nghiên cứu phát triển nguyên liệu tạo ra sản phẩm chống ung thư phục vụ cộng đồng.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

➤ Lần đầu tiên loài Xương quạ ở Việt nam được nghiên cứu về thành phần hóa học. Từ loài này đã phân lập và xác định được cấu trúc của 4 hợp chất mới là 7-acetyl-4R,8-dihydroxy-6-methyl-1-tetralone (**DN1**), (2S)-2',4'-dihydroxy-7-methoxyflavan (**DN2**), diaensi-biflavan (**DN4**), diaensi-biflavan A (**DN5**). Chất (2S)-7,4'-dimethoxyflavan (**DN3**) lần đầu được phân lập từ thiên nhiên.

➤ Chất mới elaeohainencin A (**EH8**) là đại diện đầu tiên của cucurbitacin có nhóm hydroperoxide, và chất $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-12-ene 1-sulfate (**EH9**), $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-18-ene 1-sulfate (**EH13**) là hai oleanane triterpen mới có chứa nhóm sulfate được phân lập và xác định từ loài Côm hải nam.

➤ Lần đầu tiên hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cucurbitacin D (**EH1**), **EH2a** (Hỗn hợp cucurbitacin D và -I (**EH2**)) và 3-*epi*-cucurbitacin D (**EH3**) được thử nghiệm và có tác dụng mạnh trên dòng OCI-AML3.

➤ Các chất triterpenoid **EH1**, **EH10**, **EH2a**, **EH3** lần đầu được đánh giá tác động vào các pha phân bào và **EH1**, **EH3** cũng lần đầu được thử nghiệm tác động gây cảm ứng *apoptosis* đối với dòng tế bào ung thư OCI-AML3.

➤ Đây cũng là lần đầu tiên **EH1** và **EH3** được đánh giá tác động đến biểu hiện gen liên quan đến ung thư dòng OCI-AML3. Cả hai hợp chất đều có tác động điều khiển giảm biểu hiện các gen liên quan đến ung thư (TNF α , Bcl-2, TGF- β , ZNF-217).

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Ba Thi Cham**, Nguyen Thi Thuy Linh, Nguyen Thi Hoang Anh, Trinh Thi Thuy, Nguyen Hai Dang, Domenico V. Delfino, Le Thi Hong Nhung, Cytotoxic activity of new phenolic from *Dianella ensifolia* (L.) DC., Journal of Science and Technology (Đại học Công nghiệp HN), 2021, 57, 123-125.
2. Le Thi Hong Nhung, Nguyen Thi Thuy Linh, **Ba Thi Cham**, Trinh Thi Thuy, Nguyen Thanh Tam, Dao Duc Thien, Pham Thi Mai Huong, Vu Minh Tan, Bui Huu Tai & Nguyen Thi Hoang Anh, New phenolics from *Dianella ensifolia*, Natural Product Research, 2021, 35(18), 3063–3070, doi.org/10.1080/14786419.2019.1689499.
3. **Ba Thi Cham**, Vu Dinh Hoang, Nguyen Thi Thuy Linh, Bui Huu Tai, Domenico V Delfino, Trinh Thi Thuy, Noncytotoxic 16,23-epoxycucurbitacin-type triterpenoids from *Elaeocarpus hainanensis*, Natural Product Research, online 10/2022, doi.org/10.1080/14786419.2022.2137507.
4. **Bá Thị Châm**, Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Thị Thùy Linh, Vũ Đình Hoàng, Trịnh Thị Thủy, Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất aromatic và flavan từ loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*), Tạp chí Khoa học Công nghệ (Đại học Đà Nẵng), 2023, 21 (3), 93-96.
5. **Ba Thi Cham**, Vu Dinh Hoang, Nguyen Thi Thuy Linh, Nguyen Thi Thu Hoa, Nguyen Thi Hoang Anh, Bui Huu Tai, Le Thi Hong Nhung, Domenico V. Delfino, Trinh Thi Thuy, Oleanane-type triterpenoid sulfates, two new α -glucosidase inhibitors from *Elaeocarpus hainanensis*. Natural Product Research, online 24/8/2023, doi.org/10.1080/14786419.2023.2250900.
6. Nguyen Thi Thuy Linh, **Ba Thi Cham**, Le Thi Hong Nhung, Bui Huu Tai, Vu Dinh Hoang, Tran Duc Quan, Nguyen Thi Hoang Anh, Nguyen Huu Truc, Trinh Thi Thuy, A new biflavan from *Dianella ensifolia* and its cytotoxic activity. Submitted to Natural Product Communication, 05/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Moraes D.F.C., Mesquita L.S.S., Amaral F.M.M., Ribiero M.N.S., 2017, Anticancer Drugs from Plants, *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds*, 121-142.
2. Chen Y.C., Su S.H., Huang J.C., Chao C.Y., Sung P.J., Chen Y.F., Ko H.H., Kuo Y.H., 2022, Tyrosinase Inhibitors Derived from Chemical Constituents of *Dianella ensifolia*. *Plants*, 11, 2142.
3. Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Qin X.S., Gan R.Y., Li H.B., 2010, Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of 56 Wild Fruits from South China, *Molecules*, 15, 8602-8617.
4. Zhang S.Q., Zhu L., Wen N., Yu M., Shen Y.Z., Jia Q., Li Z.G., Li B., 2011, Quantification of a novel natural antioxidant (UP302) in rat plasma using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 879, 3763-3766.
5. Mammone T., Muizzuddin N., Declercq L., Clio D., Corstjens H., Sente I., et al., 2010, Modification of skin discoloration by a topical treatment containing an extract of *Dianella ensifolia*: a potent antioxidant, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 9, 89-95.
6. He Z.Q., Xue-Yuan S., Ze-Yu C., Rou-Lan W., Peng-Xiang L., Xiang X., 2020, Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of the essential oil of *Dianella ensifolia*, *Records of Natural Products*, 14, 160-165.
7. Quyết T.N., Tân V.M., Hải T.T., Nhung L.T.H., 2020, Tạo căn chiết và hoạt tính sinh học của loài Xương quạt (*Dianella ensifolia*), *Journal of Science and Technology*, 56, (3), 125-127.
8. Niki Y., Yoshida M., Ando H., Wakamatsu K., Ito S., Harada N., et al., 2011, 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane inhibits melanin synthesis by dual mechanisms, *Journal of Dermatological Science*, 63, 115-121.
9. Nesterov A., Zhao J., Minter D., Hertel C., Ma W., Abeysinghe P., Hong M., Jia Q., 2008, 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane, a

- novel tyrosinase inhibitor with strong depigmenting effects, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 1292-1296.
10. Yang F., Fan M.Y., Liu B.R., Zhang P.Z., 2022, Two new glycosides from *Dianella ensifolia* (L.) DC, *Phytochemistry letters*, 47, 18-20.
 11. Meng D., Qiang S., Lou L., Zhao W., 2008, Cytotoxic cucurbitane-type triterpenoids from *Elaeocarpus hainanensis*, *Planta Medica*, 74, 1741–1744.
 12. Tung N.H., Duong P.Q., Phuong Anh D.T., My N.T.T., Quang L.D., Hoang V.D., 2020, A new oleanane type saponin from the Aerial parts of *Elaeocarpus hainanensis*, *Records of Natural Products*, 14, 301-306.
 13. Nga D.T., Duong P.Q., Quang L.D., Tung N.H., Hoang V.D., 2018, Two new oleanane-type saponins from *Elaeocarpus hainanensis* Oliv. growing in Vietnam, *Phytochemistry Letters*, 27, 174–177.
 14. Henderson R.I.F., 1987, *Dianella*. In: Flora of Australia, Hydatellaceae to Liliaceae (ed. AS George), *Australian Government Publishing Service*, 45, 194–225.
 15. Xinqi C., Songyun L., Jiemei X., Tamura M.N., 2000, Liliacea: Flora of China, 24, 73–263.
 16. Henderson R.I.F., Rodney J. F., 2020, *Dianella* Lam, Australian Biological Resources Study, *Department of Agriculture, Water and the Environment: Canberra*. Retrieved,
 17. Đỗ Tất Lợi, 2005, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*, Nhà xuất bản Y học, 324-325.
 18. Widyaning E.A., Rahayu I., Timotius K.H., 2020, Ethno medical uses, phytochemistry and pharmacology of *Dianella ensifolia* (Linnaeus) de Candolle: A systematic review, *International Journal of Herbal Medicine*, 8, 10-18.
 19. Jorim R.Y., Korape S., Legu W., Koch M., Barrows L.R., Matainaho T.K., Rai P.P., 2012, An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the eastern highlands of Papua New Guinea, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8, 47.
 20. Clarke P.A., 1987, Aboriginal uses of plants as medicines, narcotics, and poisons in southern South Australia, *J. Anth. Soc. S. Aust*, 25, 3–23.

21. Tang B.Q., Chen Z.Y., Sun J.B., Lee S.M., Lu J.L., 2017a, Phytochemical and chemotaxonomic study on *Dianella ensifolia* (L.) DC, *Biochemical Systematics and Ecology*, 72, 12-14.
22. Jassim S.A.A., Naji M.A., 2003, *Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective*, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 412-427.
23. Saladino R., Gualandia G., Farinaa A., Crestinib C., Nencionic L., and Palamara A.T., 2008, Advances and Challenges in the Synthesis of Highly Oxidised Natural Phenols with Antiviral, Antioxidant and Cytotoxic Activities, *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1500-1519.
24. Bloor S.J., 2001, Deep blue anthocyanins from blue *Dianella berries*, *Phytochemistry* 58, 923-927.
25. Tang B. Q., Huang S. S., Liang Y. E., Sun J. B., Ma Y., Zeng B., Lee S. M., Lu J. L., 2017b , Two new flavans from the roots of *Dianella ensifolia* (L.) DC, *Natural product research*, 31, 1561-1565.
26. Randrianasolo R., Raharinirina A., Rasoanatro H.L., Krebs H.C., Raharisolololao A., Razakarivony A.A., Rakotondramanga M.F., 2015, A new Dihydronaphtaquinone from *Dianella ensifolia* L. Redrout, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3, 140-144.
27. Cooke R., Sparrow L., 1965, Quinones from *Dianella revoluta* and *Stypandra grandis*, Colouring matters of Australian plants. XII. *Australian Journal of Chemistry*, 18, 218.
28. Byrne L.T., Colegate S.M., Dorling P.R., Huxtable C.R., 1987, Imbricatanol, a Naphthol-Naphthoquinone dimer isolated from *Stypandra imbricata* and *Dianella revoluta*, *Aust. J. Chem.*, 40, 1315-20.
29. Semple S.J., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L., 2001, In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus, *Antiviral Research*, 49, 169-178.
30. Colegate S.M., Dorling P.R., Huxtable C.R., 1986, Dianellidin, stypandrol and dianellinone: An oxidation-related series from *Dianella revoluta*, *Phytochemistry*, 25, 1245-1247.

31. Batterham T., Cooke H., Duewell H., Sparrow L.G., 1961, Naphthalene derivatives from *Dianella* species, *Colouring matters of Australian plants VIII*, 637-642.
32. Colegate S.M., Dorling P.R., Huxtable C.R., 1987, Stypandrone: A toxic naphthalene-14-quinone from *Stypandra imbricata* and *Dianella revoluta*, *Phytochemistry*, 26, 979-81.
33. Cooke R.G., Down J.G., 1971, Minor constituents of *Dianella revoluta* and *Stypandra grandis*, *Colouring matters of Australian plants XVI. Aust. J. Chem.*, 24, 1257-65.
34. Lojanapiwatna V., Chanchaen K., Sakarin K., Wiriyaichitra P., 1982, Chemical constituents of *Dianella ensifolia* Redoute, *J. Si. Soc. Thailand*, 8, 95-102.
35. Dias D.A., Silva C.A., 2009, Urban S. Naphthalene aglycones and glycosides from the Australian medicinal plant. *Dianella callicarpa*, *Planta Medica*, 75, 1442-1447.
36. Phạm Hoàng Hộ, 1999, *Cây cỏ Việt nam*, Quyển III, Nhà xuất bản trẻ TP Hồ Chí Minh, 477.
37. Võ Văn Chi, 1996, *Từ điển cây thuốc Việt nam*, Nhà xuất bản y học, 595-596.
38. Tang B.Q., Li C.W., Sun J.B., Chang Y., Chan J.Y.W., Lee S.M.M., Zeng B., 2016, A new cycloartane-type triterpenoid from the roots of *Dianella ensifolia* (L.) DC. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 966-971.
39. Karim A.K., Sismindari S., Asmara W., Istriyati I., 2012, Cytotoxic Activity of Tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) Methanol Extract Against HeLa Cells, *Indonesian Journal of Biotechnology*, 17, 1-9.
40. Christenhusz M.J.M., Byng J.W., 2016, The number of known plants species in the world and its annual increase, *Phytotaxa*, 261, 201-217.
41. Phạm Hoàng Hộ, 1999, *Cây cỏ Việt nam*, Quyển I, Nhà xuất bản trẻ TP Hồ Chí Minh, 465-475.
42. Shah G., Singh P., Mann A., Shri R., 2011, Scientific basis for the chemical constituent and therapeutic use of *Elaeocarpus* species: A review, *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 1, 267-278.

43. Nandy B., Hardainiyan S., Kumar K., 2015, *Elaeocarpus ganitrus* (Rudraksha): a reservoir plant with their pharmacological effects, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 34, 55–64.
44. Juvekar M.R., Bodhankar S.S., Sakat S.S., Wankhede S.S., Mali V.R., Juvekar A.R., 2008, Study of antihypertensive activity of *Elaeocarpus ganitrus* water extract in renal artery-occluded hypertensive rats, *Planta Medica*, 74, 9-13.
45. Geetha D. H., Indhiramuthu J., Rajeswari M., 2015, In vitro antiarthritic activity of *Elaeocarpus serratus* Linn. (Elaeocarpaceae), *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 2649-2651.
46. Jayashree I., Geetha D.H., Rajeswari M., 2014, Evaluation of antimicrobial potential of *Elaeocarpus serratus* L., *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5, 3467-3472.
47. Gurib-Fakim, Guého J., Bissoondoyal M.D., 1996, Plantes médicinales de Maurice, tome 2. *Editions de l'Océan Indien, Rose-Hill, Mauritius*, 532.
48. Jamal J.A., Zakiah A.G., Khairana H., 2011, Medicinal plants used for postnatal care in Malay traditional medicine in the Peninsular Malaysia, *Pharmacognosy Journal*, 3, 15-24.
49. Das N., 2014, The effect of seed sources variation and presowing treatments on the seed germination of *Acacia catechu* and *Elaeocarpus floribundus* species in Bangladesh, *International Journal of Forestry Research*, 1–2.
50. Fang X., Phonebe C.H., Pezzuto J.M., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., 1984, Plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*, *Journal of Natural Products*, 47, 988–993.
51. Pan L., Yong Y., Deng Y., Lantvit D.D, Ninh T.N., Chai H., Kinghorn A.D., 2012, Isolation, structure elucidation, and biological evaluation of 16,23-epoxycucurbitacin constituents from *Elaeocarpus chinensis*, *Journal of Natural Products*, 75, 444–452.
52. Cho E.S., Krishnan P., Loh H.S., Daly J. M., Leong C.O., Mai C.W., Low Y.Y., Yong K.T., Lim K.H., 2022, Pentacyclic and hexacyclic cucurbitacins from *Elaeocarpus petiolatus*, *Phytochemistry*, 193, 112998.
53. Ogundele A.V., Das A.M., 2019, Chemical constituents from the leaves of *Elaeocarpus floribundus*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31, 330–334.

54. Sukari M., Utami R., Khalid N., Rahmani M., Abdul A., 2013, Dachriyanus, Phenolic contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Elaeocarpus floribundus* Blume, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 245-249.
55. Ogundele A.V., Yadav A., Haldar S., Das A.M., 2021a, Antimicrobial activities of extracts, fractions, and isolated compounds from the fruits of *Elaeocarpus floribundus* growing in North-East India, *Journal of Herbal Medicine*, 30, 100511.
56. Chand L., Dasgupta S., Chattopadhyay S.K., Ray A. B., 1977, Chemical investigation of some *Elaeocarpus species*, *Planta Medica*, 32, 197-199.
57. Johns S.R., Lamberton J.A., Sioumis A.A., Willing R.I., 1971, The alkaloids of *Elaeocarpus sphaericus*, *Australian journal of chemistry*, 24, 1679-1694.
58. Katavic P.L., Venables D.A., Rali T., Carroll A.R., 2007, Indolizidine alkaloids with delta-opioid receptor binding affinity from the leaves of *Elaeocarpus fuscooides*. *Journal of natural products*, 70, 872-875.
59. Katavic P.L., Venables D.A., Forster P.I., Guymer G., and Carroll A.R., 2006, Grandisines C-G, Indolizidine Alkaloids from the Australian Rainforest Tree *Elaeocarpus grandis*, *Journal of natural products*, 69, 1295-1299.
60. Ogundele A.V., Haldar S., Yada A., Das A.M., 2021b, *Elaeocarpus floribundus* Bl. seeds as a new source of bioactive compounds with promising antioxidant and antimicrobial properties, *Z. naturforsch*, 76, 141-146.
61. Wu L., Wu J., Chen S.P., Li Z.J., Zhang J., Yuan E., Ma G.Q., Jin L., Hu J.W., 2019, Chemical constituents of the twigs of *Elaeocarpus sylvestris*, *Chemistry of Natural Compounds*, 55 (2), 324-326.
62. Elkhateeb A., Subeki, Takahashi K., Matsuura H., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Yoshihara T., Nabeta K., 2005, Anti-babesial ellagic acid rhamnosides from the bark of *Elaeocarpus parvifolius*, *Phytochemistry*, 66 (21), 2577-2580.
63. Miller R.E., Stewart M., Capon R.J., Woodrow I.E., 2006, A galloylated cyanogenic glycoside from the Australian endemic rainforest tree *Elaeocarpus sericopetalus* (Elaeocarpaceae), *Phytochemistry*, 67 (13), 1365-1371.

64. Shitamoto J., Katsuyoshi M., Hideaki O., Takakazu S., Yoshio T., 2010, Elaeocarpionoside, a megastigmane glucoside from the leaves of *Elaeocarpus japonicus* Sieb. et Zucc, *Journal of Natural Medicines*, 64, 104-107.
65. Phạm Hoàng Hộ, 1999, *Cây cỏ Việt nam*, Quyển I, Nhà xuất bản trẻ TP Hồ Chí Minh, 470.
66. Tang Y., Phengklai C., Wu Z.Y., Raven P.H., and Hong D.Y., Eds, 2007, *Elaeocarpus*. In: Flora of China, *Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis*, 12:223–235.
67. Kaushik U., Aeri V., Mir S.R., 2015, Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature, *Pharmacognosy Reviews*, 9 (17), 12-18.
68. Ramezani M., Hasani M., Ramezani F., Abdolmaleki M.K., 2021, Cucurbitacins: A Focus on Cucurbitacin E as A Natural Product and Their Biological Activities, *Pharmaceutical Sciences*, 27 (1), 1-13.
69. Dandawate P., Subramaniam D., Panovich P., Standing D., Krishnamachary B., Kaushik G., Thomas S.M., et al., 2020, Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway, *Scientific Reports*, 10:1290 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57940-9>.
70. Sikander M., Hafeez B.B, Malik S., Alsayri A., Halawweish F., Yallapu M.M., Chauhan S.C., Jaggi M., 2016, Cucurbitacin D exhibits potent anticancer activity in cervical cancer, *Scientific Reports*, 6:36594, DOI: 10.1038/srep36594.
71. Alsayari A., Halaweish F.T., Gurusamy N., 2018, The Role of Cucurbitacins in Combating Cancers: A Mechanistic Review, *Phcog. Rev*, 12 (24), 157-65.
72. Kurman Y., Kiliccioglu I., Dikmen A.U., Esendagli G., Bilen C.Y., Sozen S., Konac E., 2020, Cucurbitacin B and cisplatin induce the cell death pathways in MB49 mouse bladder cancer model, *Experimental Biology and Medicine*, 0, 1–10.
73. Jinga S., Zoua H., Wua Z., Rena L., Zhanga T., Zhanga J., Weib Z., 2020, Cucurbitacins: Bioactivities and synergistic effect with small-molecule drugs, *Journal of Functional Foods*, 72, 104042.
74. Yuang R., Zhao W., Wang Q.Q., He J., Han S., Gao H., Feng Y., Yang S., 2021, Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer in vivo and in vitro by

- triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis, *Pharmacological Research*, 170, 105748.
75. Dai S., Wang C., Zhao X.T., Ma C., Fu K., Liu Y., Peng C., Li Y., 2023, Cucurbitacin B: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics, *Pharmacological Research*, 187, 106587, doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106587.
76. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L., 2011, Principles of early drug discovery, *British journal of pharmacology*, 162 (6):1239-1249.
77. Mosmann, Tim, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, (1-2), 55–63.
78. Riccardi C., Nicoletti I., 2006, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nat Protoc*, 1 (3), 1458-61.
79. Adorisio S., Fierabracci A., Muscari I., Liberati A.M., Cannarile L., T.T. Thuy, Sung T.V., Sohrab H., Hasan C.M., Ayroldi E., et al., 2019, Fusarubin and Anhydrofusarubin Isolated from A Cladosporium Species Inhibit Cell Growth in Human Cancer Cell Lines, *Toxins*, 11, 503, doi:10.3390/toxins11090503.
80. Binh V.N., Sabrina A., Domenico V.D., Anh N.Q., 2022, New 1,4-Dihydropyrazolo[4,3-b]indoles Induce Antiproliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells and Inhibition of Selective Inflammatory Cytokines, *Natural Product Communications*, 17 (6), 1–7.
81. Thuy T.T., Cham B. T., Linh N. T. T., Bich P. T. N., Sabrina A., Domenico V. D., 2022, Phenolic Acid Analogues from *Balanophora laxiflora* Inhibit Proliferation of In Vitro Acute Myeloid Leukemia Cells, *Rec. Nat. Prod.*, 16 (3), 253-258.
82. Sabrina A., Alessandra F., Giulia G., Isabella M., Lorenza C., Anna M.L., Maria C. M., Carlo R., Massimo C., Ramon E. R. Z., Domenico V.D., 2017, The Hexane Fraction of *Bursera microphylla* A Gray Induces p21-Mediated Antiproliferative and Proapoptotic Effects in Human Cancer–Derived Cell Lines, *Integrative Cancer Therapies*, 16 (3), 426–435.
83. Shan R., Stadler M., Anke H., Sterner O., 1997, Naphthalenone and phthalide metabolites from *Lachnum papyraceum*, *Journal of Natural Products*, 60 (8), 804–805.

84. Yeo W.H., Yun B.S., Kim S.S., Park E.K., Kim Y.H., Yoo I.D., Yu S.H., 1998, GTRI-02, a new lipid peroxidation inhibitor from *Micromonospora* sp. SA246, *J. Antibiot*, 51 (10), 952–953.
85. Gu J-Q., Graf T.N., Lee D., Chai H-B., Mi Q., Kardono L.B.S., Setyowati F.M., Ismail R., Riswan S., Farnsworth N.R., 2004, Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia, *Journal of Natural Products*, 67 (7), 1156–1161.
86. Bringmann G., Münchnach M., Messer K., Koppler D., Michel M., Schuppa O., Wenzel M., Louis A. M., 1999, Cis- and trans-isoshinanolone from *Dioncophyllum thollonii*: absolute configuration of two ‘known’, wide-spread natural products, *Phytochemistry*, 51, 693 – 699.
87. Rezende L.C., Juck D.B.F., David J.M, David J.P., Lima M.V.B., Lima L.S., Alves C.Q., 2015, New flavans isolated from the leaves and stems of *Cratylia mollis* (Leguminosae), *Phytochem Lett.*, 14, 165–169.
88. Ramadan M.A., Kamel M.S., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., 2000, Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs, *Phytochemistry*, 54 (8), 891–896.
89. Achenbach H., Stocker M.A., Constenla M., 1988, Flavonoids and other constituents of *Bauhinia manca*, *Phytochemistry*, 27 (6), 1835–184.
90. Orr R.K., Campeau L.C., Chobanian H.R., Dunn J.M.M.C., Pio B., Plummer C.W., Nolting A., Ruck R.T., 2016, A modular synthesis of 2-alkyl- and 2-arylchromans via a three-step sequence, *Synthesis*, 49, 657–666.
91. Gao F., Wang H., Mabry T.J., 1987, Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Helianthus* species, *Journal of Natural Products*, 50 (1) 23-29.
92. Michel S., Jean-Pierre D., Nicole K., and Jacques P., 1994, Isolation of Flavans from the Amazonian Shrub *Faramea guianensis*, *Journal of Natural Products*, 57 (3), 403–406.
93. Yusof H., Azahar H., Din L.B., Ibrahim N., 2015, Chemical constituents of the Lichens *Cladonia multiformis* and *Cryptothecia* sp., *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19 (5), 930-934.
94. Karunaratne V., Thadhani V.M., Khan S.N. and Choudhary M.I., 2014, Potent α -glucosidase inhibitors from the lichen *Cladonia* species from Sri Lanka, *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka*, 42 (1) 95-98.

95. Thadhani V.M., Choudhary M.I., Khan S. and Karunaratne V., 2012, Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones, *J. Natn. Sci. Foundation SriLanka*, 40 (1), 43-48.
96. Jing Y., Zhang G., Ma E., Zhang H., Guan J., He J., 2010, Amentoflavone and the extracts from *Selaginella tamariscina* and their anticancer activity, *Asian journal of traditional medicines*, 5 (6), 226-229.
97. Dora G. and Edwards J. M., 1991, Taxonomic status of *Lanaria lanata* and isolation of a novel biflavone, *Journal of Natural Products*, 54 (3), 796-801.
98. Yan S., Yu H., Zhang L., Shan M., Chen P., Ding A., Li S.F.Y., 2017, A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Amentoflavone, a Naturally-Occurring Biflavonoid, *Molecules*, 22, (2), 299; <https://doi.org/10.3390/molecules22020299>.
99. Xiong X., Tang N., Lai X., Zhang J., Wen W., Li X., Li A., Wu Y., Liu Z., 2021, Insights Into Amentoflavone: A Natural Multifunctional Biflavonoid, *Front. Pharmacol*, 12, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.768708>.
100. Tun K.N.W., Aminah N.S., Kristanti A.N., Zahrah H.I., Takaya Y., Aung H.T., 2020, β -sistosterol and β -sitostenone from *Eucalyptus deglupta*, *Journal of the Indian Chemical Society*, 97, (5), 779-782.
101. Seger C., Sturm S., Haslinger E., 2005, Stuppner H. NMR signal assignment of 22-deoxocucurbitacin D and cucurbitacin D from *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae), *Monatsheft Chem.*, 136, 1645–9.
102. Christoph S., Sonja S., Maria-Elisabeth M., Ernst P. E. and Hermann S., 2005, Spectral Assignments and Reference Data, ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae), *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43, 489–491 DOI: 10.1002/mrc.1570.
103. Feitosa, Cléia Rocha de Sousa, 2011, *Contribuição ao conhecimento químico-biológico de plantas do nordeste do Brasil: Luffa operculata* Cogn., Universidade Federal Do Ceará.
104. Kim D.K., Choi S.H., Lee J.O., Ryu S.Y., Park D.K., Shin D.H., Jung J.H., Pyo S.K., Lee K.R., Zee O.P., 1997, Cytotoxic constituents of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila*, *Arch Pharm Res.*, 20 (1), 85-7.

105. Maloney K.N., Fujita M., Eggert U.S., Schroeder F.C., Field C.M., Mitchison T.J., Clardy J., 2008, Actin-aggregating cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*, *Journal of Natural Products*, 71 (11), 1927-1929.
106. Fujita S., Kasai R., Ohtani K., Yamasaki K., Chiu M.H., Nie R.L., Tanaka O., 1995, Dammarane glycosides from aerial parts of *Neosalsomitra integrifoliola*, *Phytochemistry*, 38 (2), 465-472.
107. Karen L.L., Tatiana D.R.G., Vanessa R.M., Lara A.Z., Izabella T.S, Marina R.T., Fernando J.D., Jorge A.P., Cláudia M.O.S., Miguel S.B.C., Eloir P.S., 2011, New Cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn, *Planta Med.*, 77, 1648 – 1651, doi.org/10.1055/s-0030-1270962.
108. Muñoz O., Delporte C., Backhouse N., Erazo S., Negrete R., Maldonado S. , Feliciano A.S., 2000, A new cucurbitacin glycoside from *Kageneckia oblonga* (Rosaceae), *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55 (3-4), 141–145. doi:10.1515/znc-2000-3-403.
109. Seger C., Sturm S., Haslinger E., Stuppner H., 2004, A New Cucurbitacin D Related 16,23-Epoxy Derivative and Its Isomerization Products, *Org. Lett.*, 6 (4), 633–636.
110. Agrawal, 1992, NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 31, 1307-1330.
111. Mahato S., Kundu A., 1994, ¹³C-NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a complication and some salient features, *Phytochemistry*, 37, 1517–1575.
112. Topcu G., 2006, Bioactive triterpenoids from *Salvia* species, *Journal of Natural Products*, 69 (3), 482–487.
113. Zheng Y.F., Wei J.H., Fang S.Q., Tang Y.P., Cheng H.B., Wang T.L., Li C.Y. and Peng G.P., 2015, Hepatoprotective triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza inflata*, *Molecules*, 20 (4), 6273-6283.
114. Kitagawa I., Zhou J.L., Sakagami M., Uchida E. and Yoshikawa M., 1991, Licorice-saponins F3, G2, H2, J2, and K2, five new oleanene-triterpene oligoglycosides from the root of *Glycyrrhiza uralensis*, *Chem. Pharm Bull*, 39, 244–246.

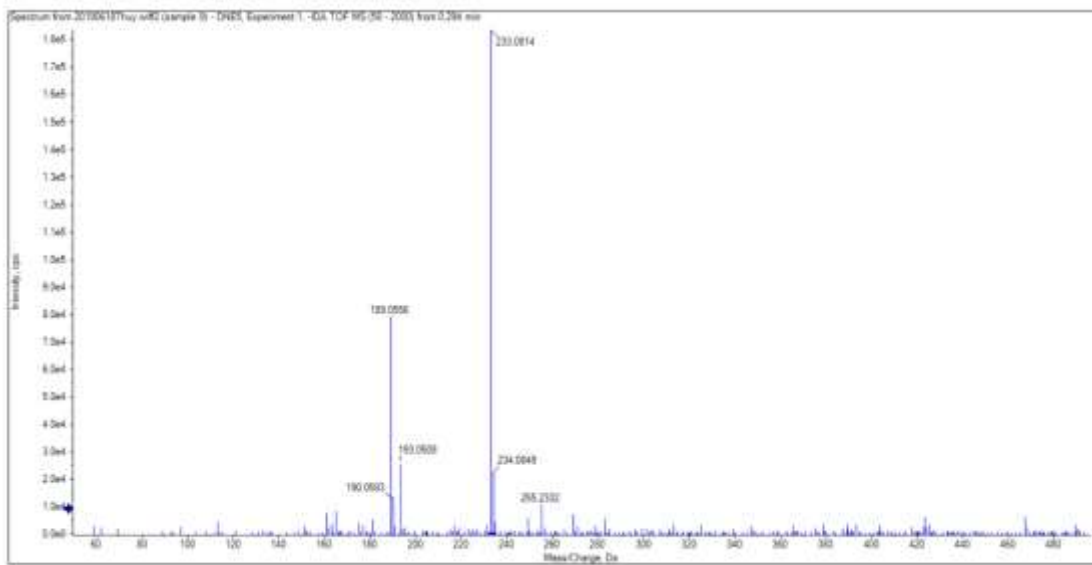
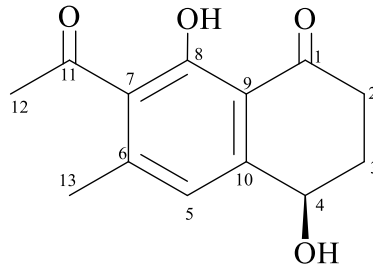
115. Li-Yang J., Nakajima J. I., Kimura N., Saito K. and Seo S., 2007, Oleanane-type triterpene glycosides from *Glycyrrhiza uralensis*, *Natural Product Communications*, 2 (3), 243–248.
116. González A.G., Fraga B.M., González P., Hernandez M.G., Ravelo A.G., 1981, ¹³C NMR spectra of olean-18-ene derivatives, *Phytochemistry*, 20 (8), 1919–1921. doi:10.1016/0031-9422(81)84035.
117. Anh T.T.V., Minh N.V., Nhung N.T.A., Hien T.D., Thuy B.T.P., Tat P.V., Han N.T., 2021, New triterpene sulfates from Vietnamese red alga *Tricleocarpa fragilis* and their α -glucosidase inhibitory activity, *J. Asian Nat Prod Res.*, 23 (8), 754-763, DOI: 10.1080/10286020.2020.1783658.
118. Ya-nan H., Ya-rong W., Chun-hui Z. & Kun F., 2020, Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural into 2,5-dihydroxymethylfuran by *Ganoderma sessile* and toxicological assessment of both compounds, *AMB Express*, 10 (1), 88.
119. Gilda E.R., Luis M.P.R., Olov S., 2009, Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*, *J. Mex. Chem. Soc.*, 53, 44-47.
120. Marchand T., Pinho S., 2021, Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities, *Frontiers in Immunology*, 12, 1-13.
121. Pawlik T.M., M.P.H., and Keyomarsi K., 2004, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 59 (4), 928-942.
122. Kim M.S., Lee K., Ku J.M. , Choi Y.J., Mok K., Kim D., Cheon C., Ko S.G., 2020, Cucurbitacin D Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis via the ROS/p38 Pathway in Capan-1 Pancreatic Cancer Cell Line, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <https://doi.org/10.1155/2020/6571674>.
123. Ku J.M., Hong S.H., Kim H.I., Lim Y.S., Lee S.J., Kim M., Seo H.S., Shin Y.C. and Ko S.G., 2018, Cucurbitacin D exhibits its anti-cancer effect in human breast cancer cells by inhibiting Stat3 and Akt signaling, *European Journal of Inflammation*, 16, 1–9.
124. Bertram J.S., 2001, The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 21, 167-223.

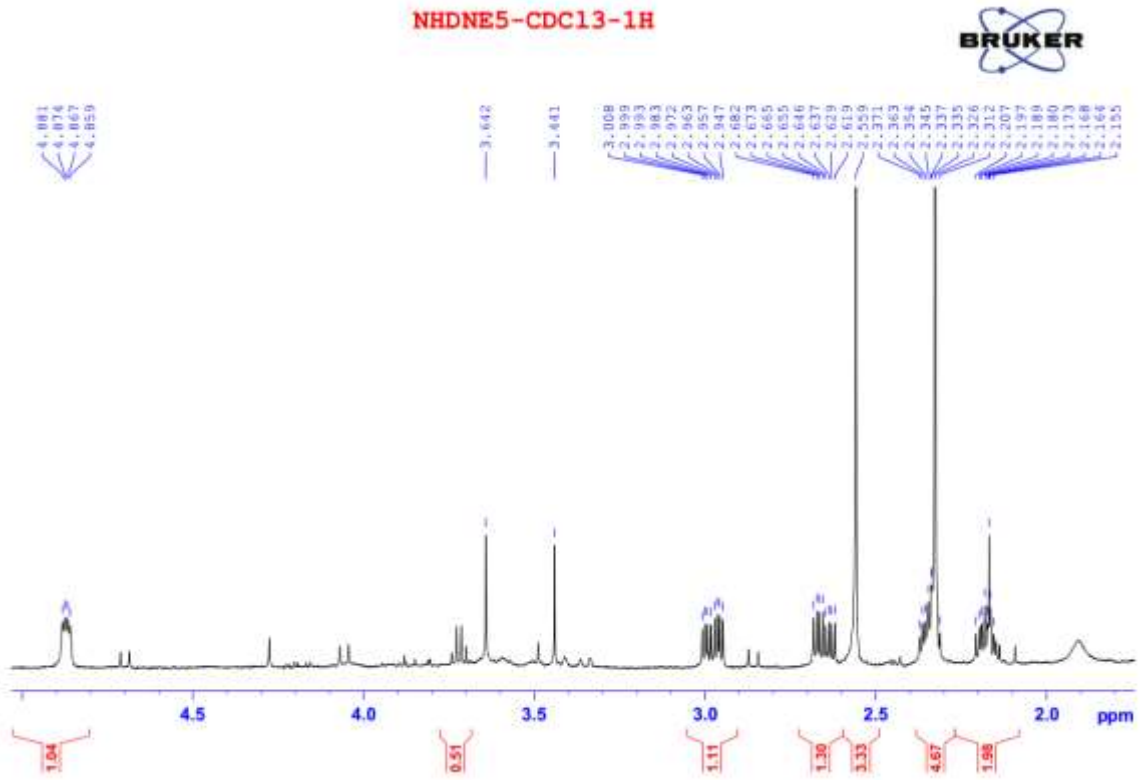
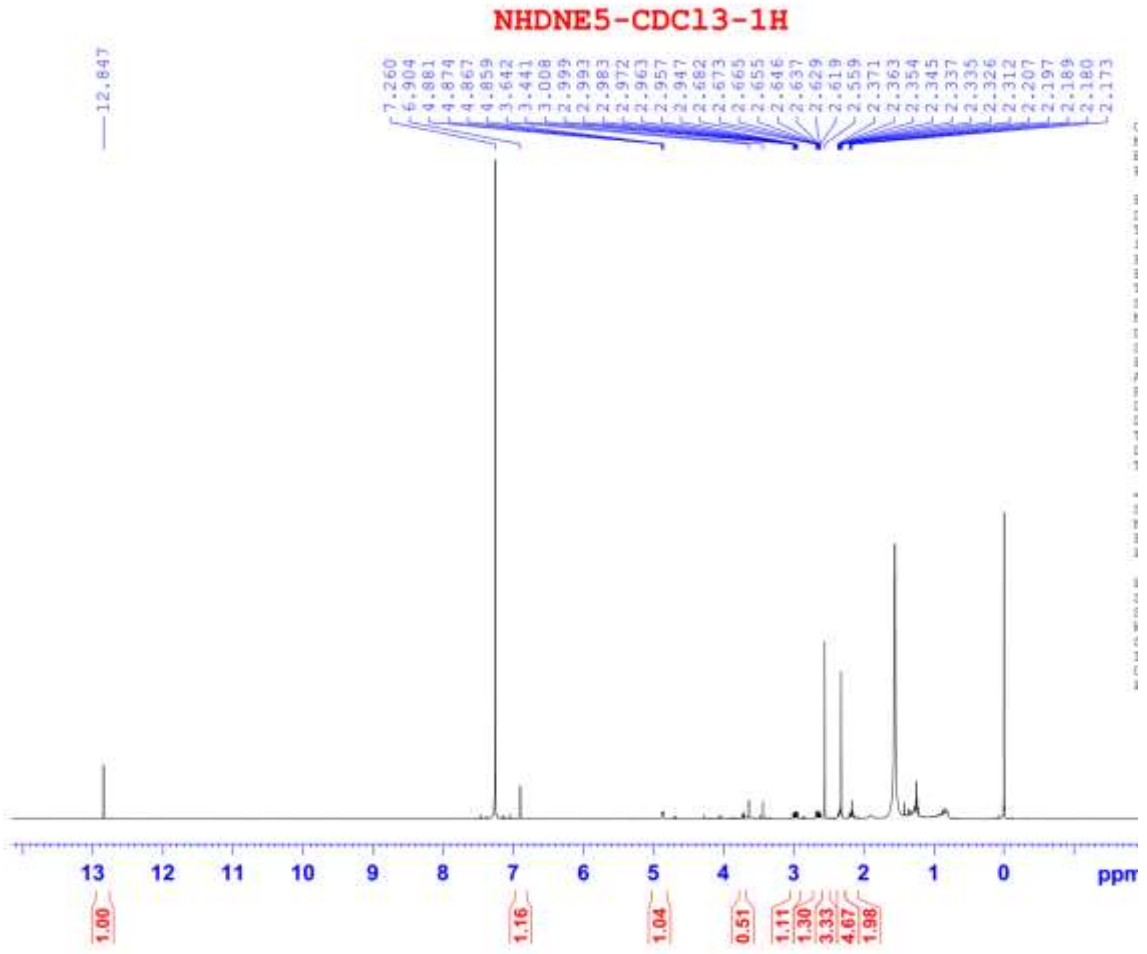
125. Hamaguchi T., Wakabayashi H., Matsumine A., Sudo A., Uchida A., 2011, TNF inhibitor suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407, 525-530.
126. Wang J., Xu Z., Wang Z., Du G., Lun L., 2021, TGF-beta signaling in cancer radiotherapy, *Cytokine*, 148, 155709.
127. Li J., Li Z., Zheng W., Li X., Wang Z., Cui Y., Jiang X., 2017, LncRNA-ATB, An indispensable cancer-related long noncoding RNA, *Cell proliferation*, 1-7, e12381.

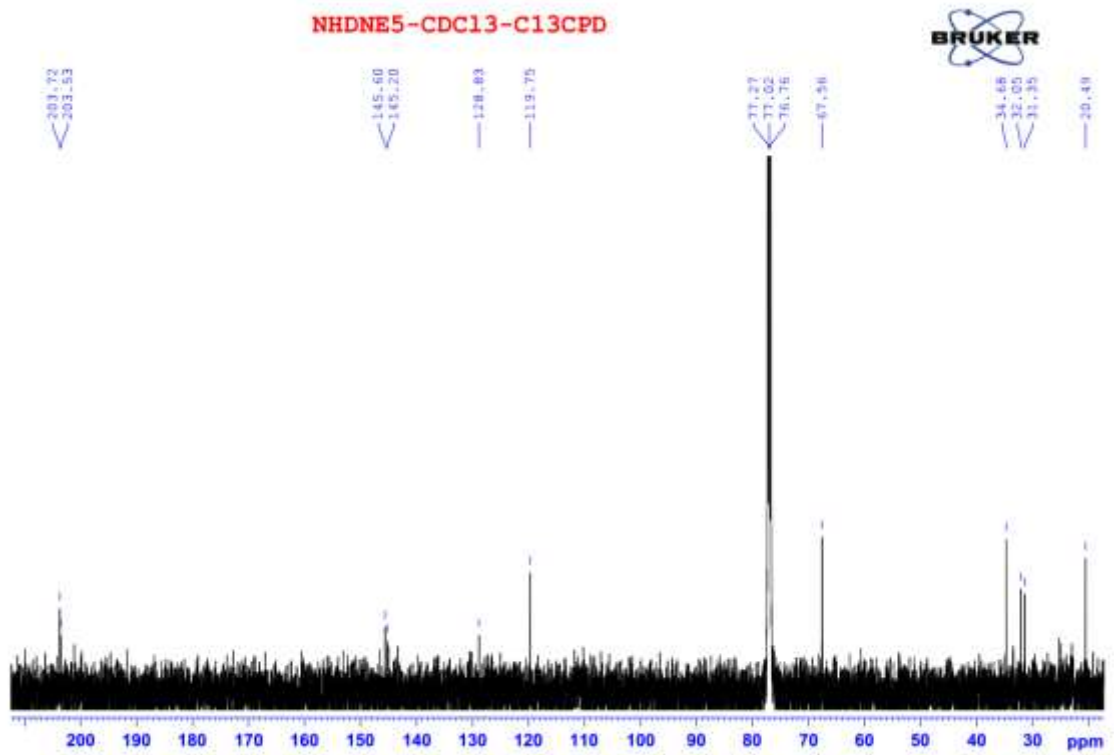
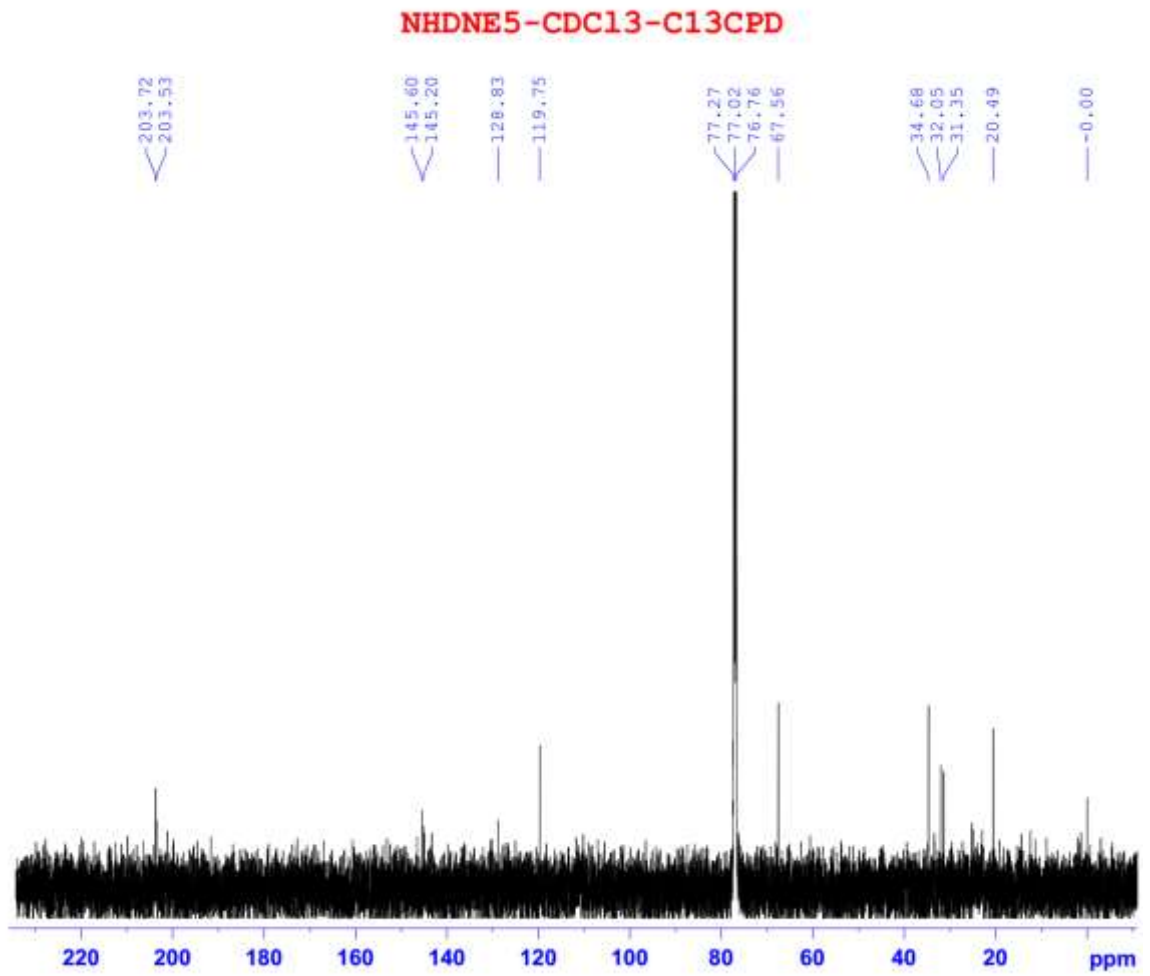
PHỤ LỤC

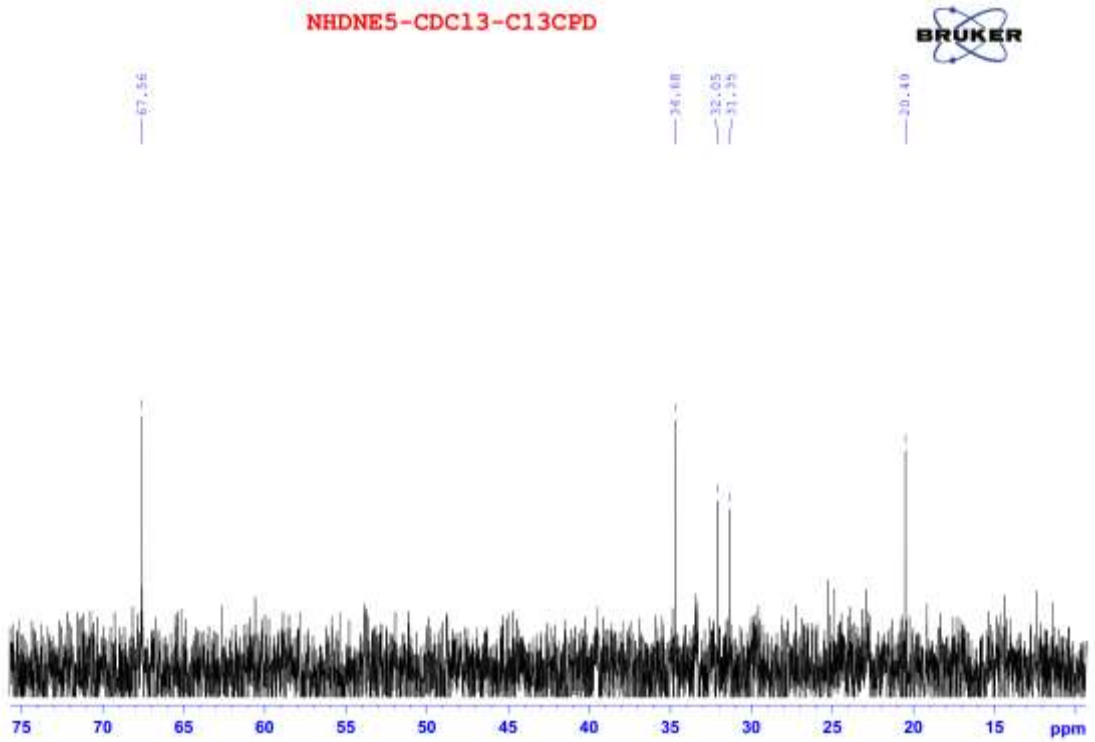
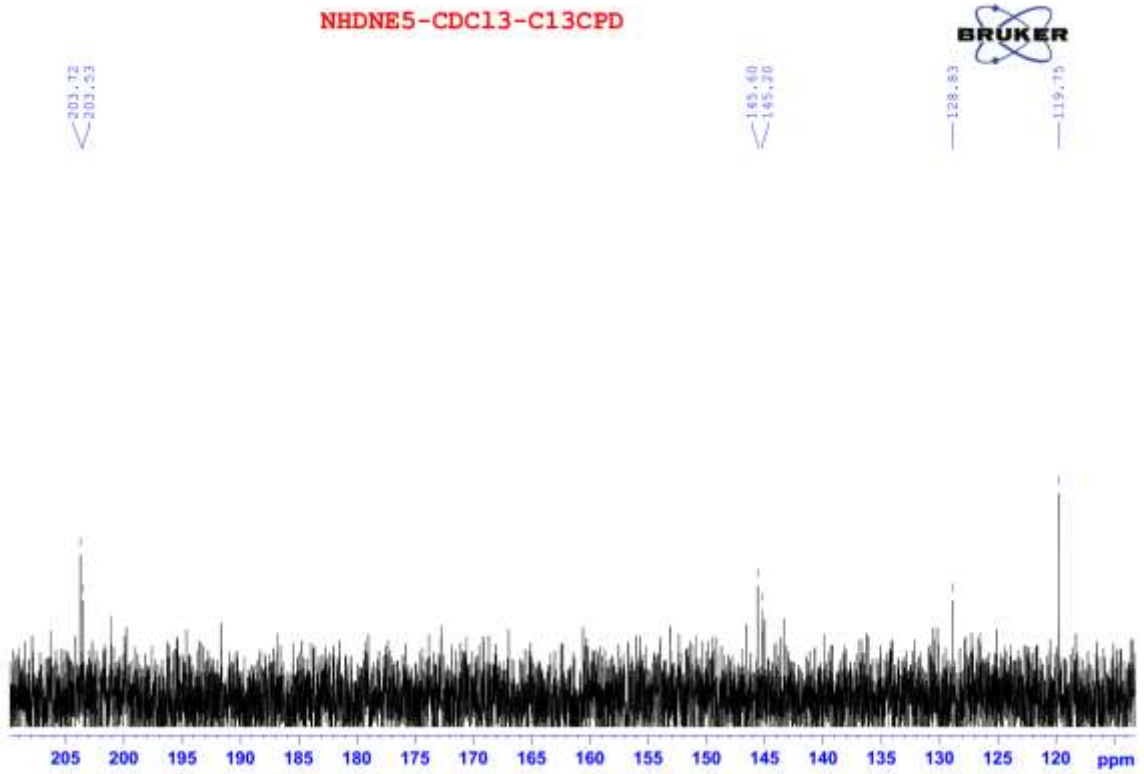
Hình ảnh phổ các hợp chất phân lập được từ cây Xương quạt và Côm hải nam

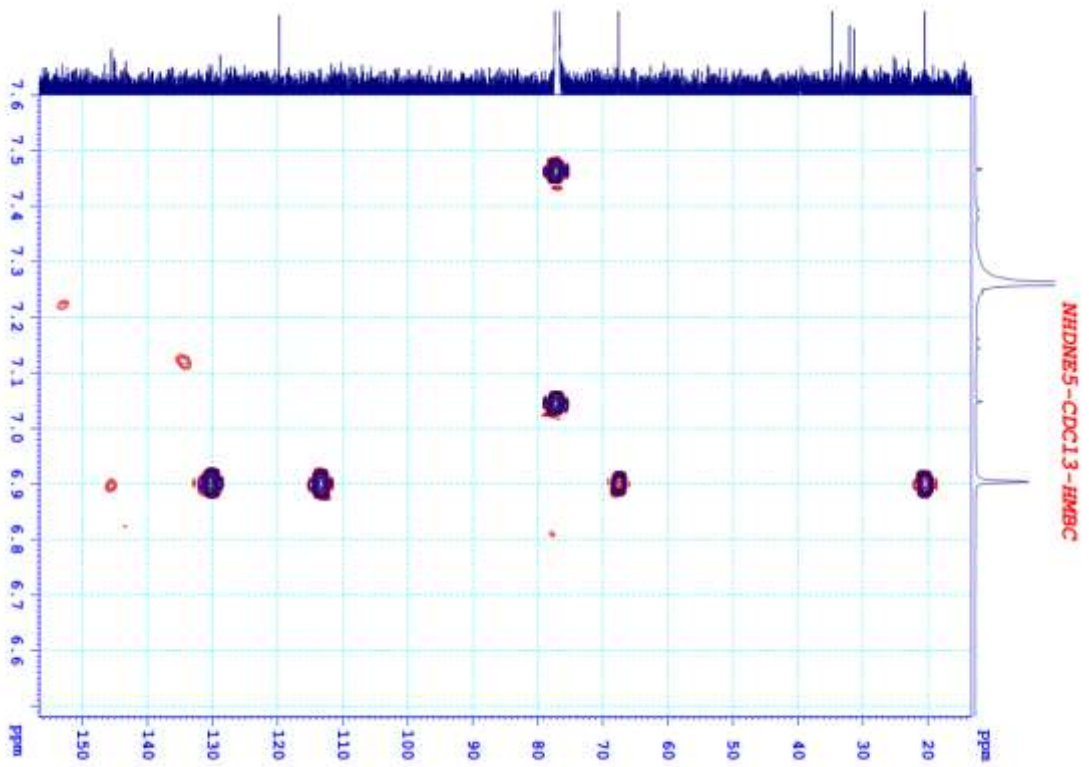
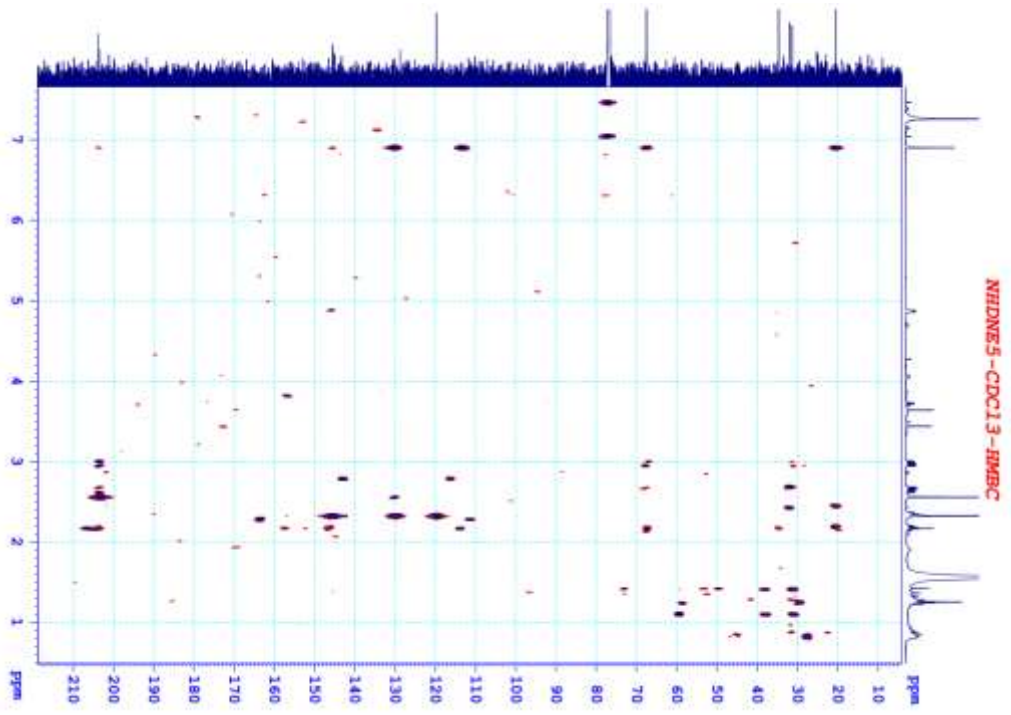
1. Phổ của hợp chất DN1

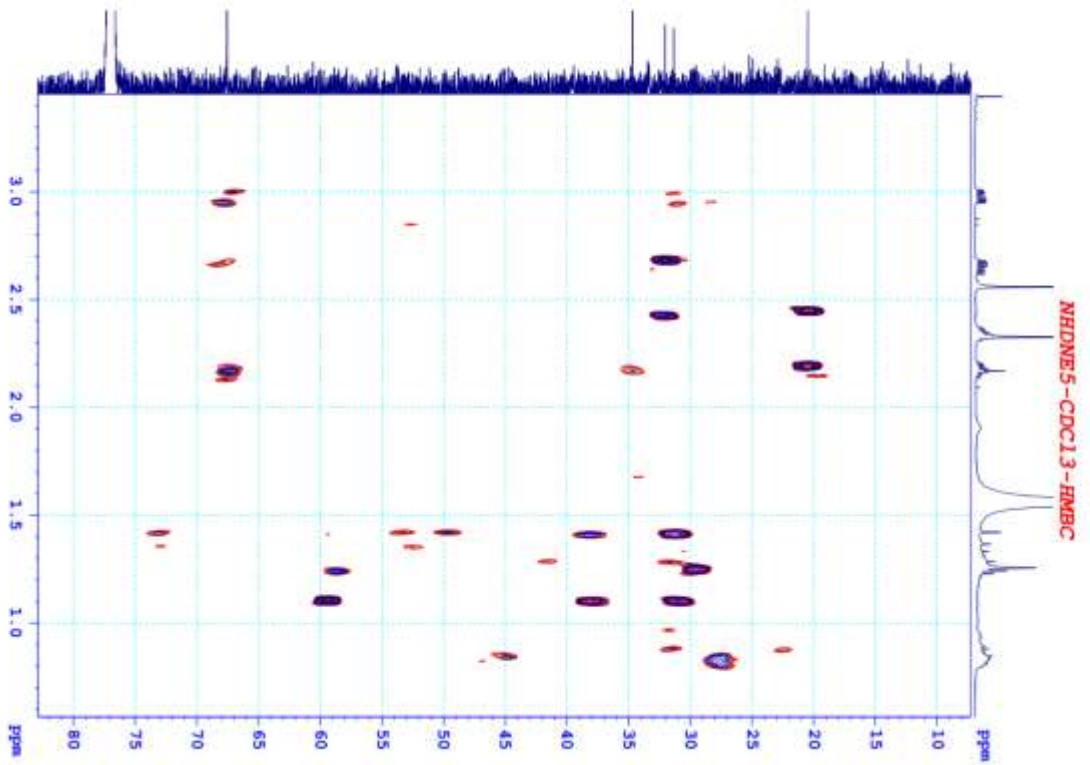
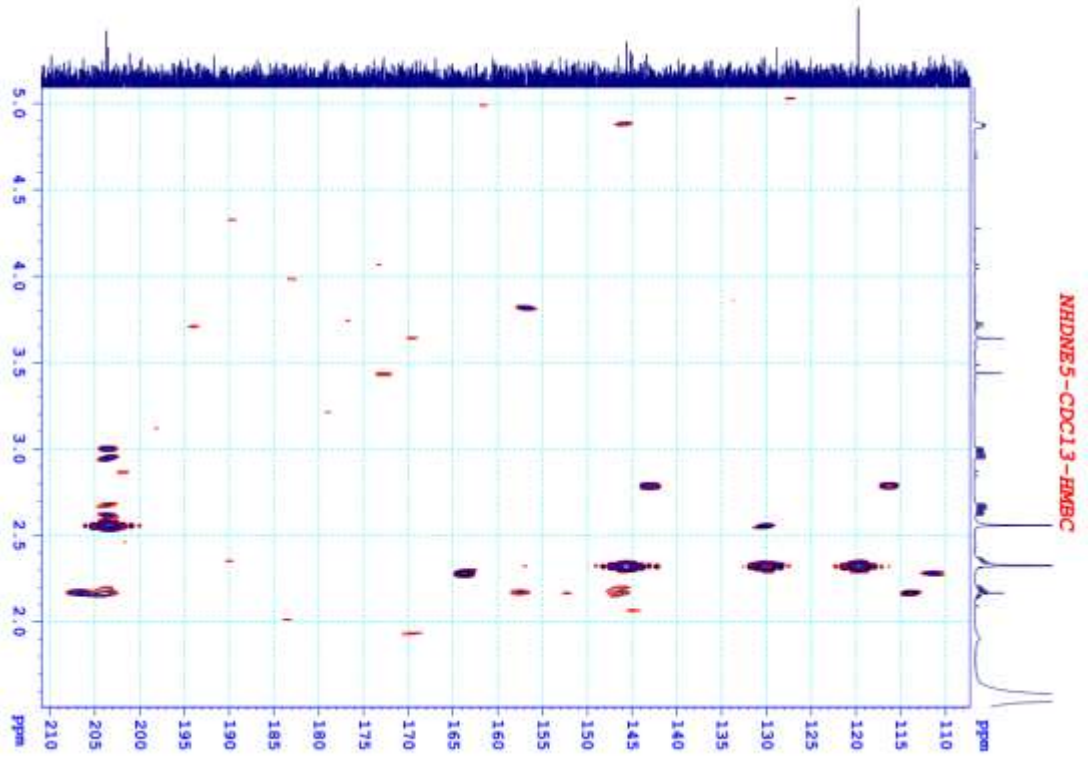


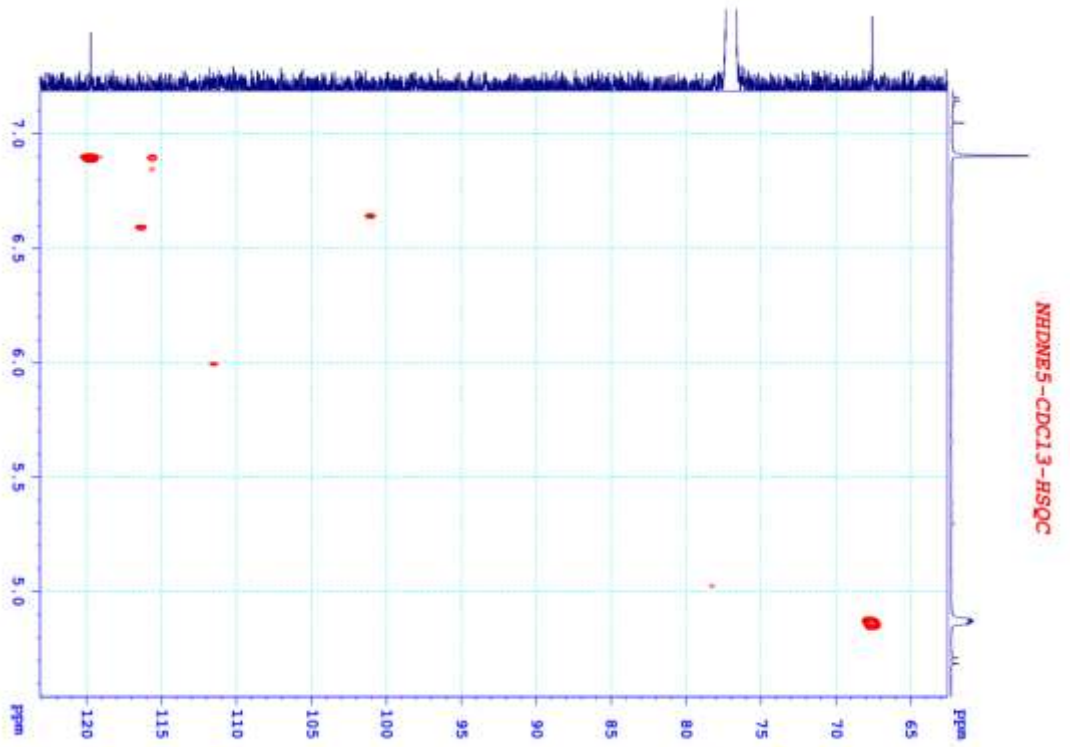
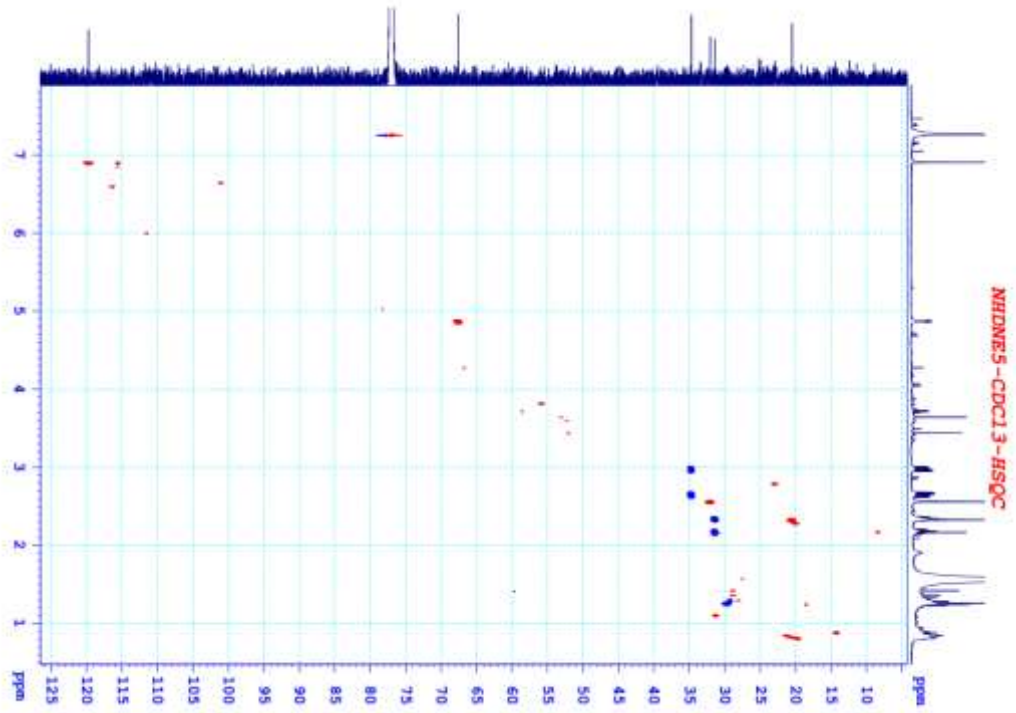


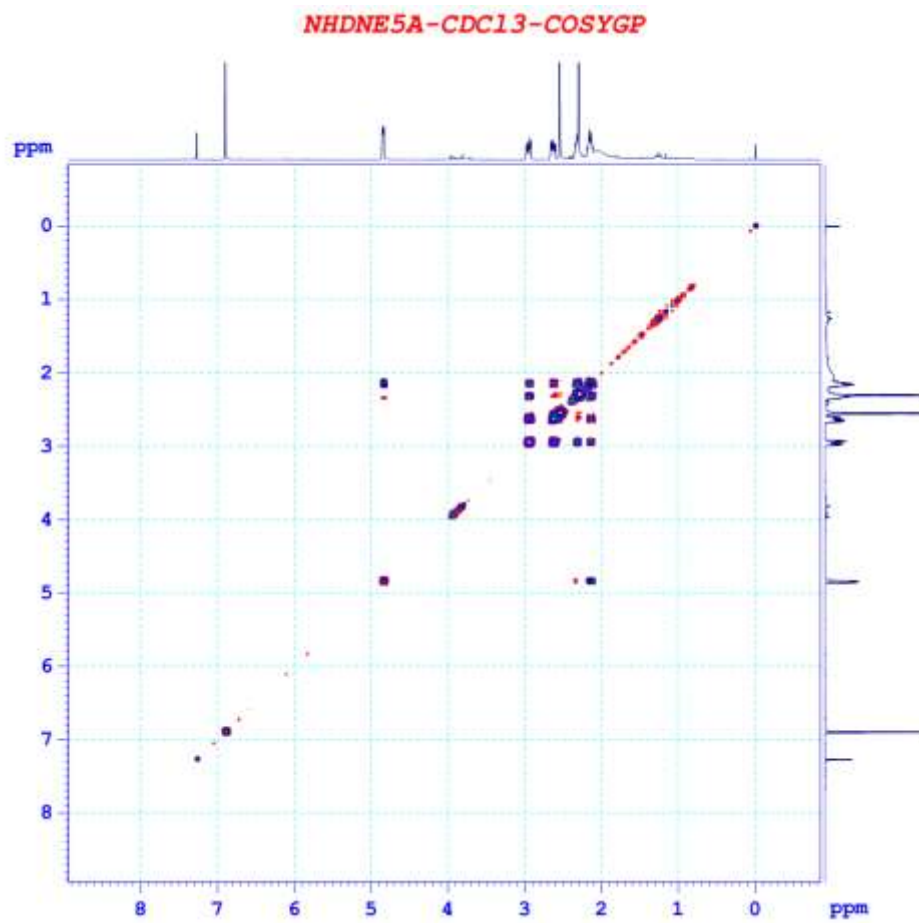
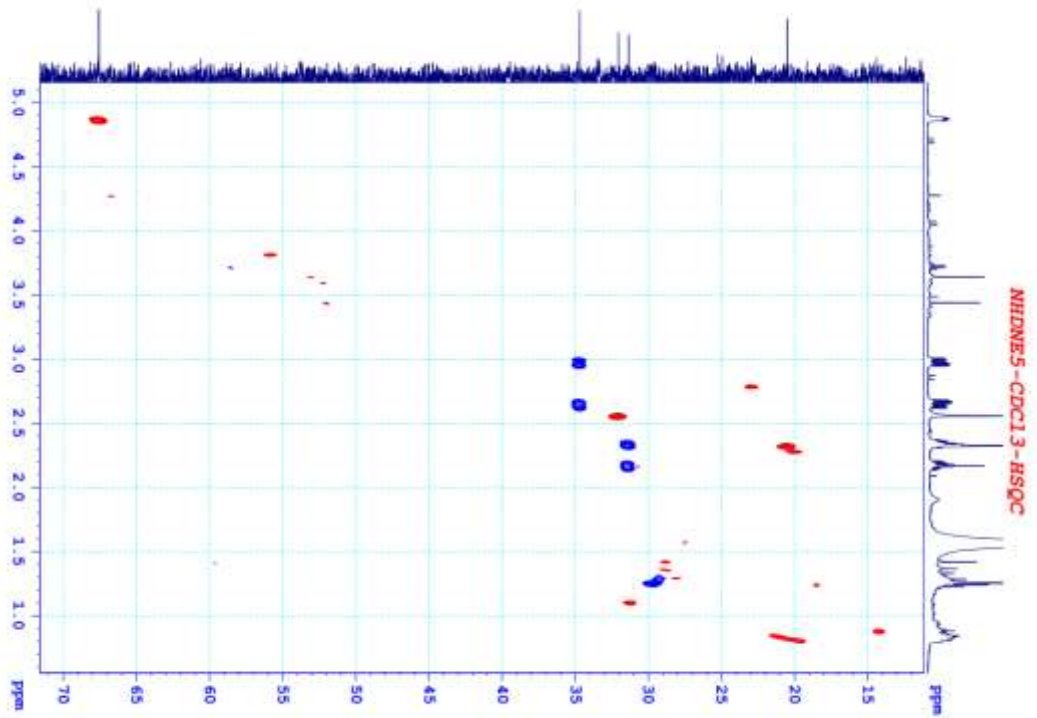




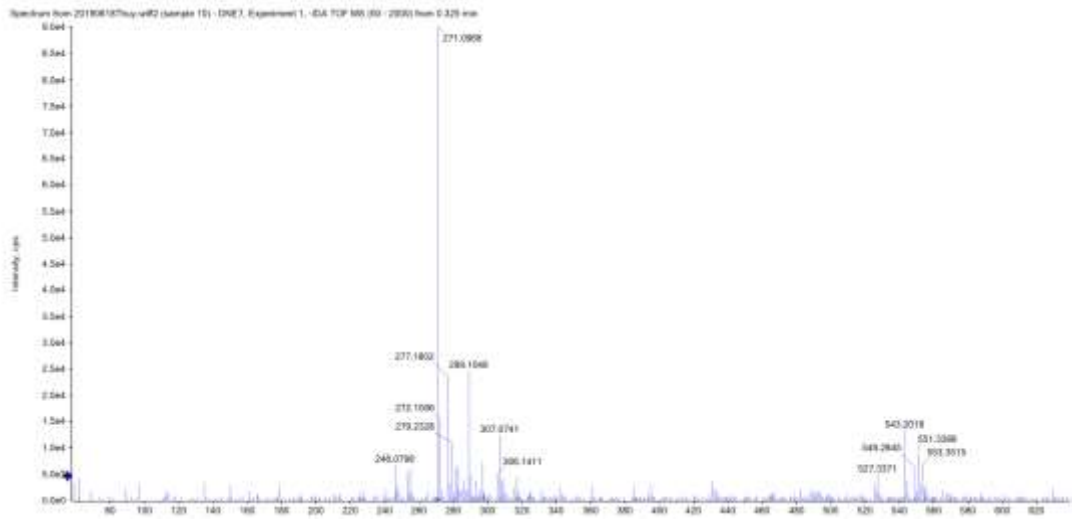
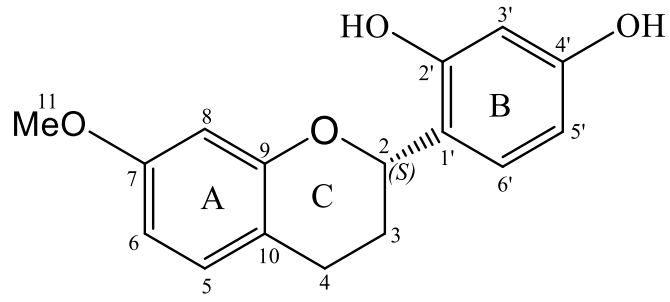




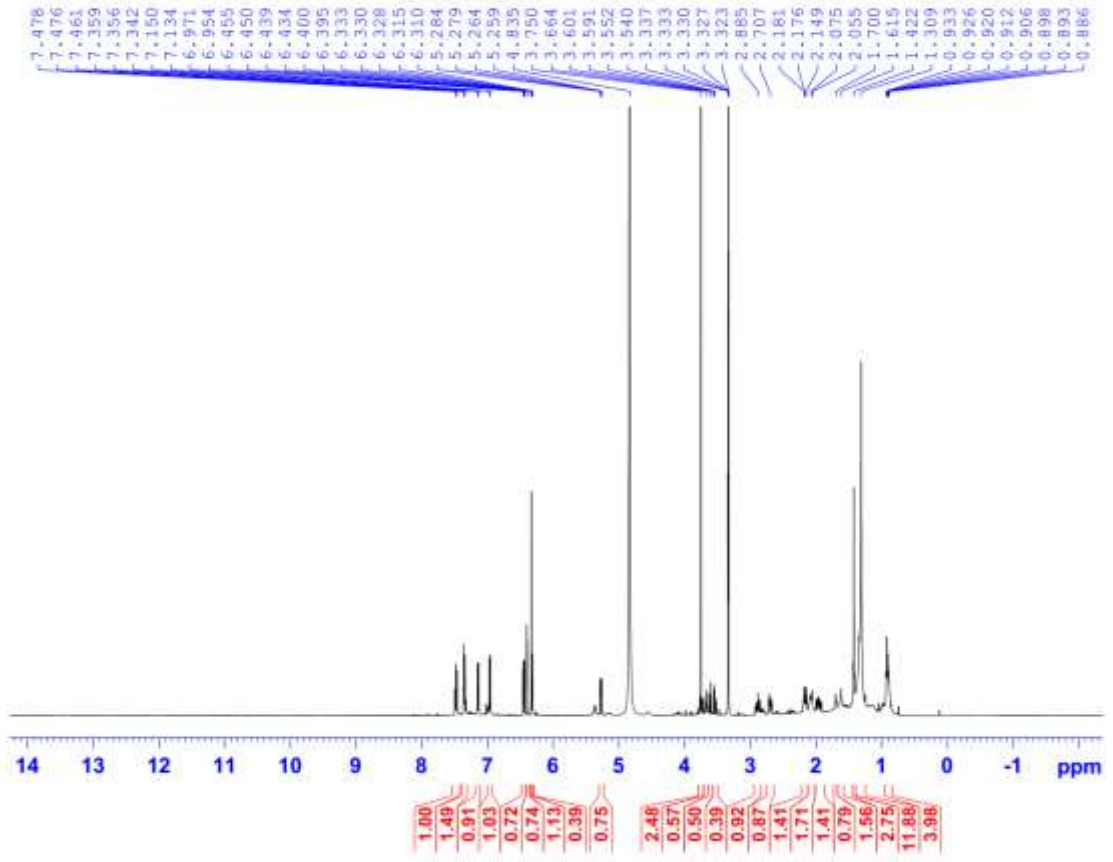




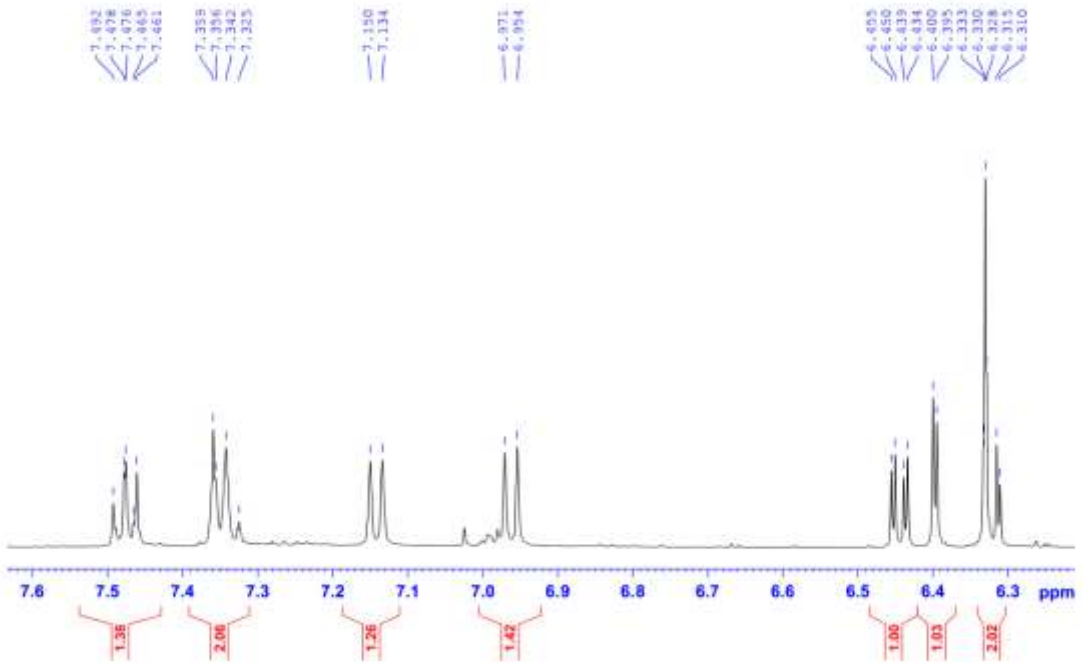
2. Phổ của hợp chất DN2

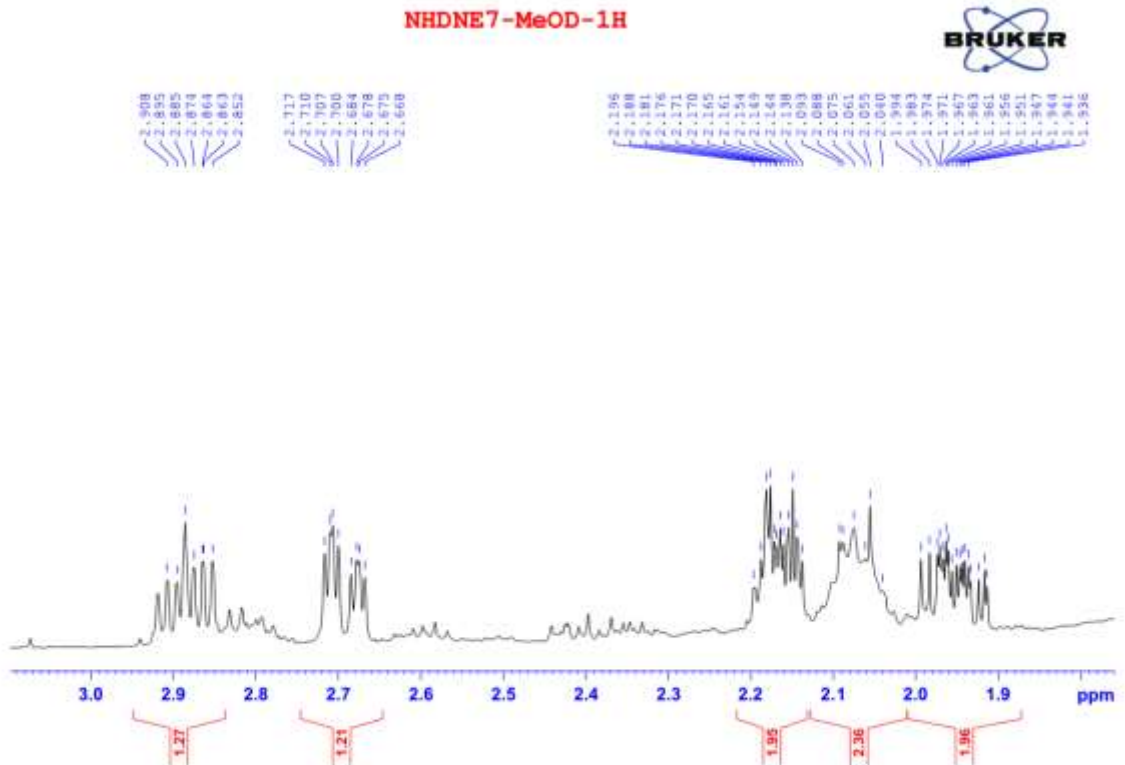
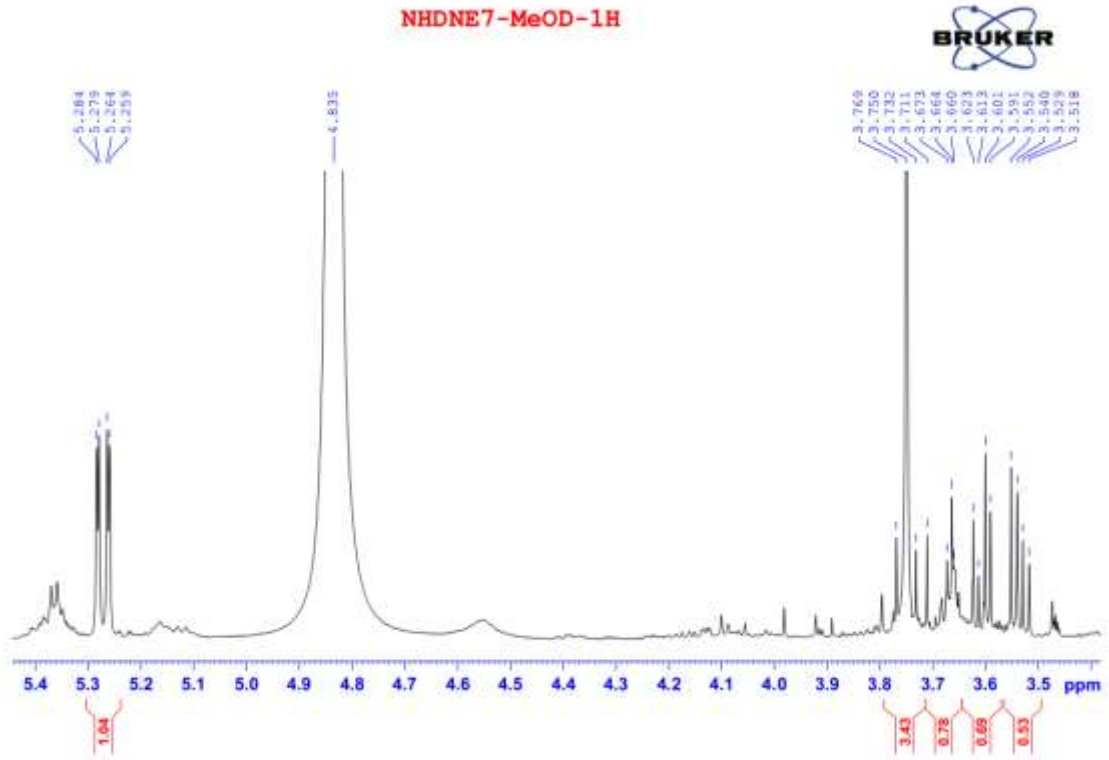


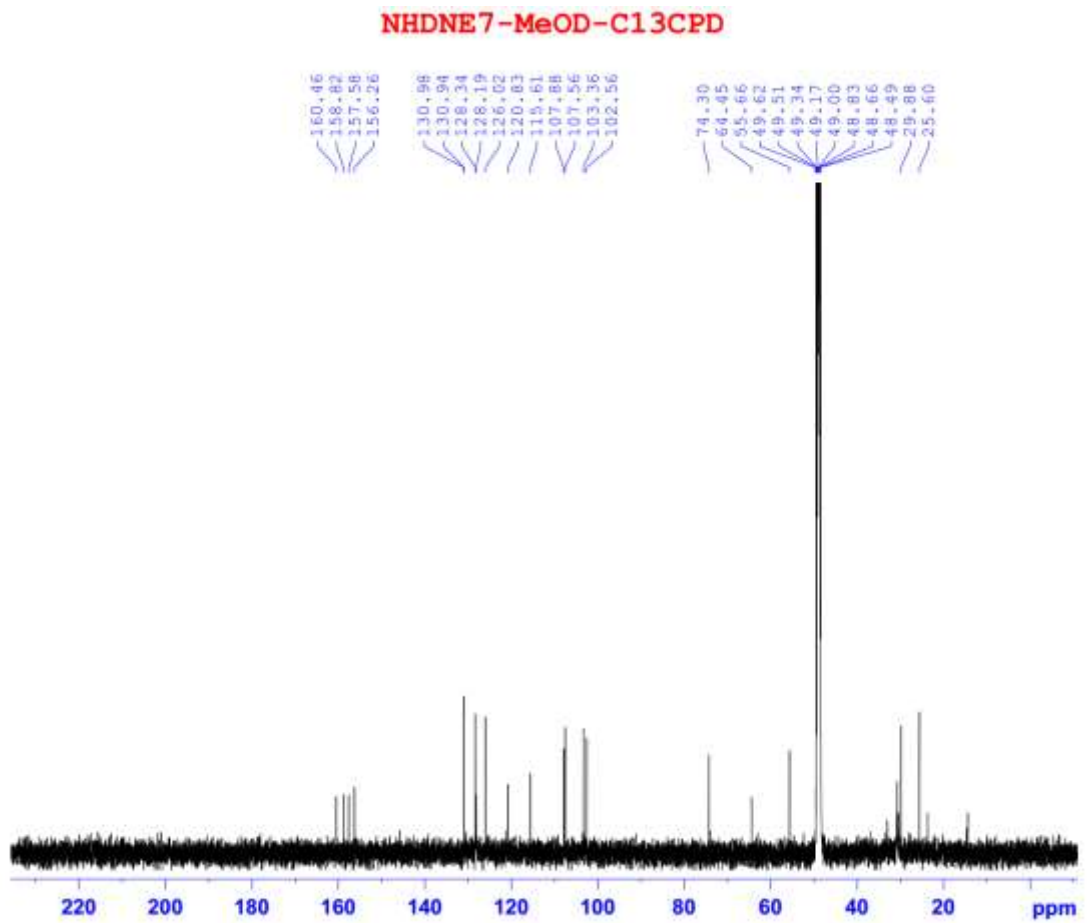
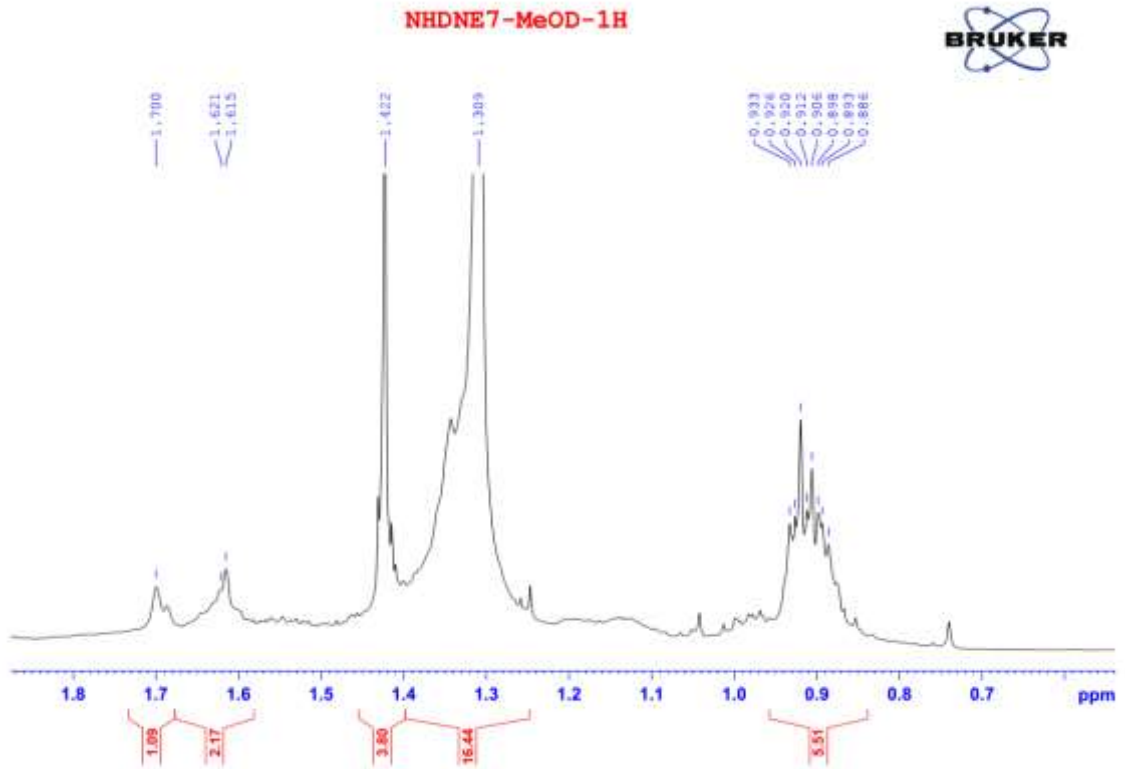
NHDNE7-MeOD-1H



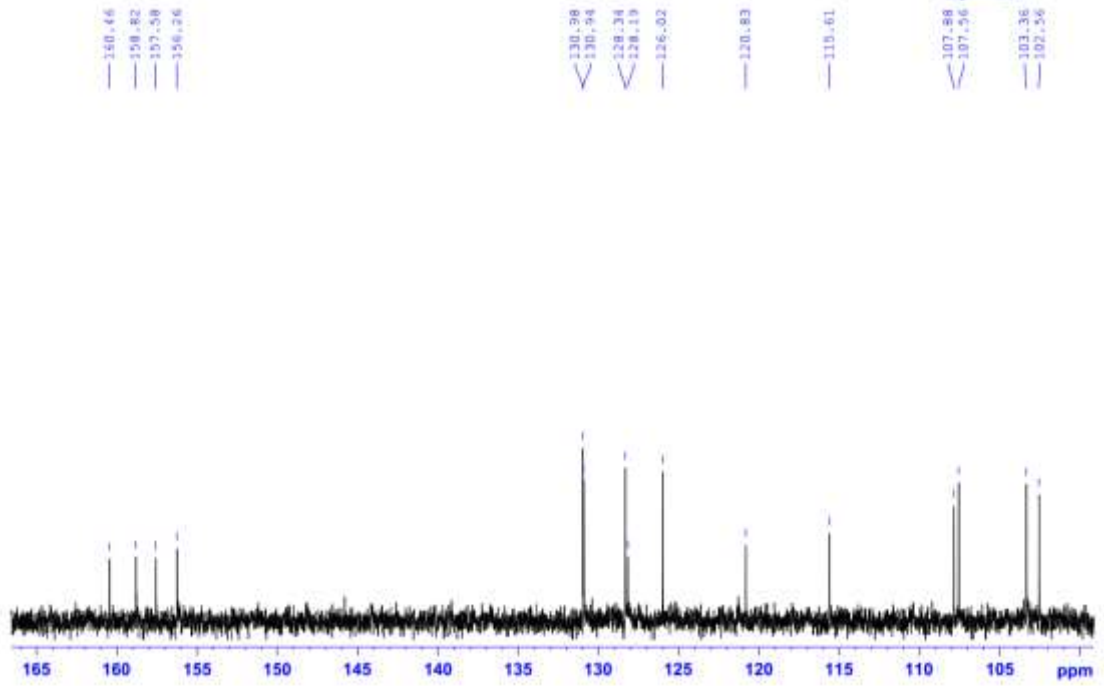
NHDNE7-MeOD-1H



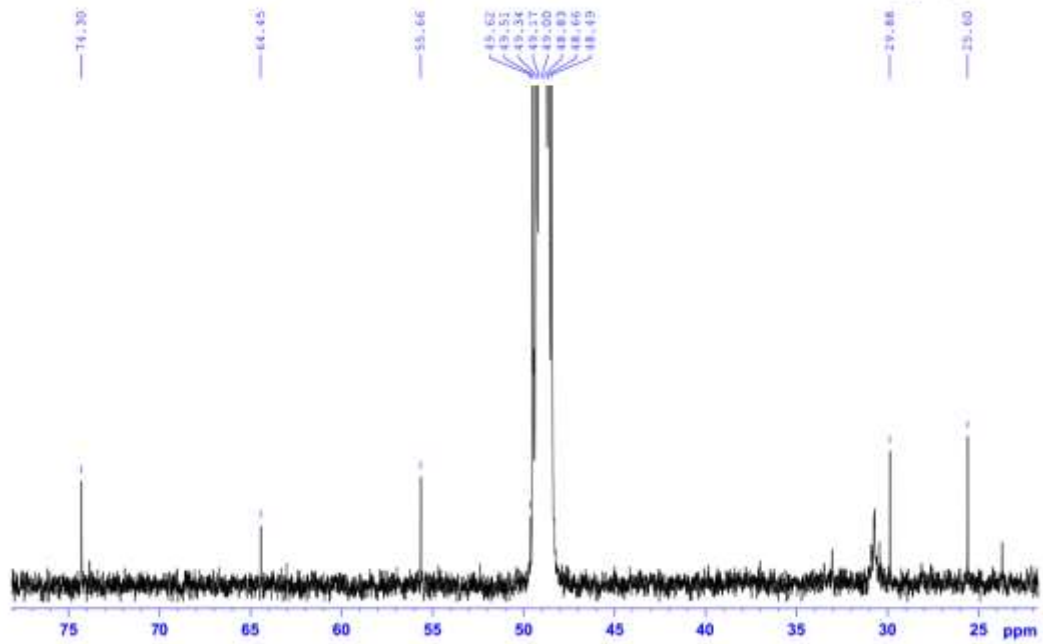


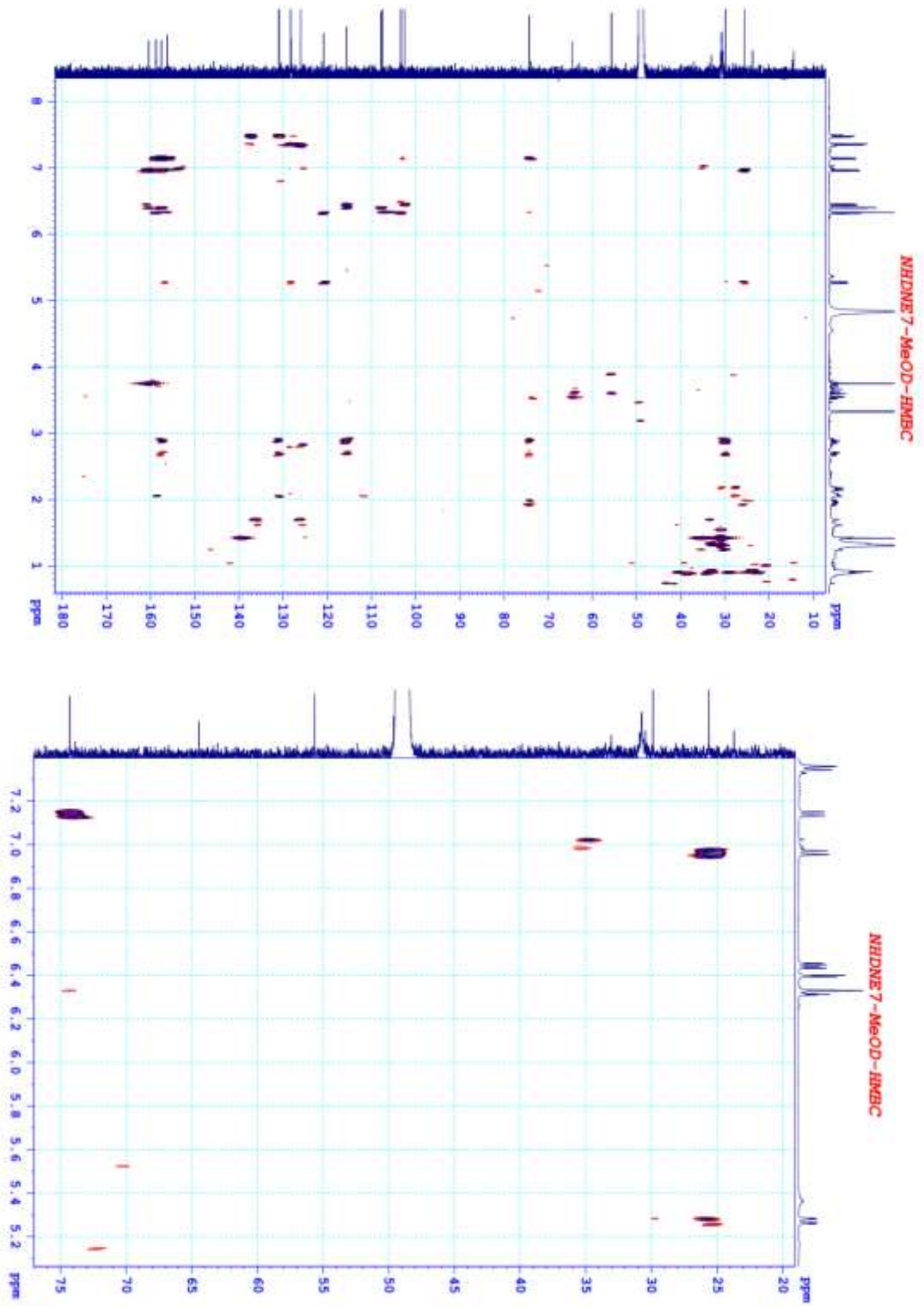


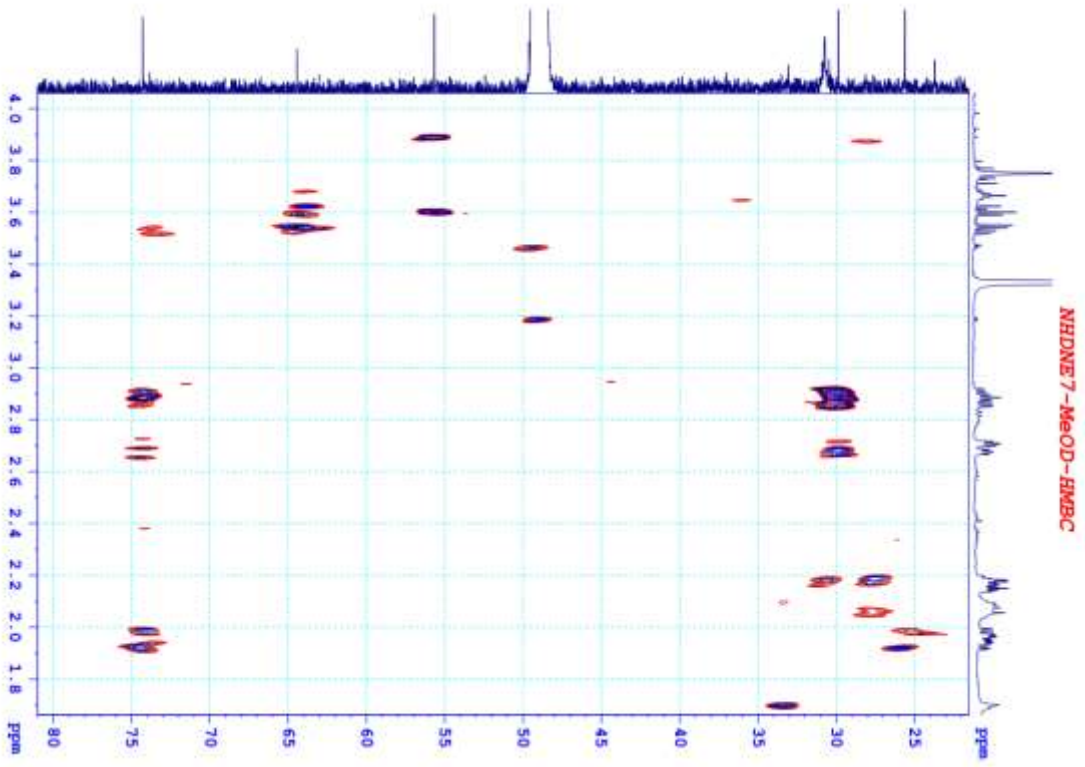
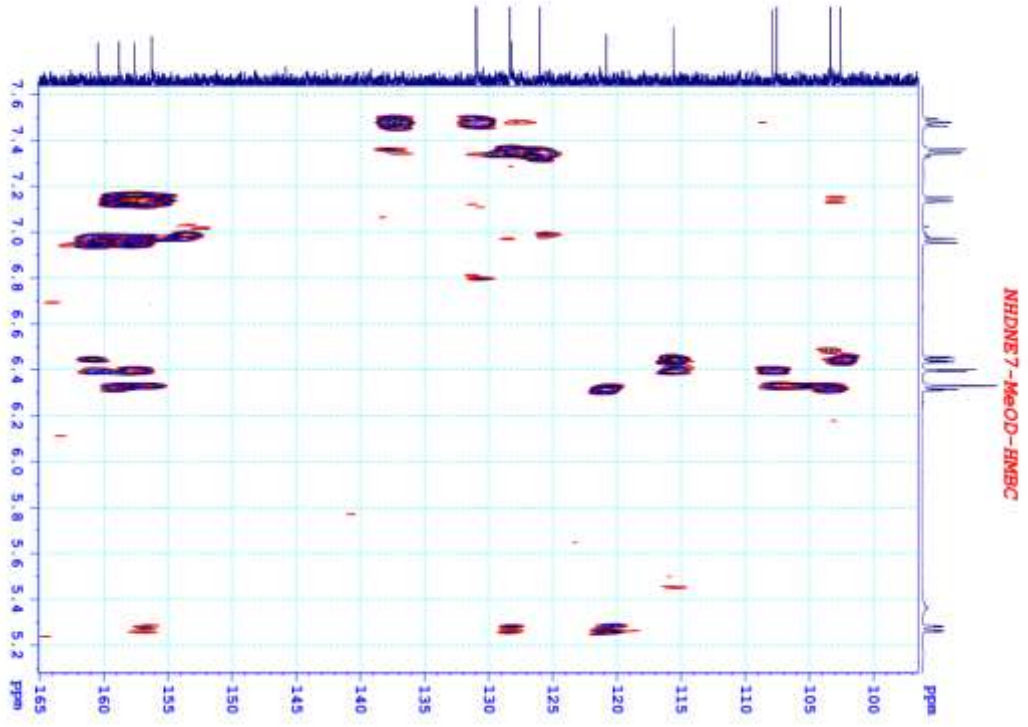
NHDNE7-MeOD-C13CPD

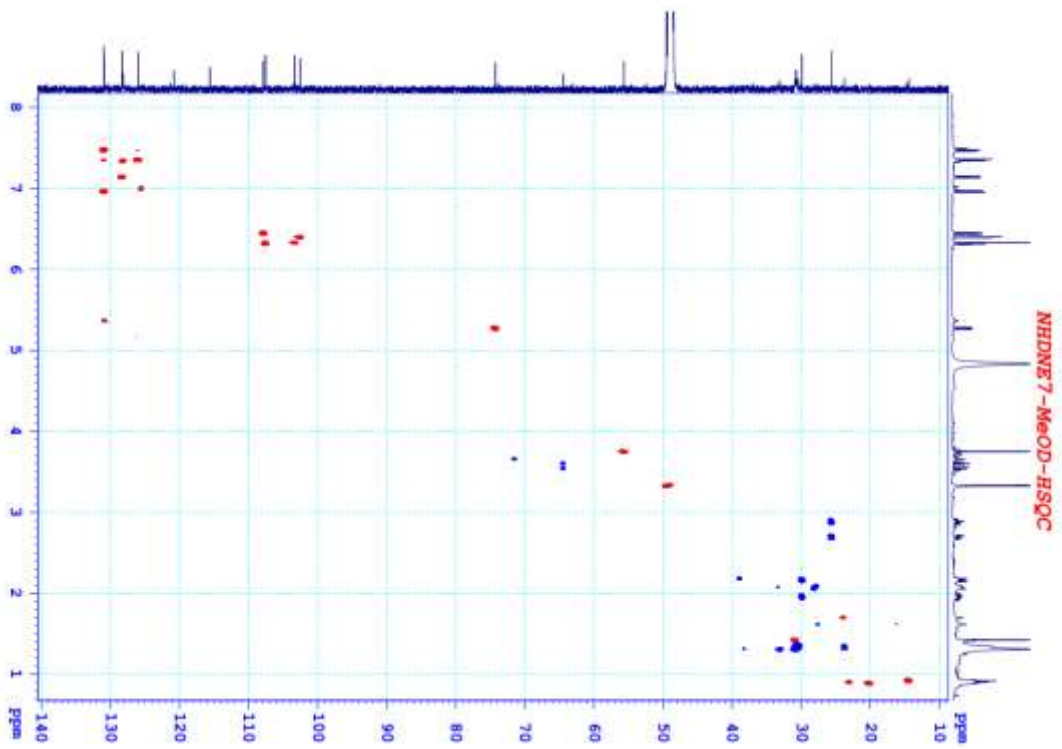
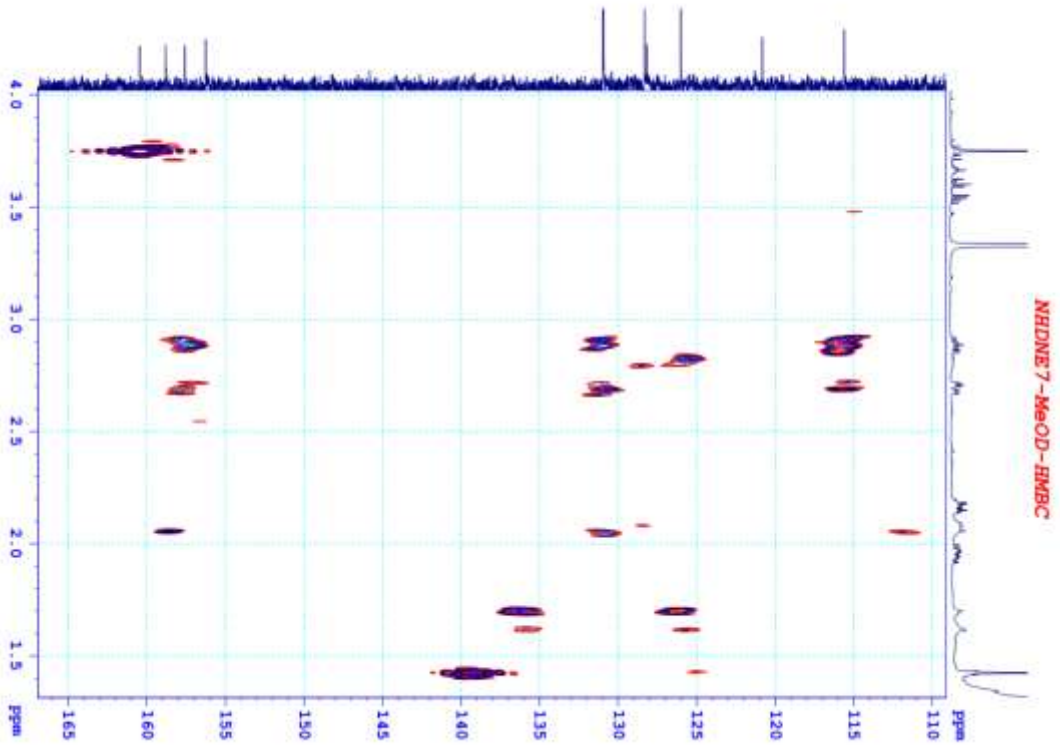


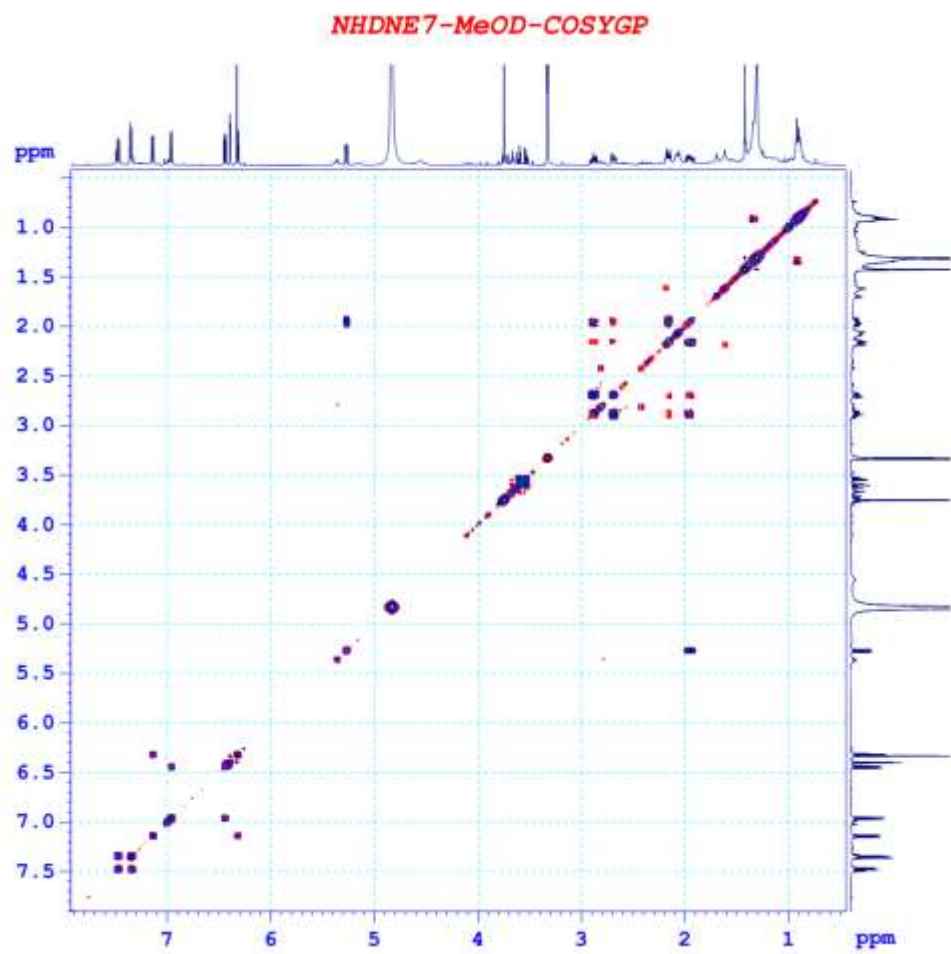
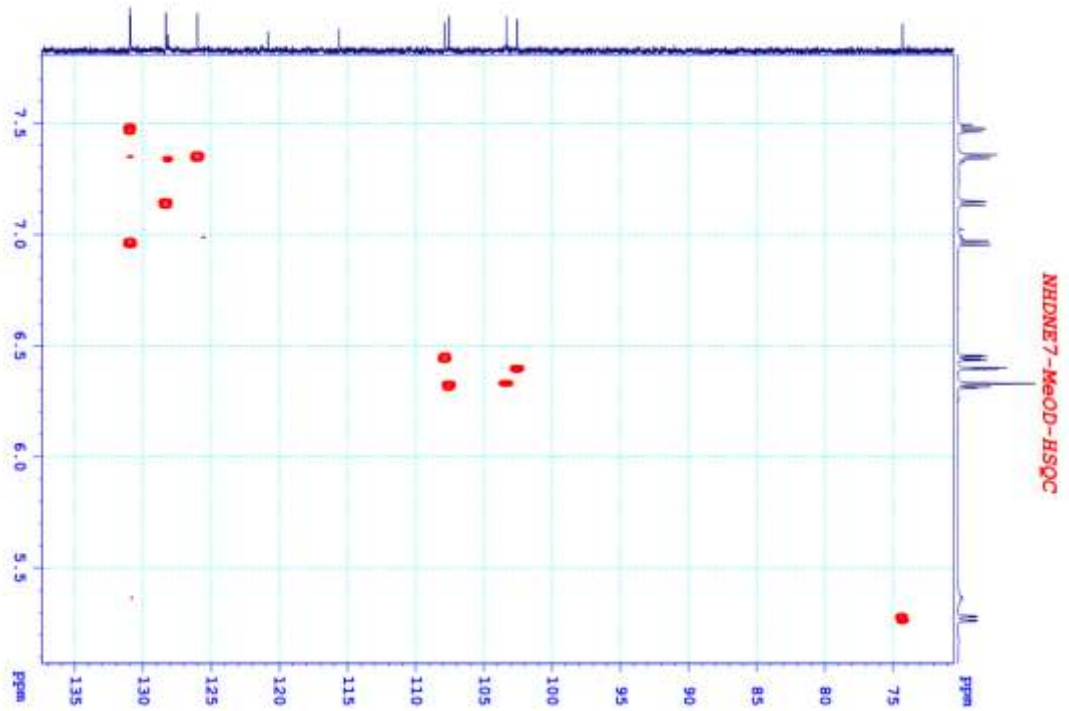
NHDNE7-MeOD-C13CPD

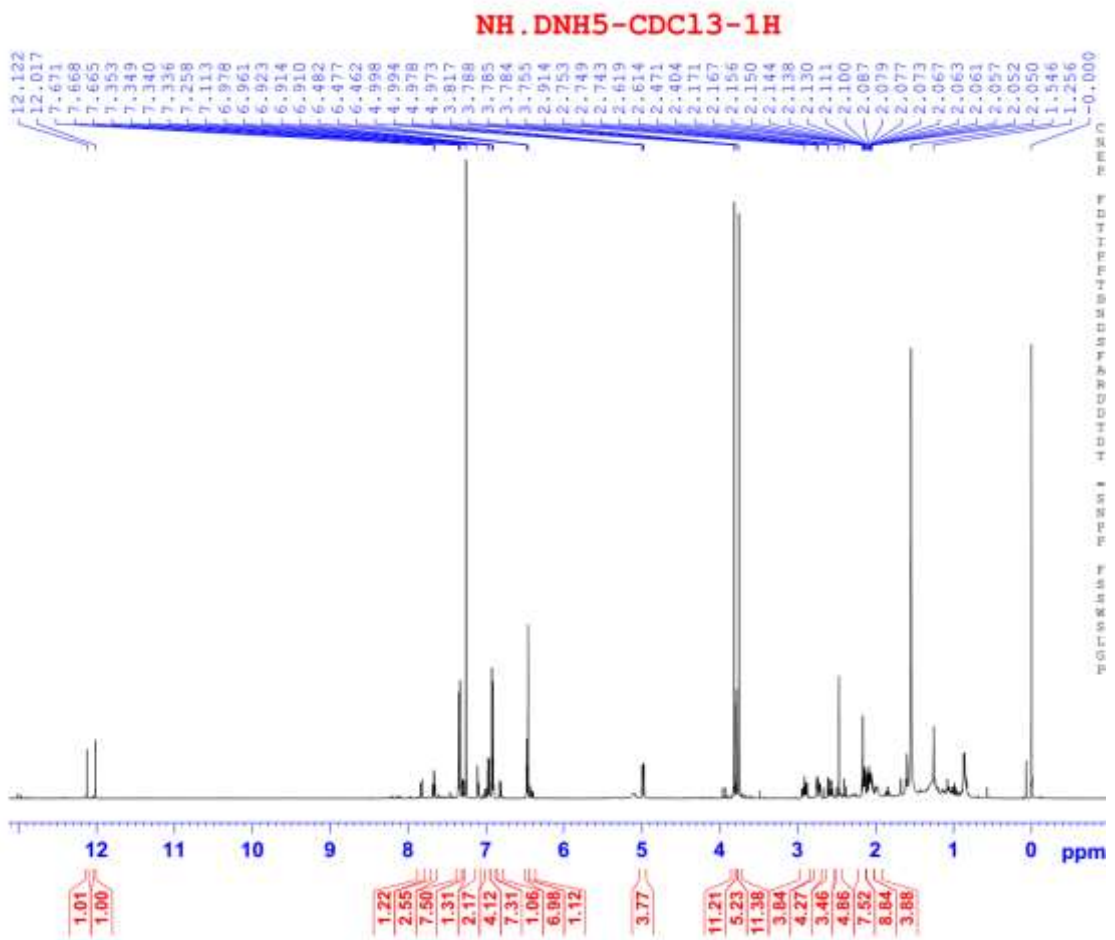
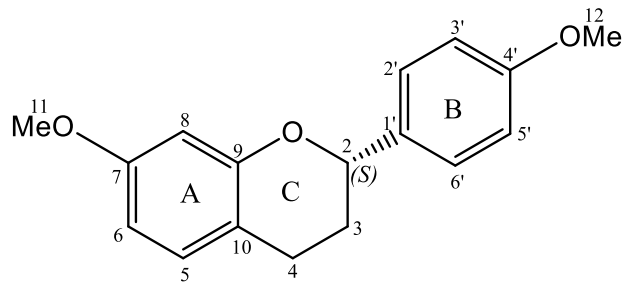






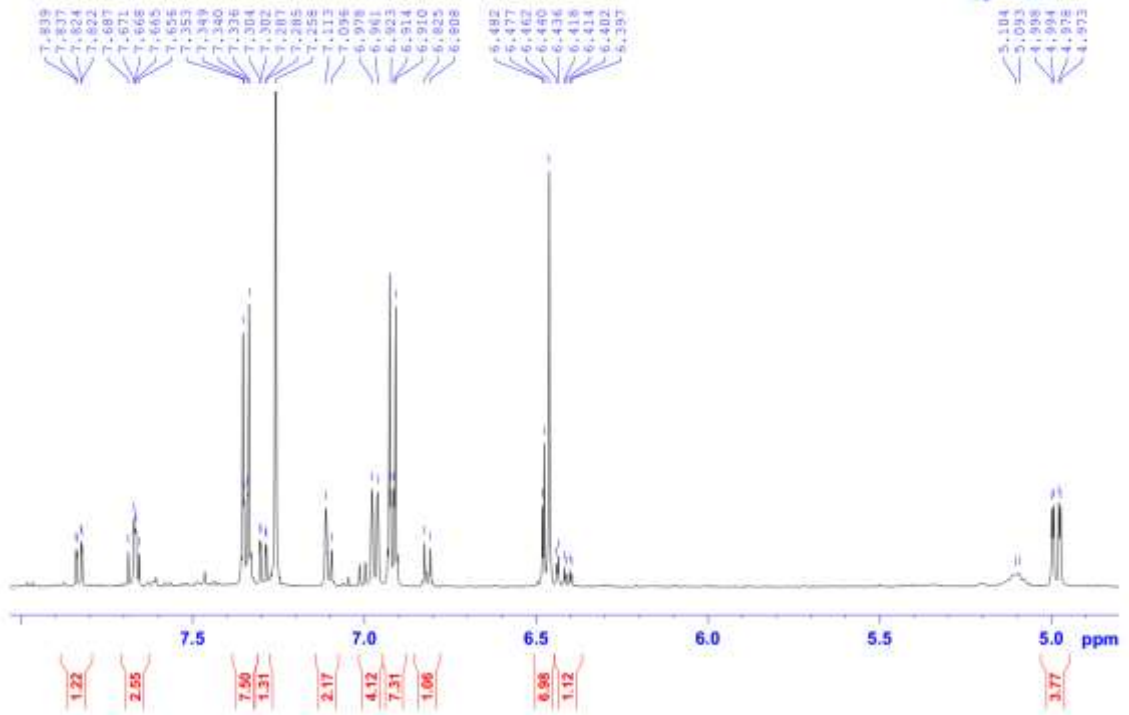




3. Phổ của hợp chất **DN3**

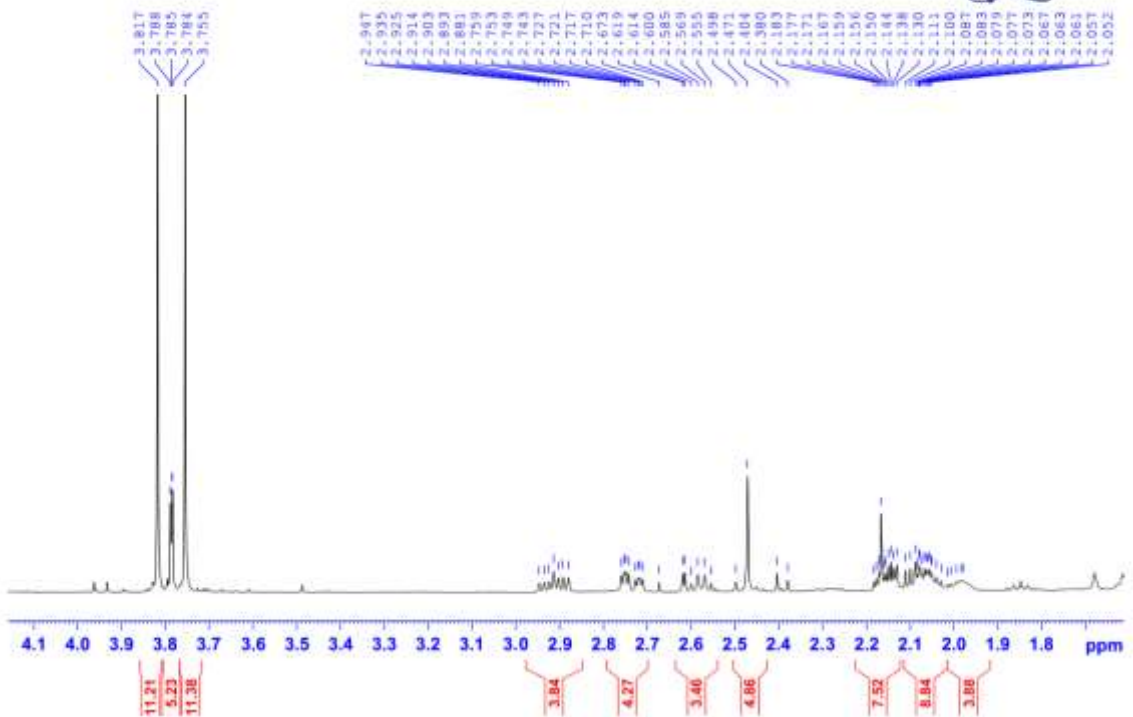
NH.DNH5-CDC13-1H

BRUKER

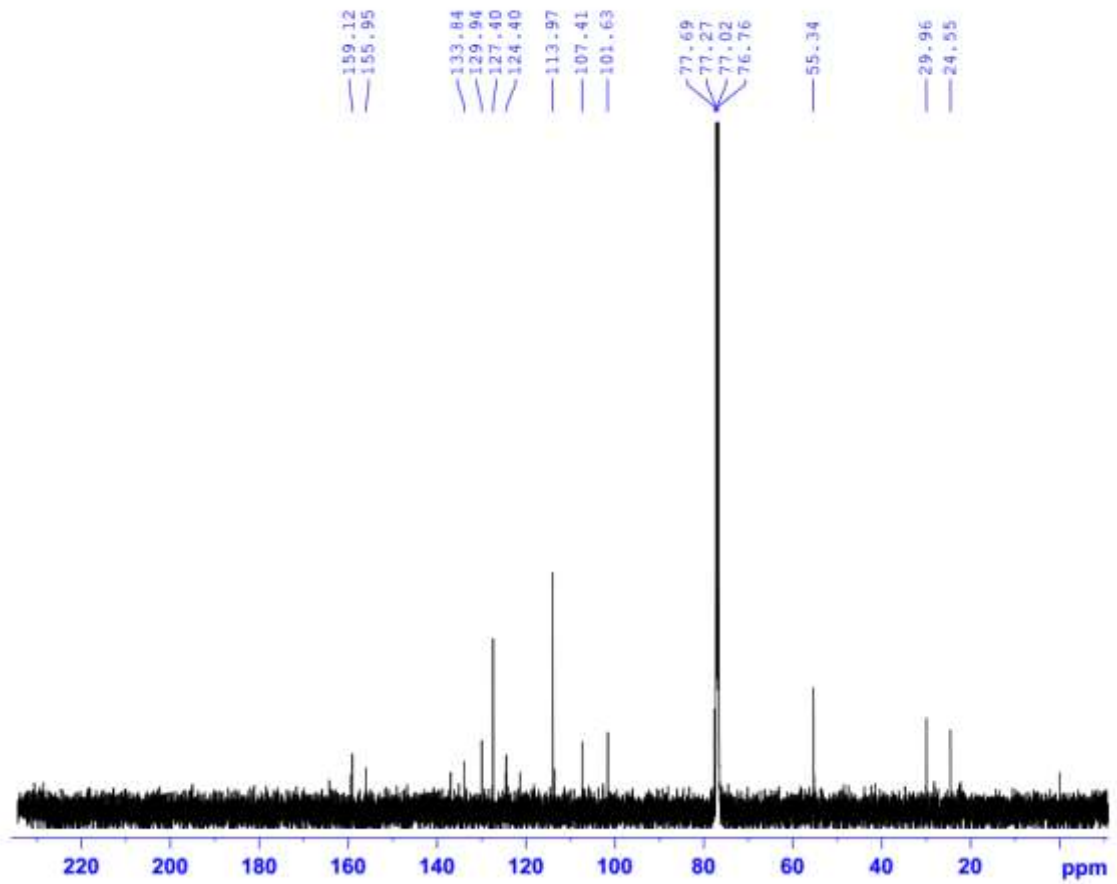


NH.DNH5-CDC13-1H

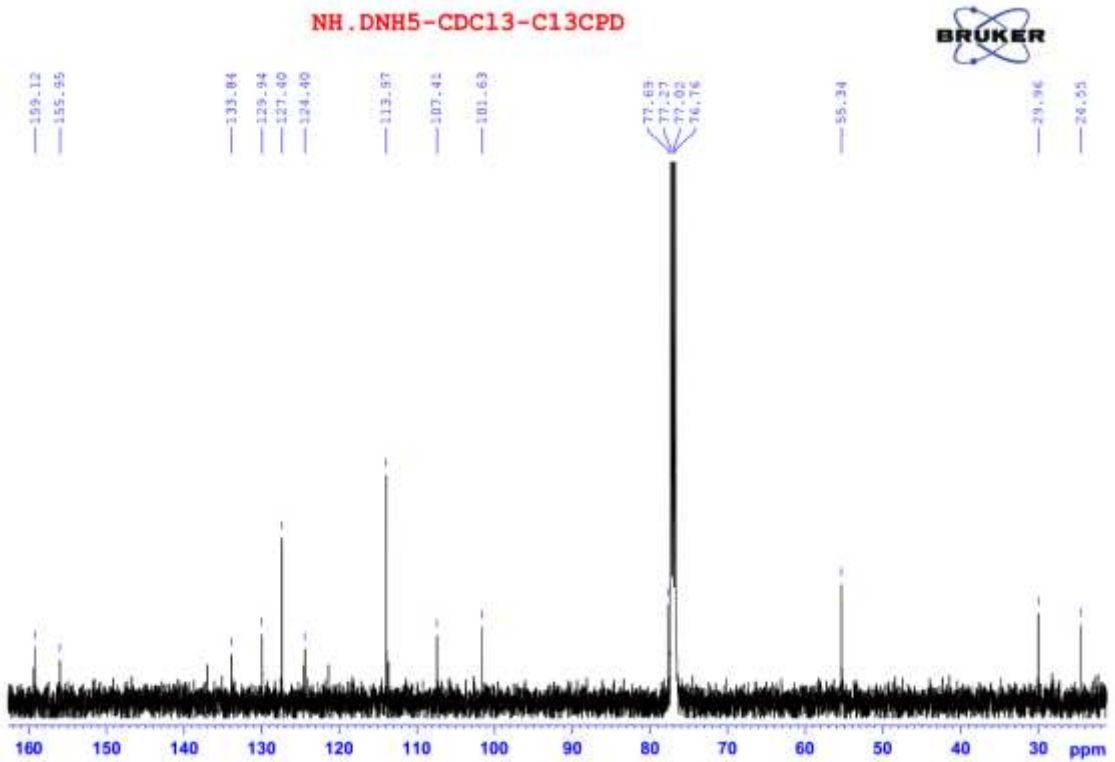
BRUKER

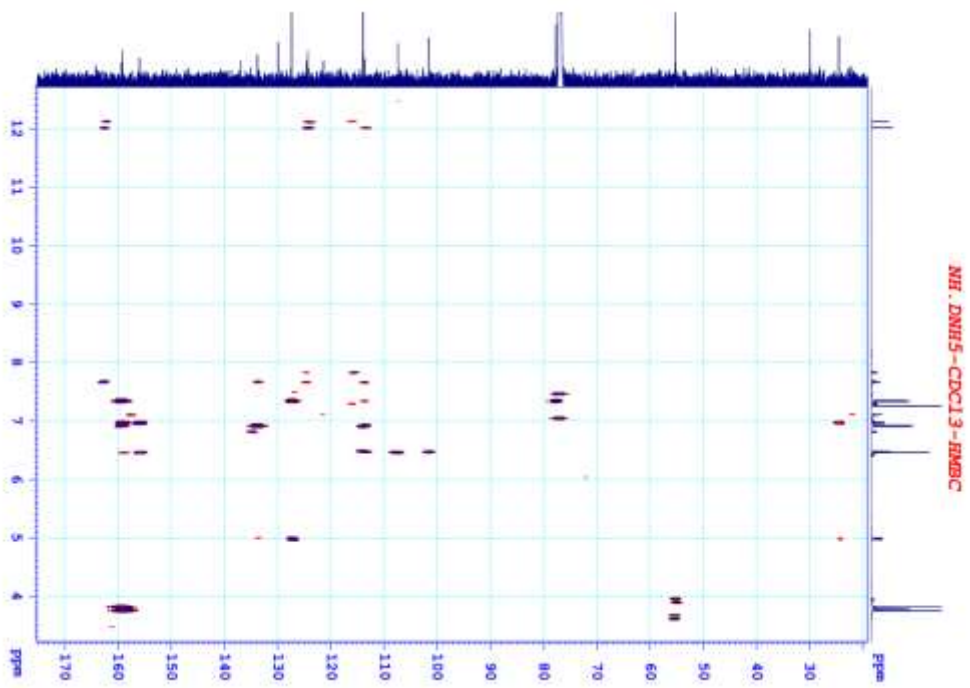
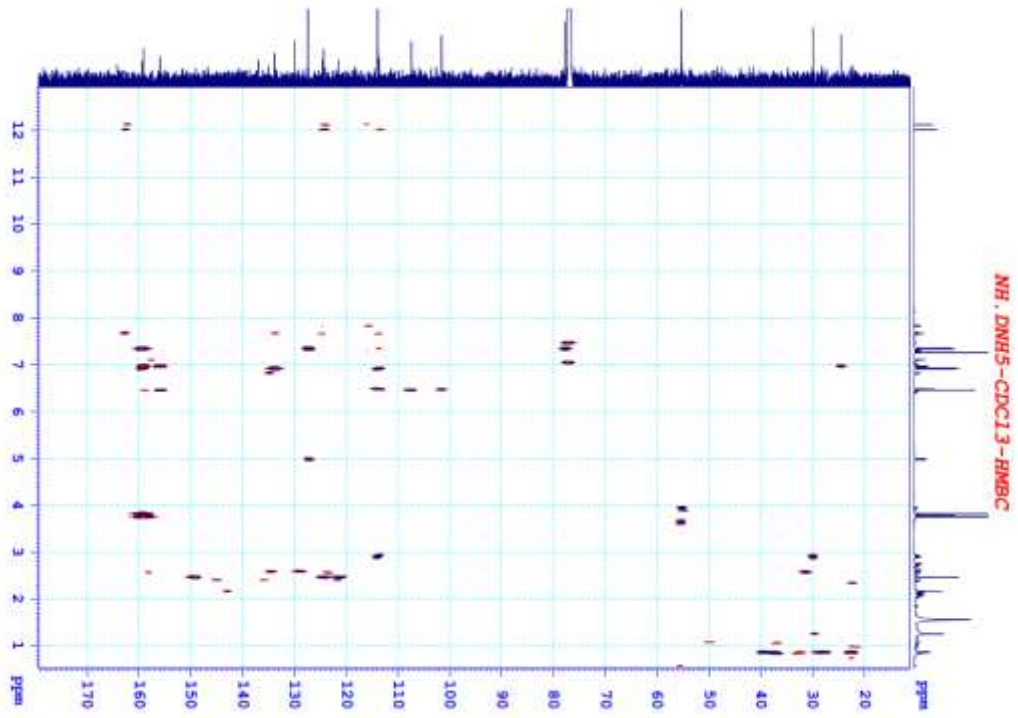


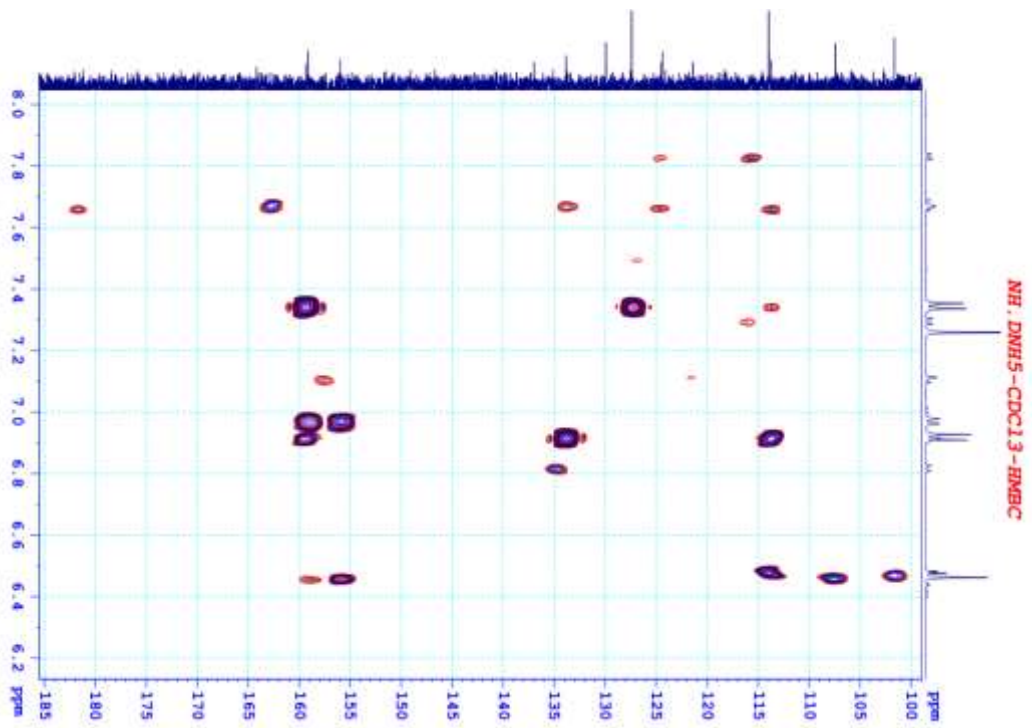
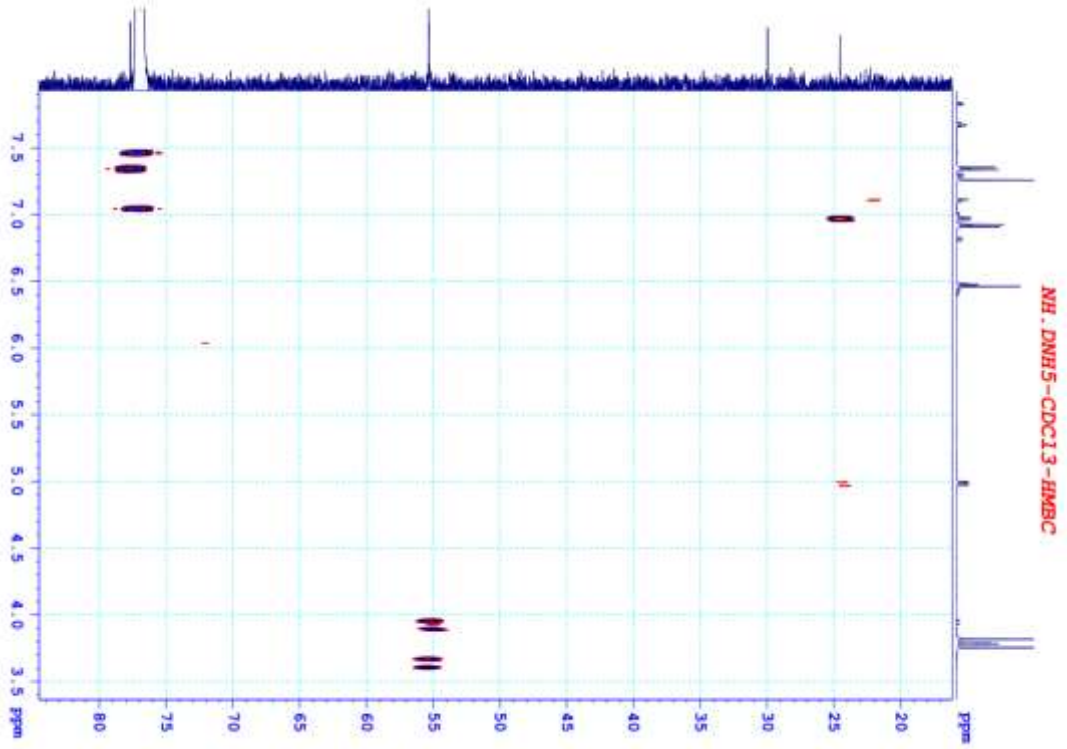
NH.DNH5-CDC13-C13CPD

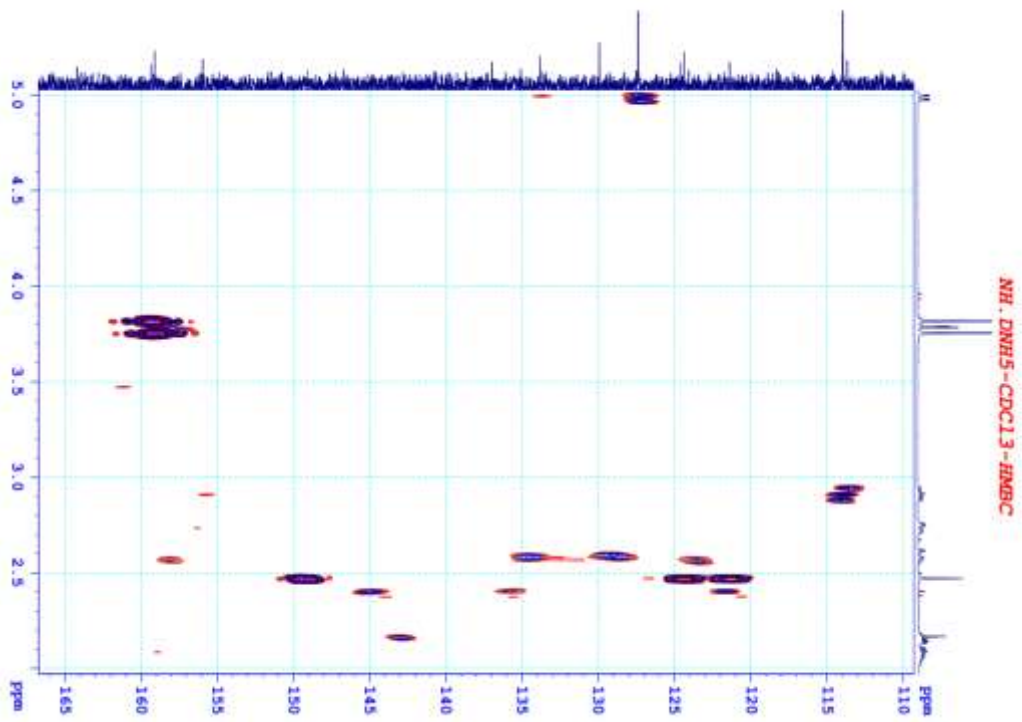
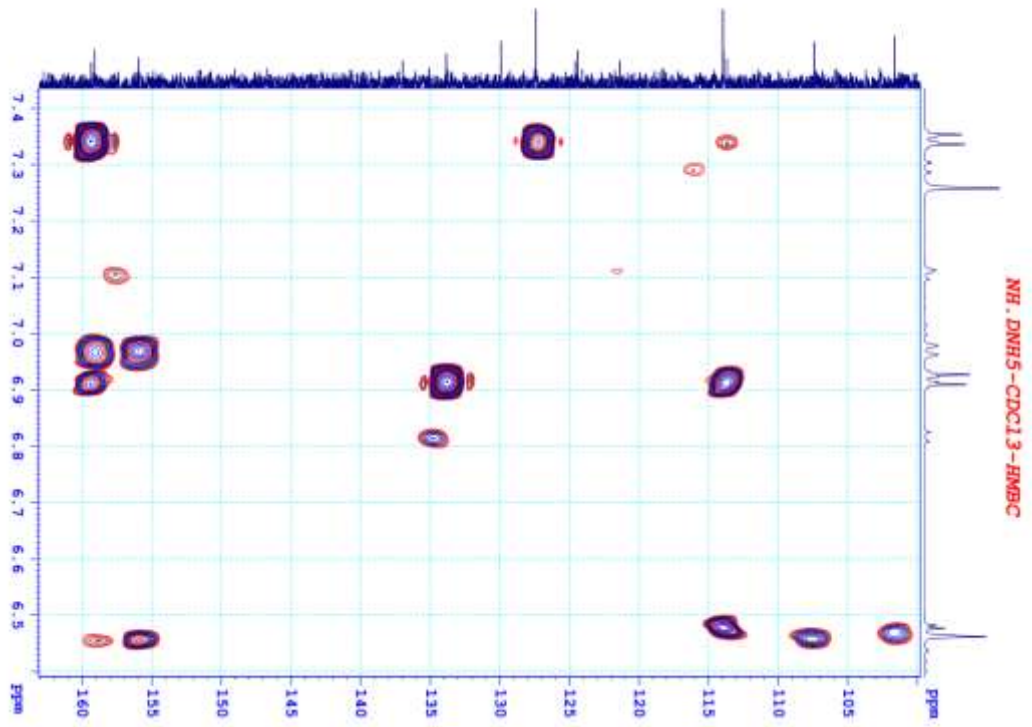


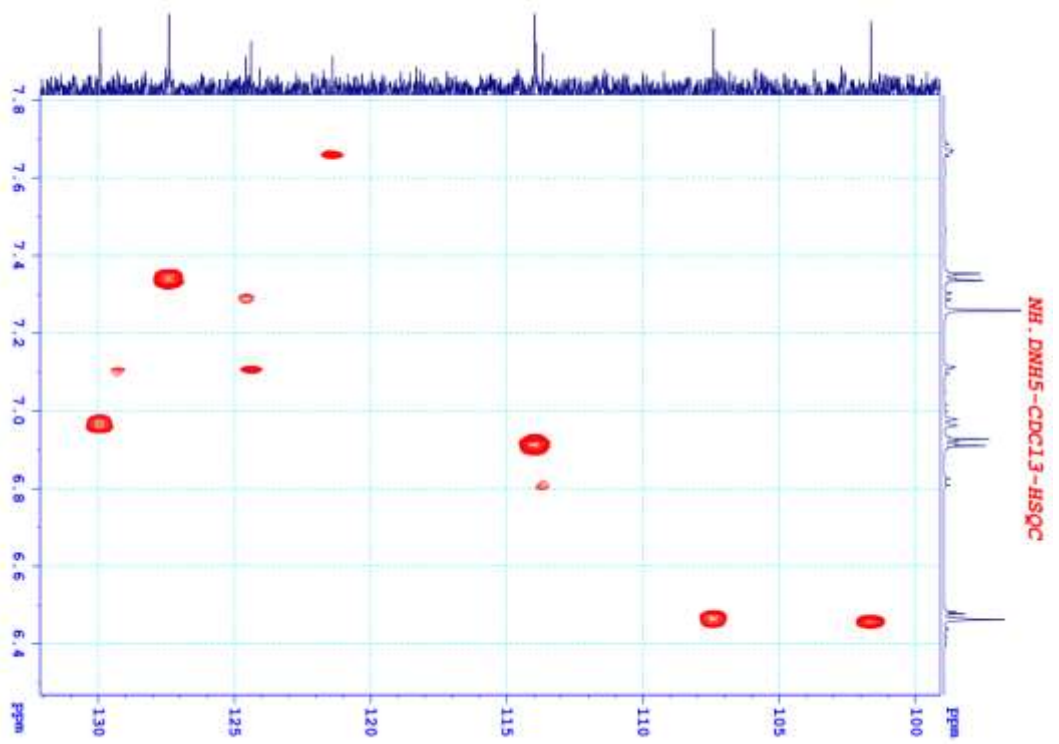
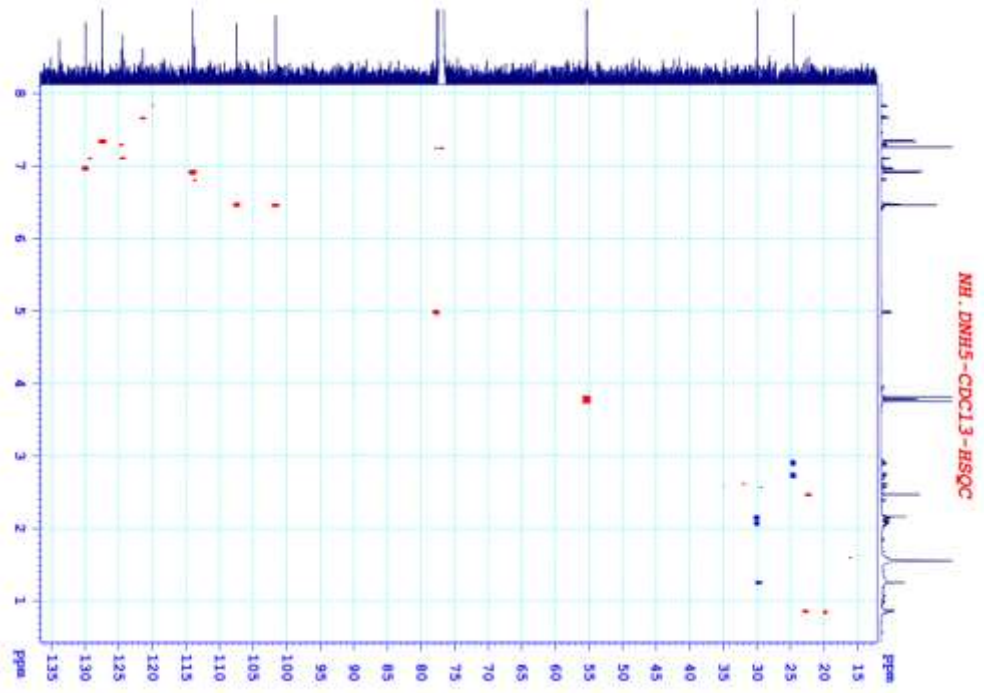
NH.DNH5-CDC13-C13CPD

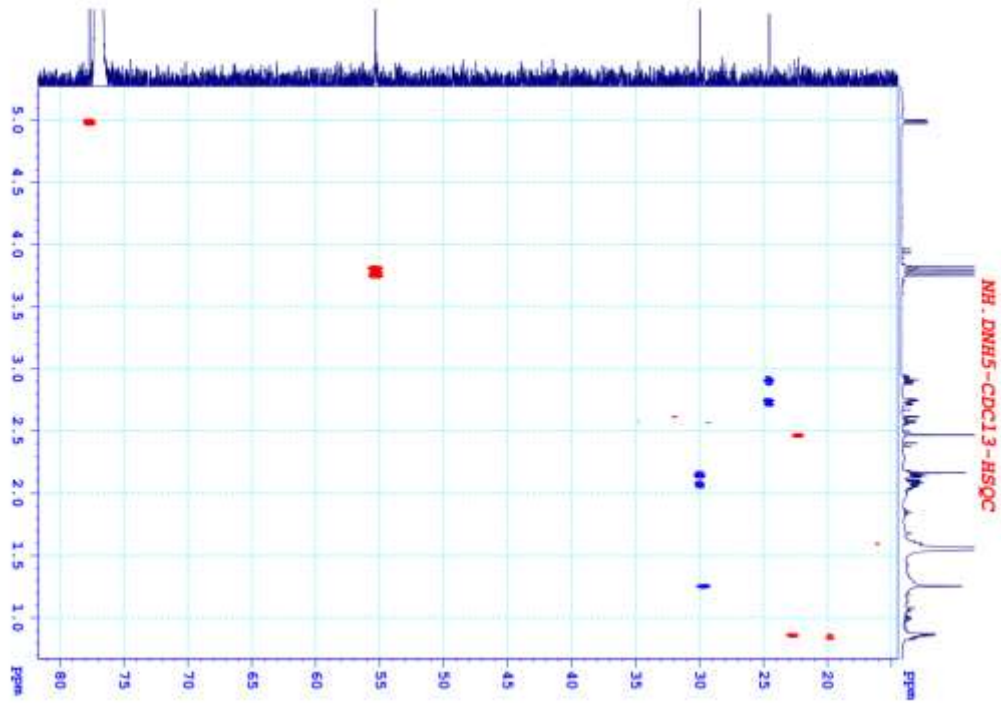
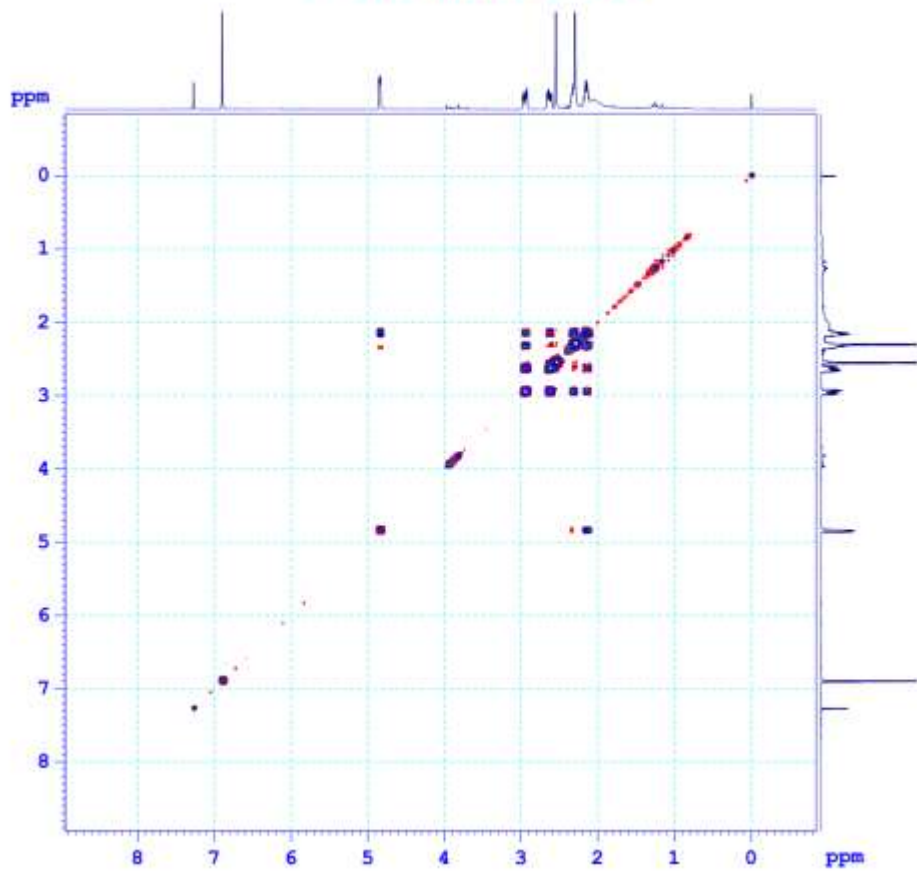


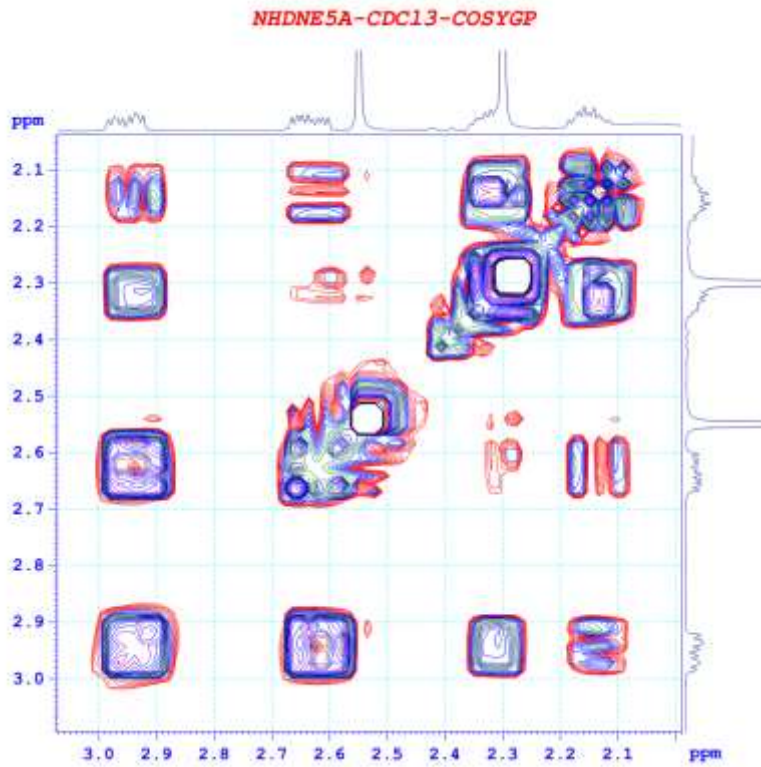




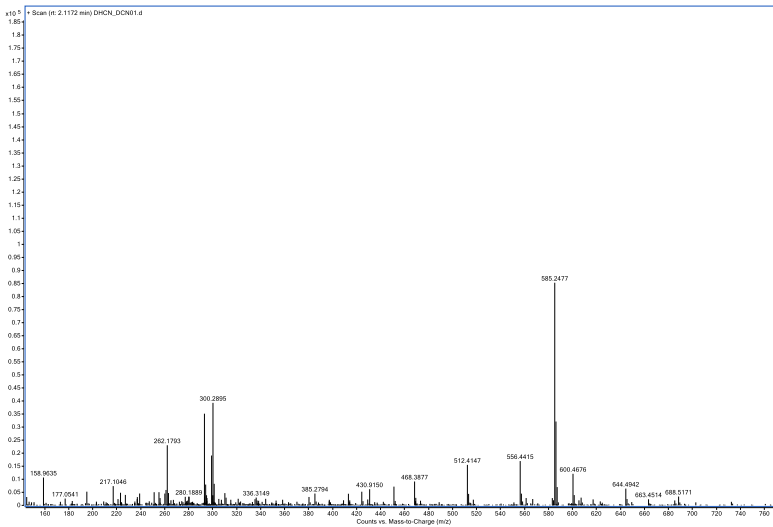
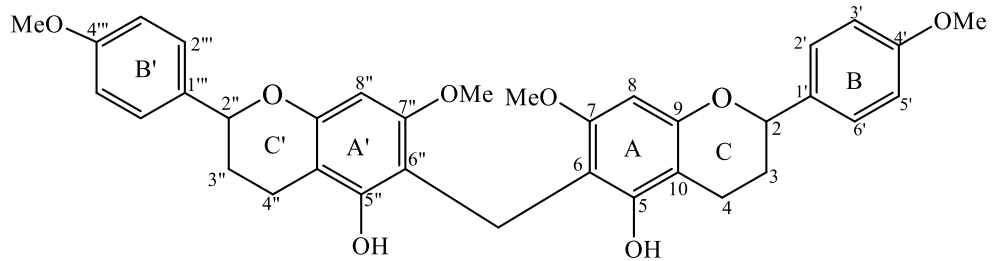




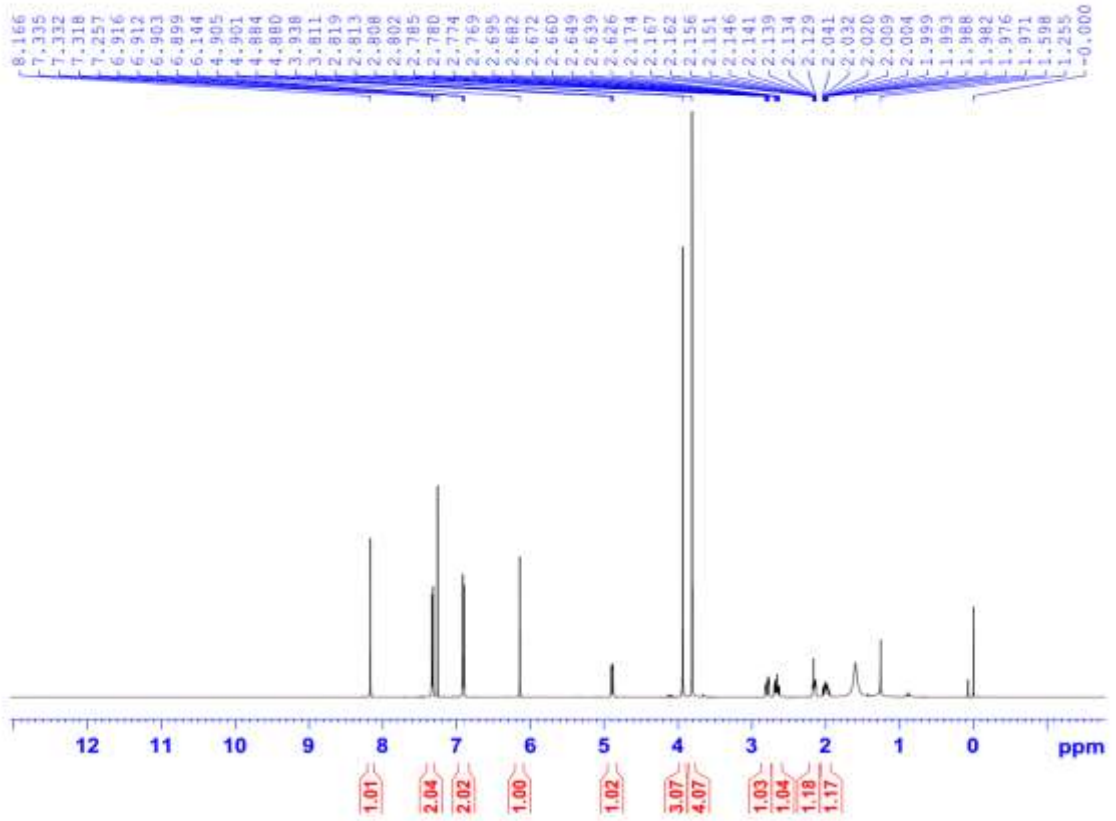
**NHDNE5A-CDC13-COSYGP**



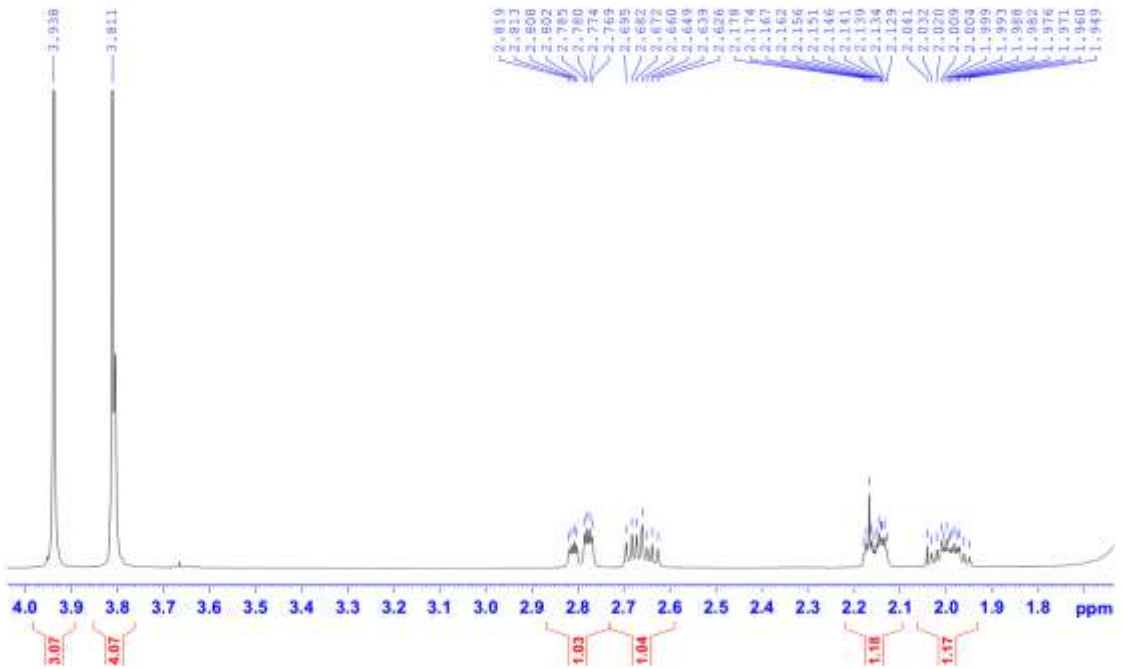
4. Phổ của hợp chất DN4



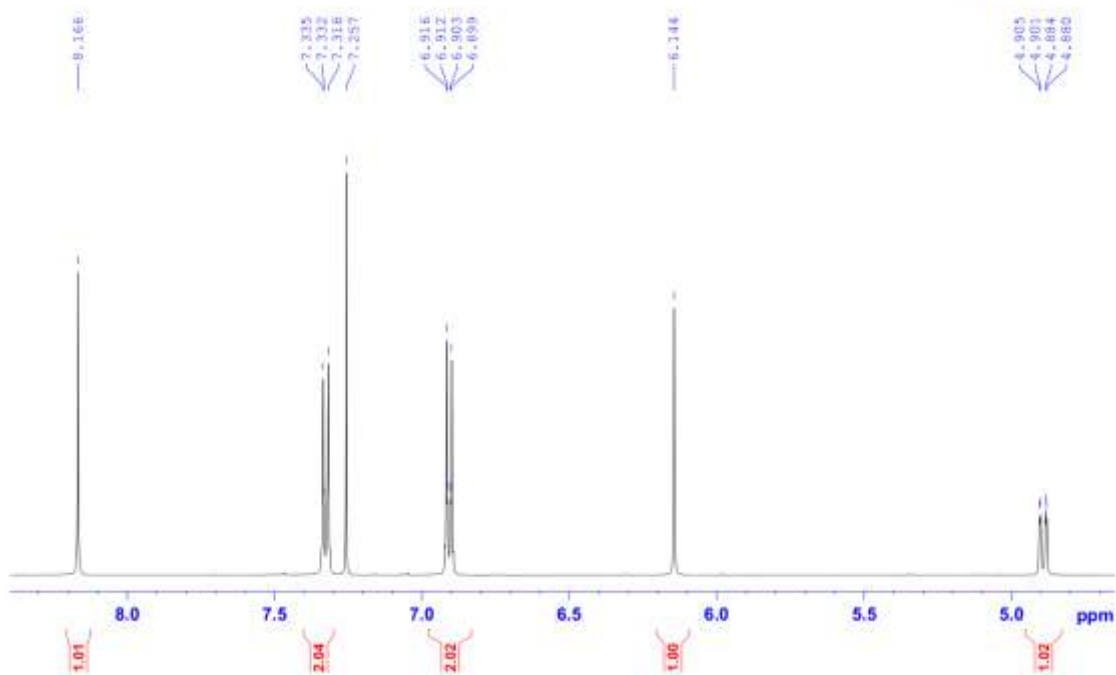
DNC01-CDC13-1H



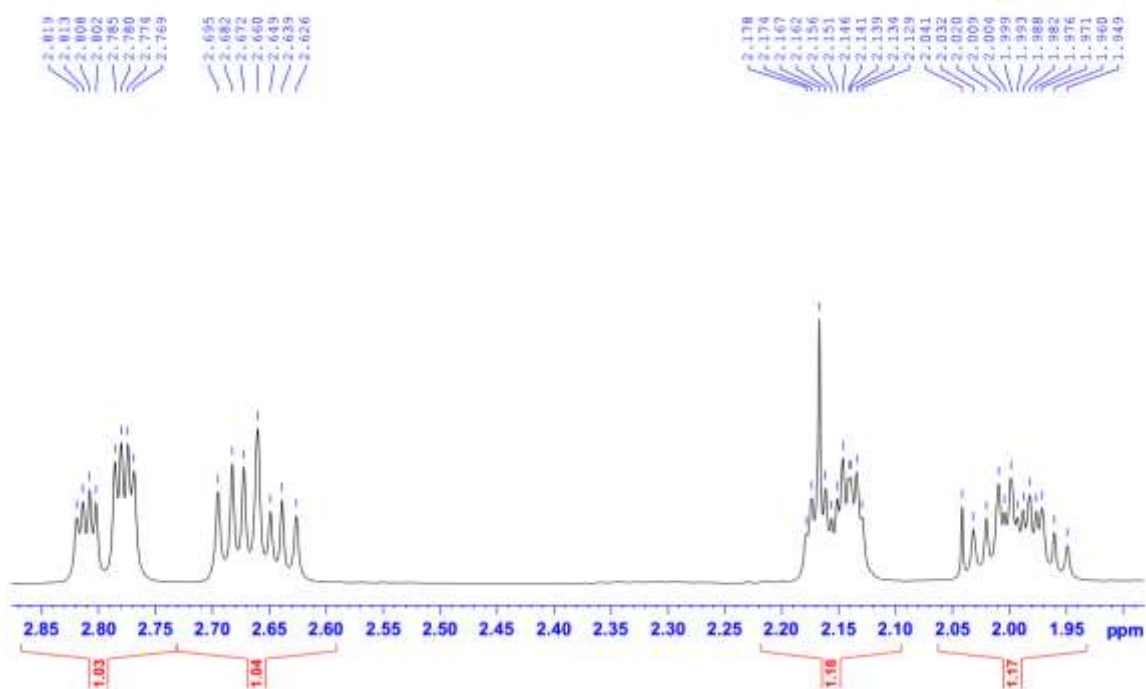
DNC01-CDC13-1H



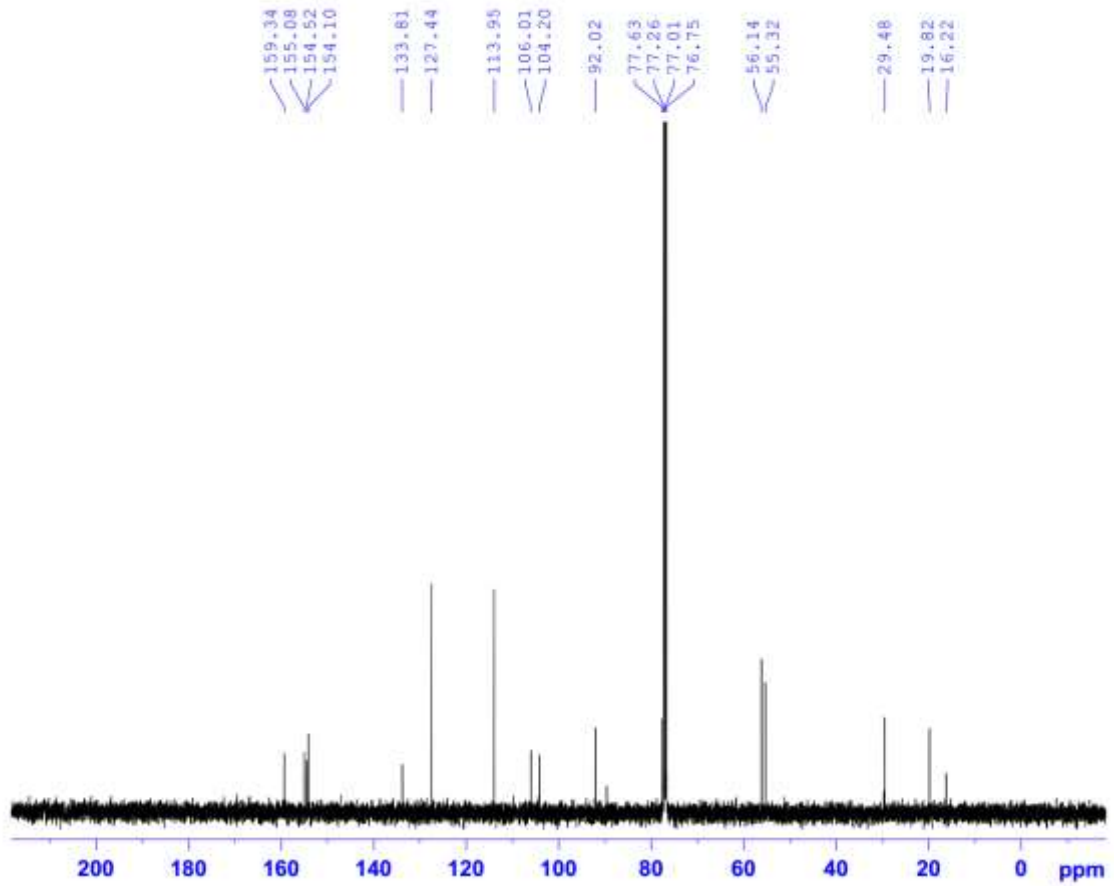
DNC01-CDCl3-1H



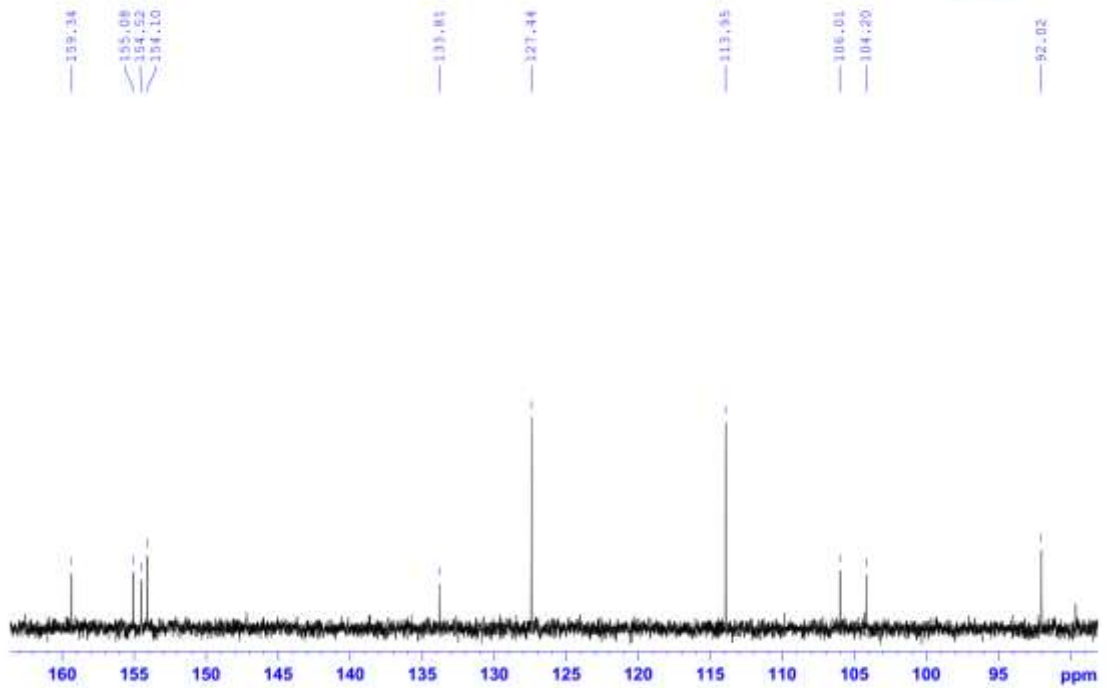
DNC01-CDCl3-1H



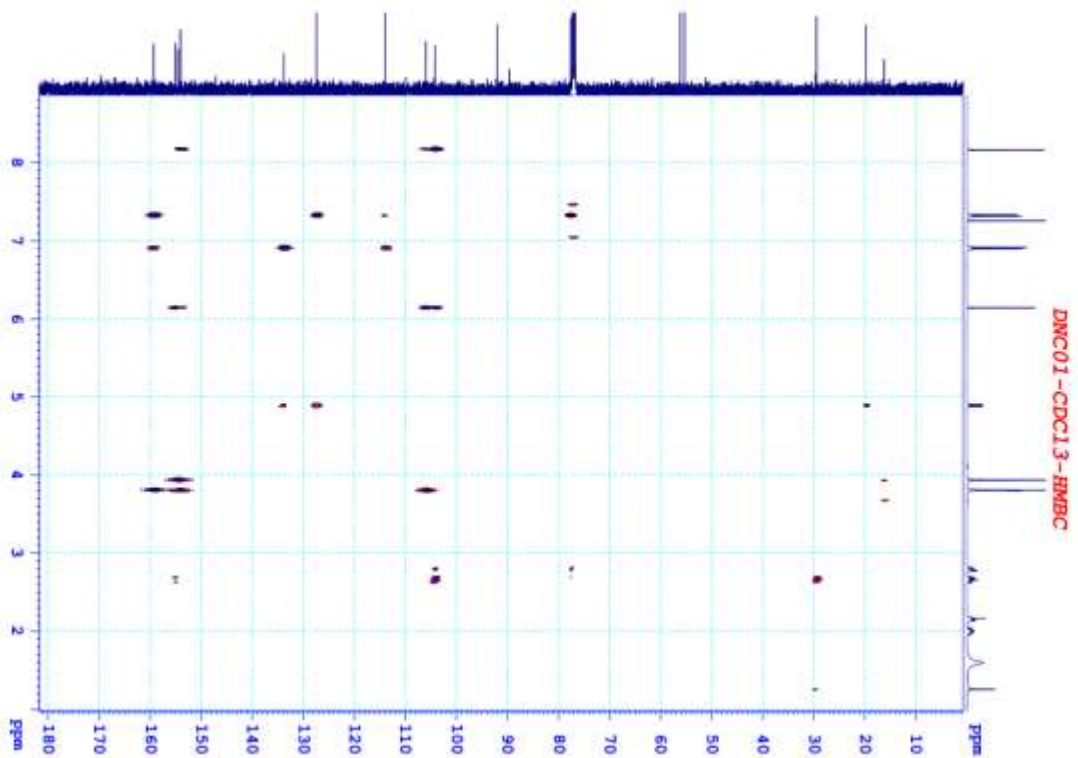
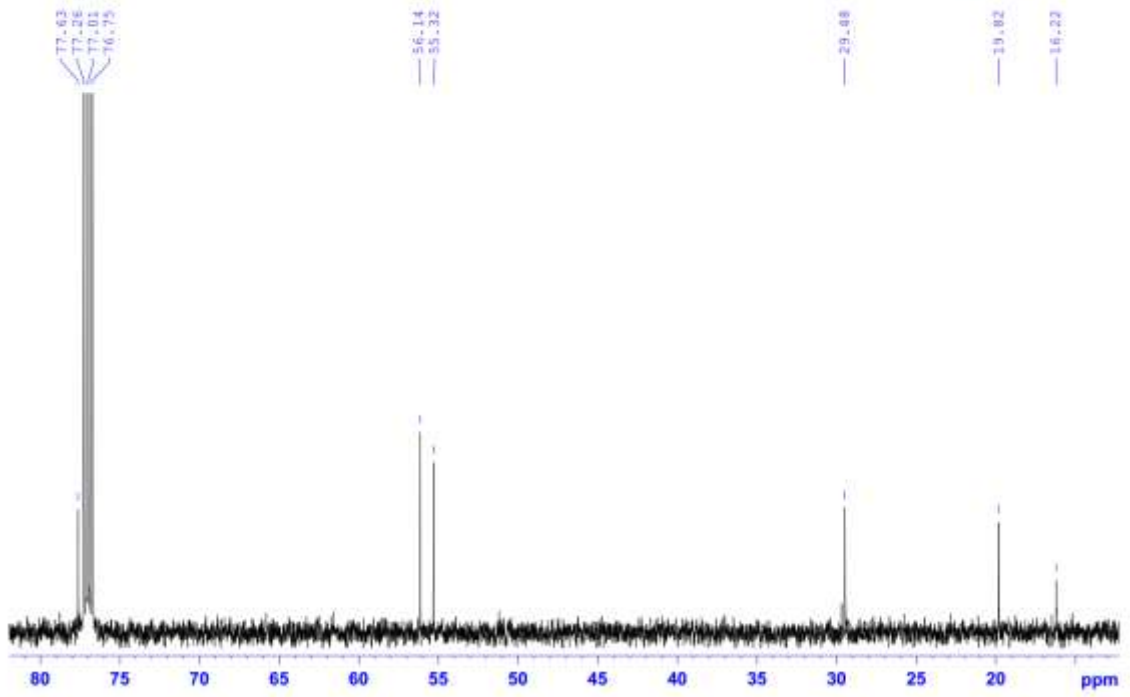
DNC01-CDC13-C13CPD

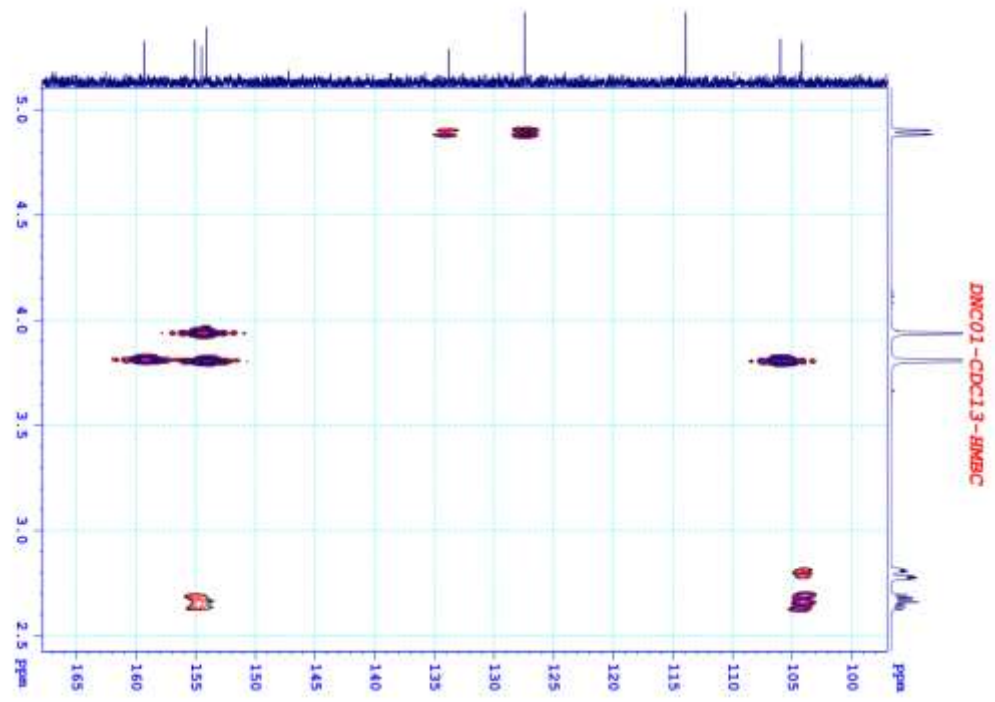
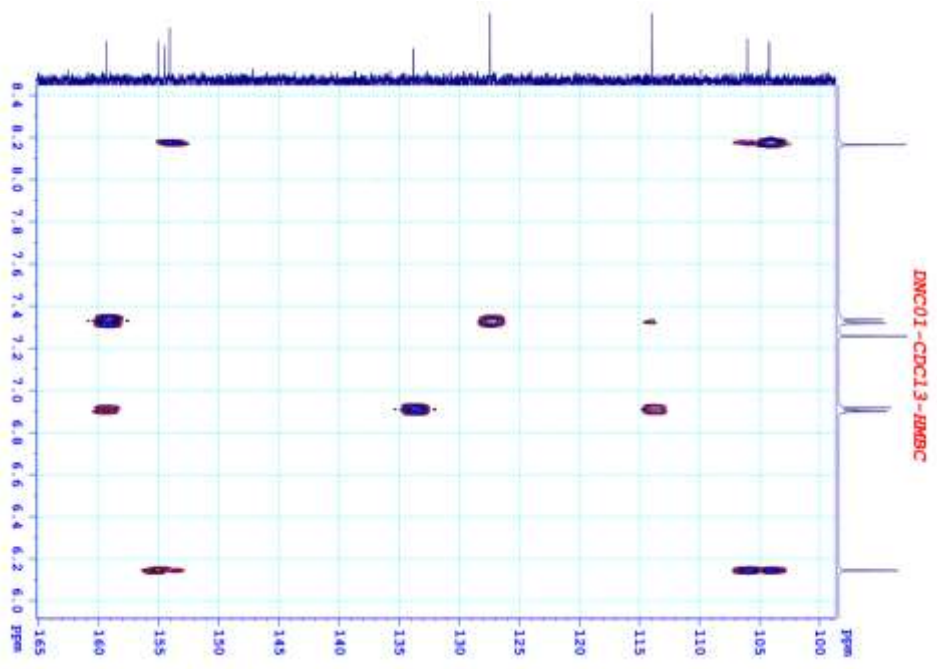


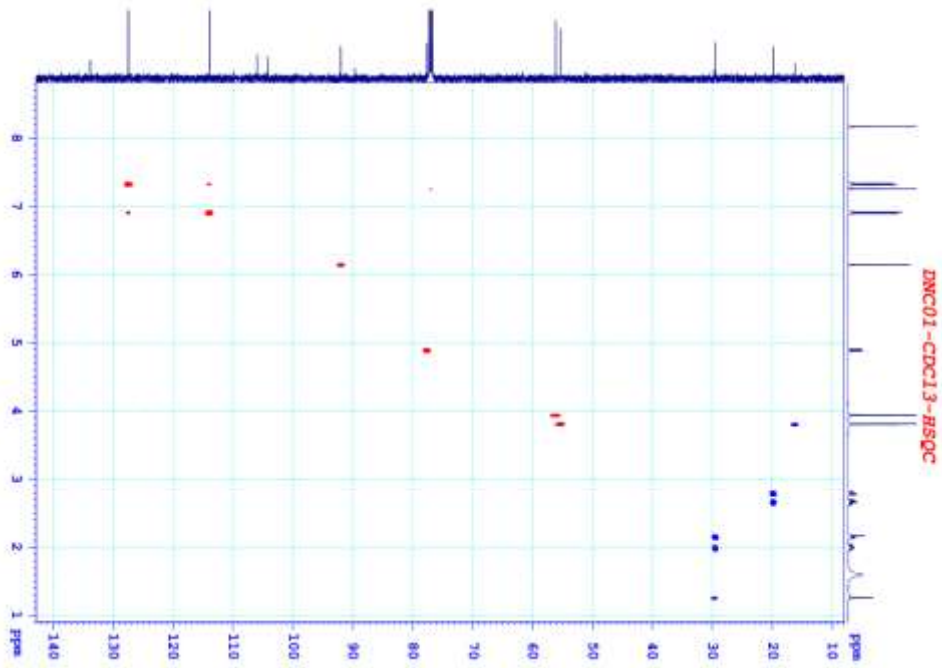
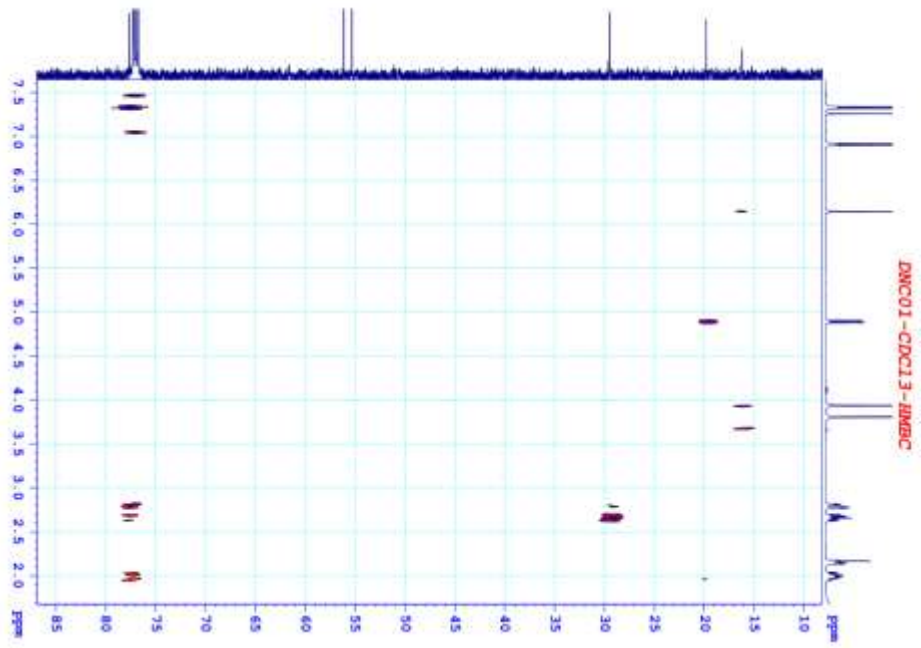
DNC01-CDC13-C13CPD

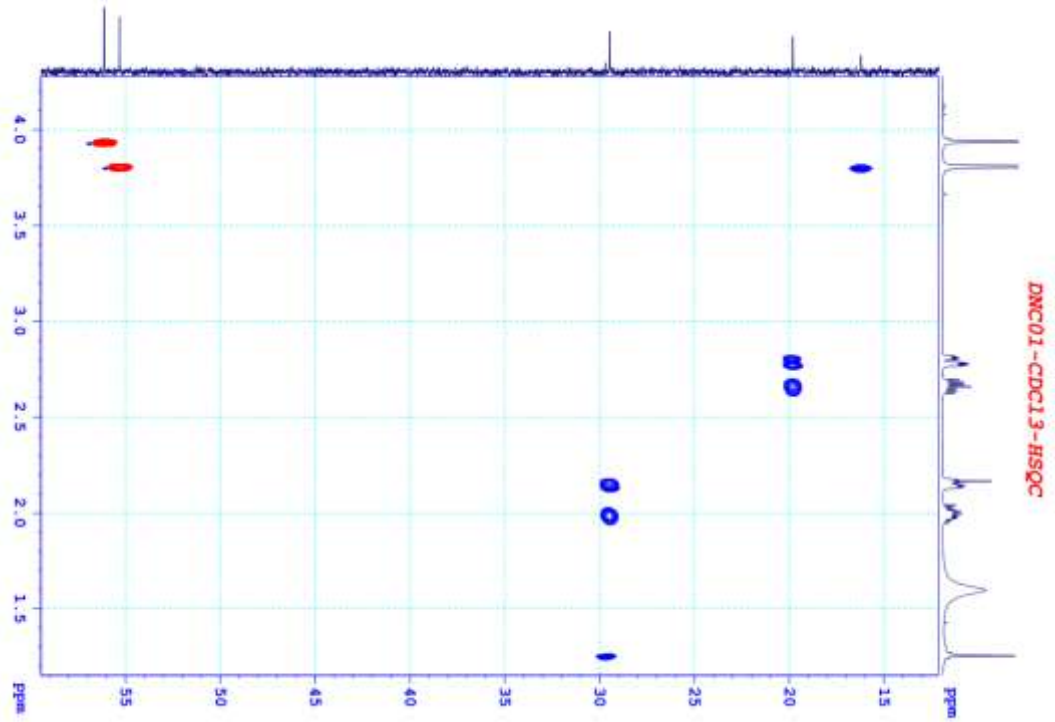
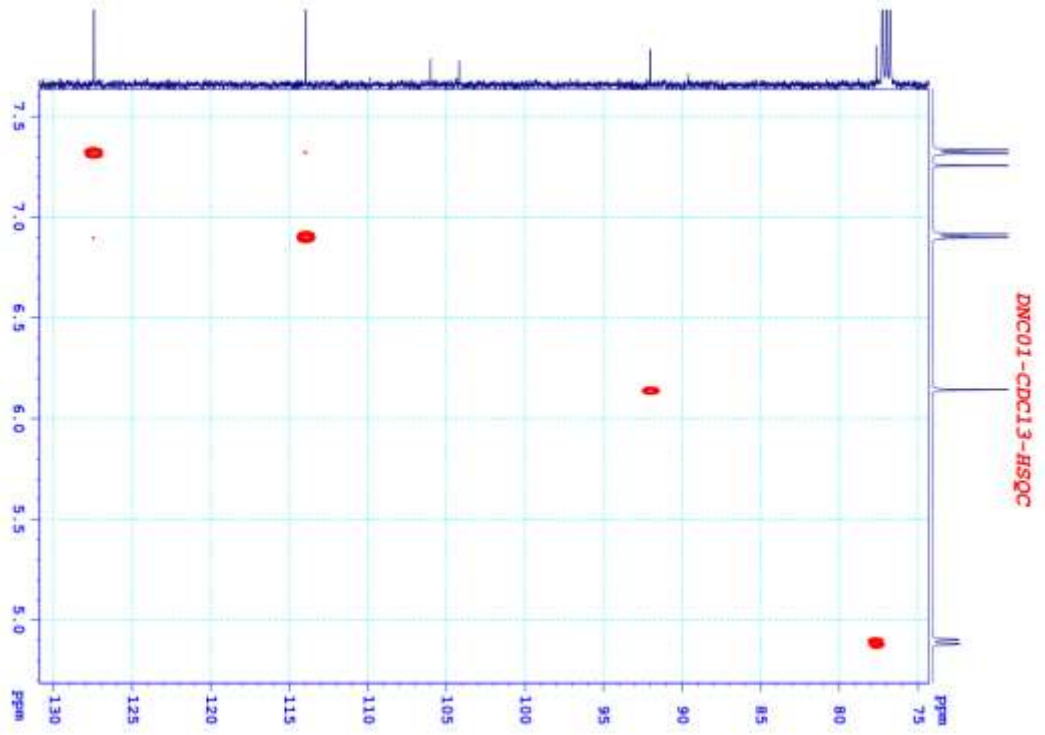


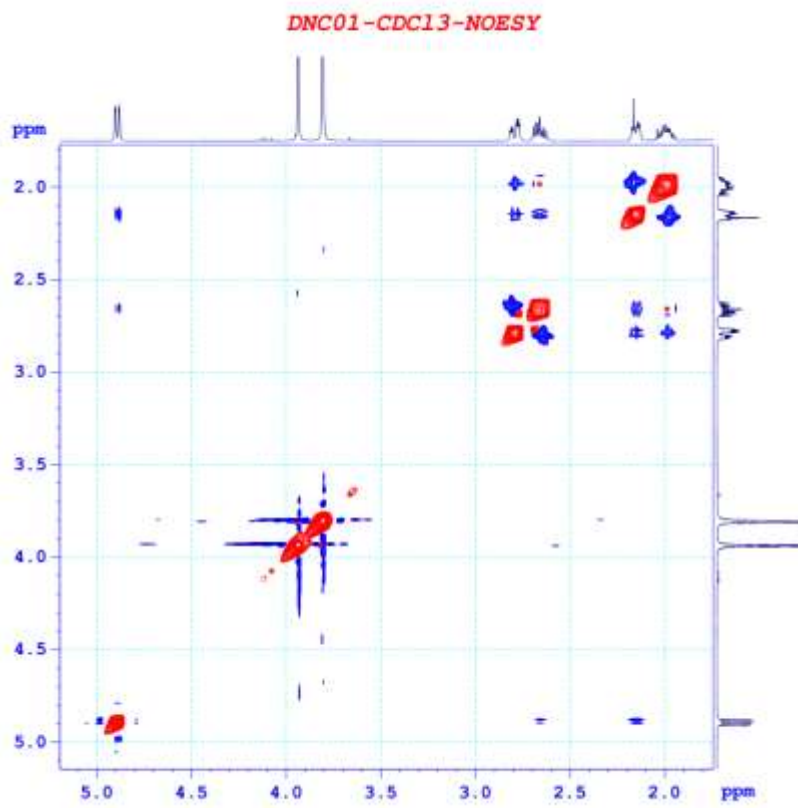
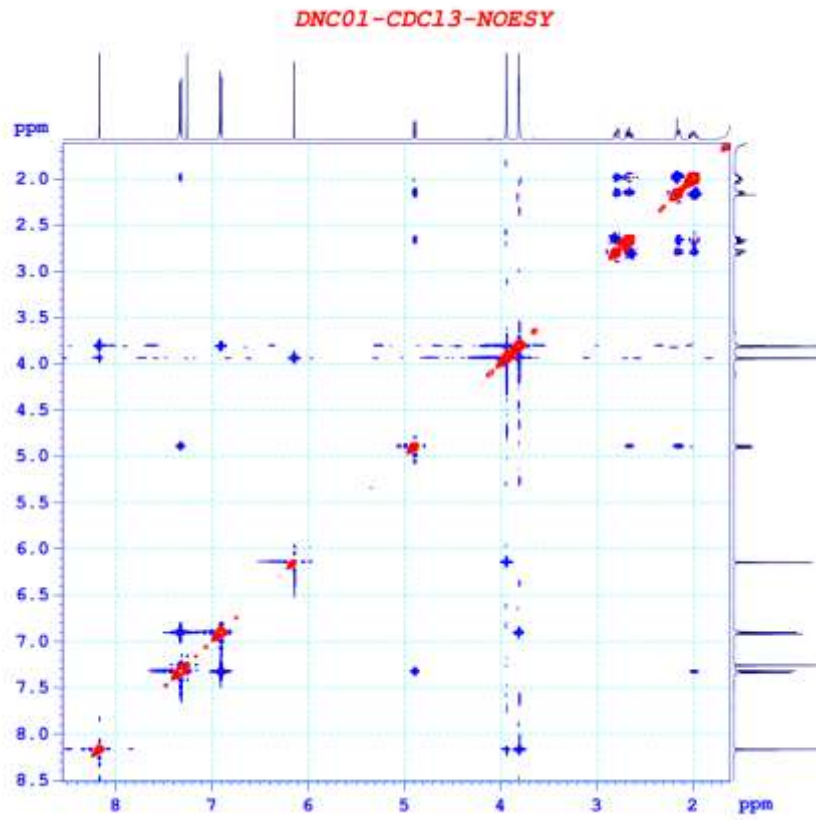
DNC01-CDCl3-C13CPD

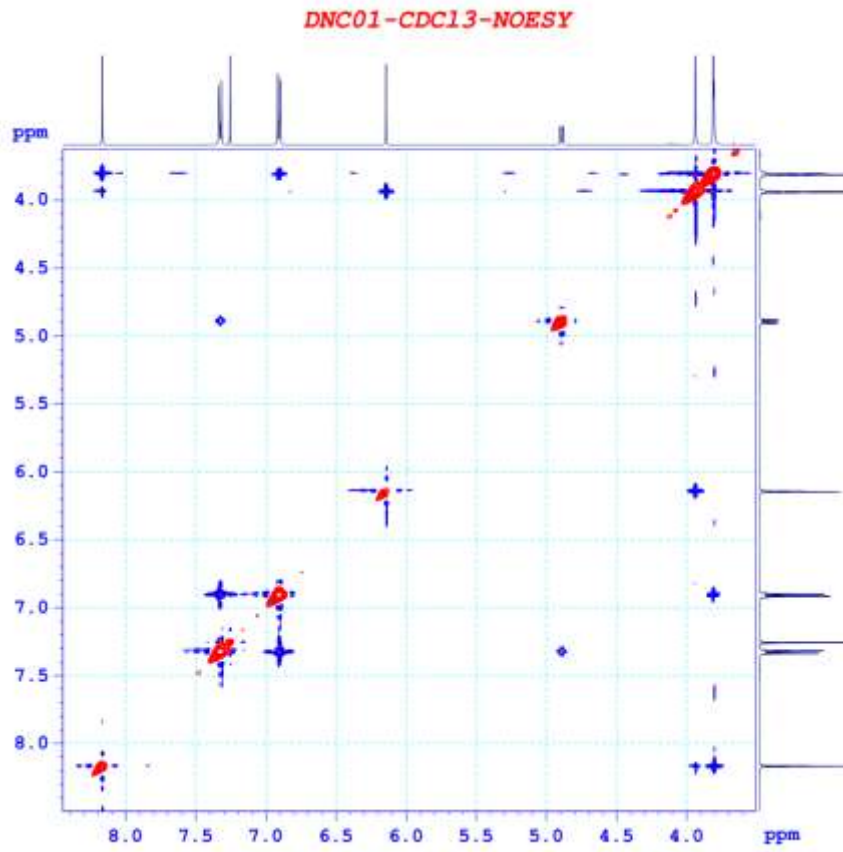




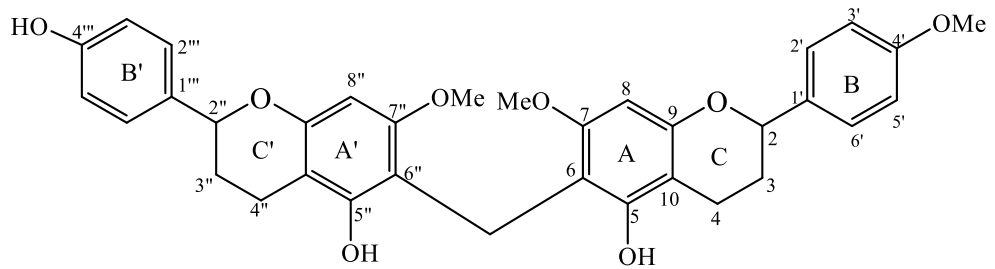




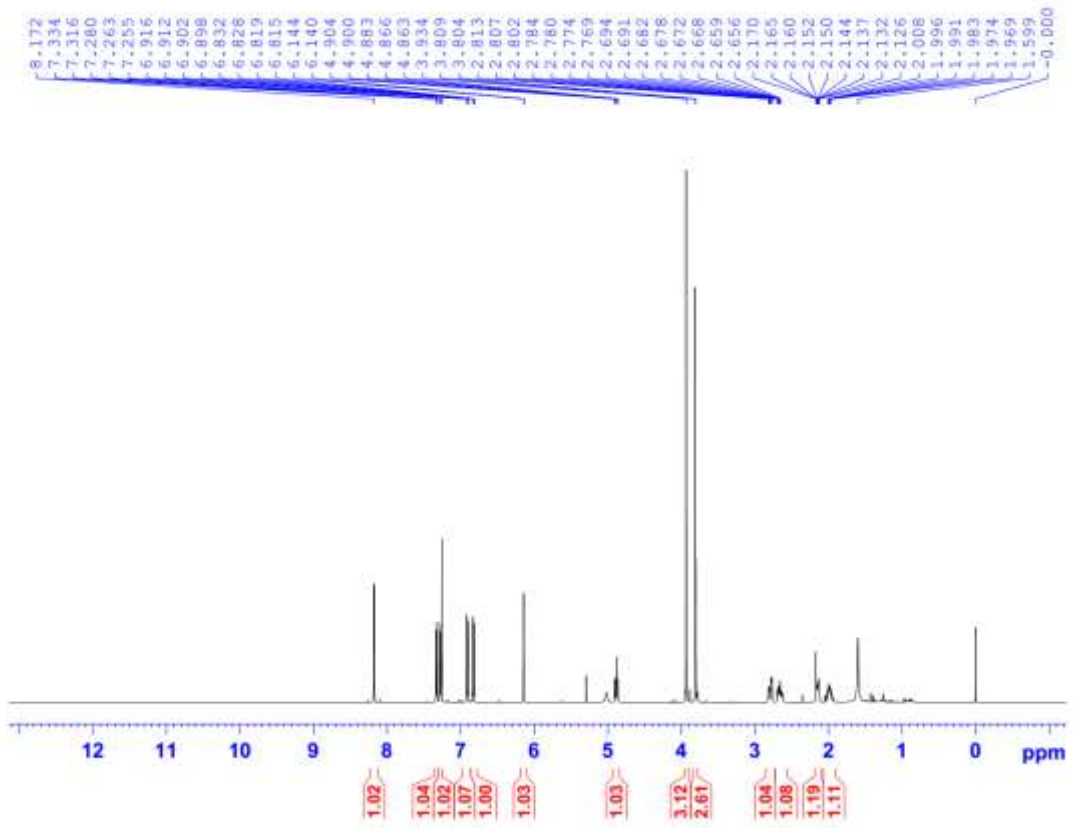




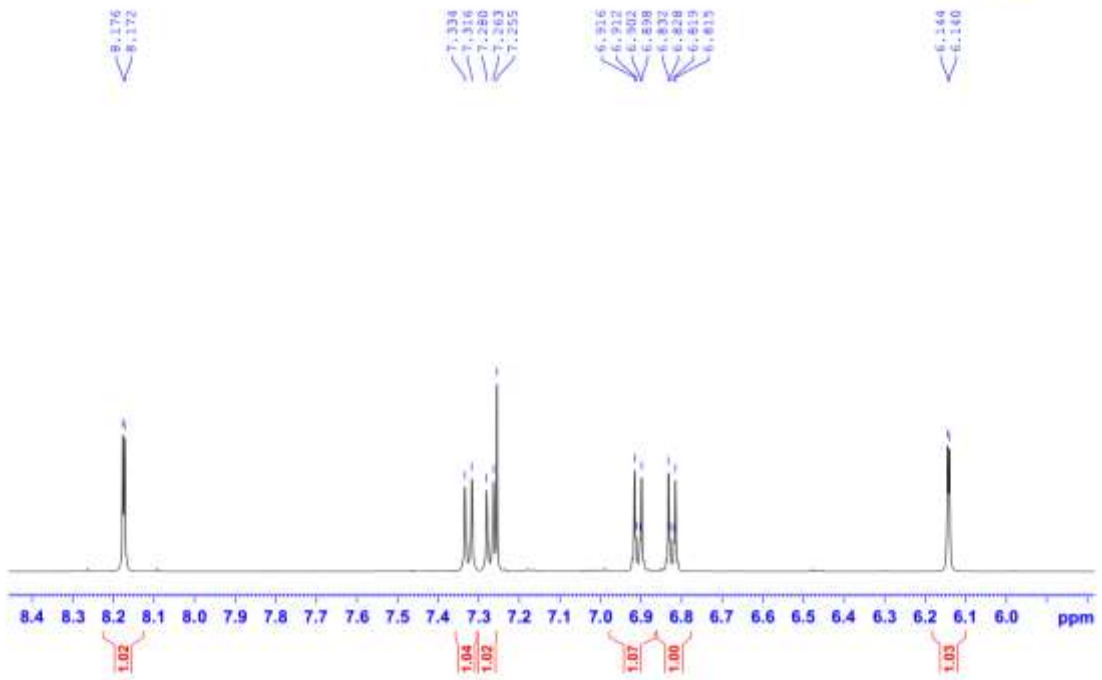
5. Phổ của hợp chất **DN5**

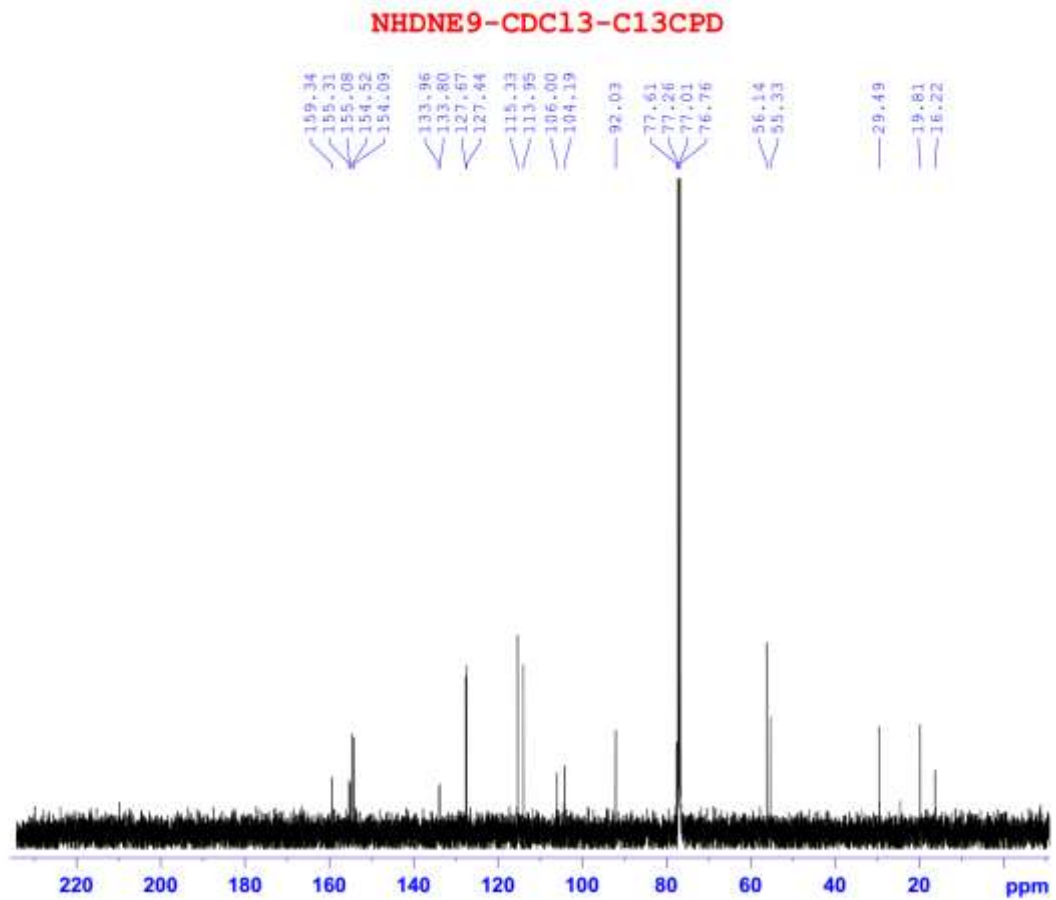
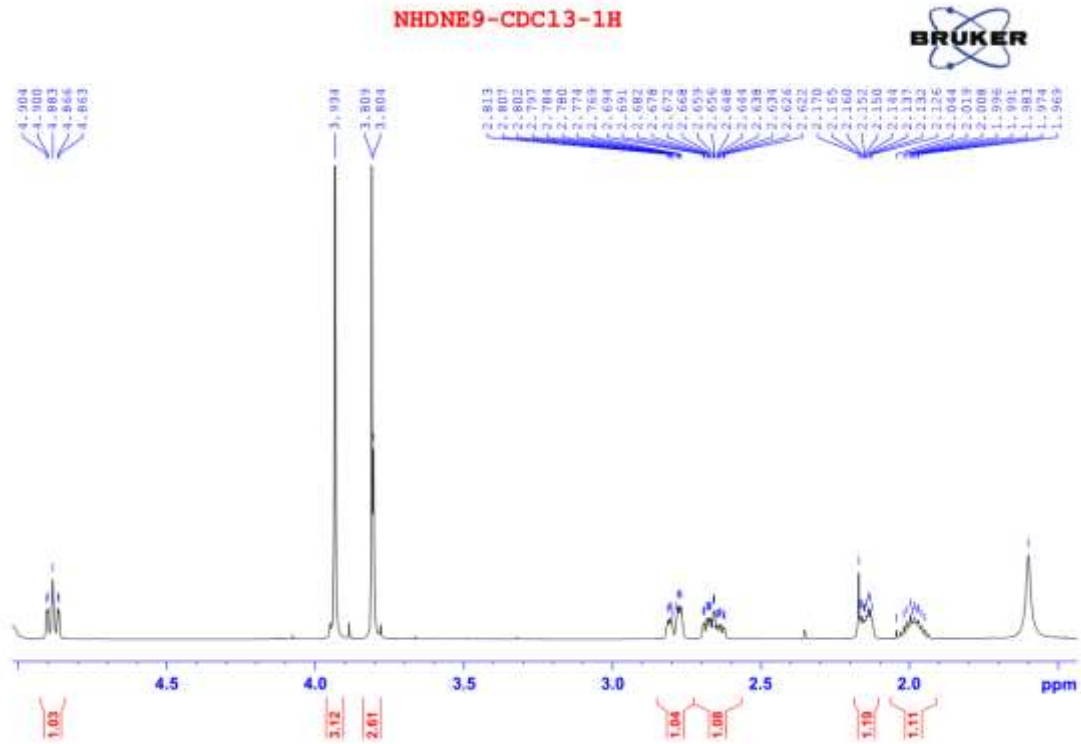


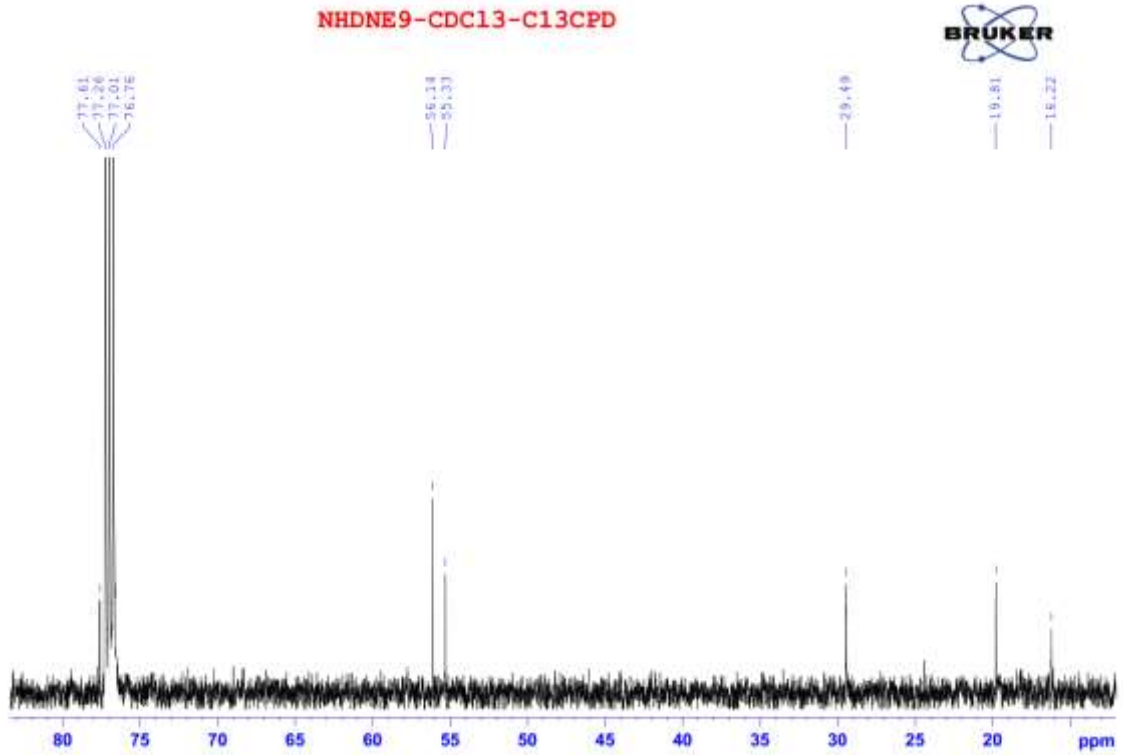
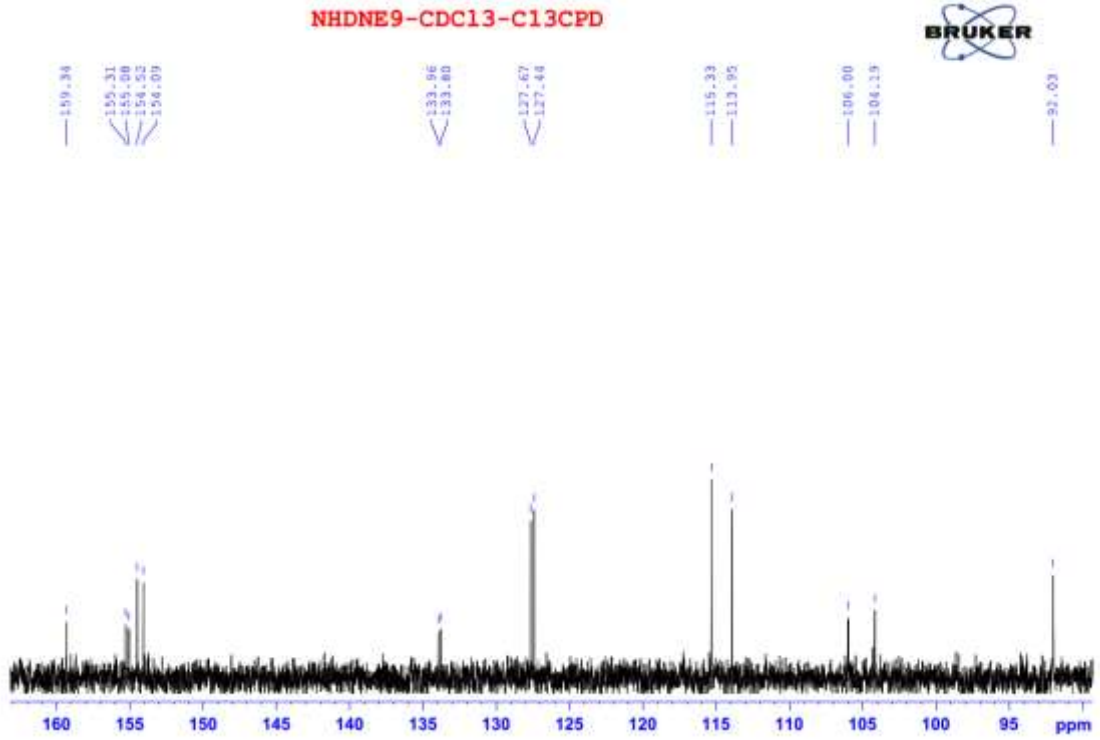
NHDNE9-CDC13-1H

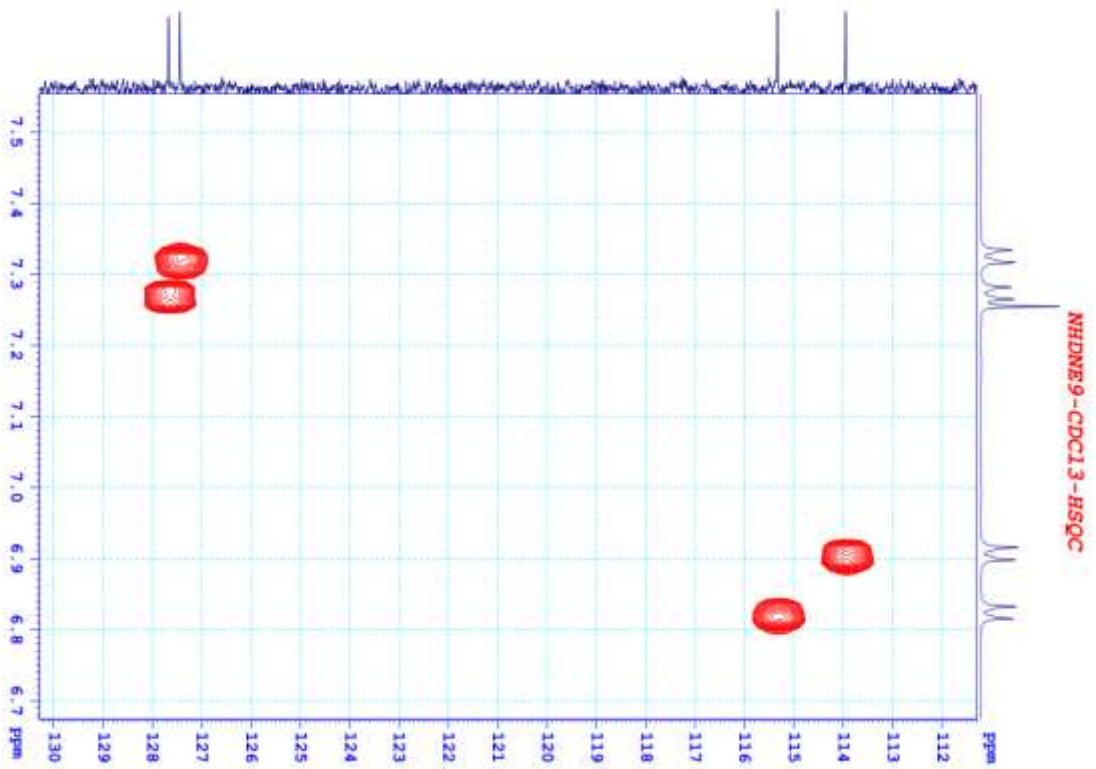
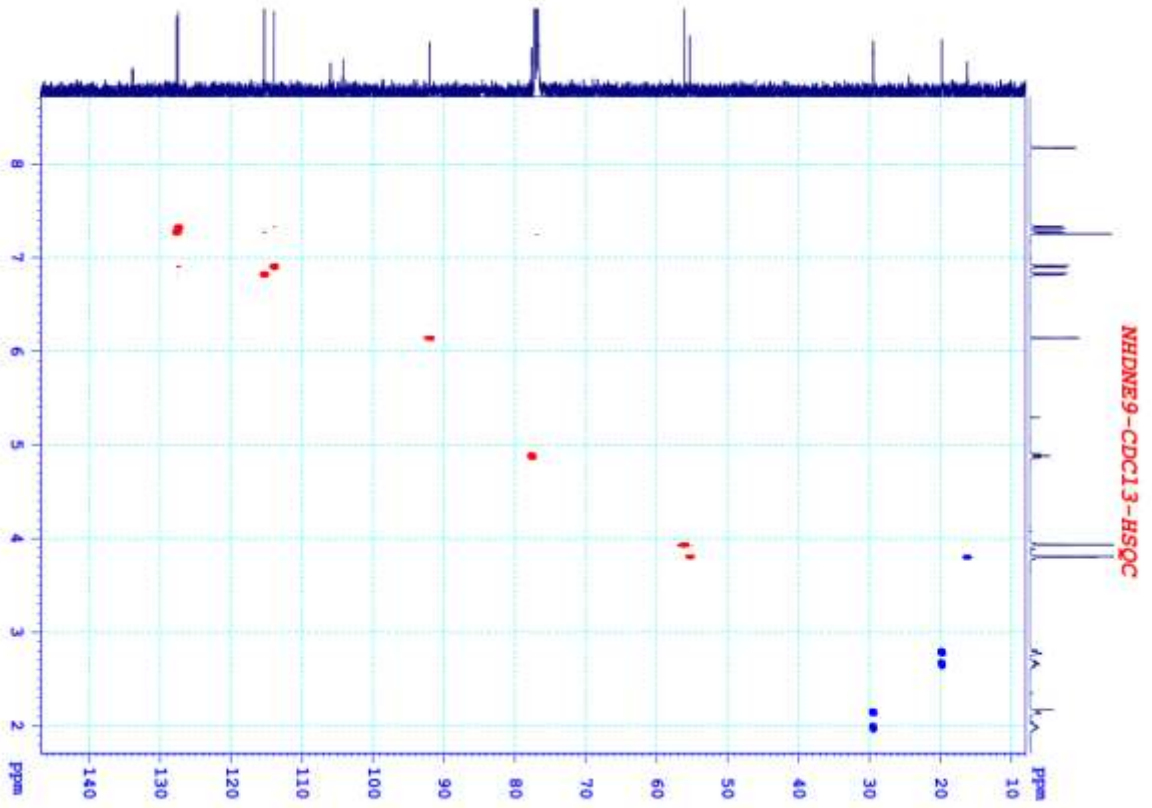


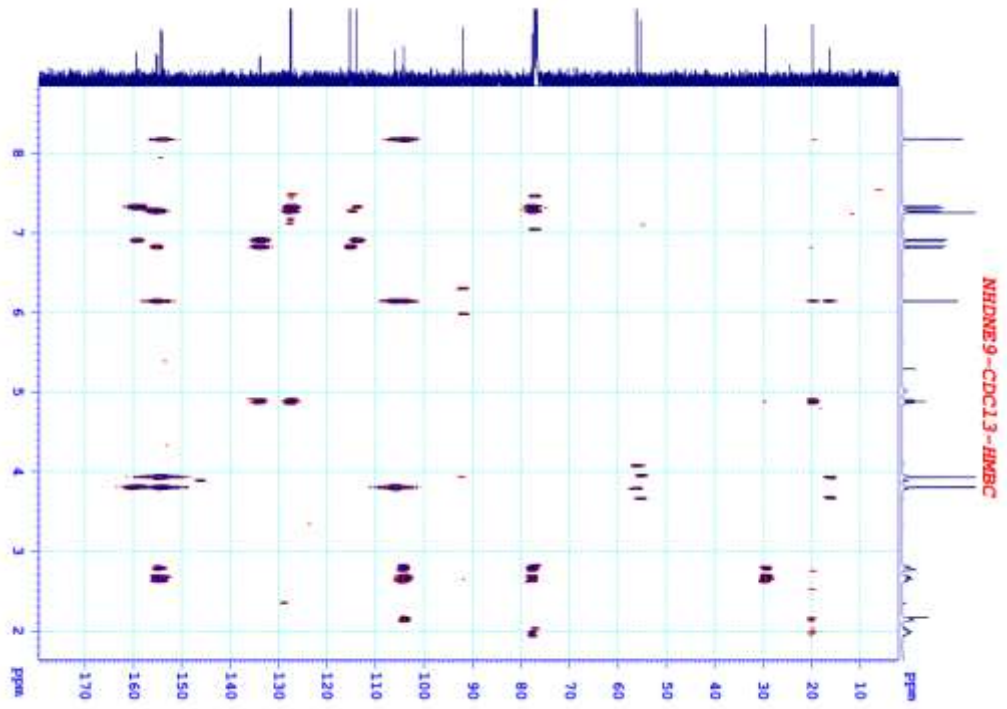
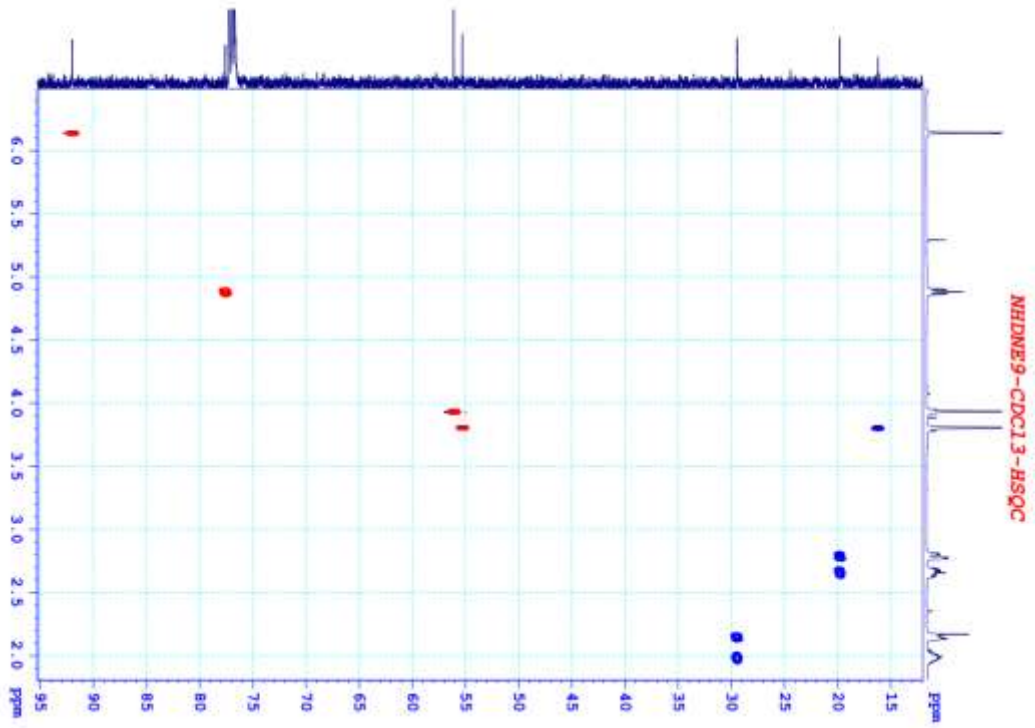
NHDNE9-CDC13-1H

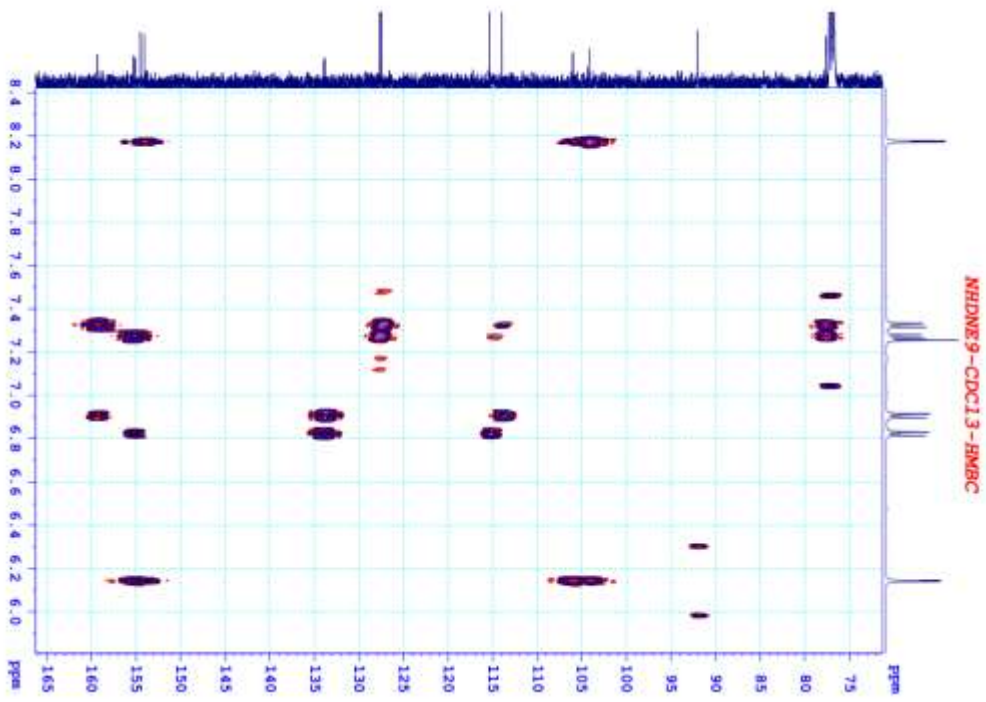
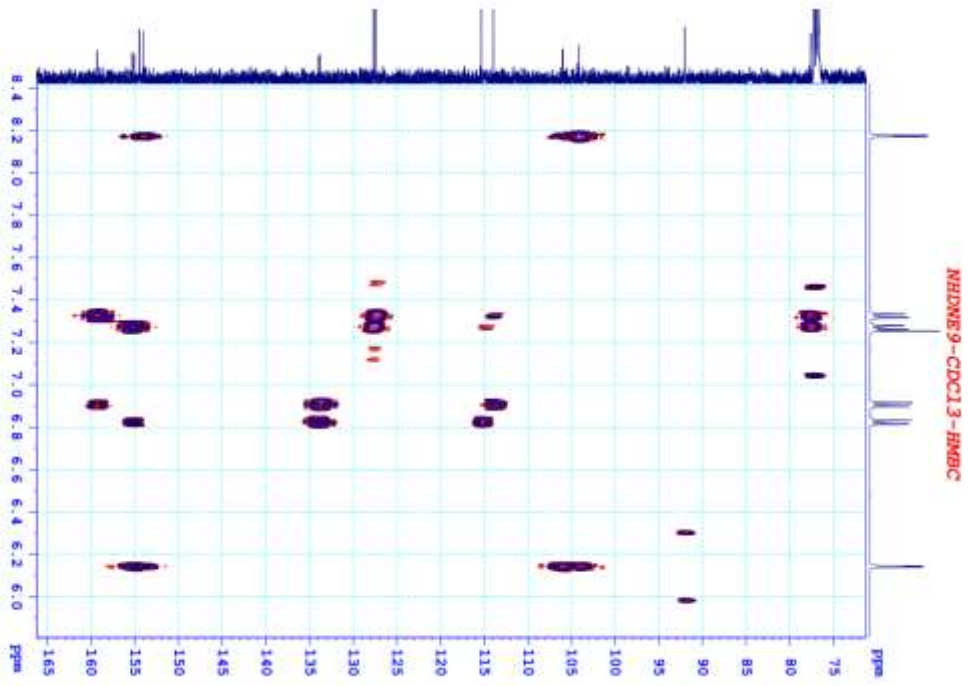


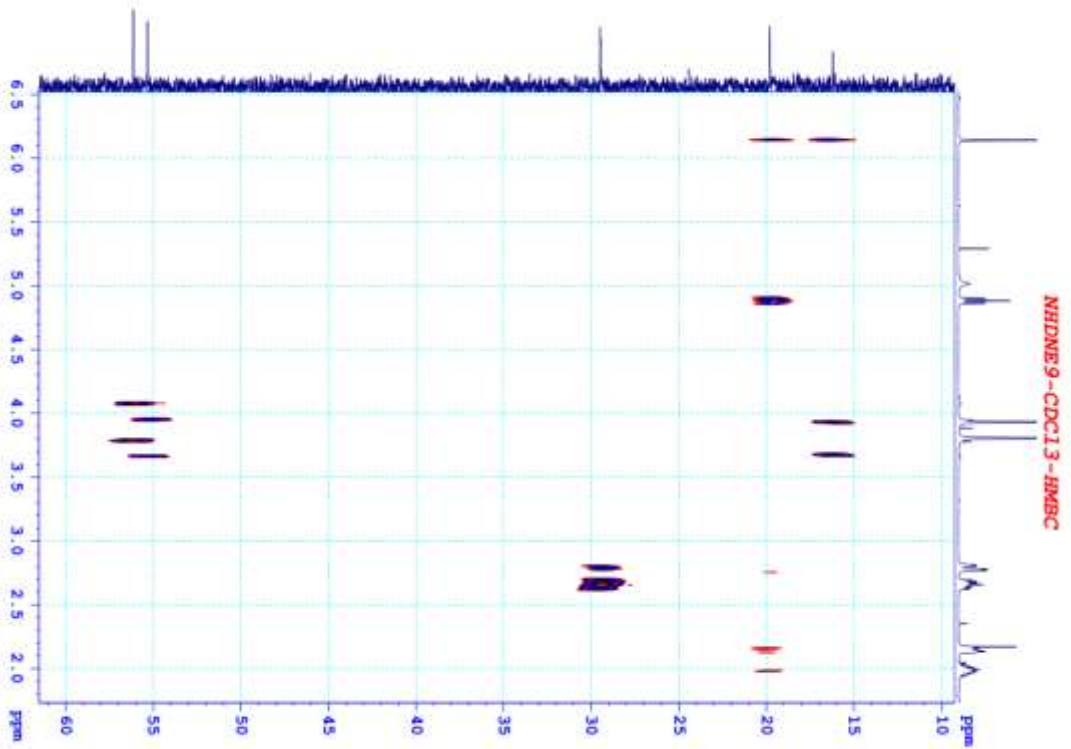
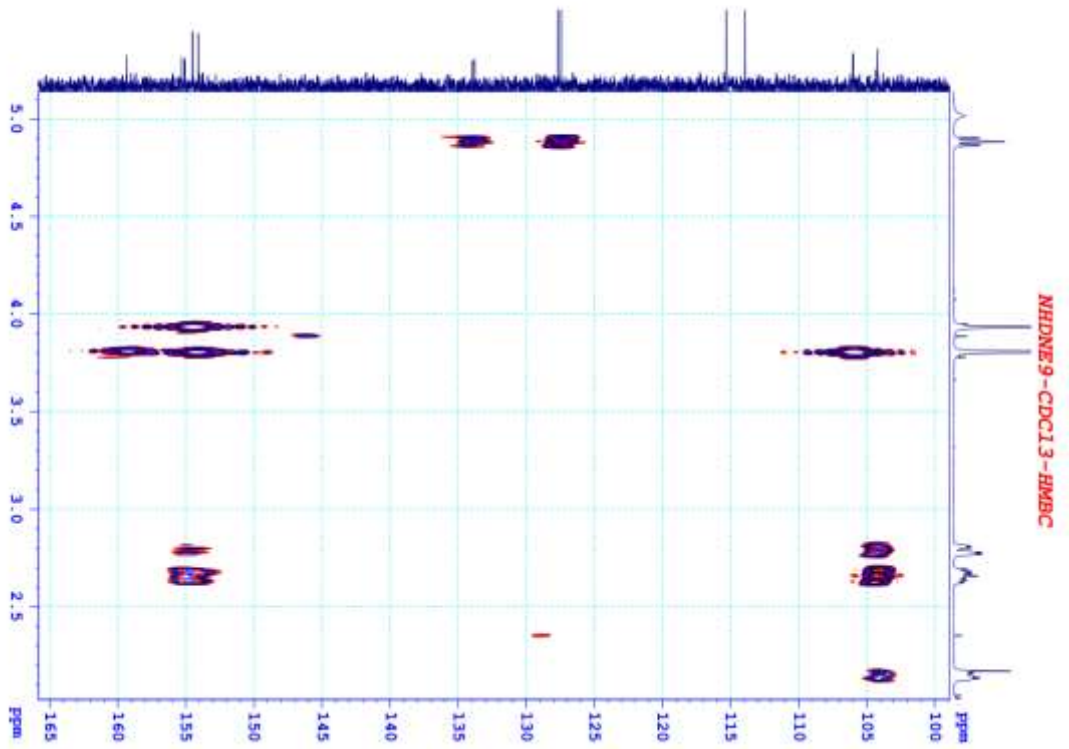


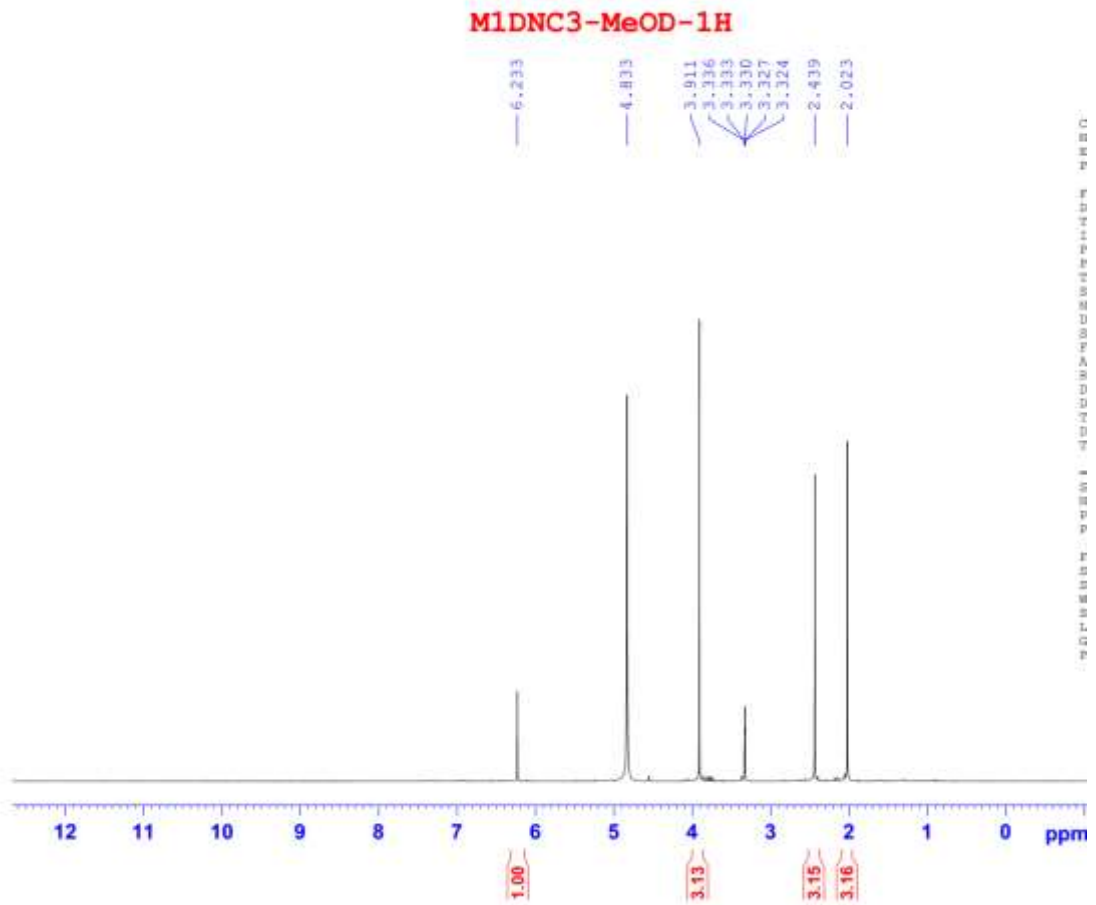
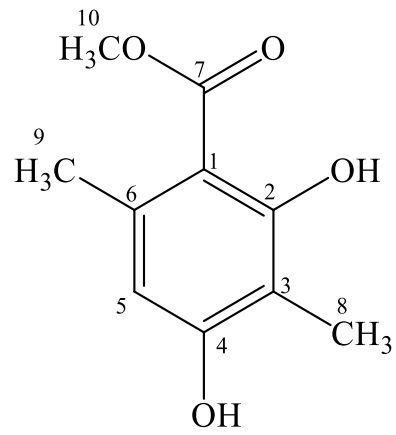


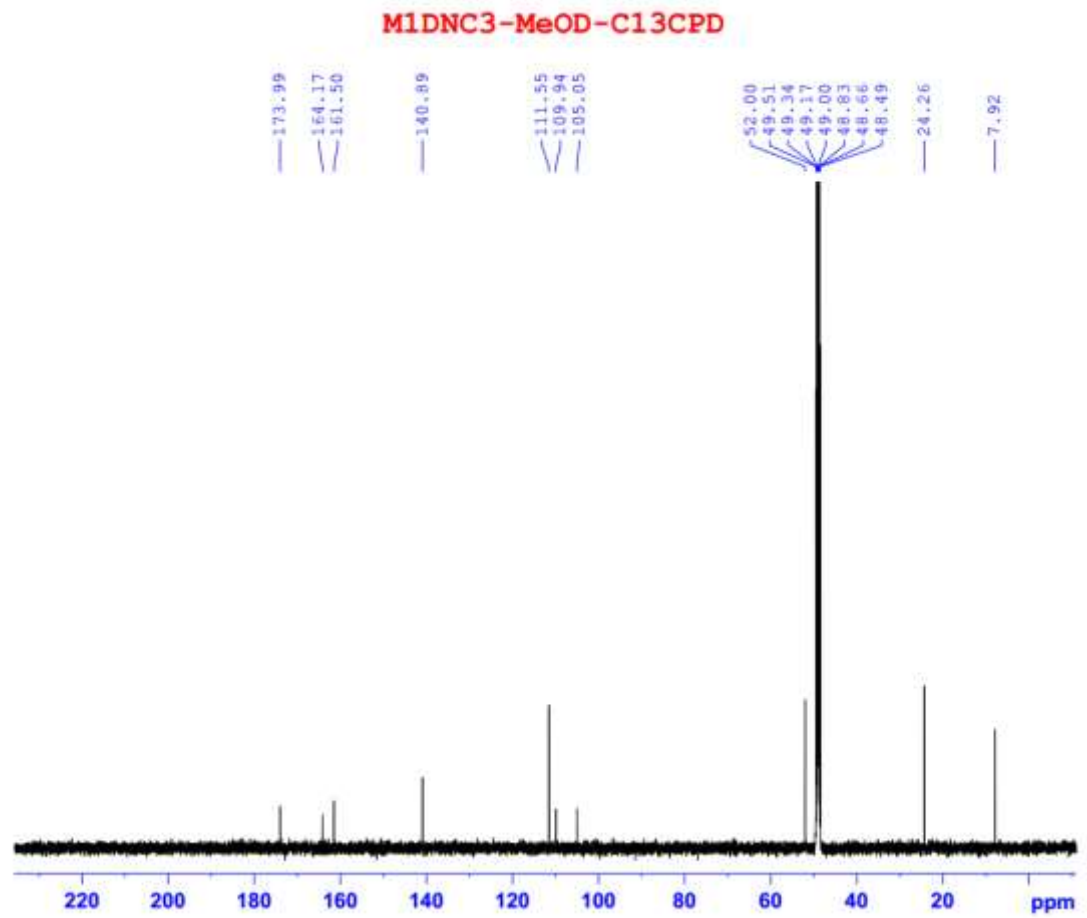
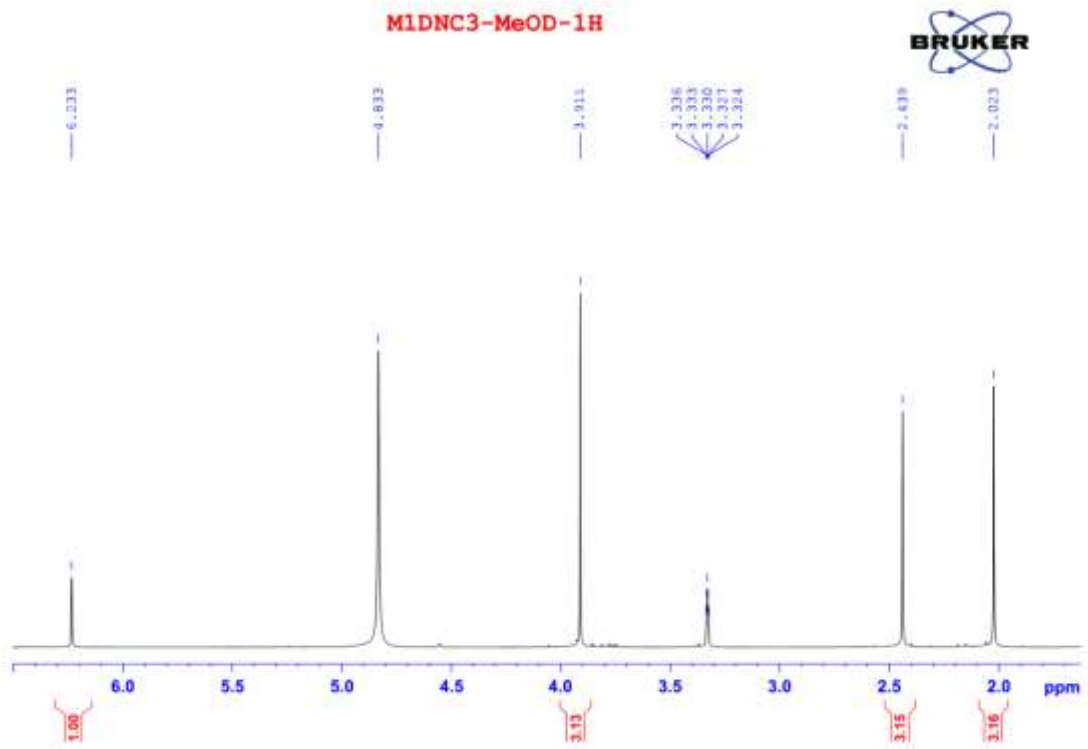


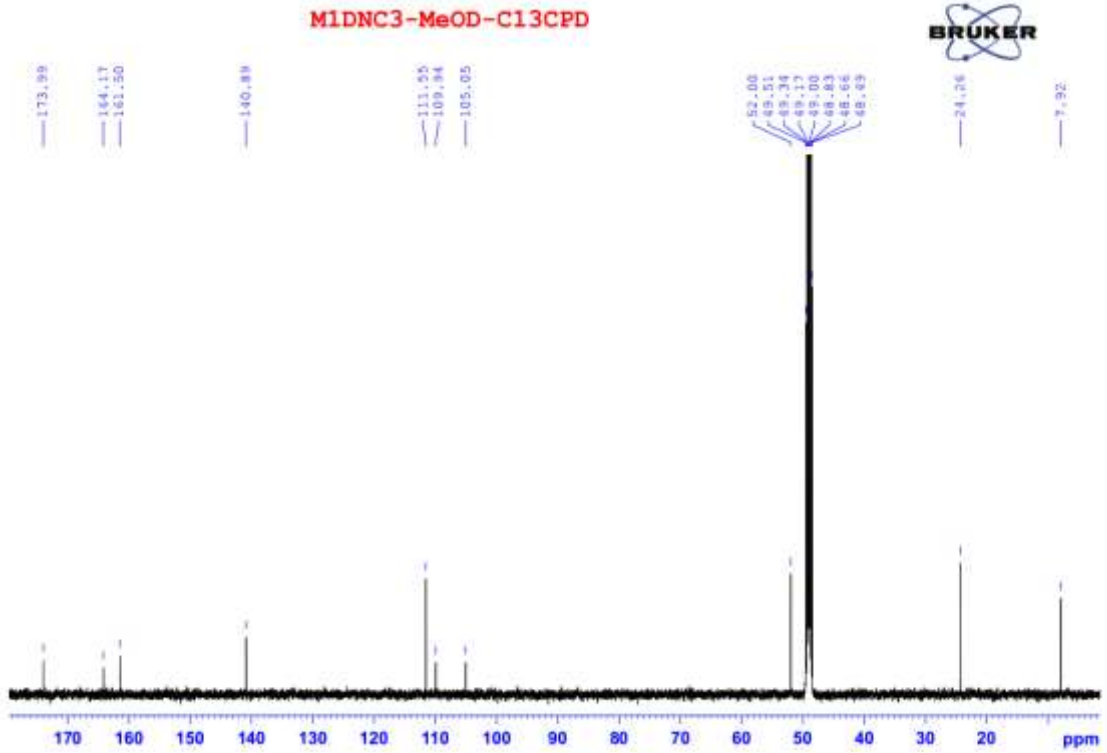




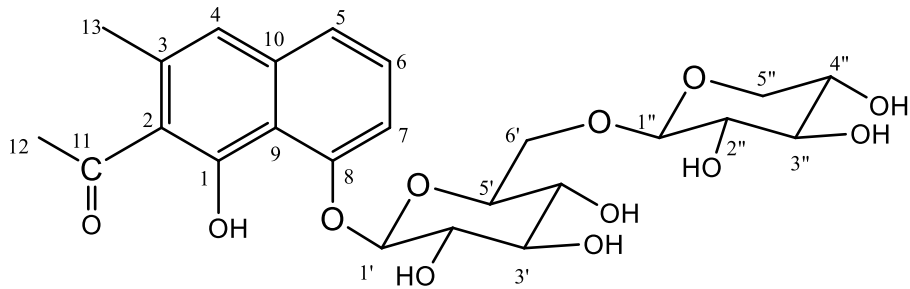


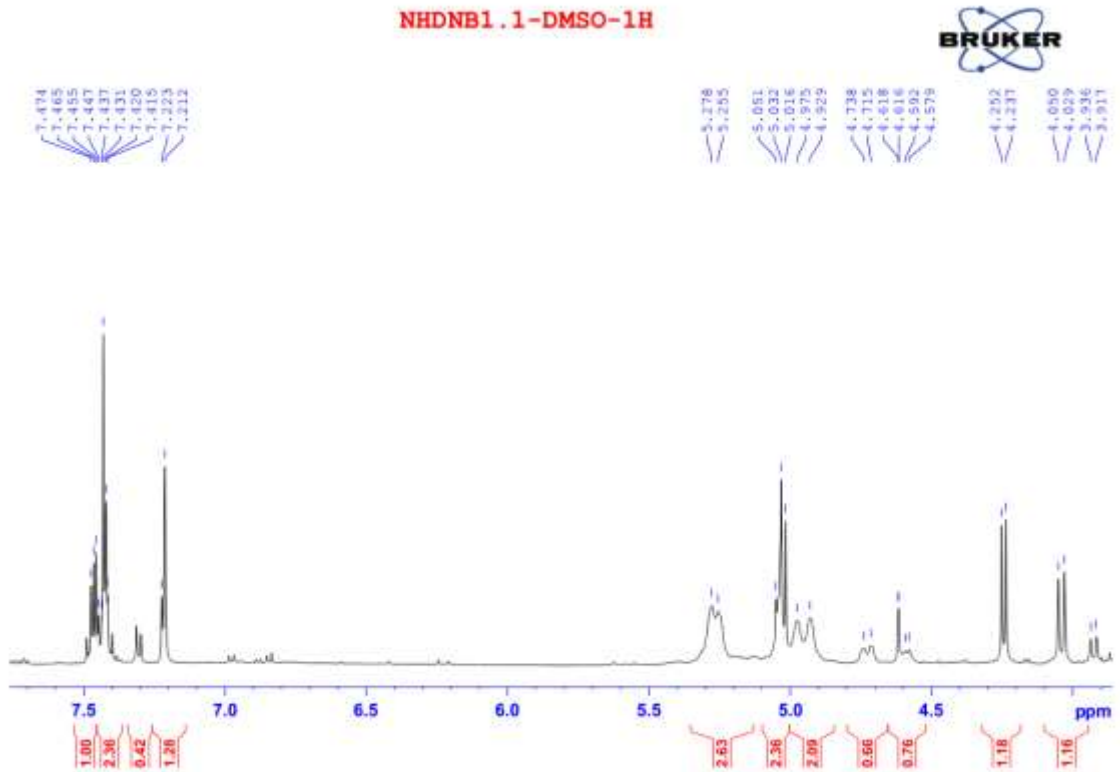
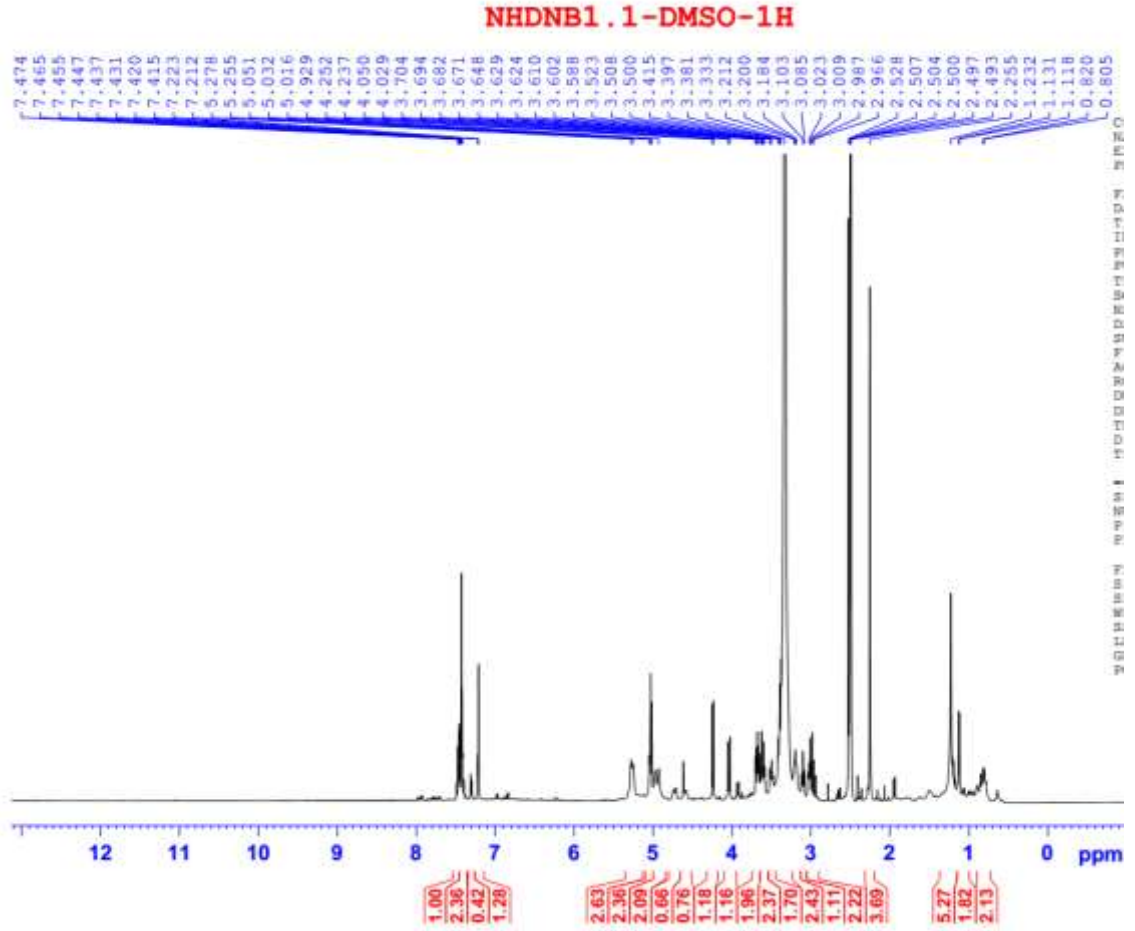
6. Phổ của hợp chất **DN6**

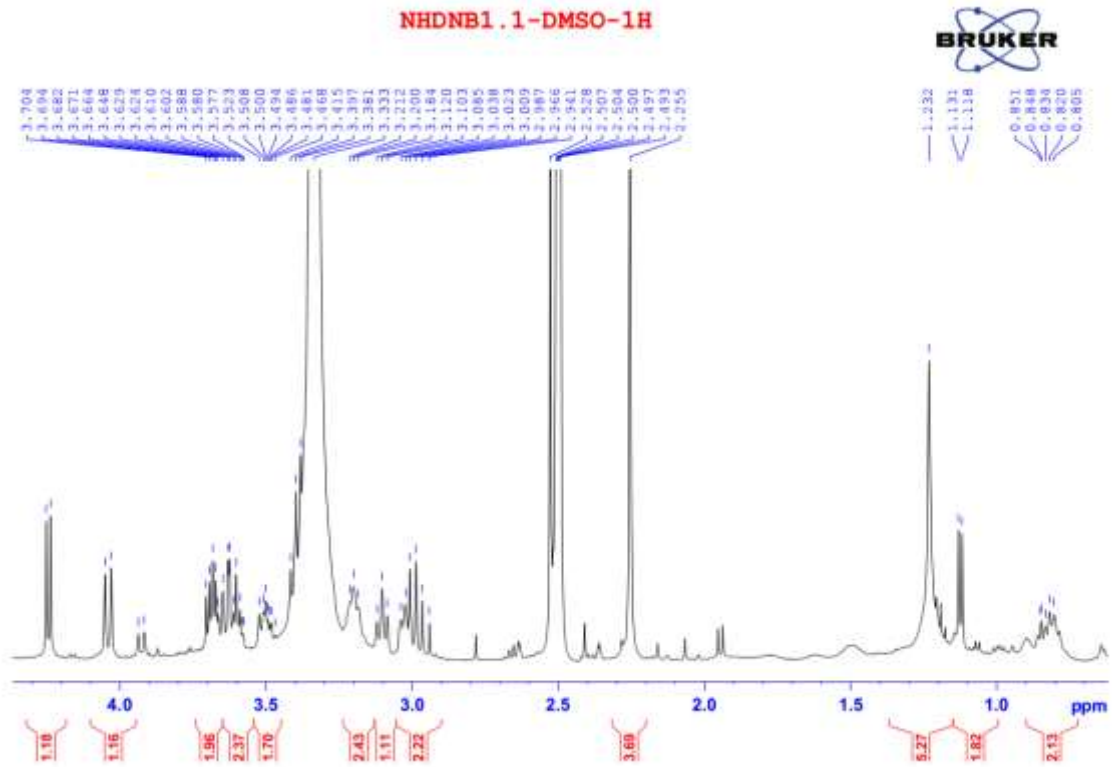




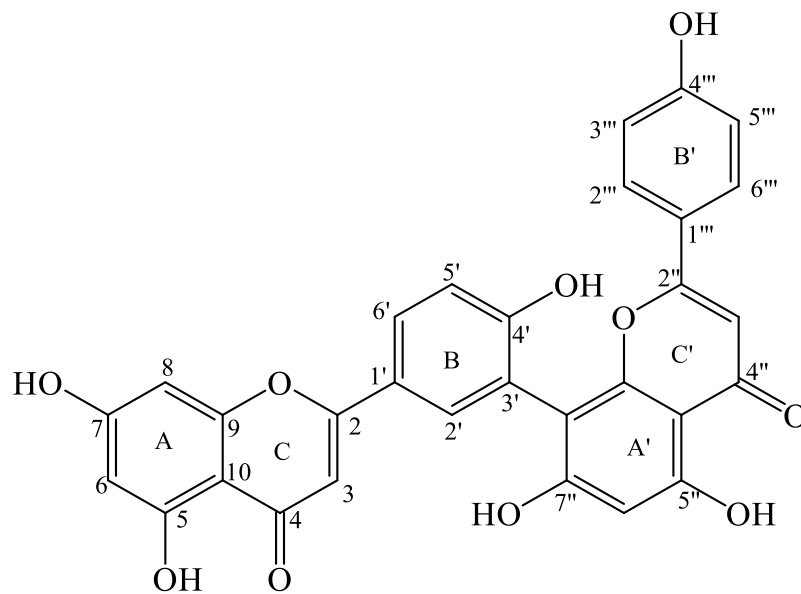
7. Phổ của hợp chất **DN7**



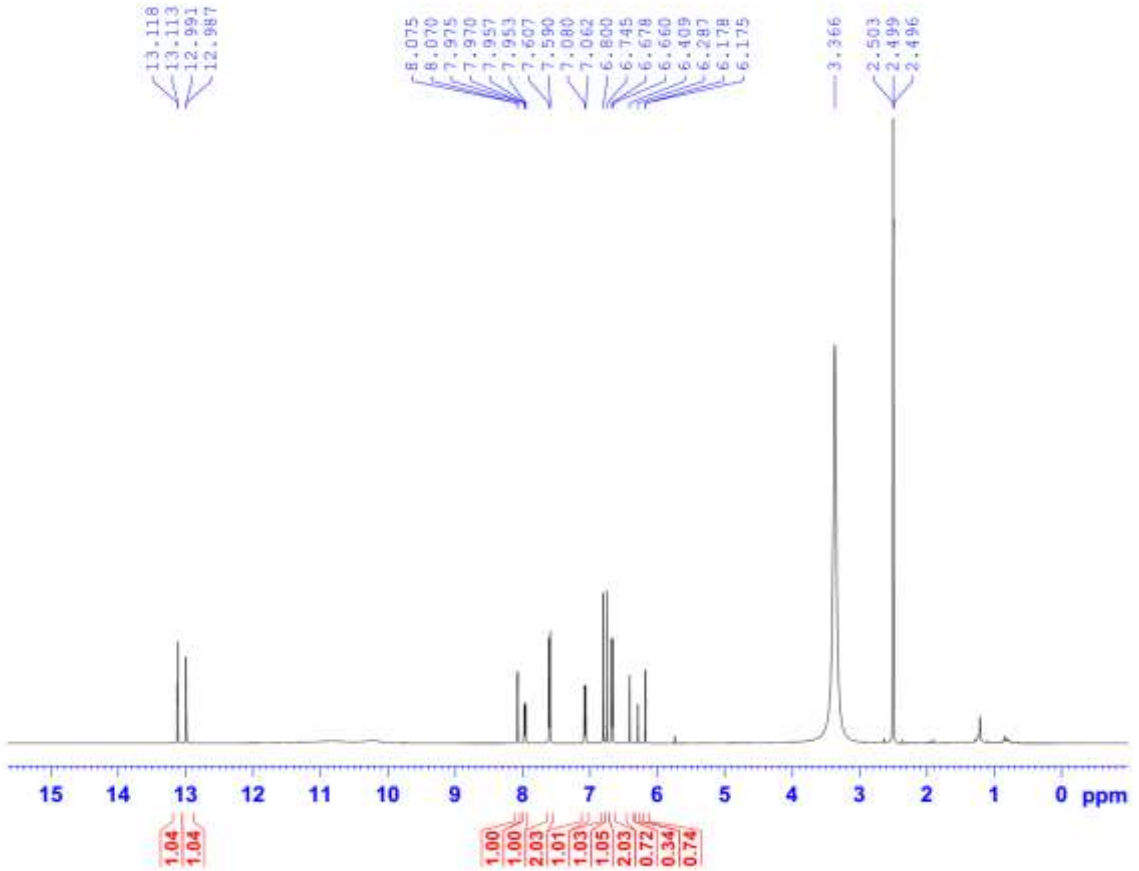




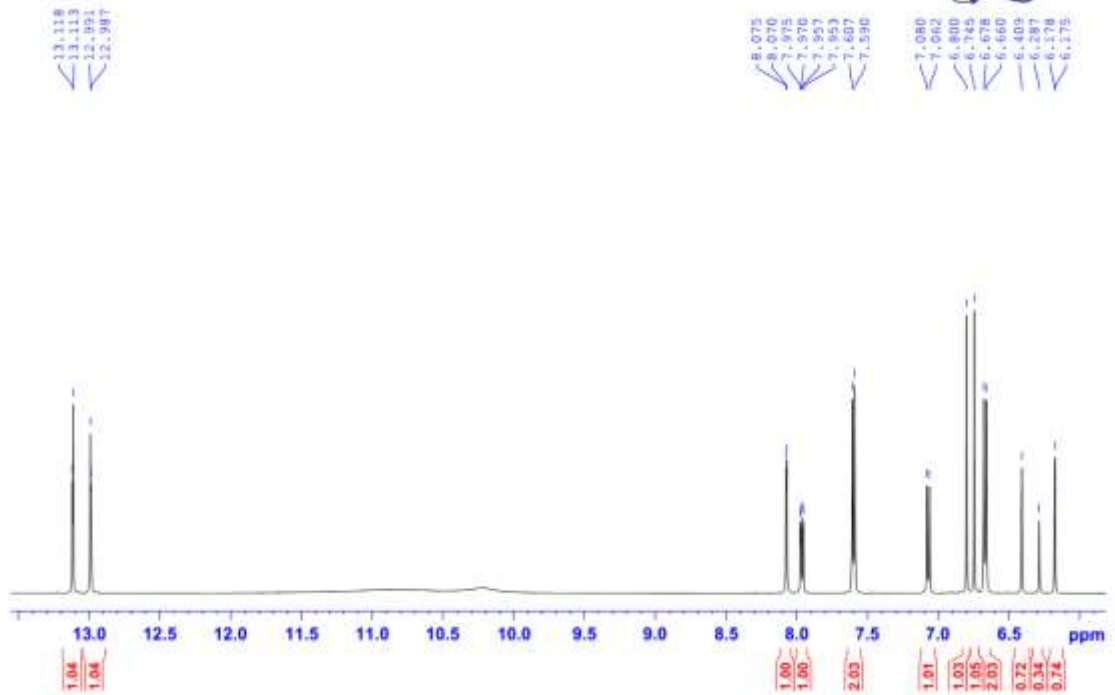
8. Phổ của hợp chất DN8

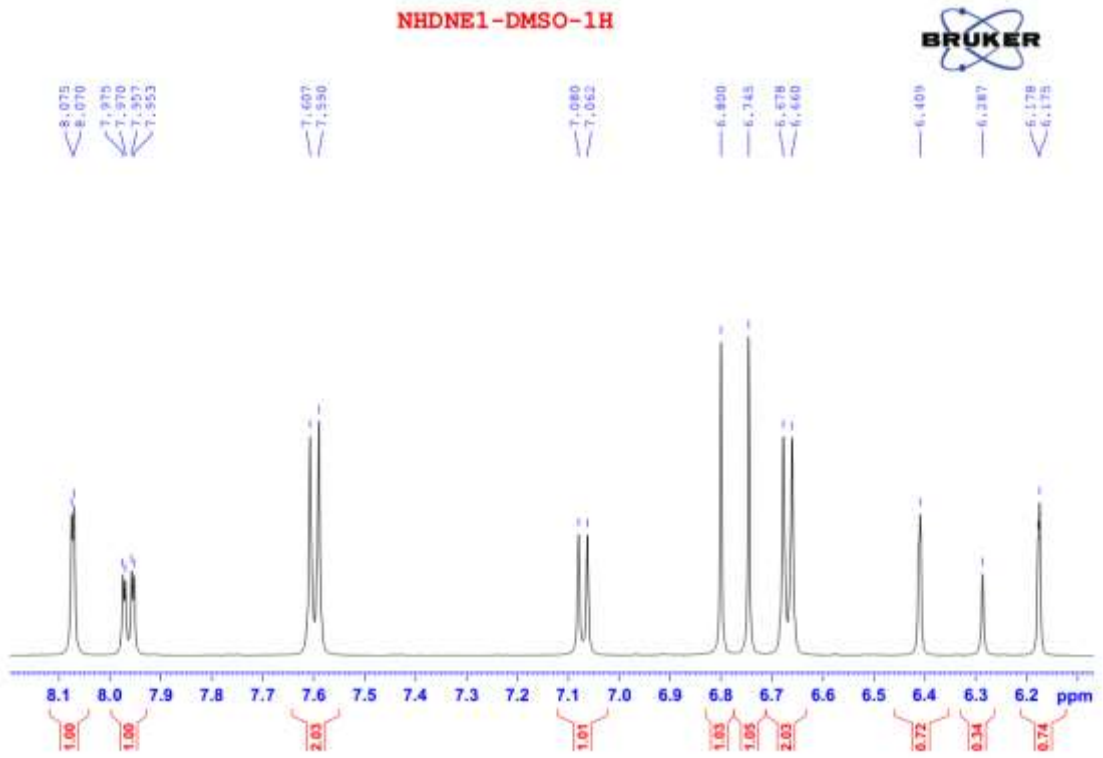


NHDNE1-DMSO-1H

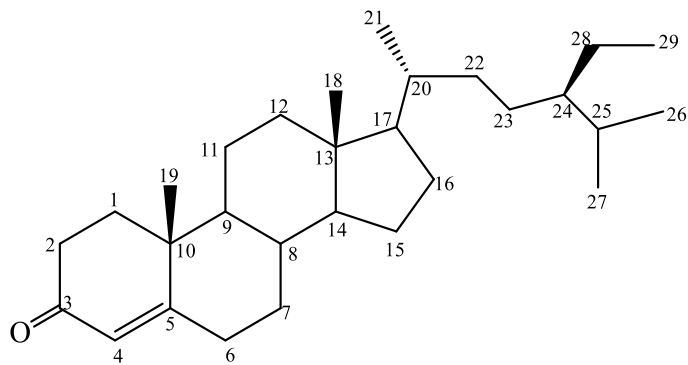


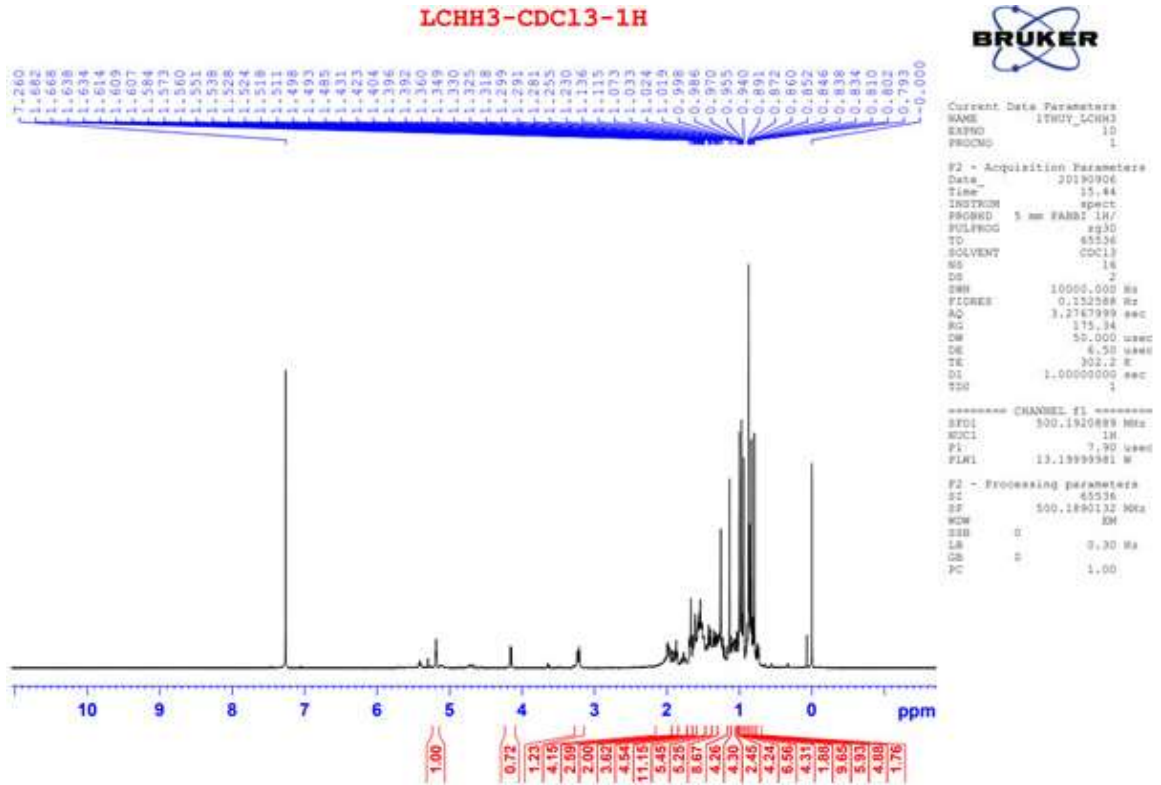
NHDNE1-DMSO-1H



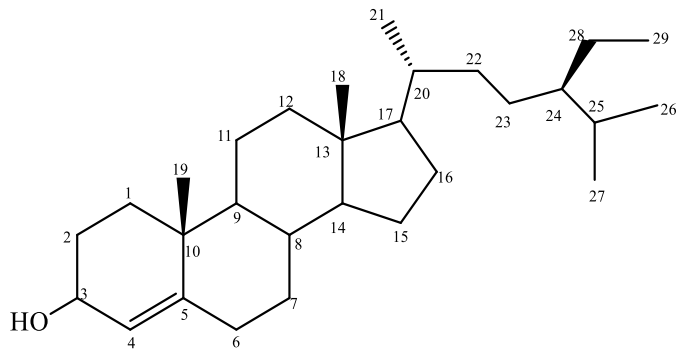


9. Phổ của chất **DN9**

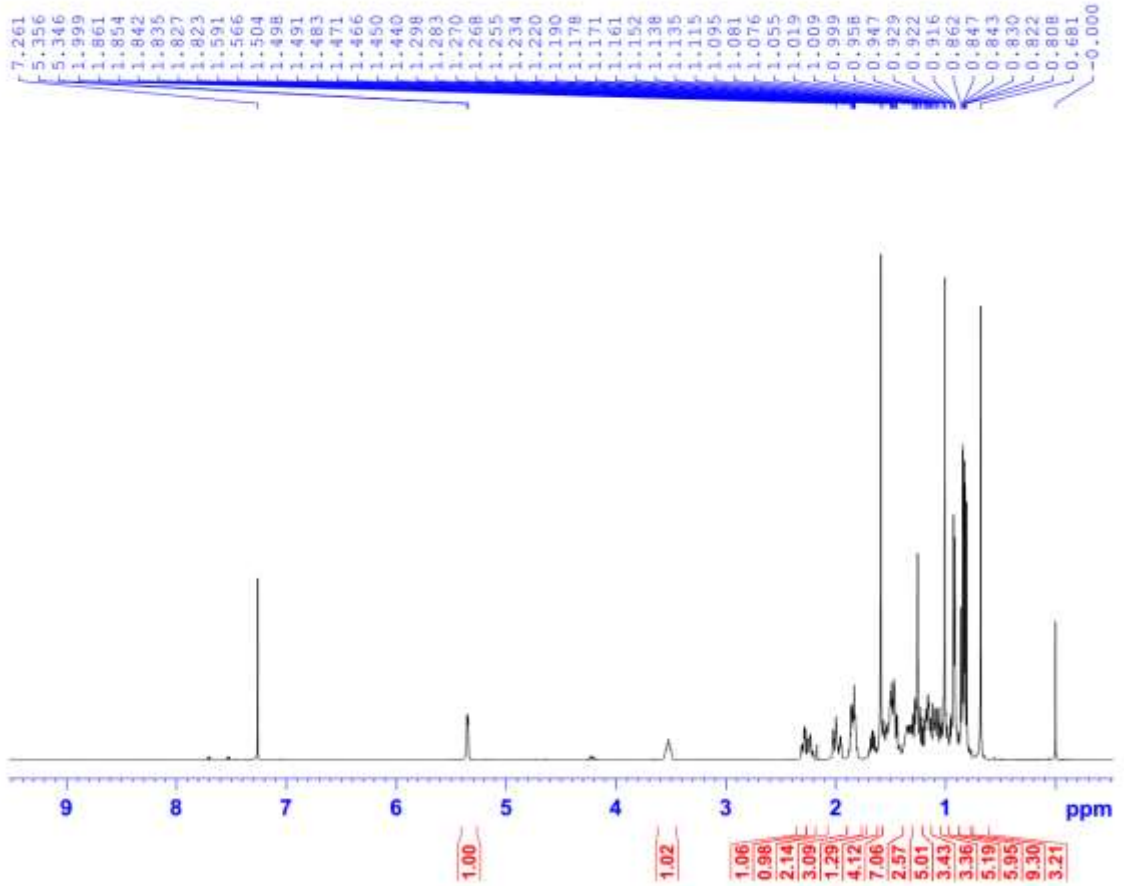




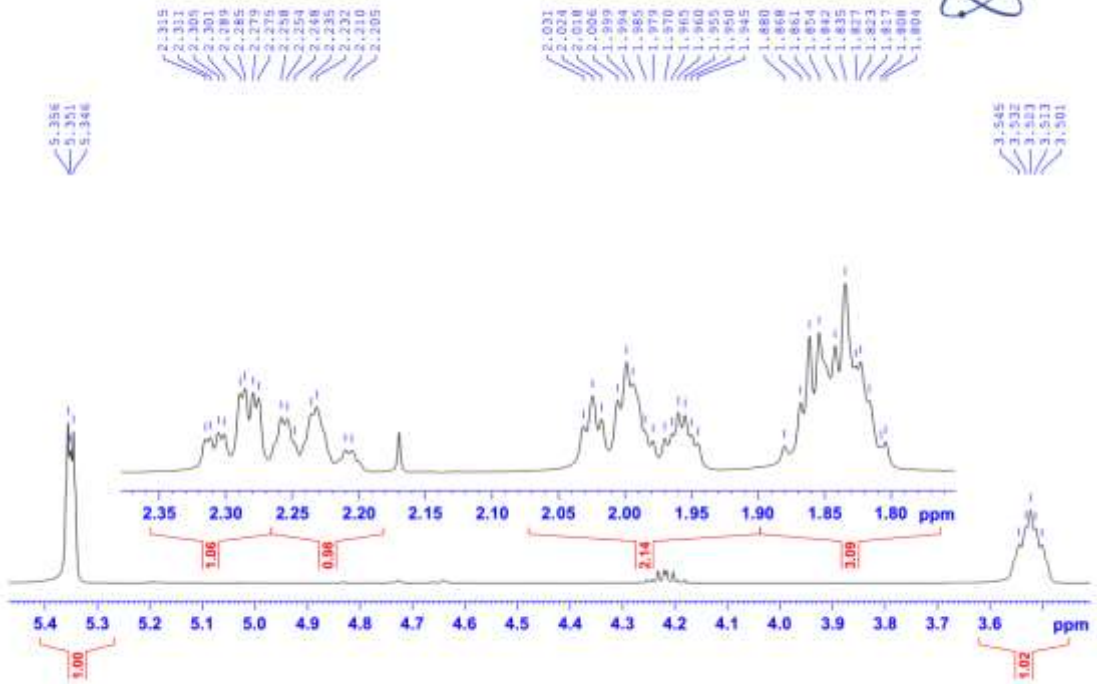
10. Phổ của chất DN10

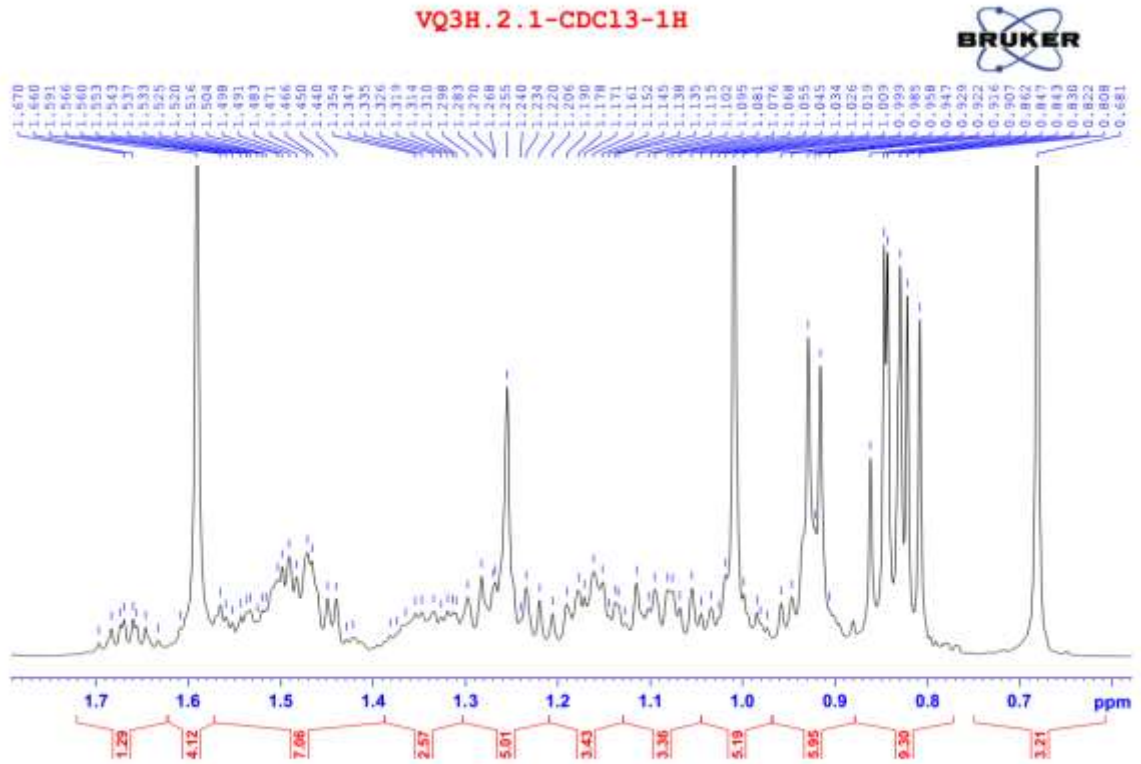


VQ3H.2.1-CDC13-1H

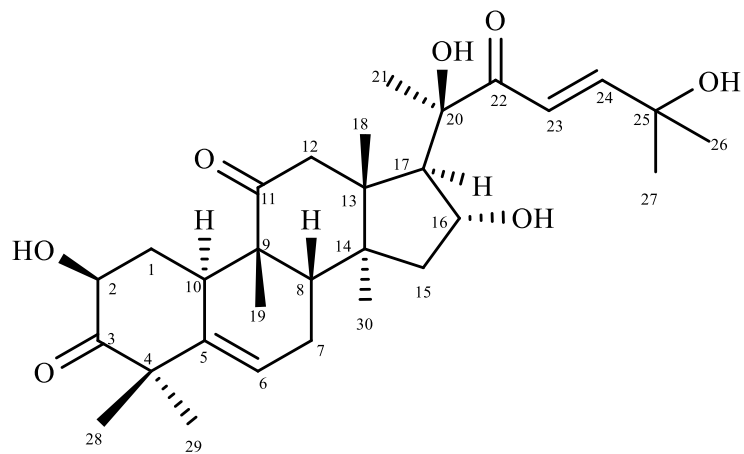


VQ3H.2.1-CDC13-1H

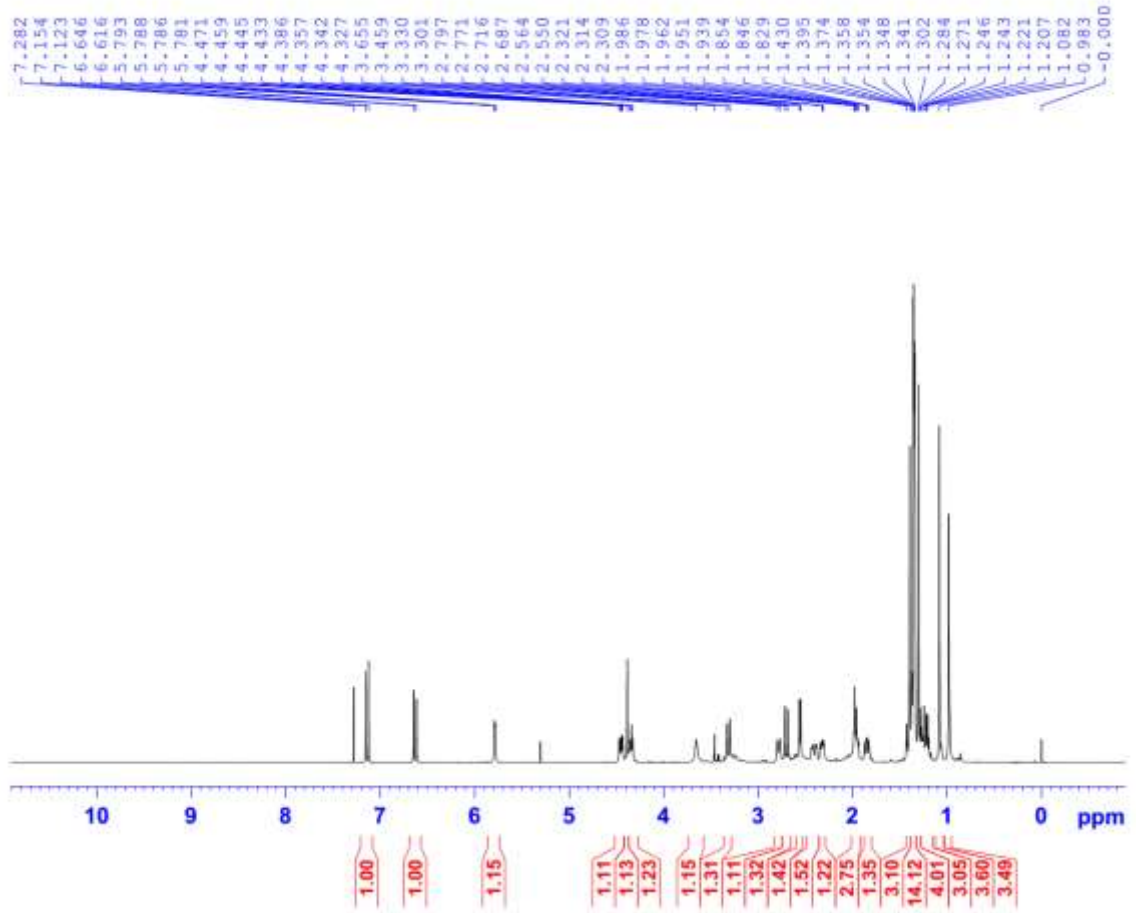




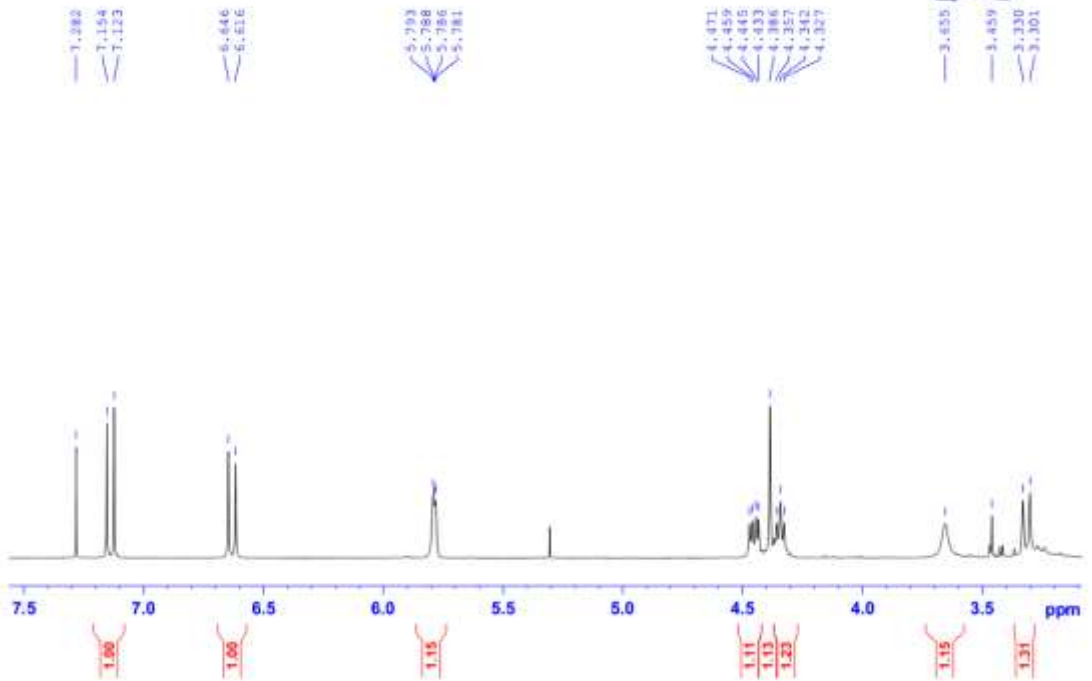
11. Phổ của chất **EH1**

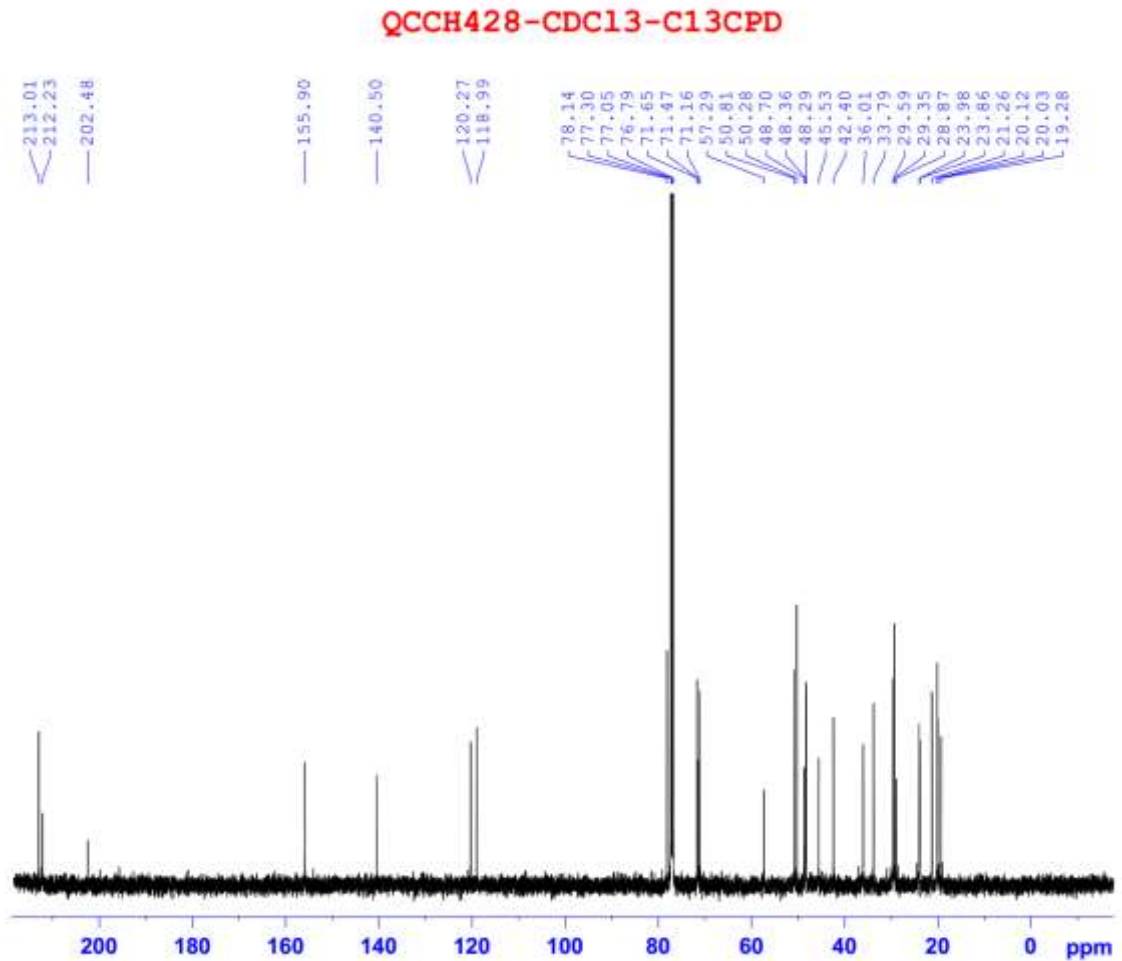
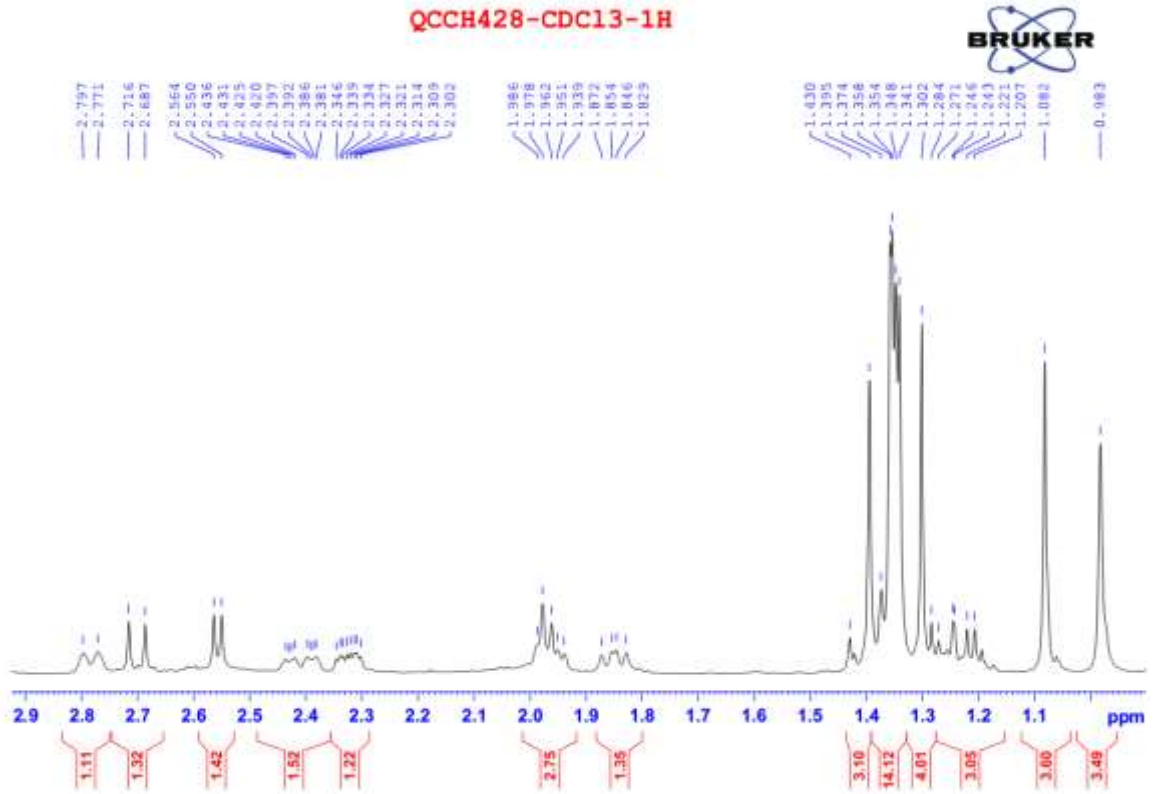


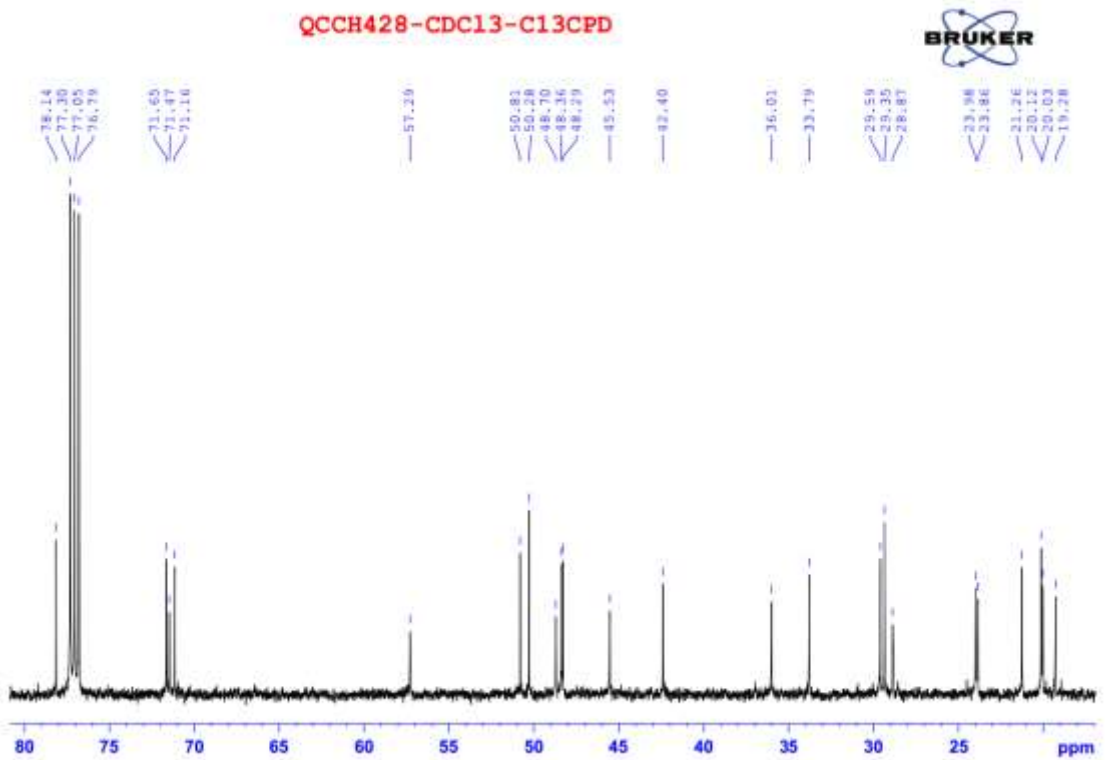
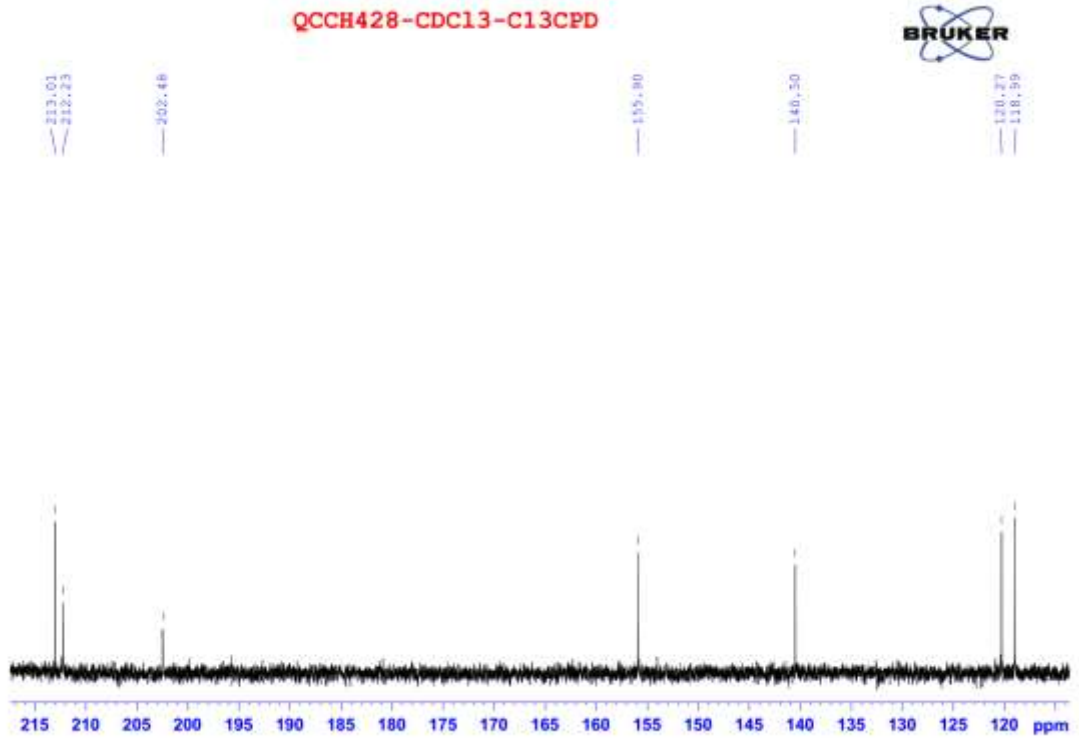
QCCH428-CDC13-1H

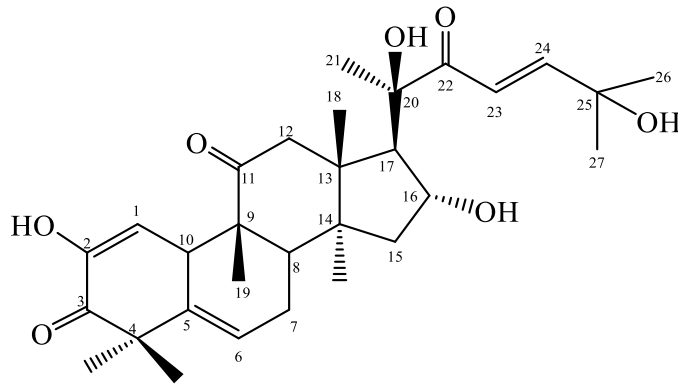


QCCH428-CDC13-1H

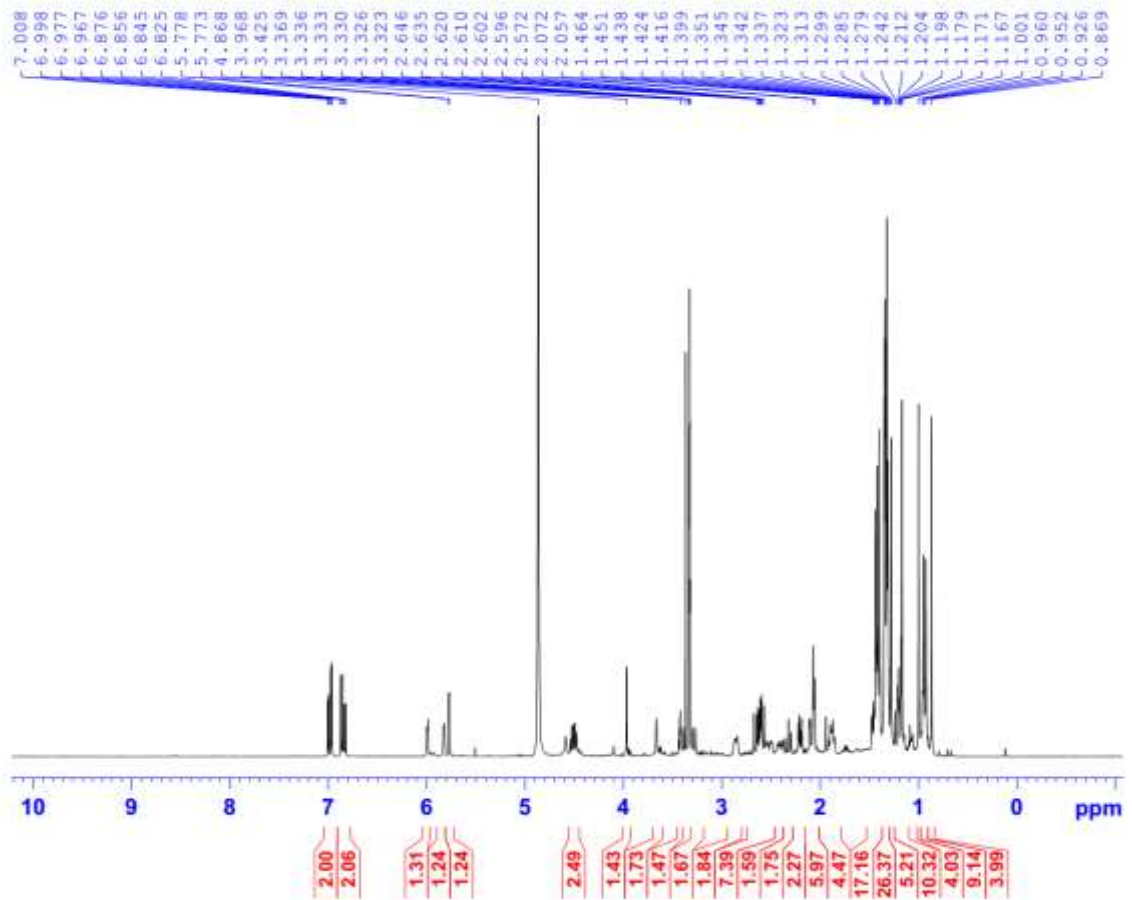


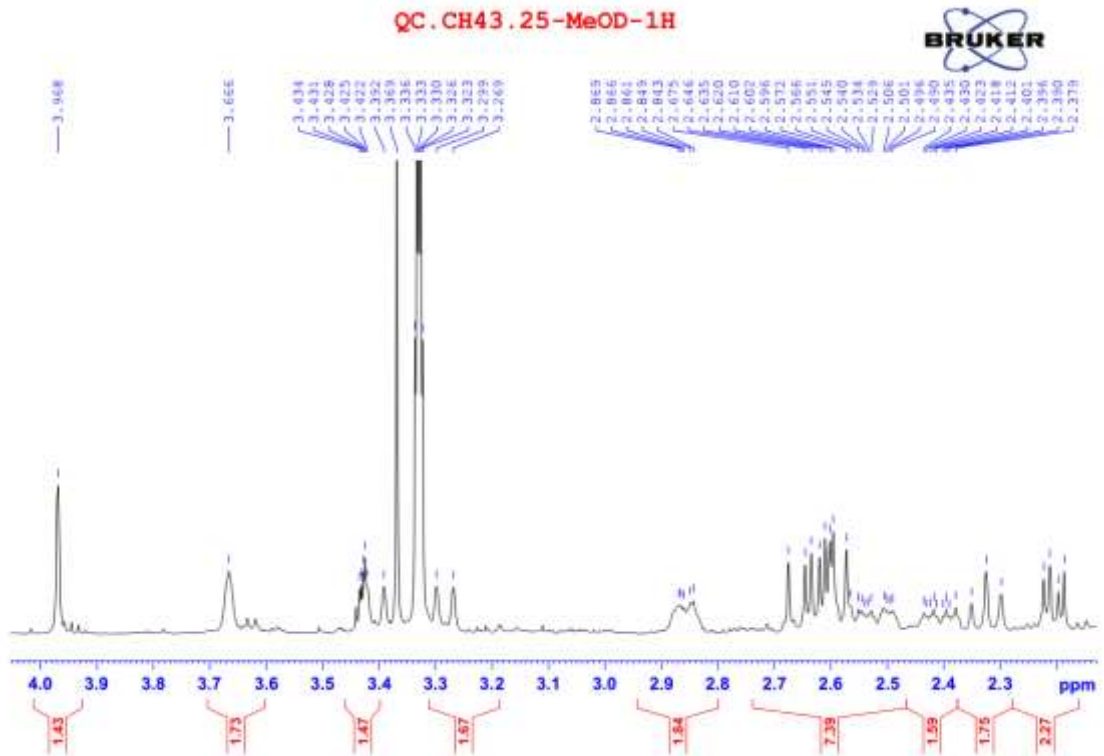
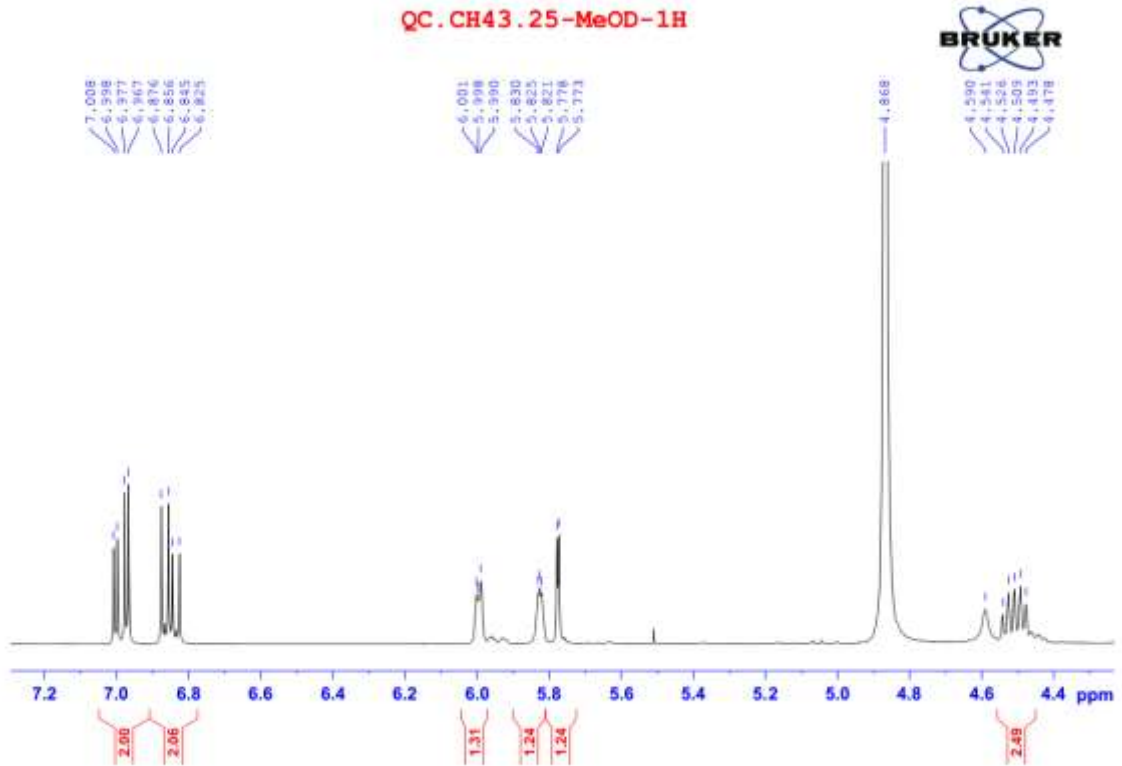




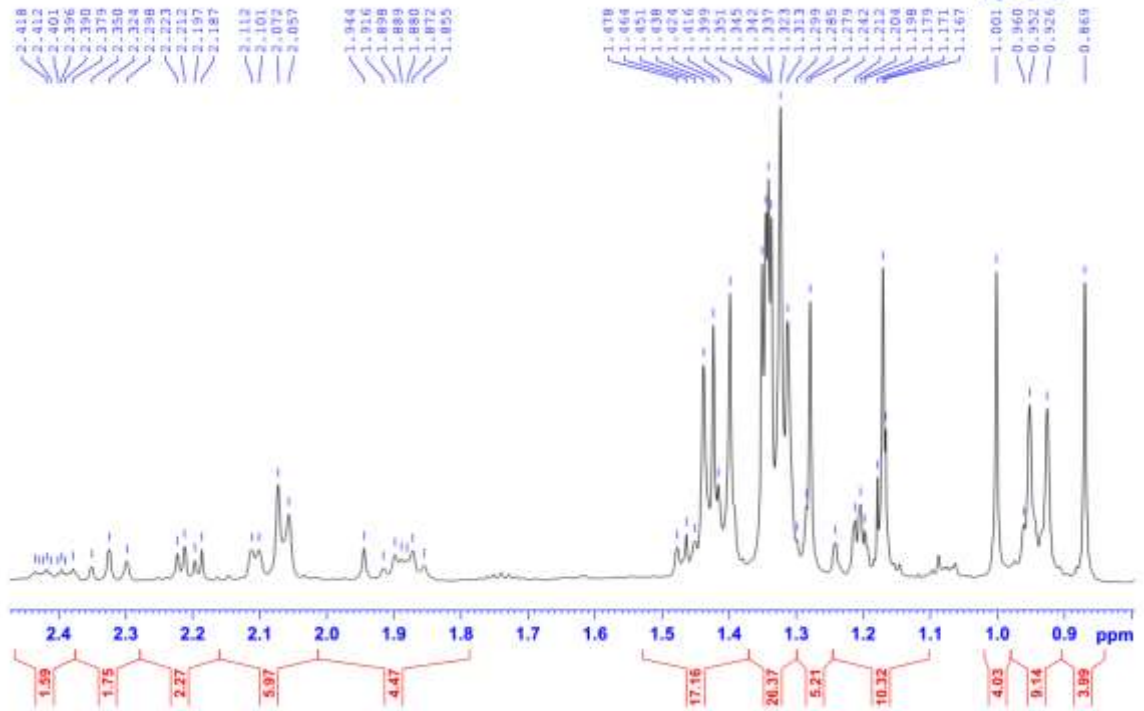
12. Phổ của hợp chất **EH2**

QC.CH43.25-MeOD-1H

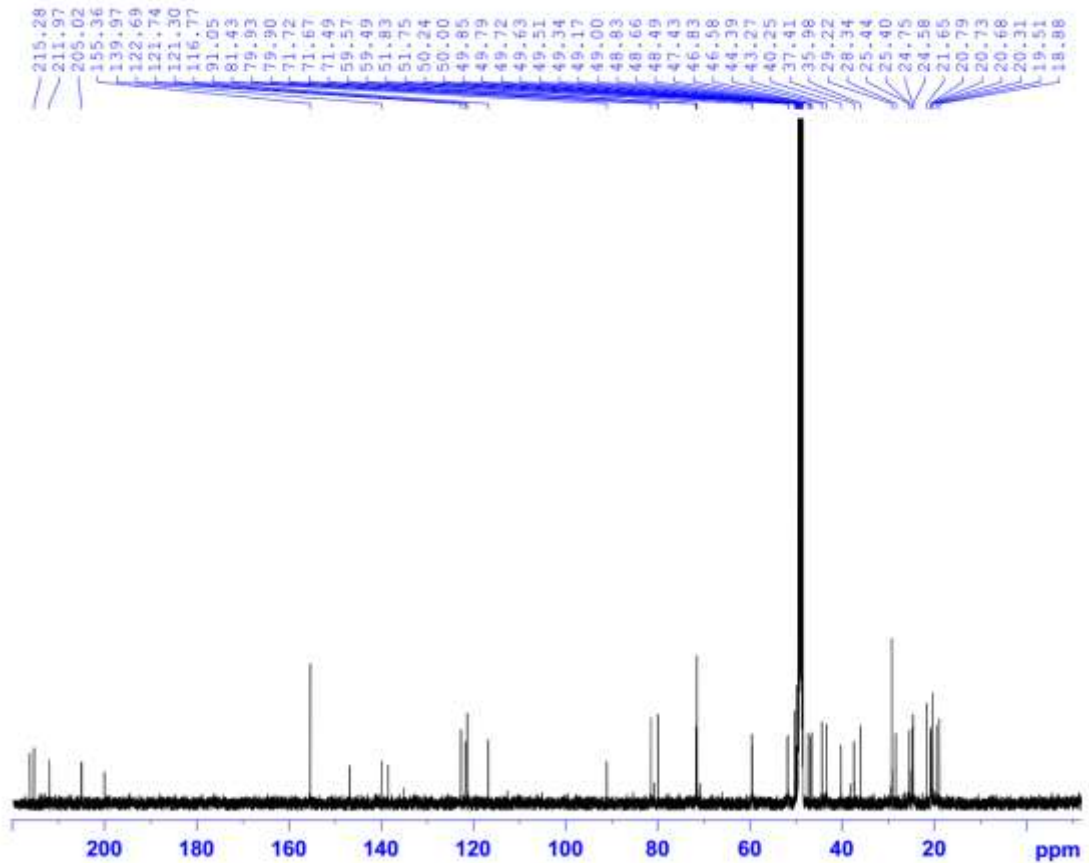


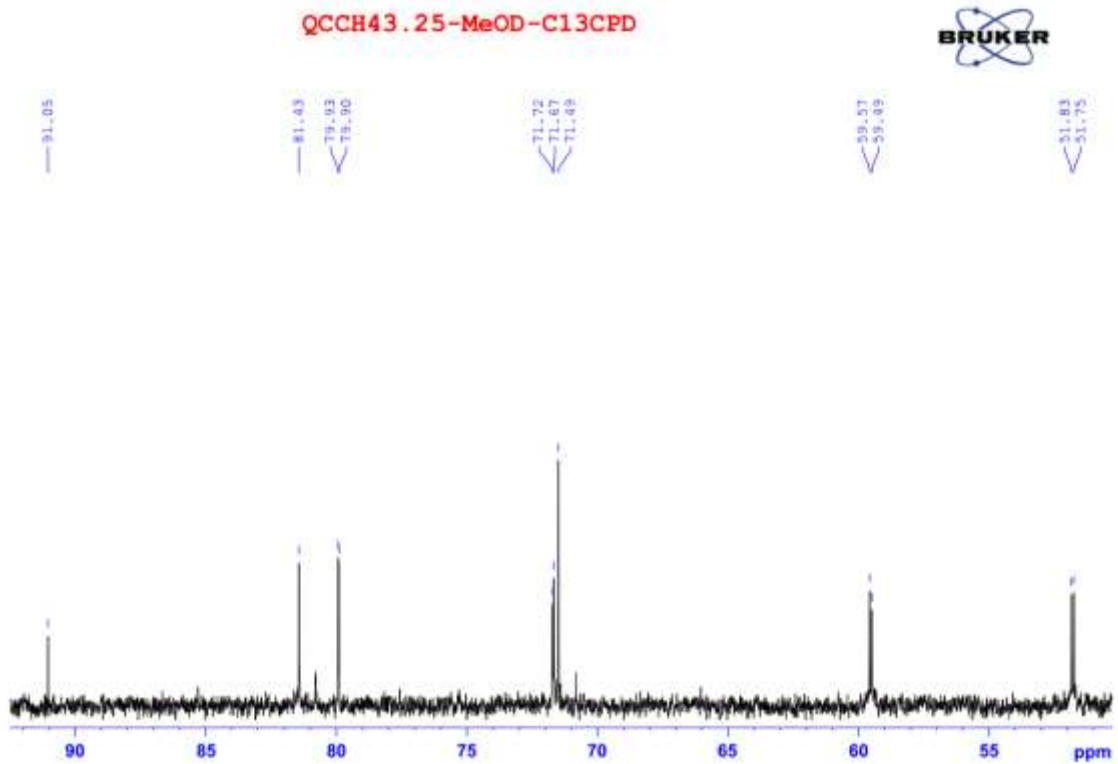
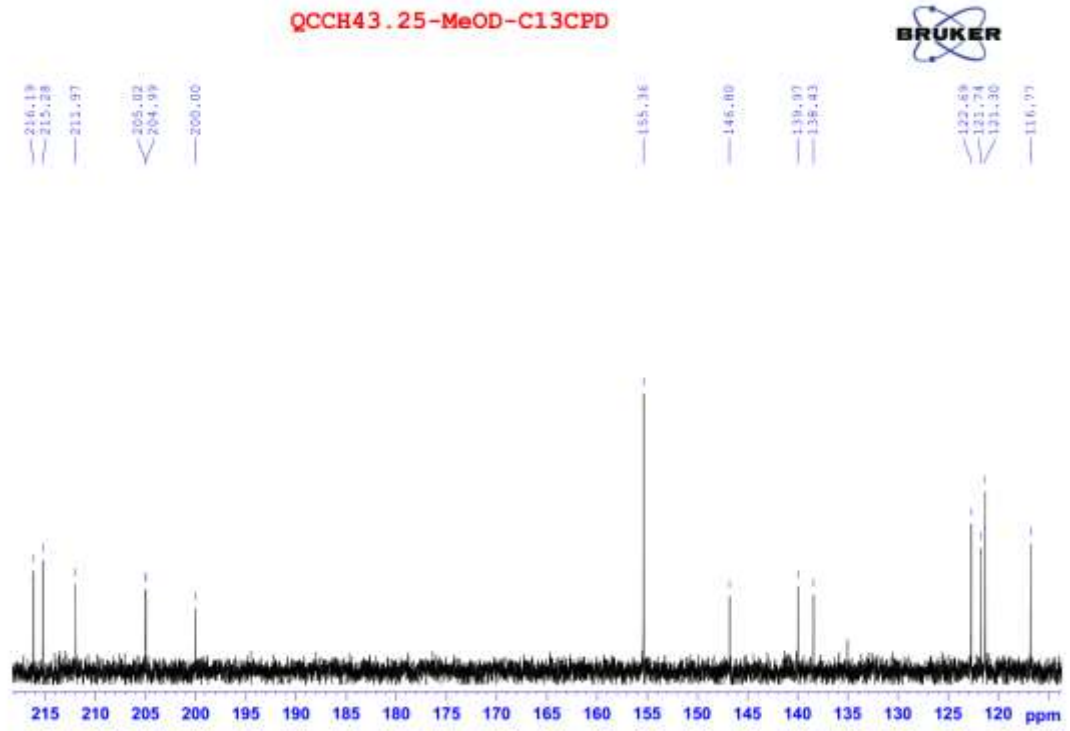


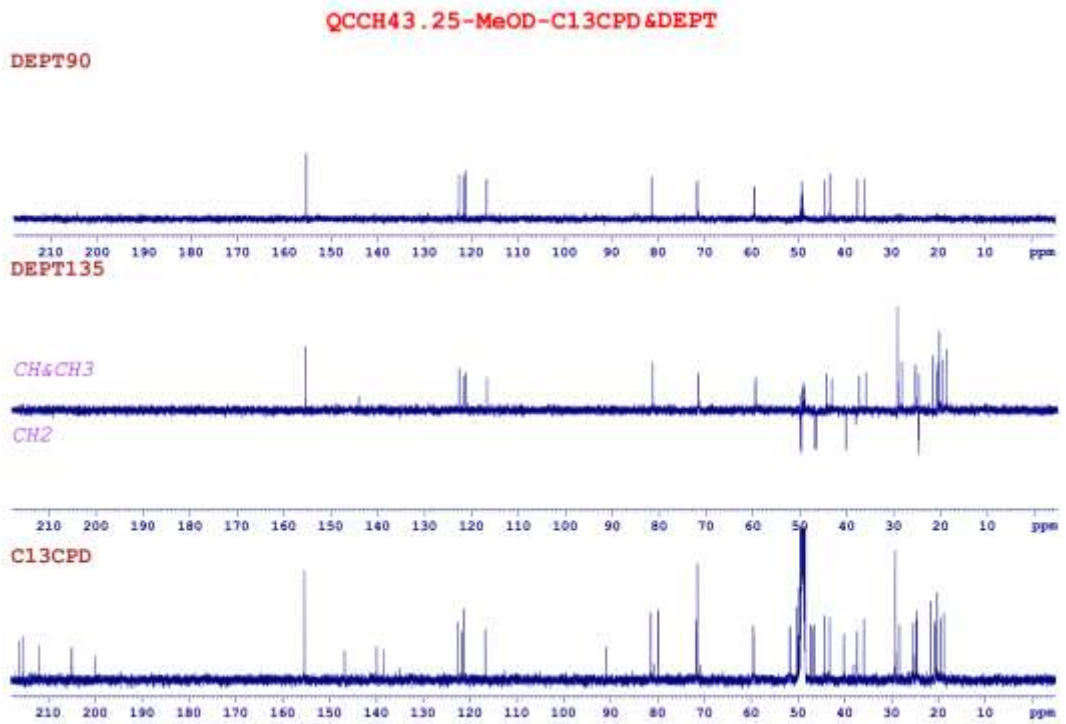
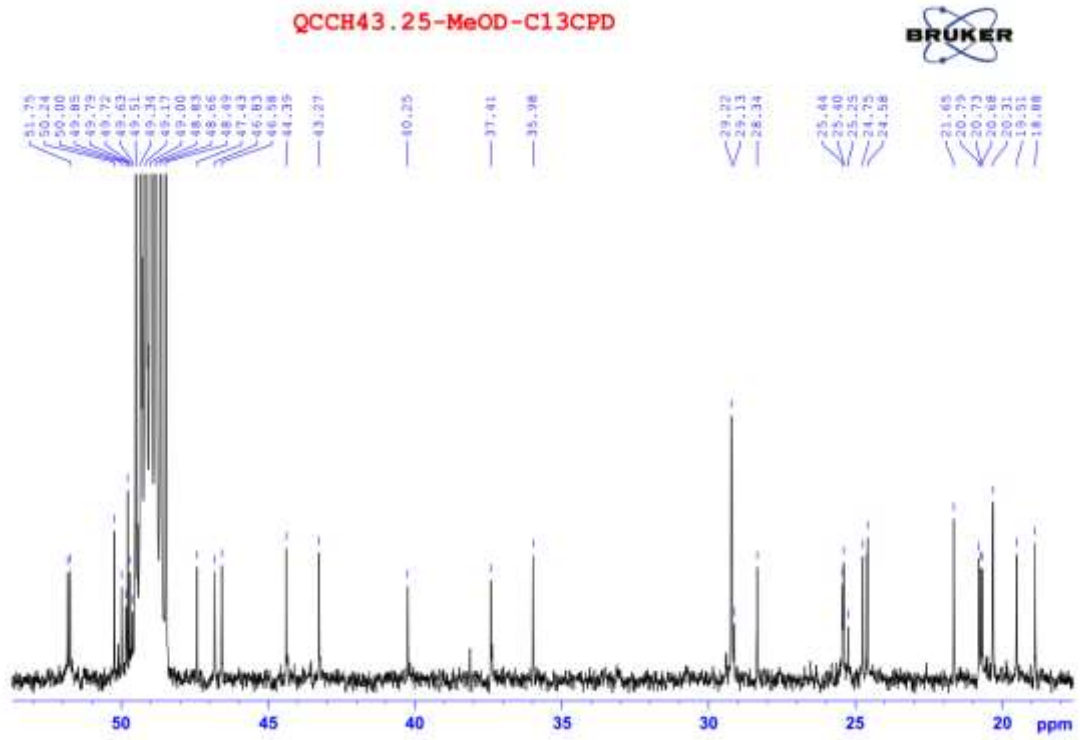
QC.CH43.25-MeOD-1H



QCCH43.25-MeOD-C13CPD

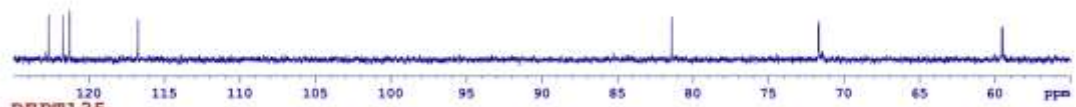




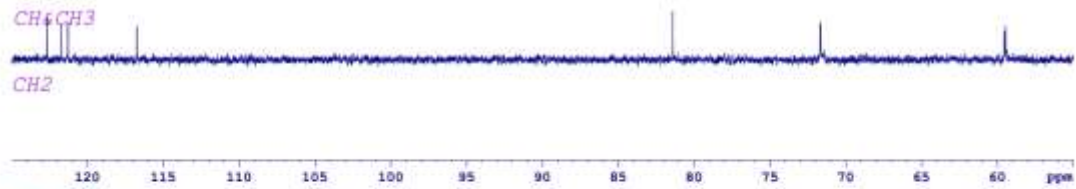


QCCH43.25-MeOD-C13CPD&DEPT

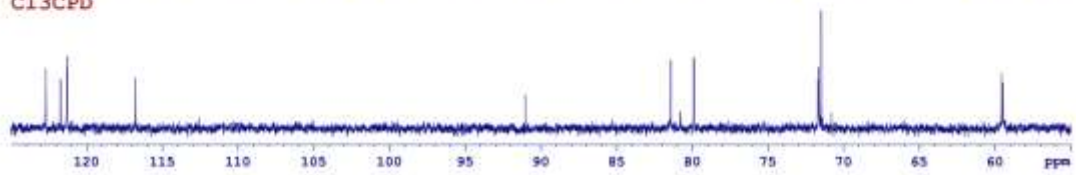
DEPT90



DEPT135

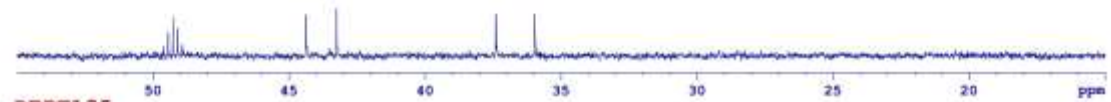


C13CPD



QCCH43.25-MeOD-C13CPD&DEPT

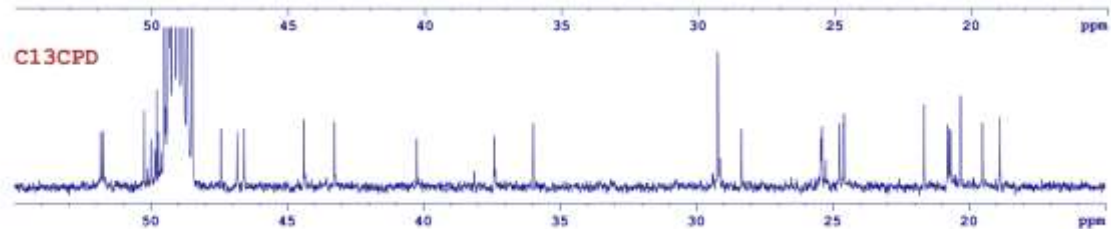
DEPT90

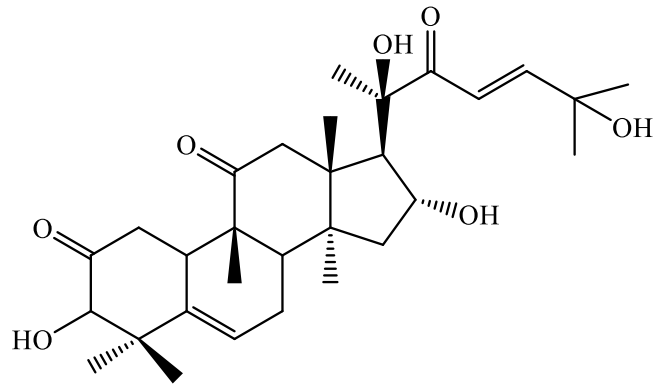


DEPT135

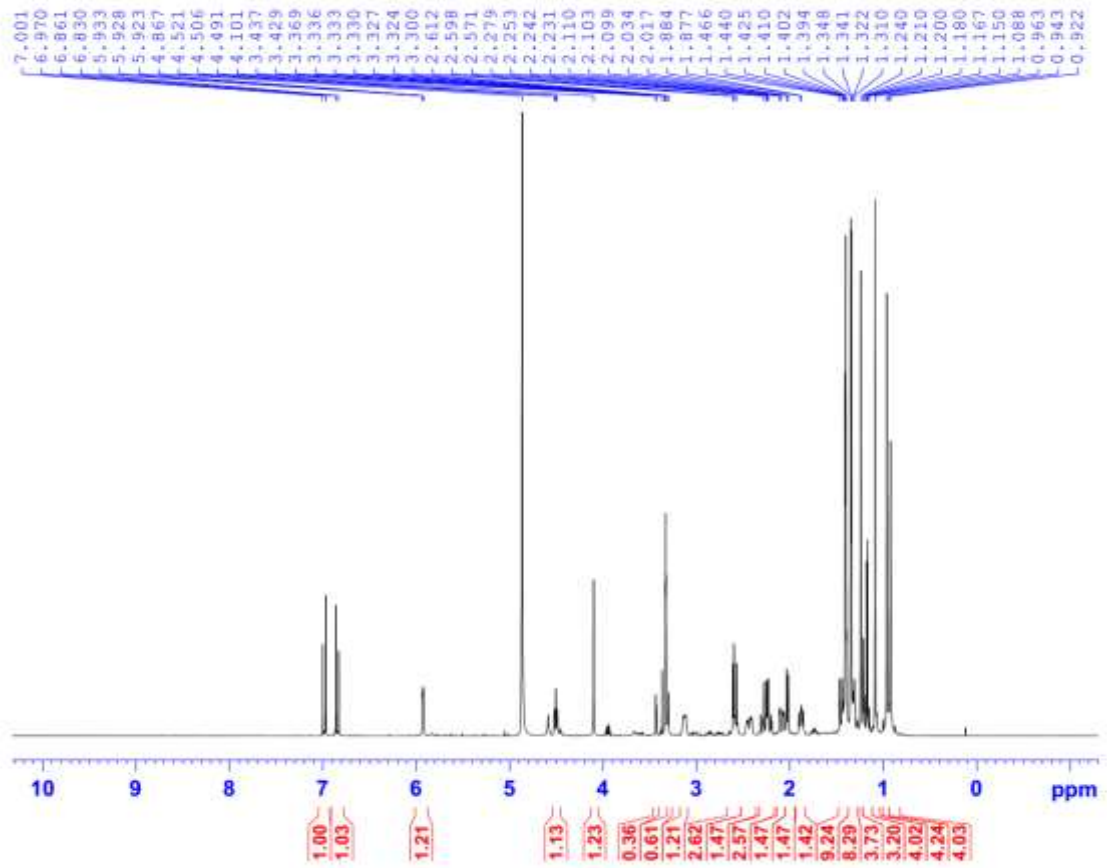


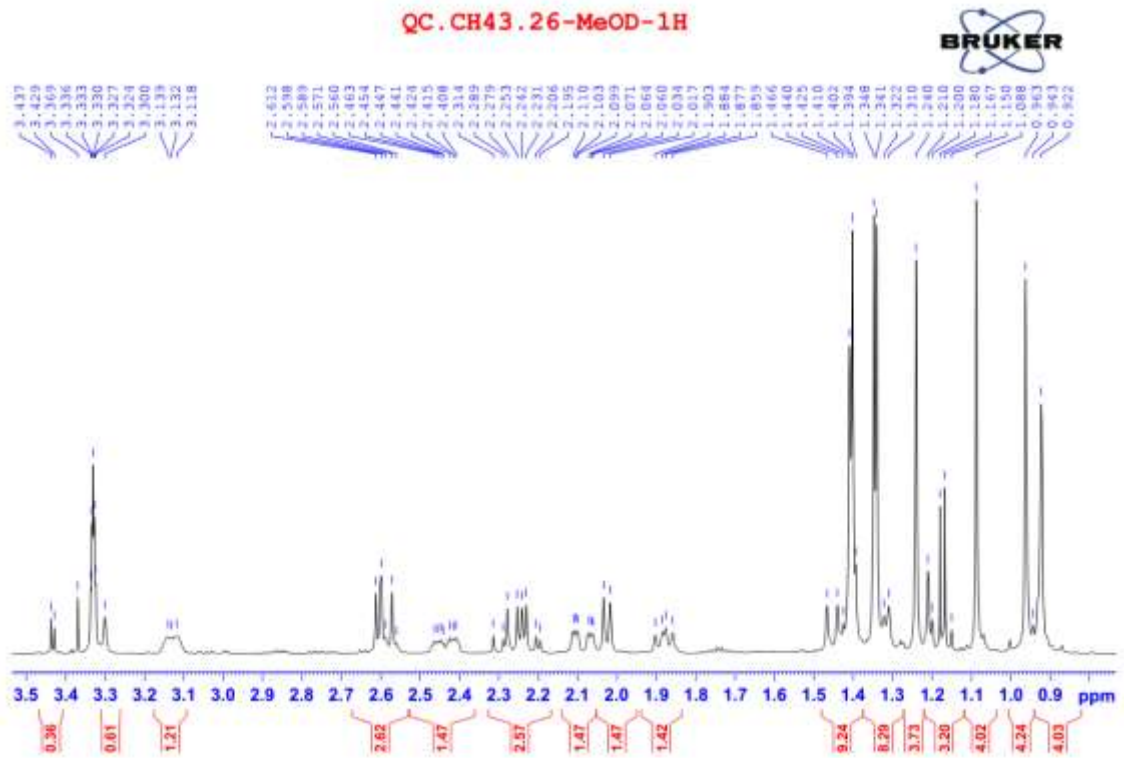
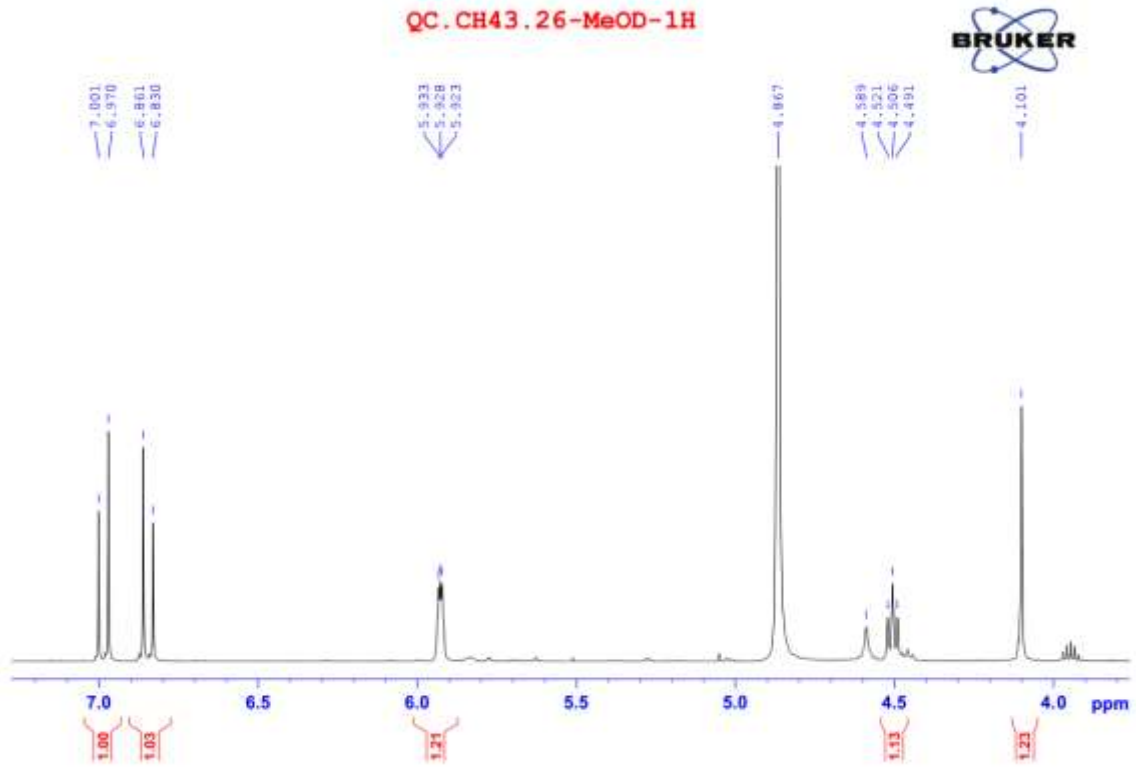
C13CPD



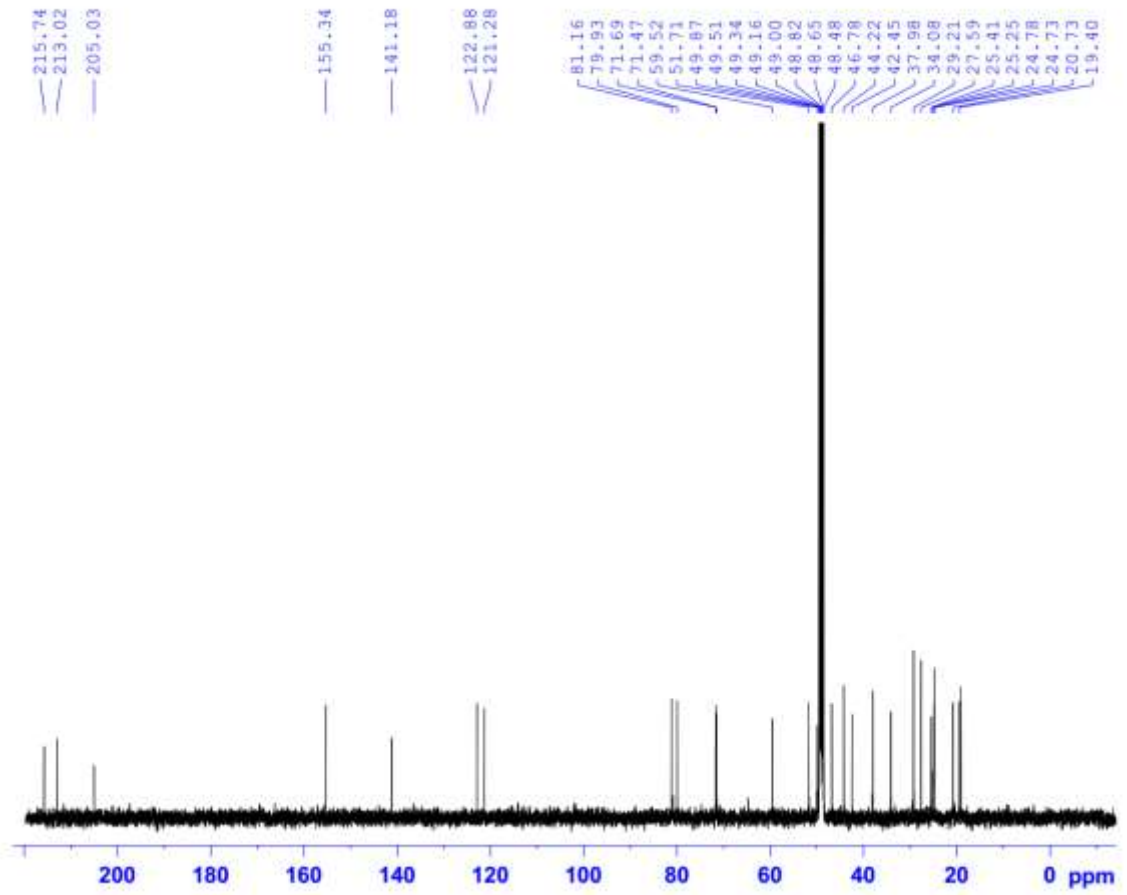
13. Phổ của hợp chất **EH3**

QC.CH43.26-MeOD-1H

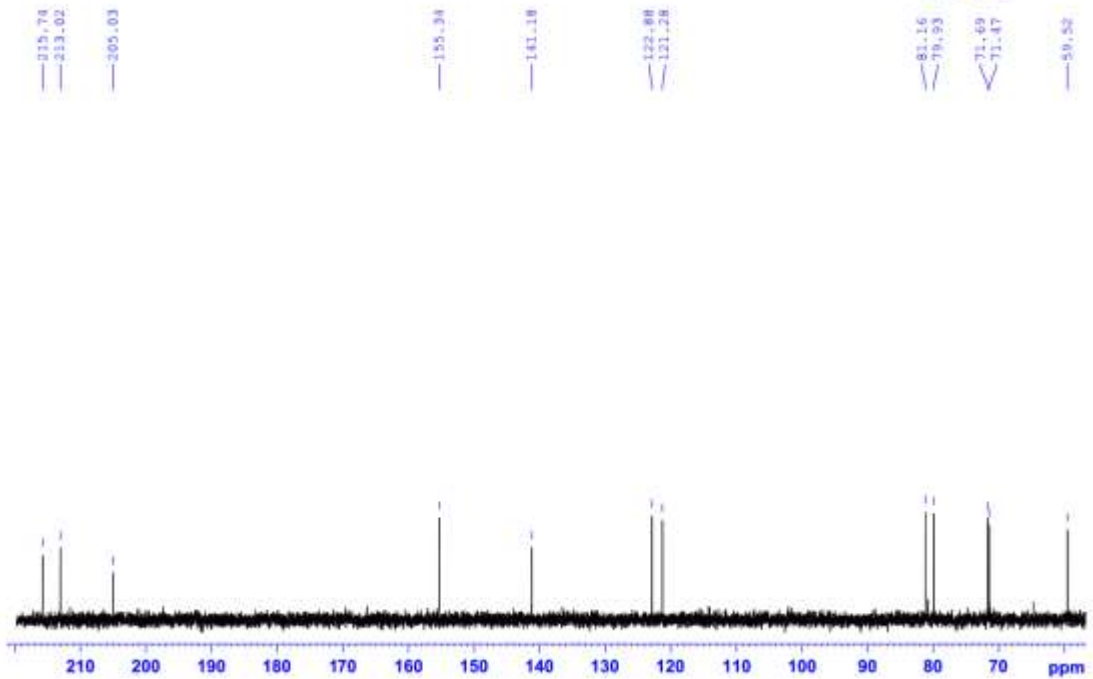


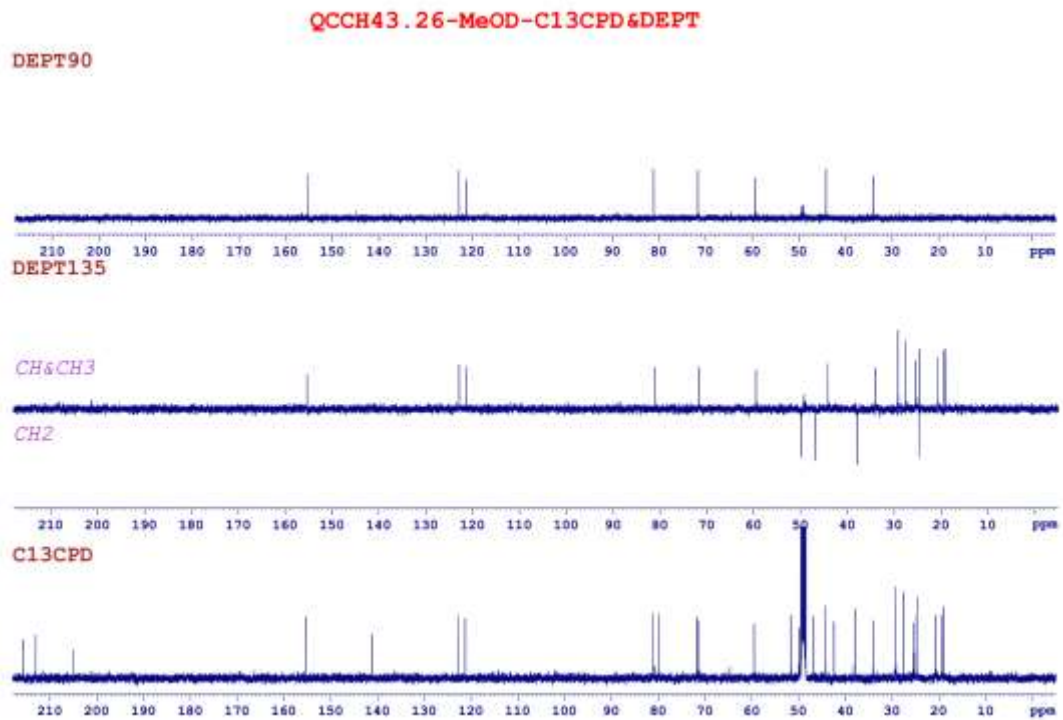
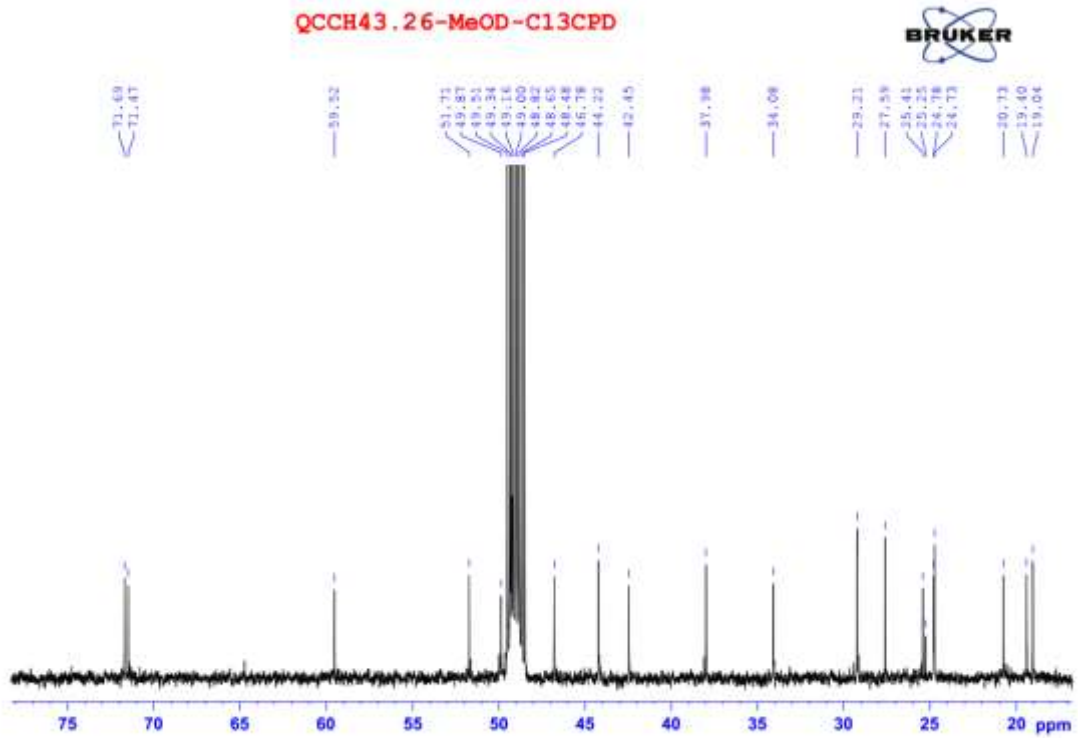


QCCH43.26-MeOD-C13CPD



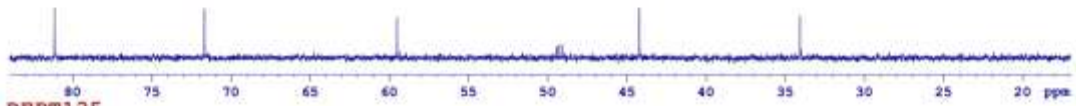
QCCH43.26-MeOD-C13CPD





QCCH43. 26-MeOD-C13CPD&DEPT

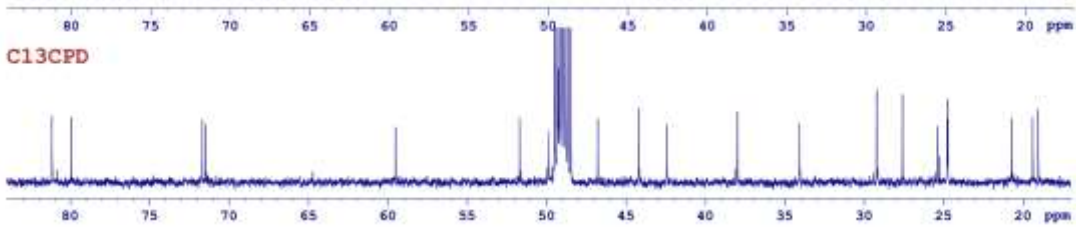
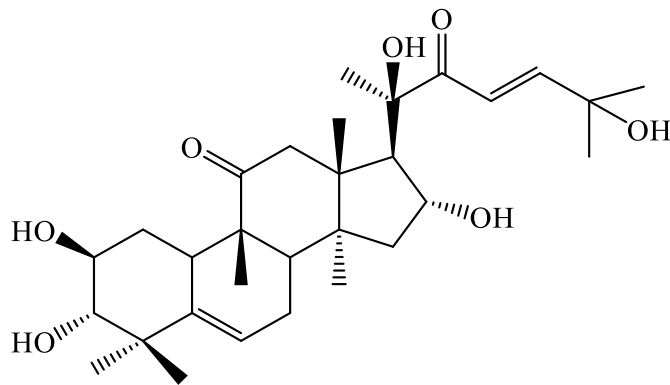
DEPT90



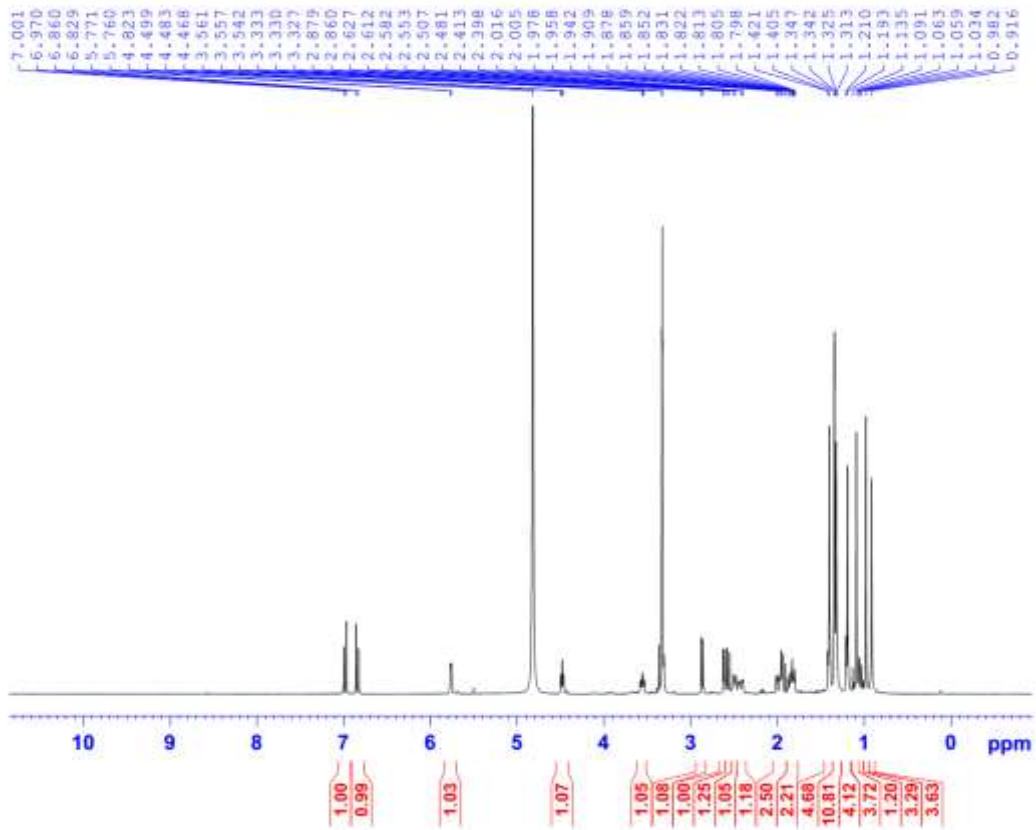
DEPT135



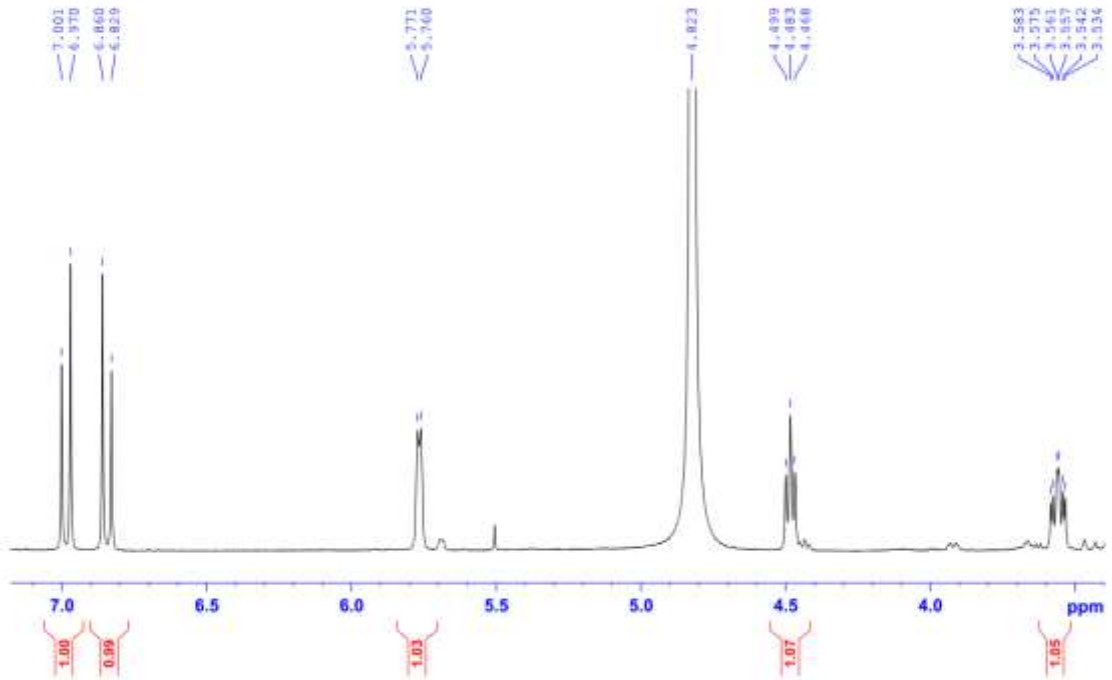
C13CPD

14. Phổ của hợp chất **EH4**

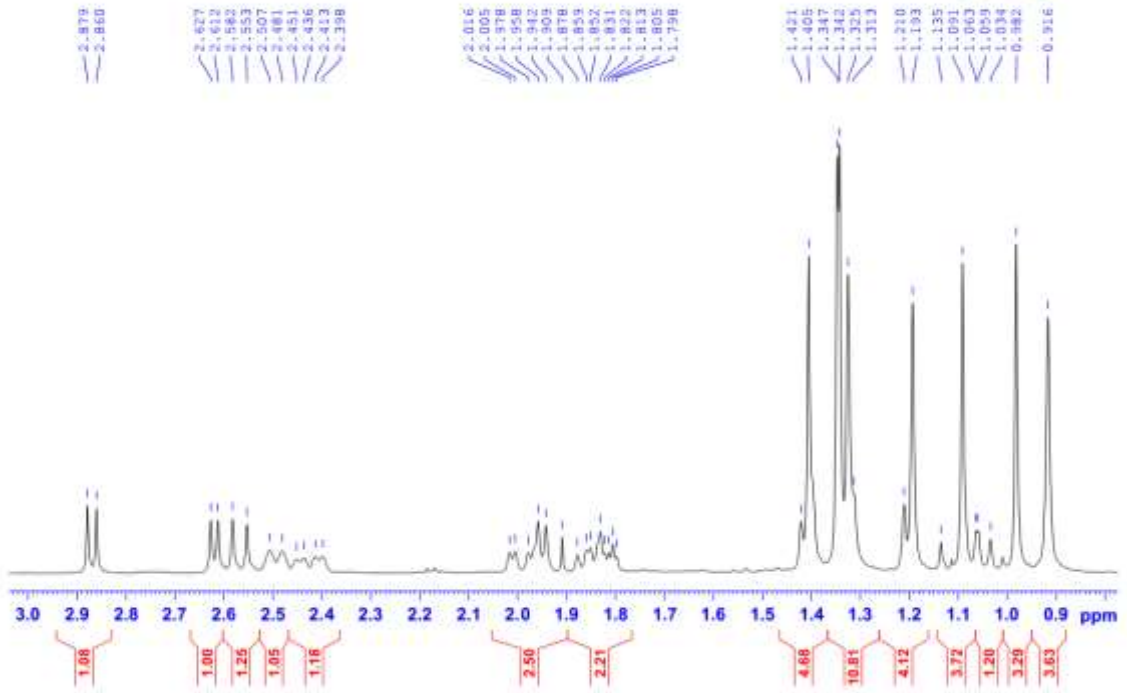
QCCH4210A-MeOD-1H



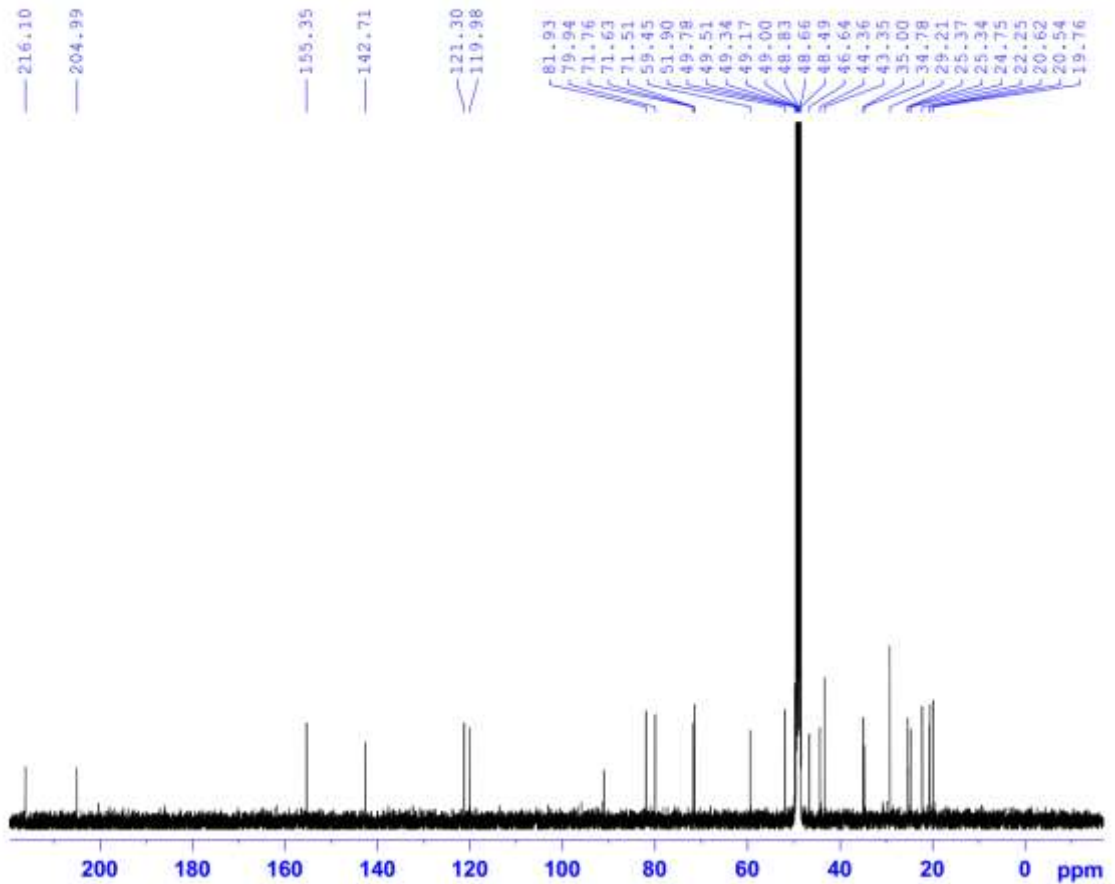
QCCH4210A-MeOD-1H

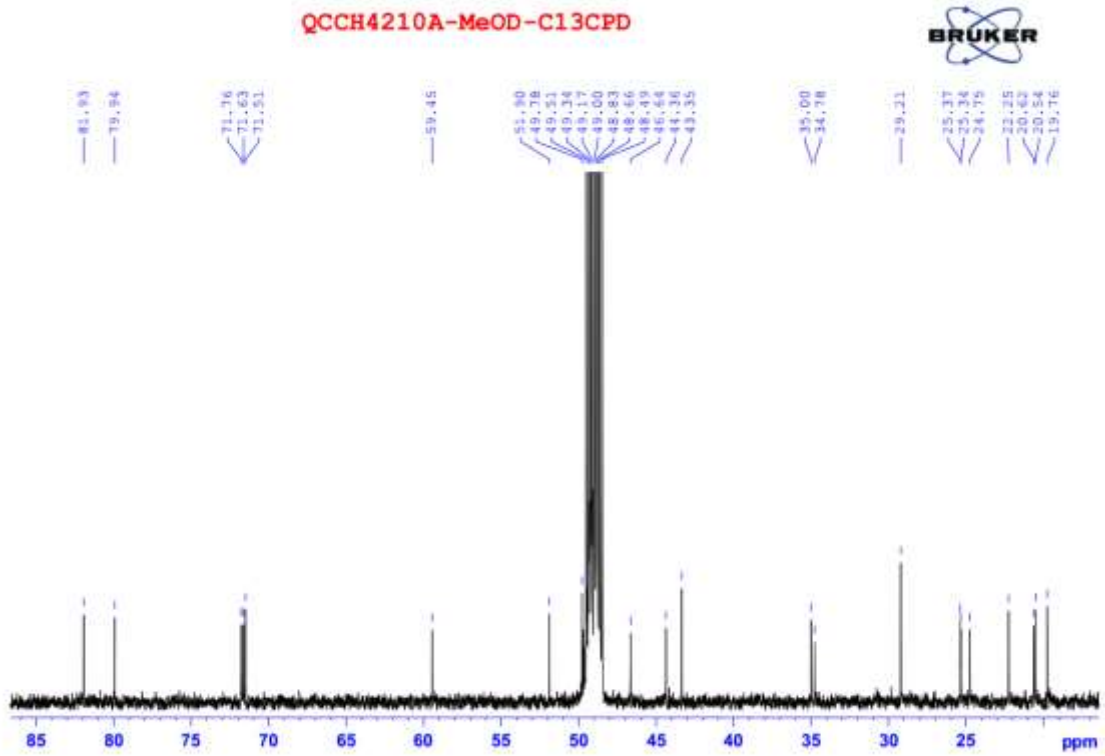


QCCH4210A-MeOD-1H

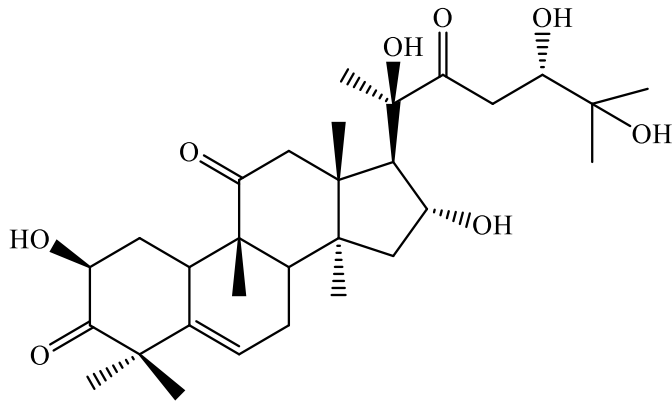


QCCH4210A-MeOD-C13CPD

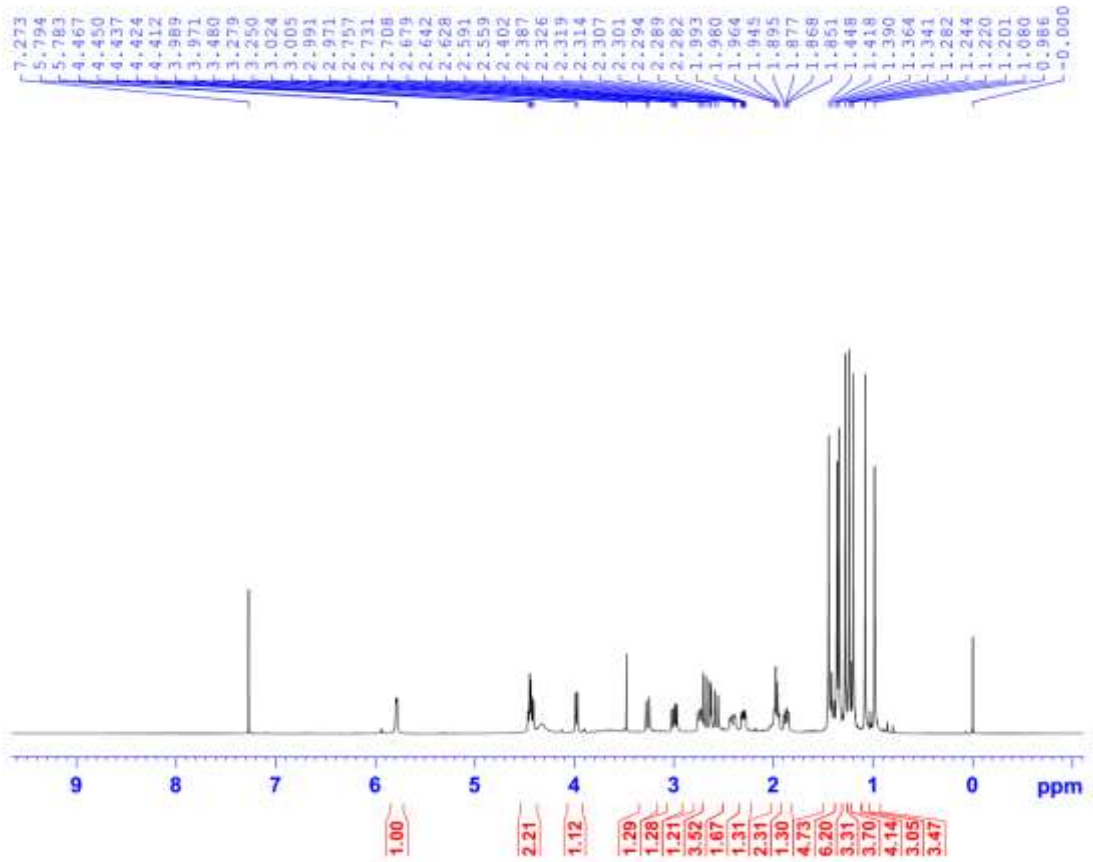




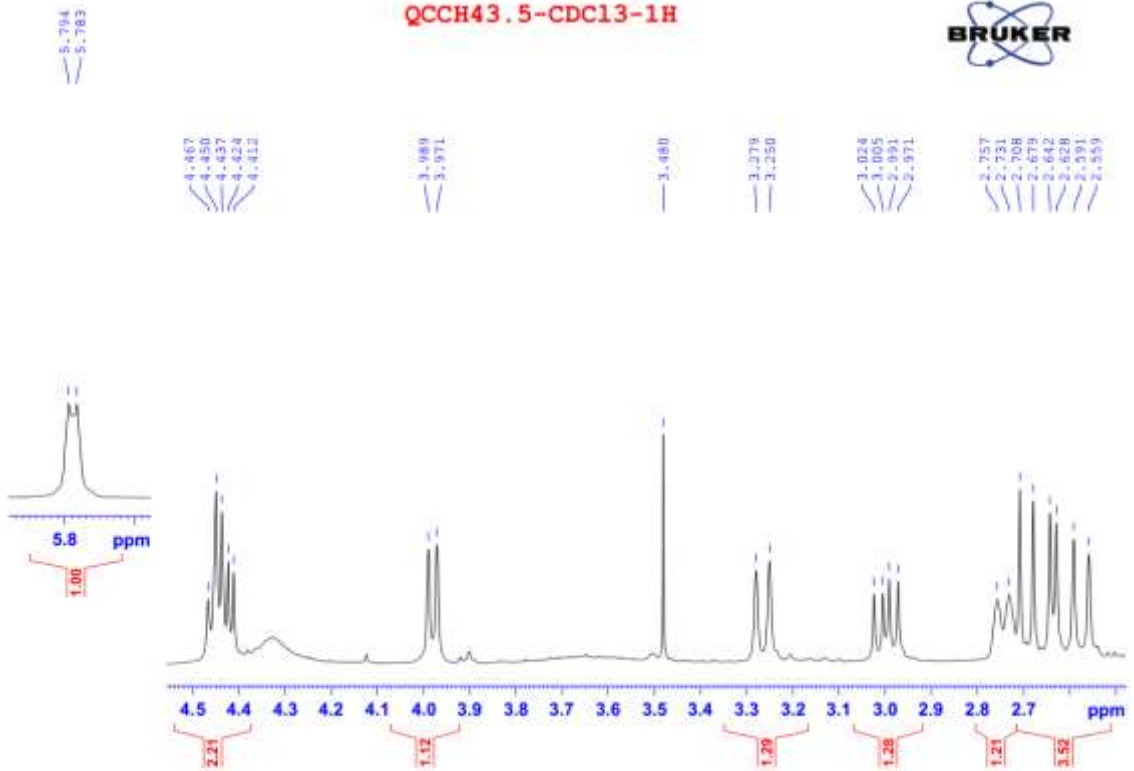
15. Phổ của hợp chất **EH5**



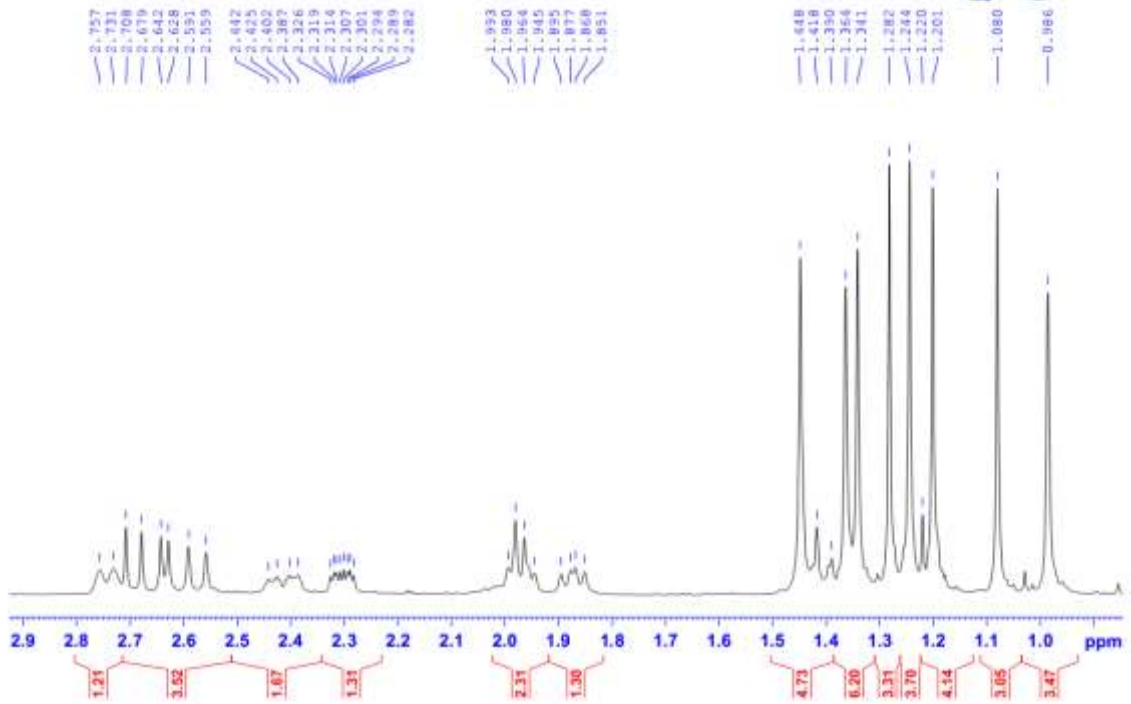
QCCH43.5-CDC13-1H



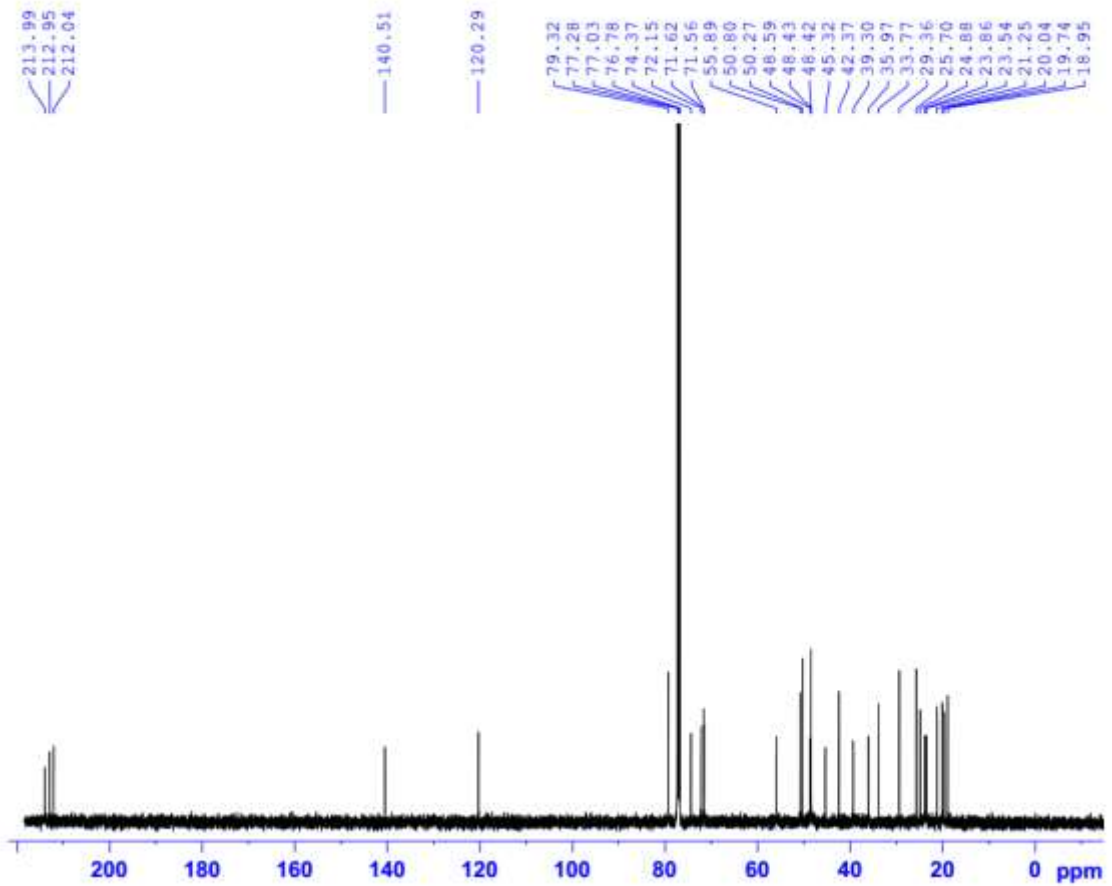
QCCH43.5-CDC13-1H

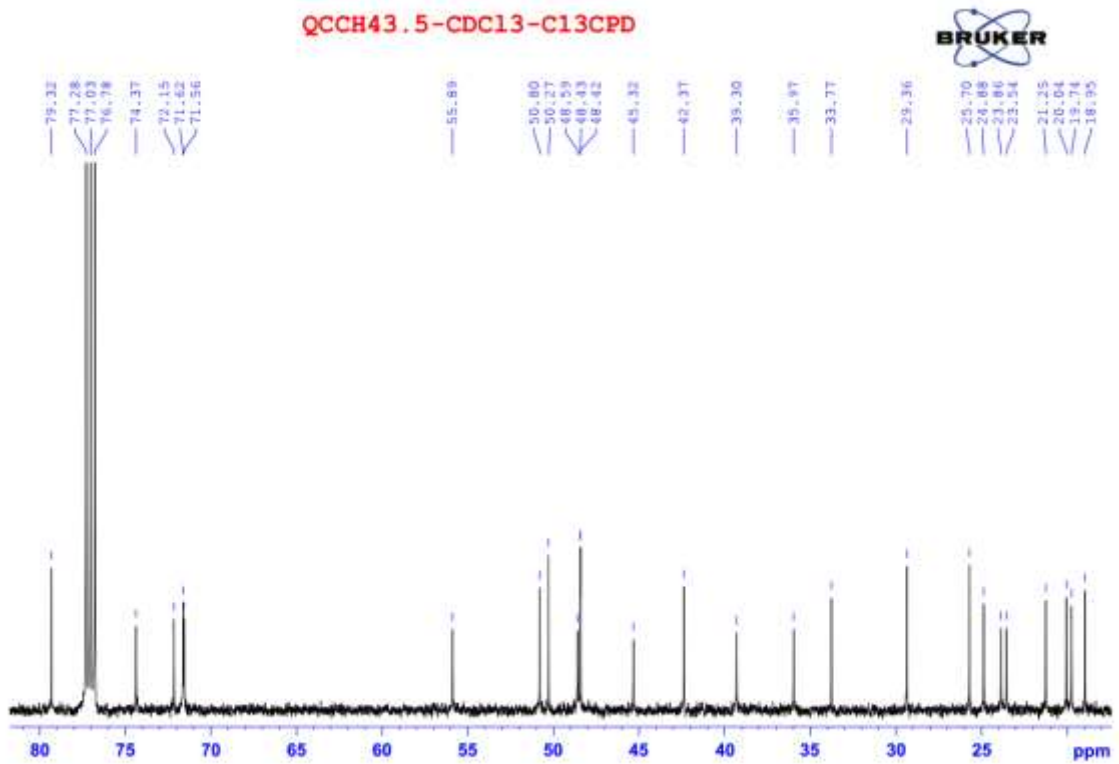
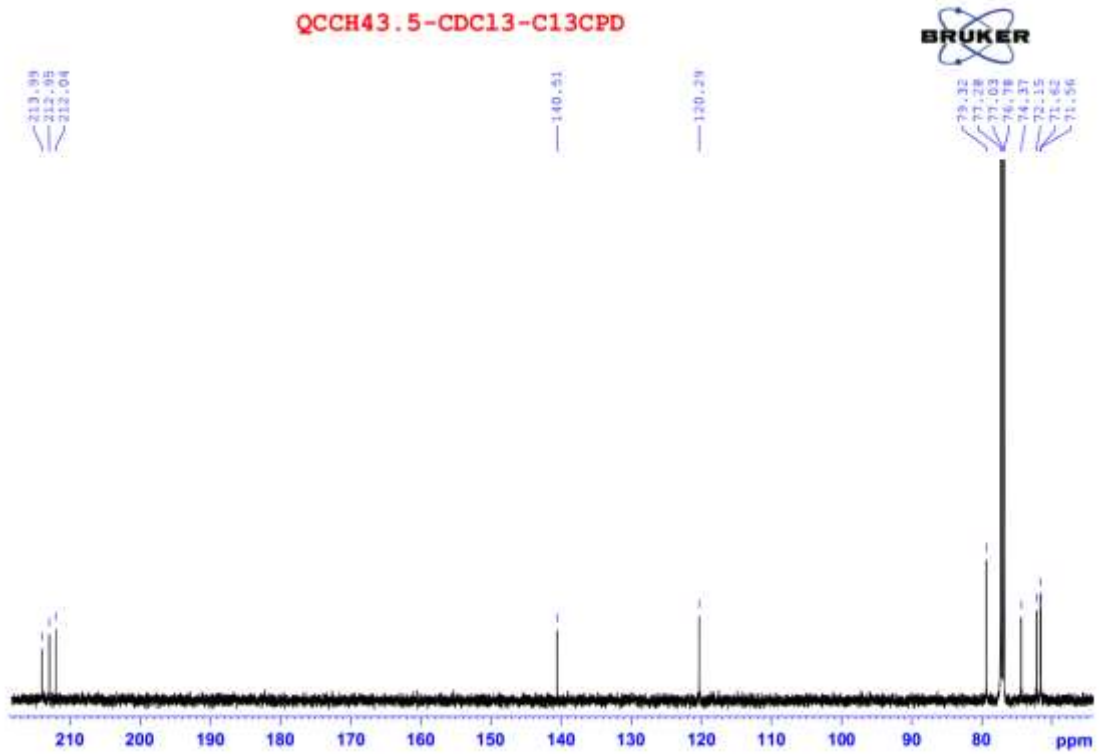


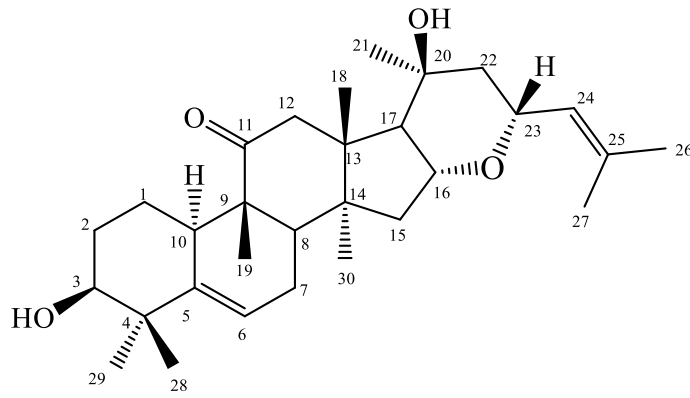
QCCH43.5-CDC13-1H



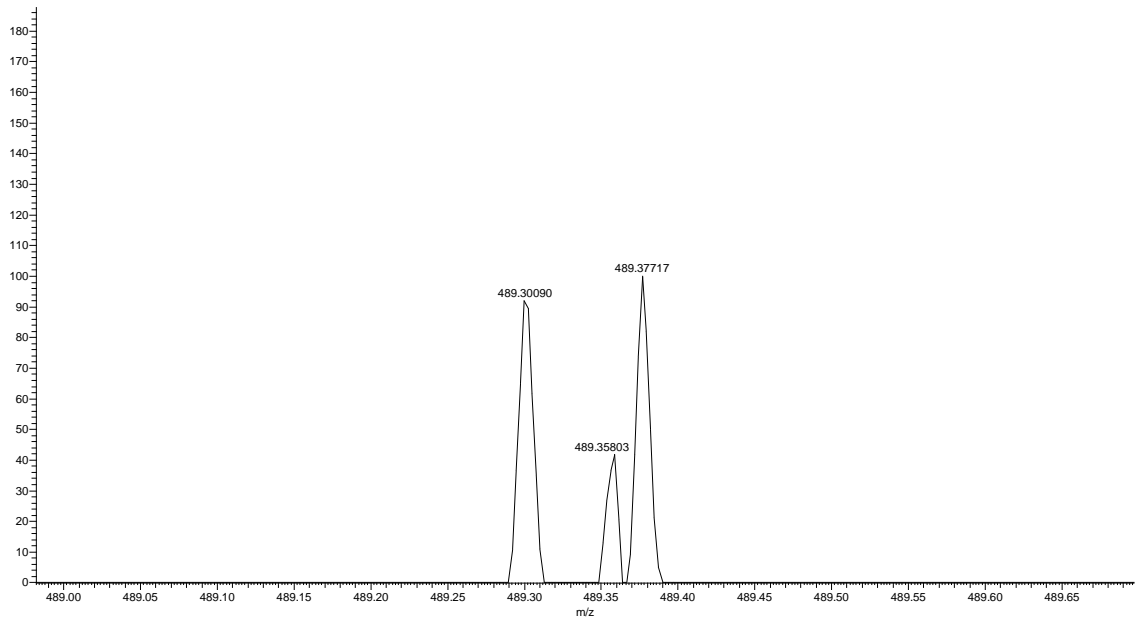
QCCH43.5-CDC13-C13CPD



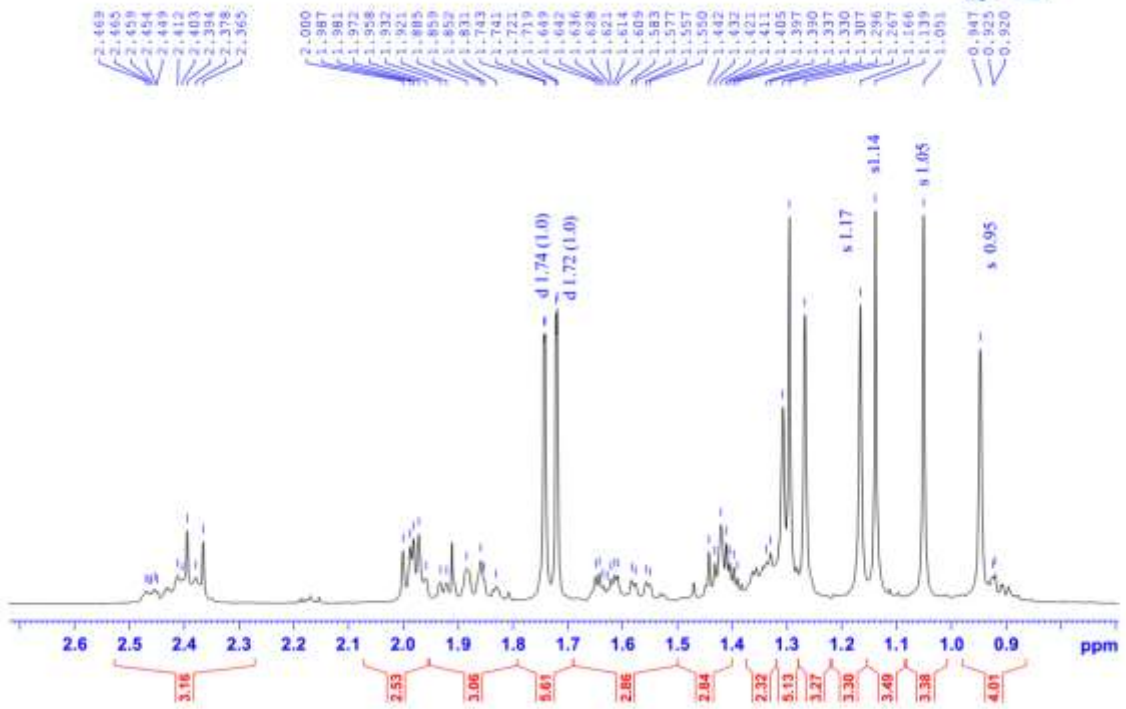


16. Phổ của hợp chất **EH6**

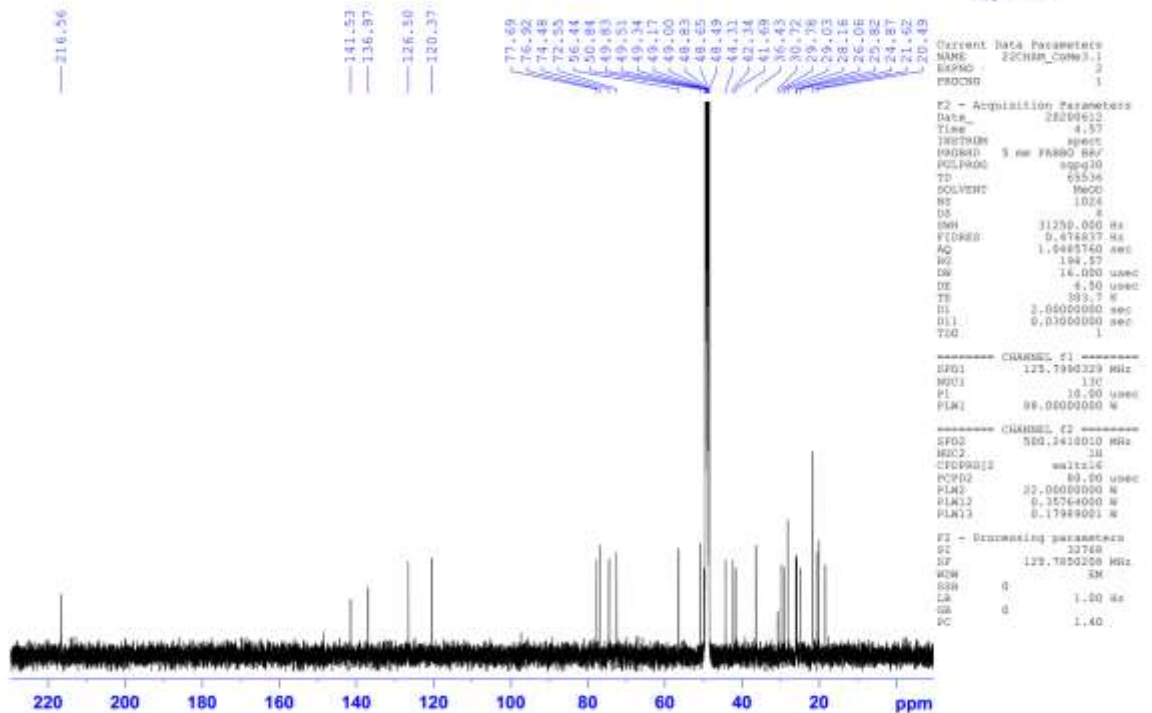
2P #37 RT: 0.17 AV: 1 NL: 6.15E5
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1200.0000]

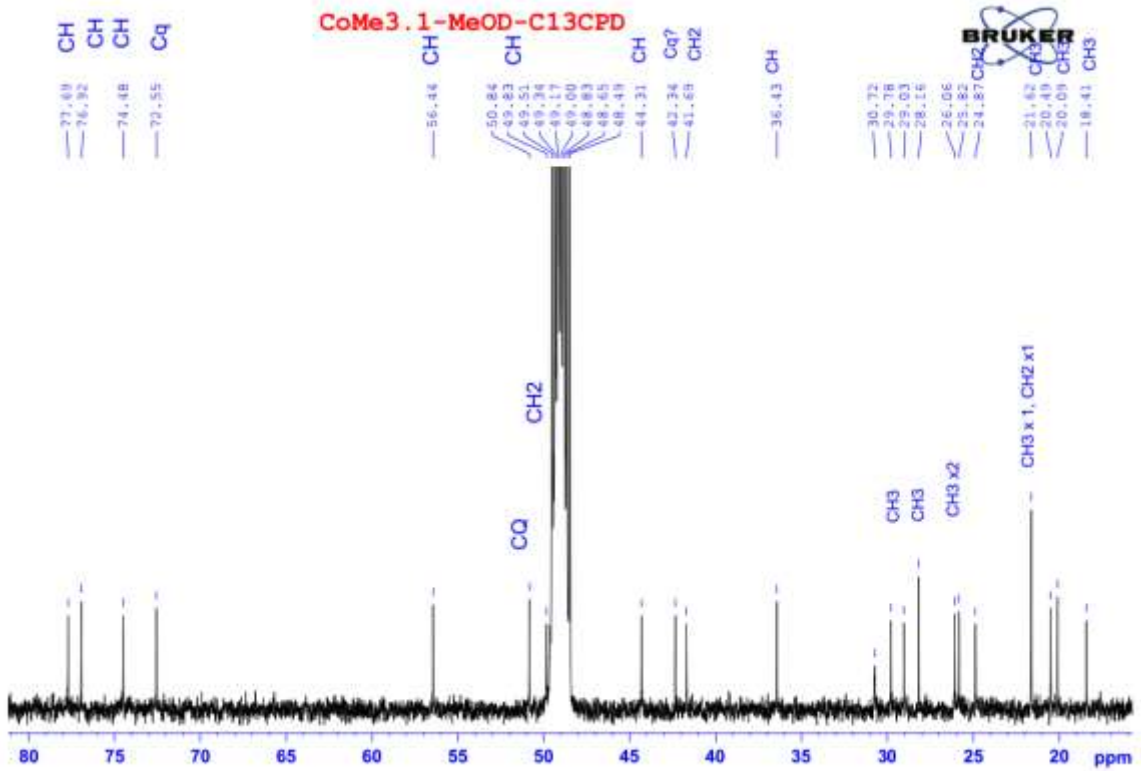
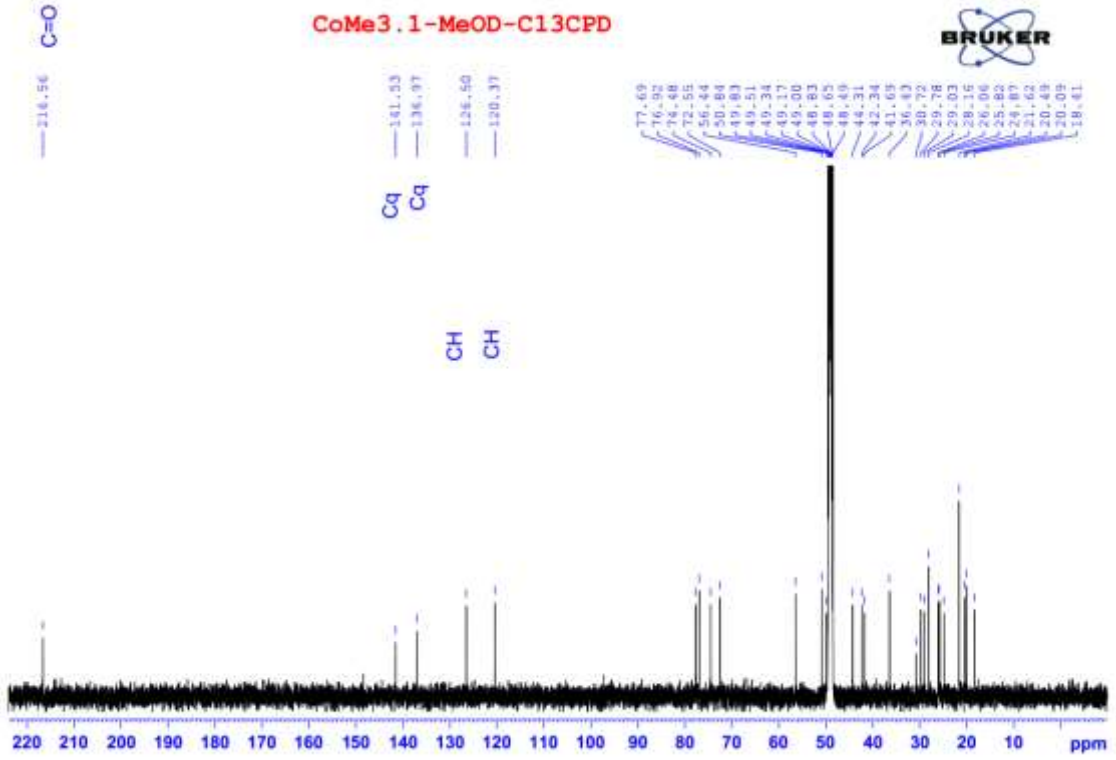


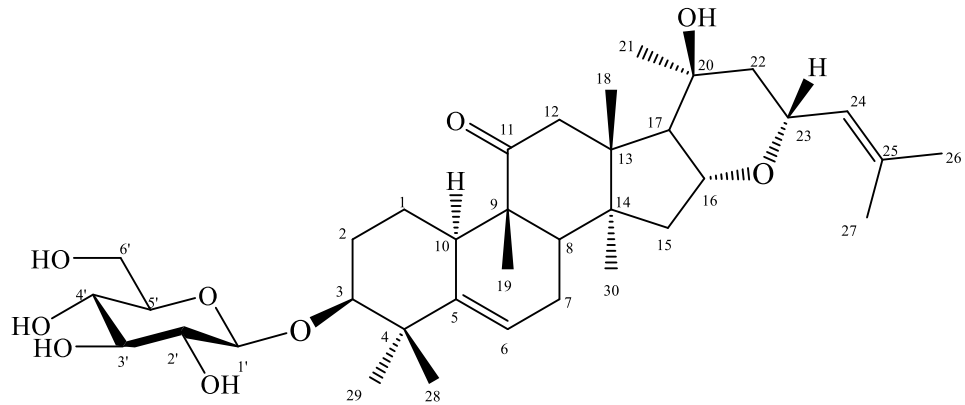
COMe3.1-MeOD-1H



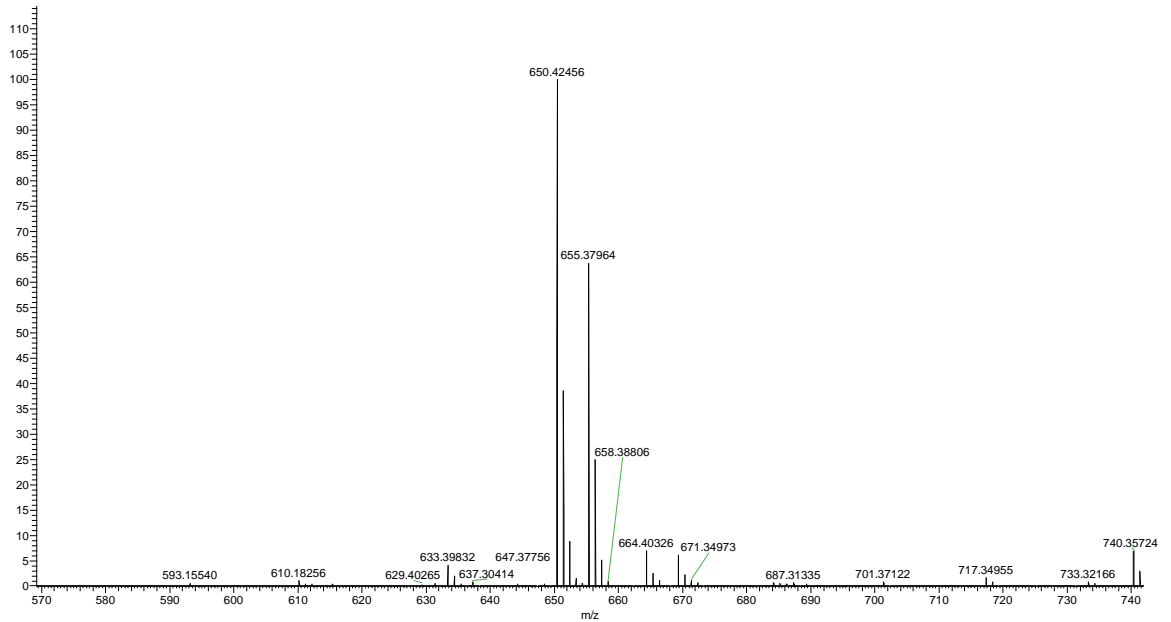
CoMe3.1-MeOD-C13CPD

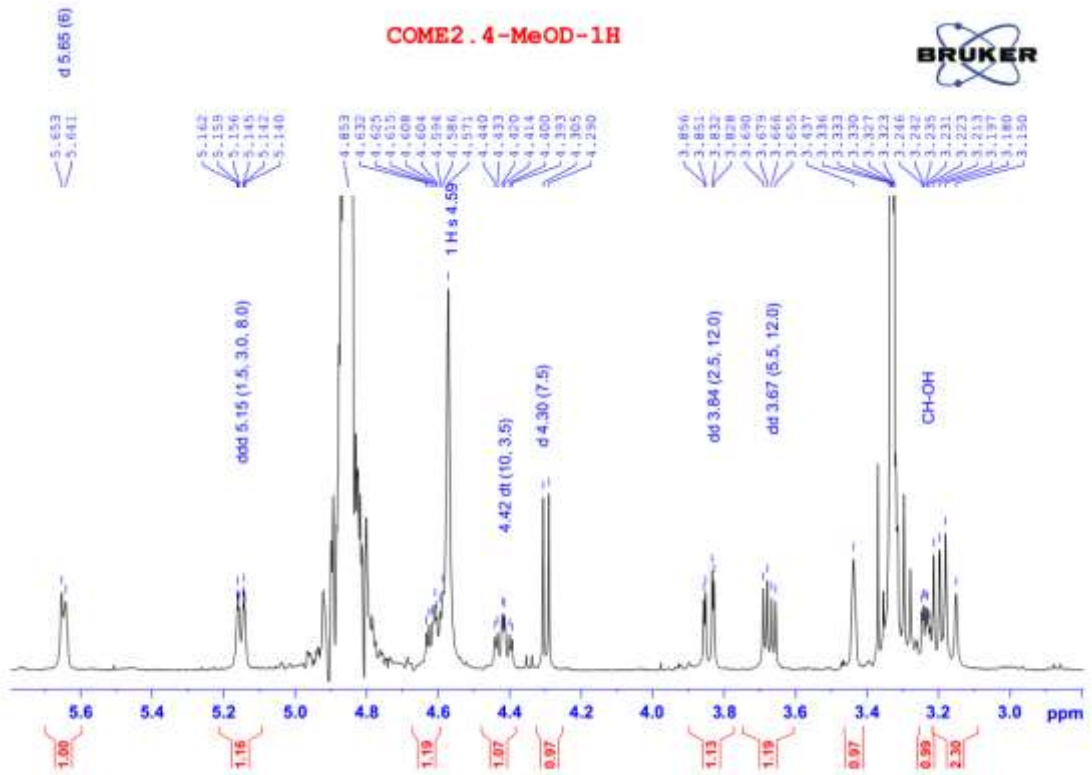
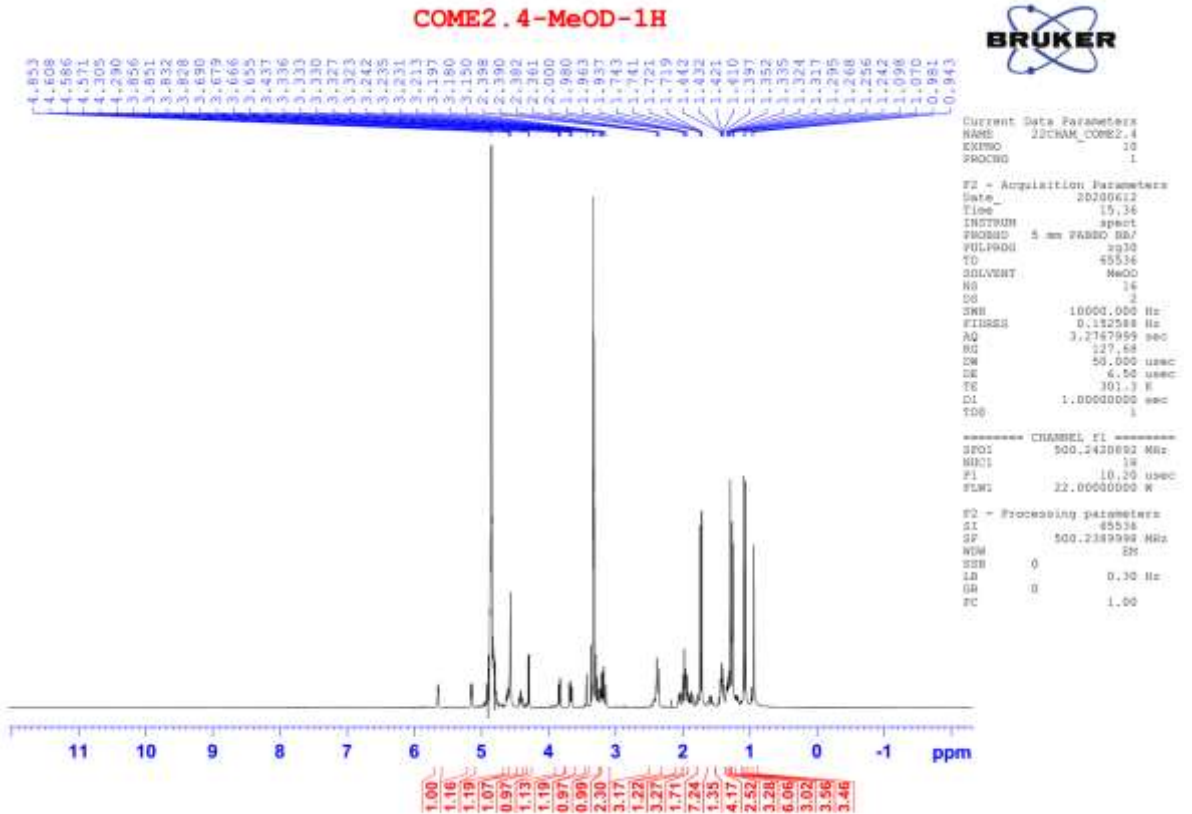


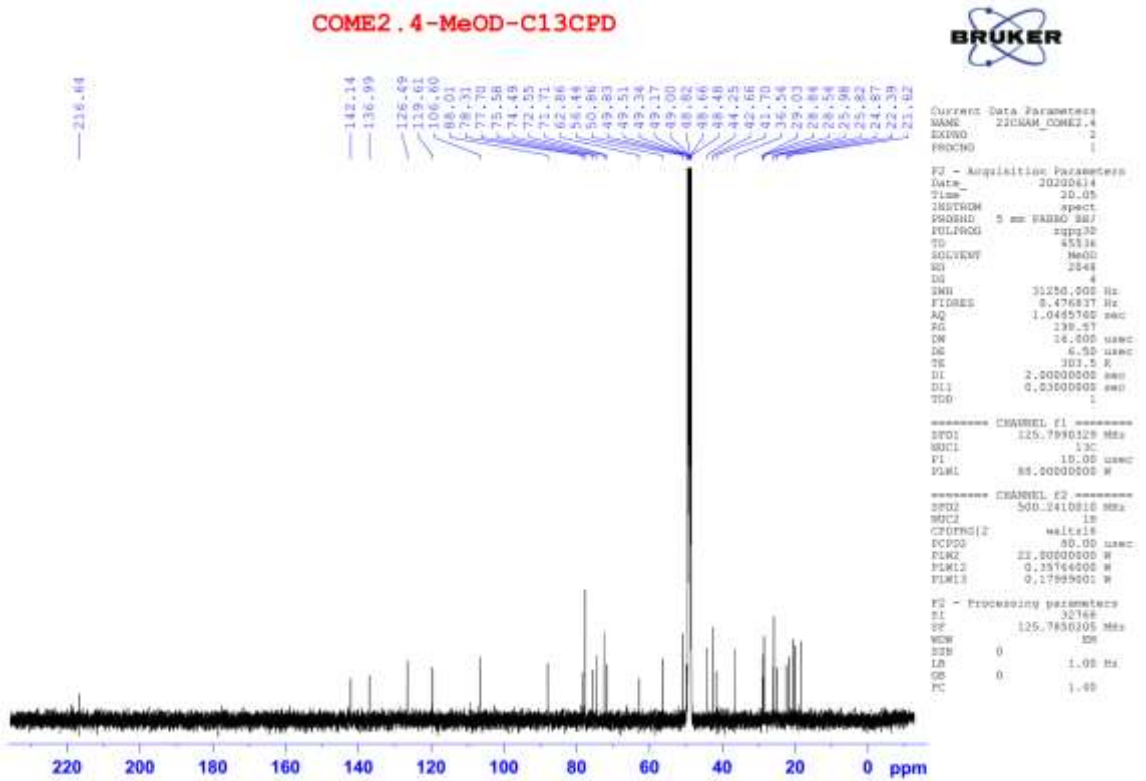
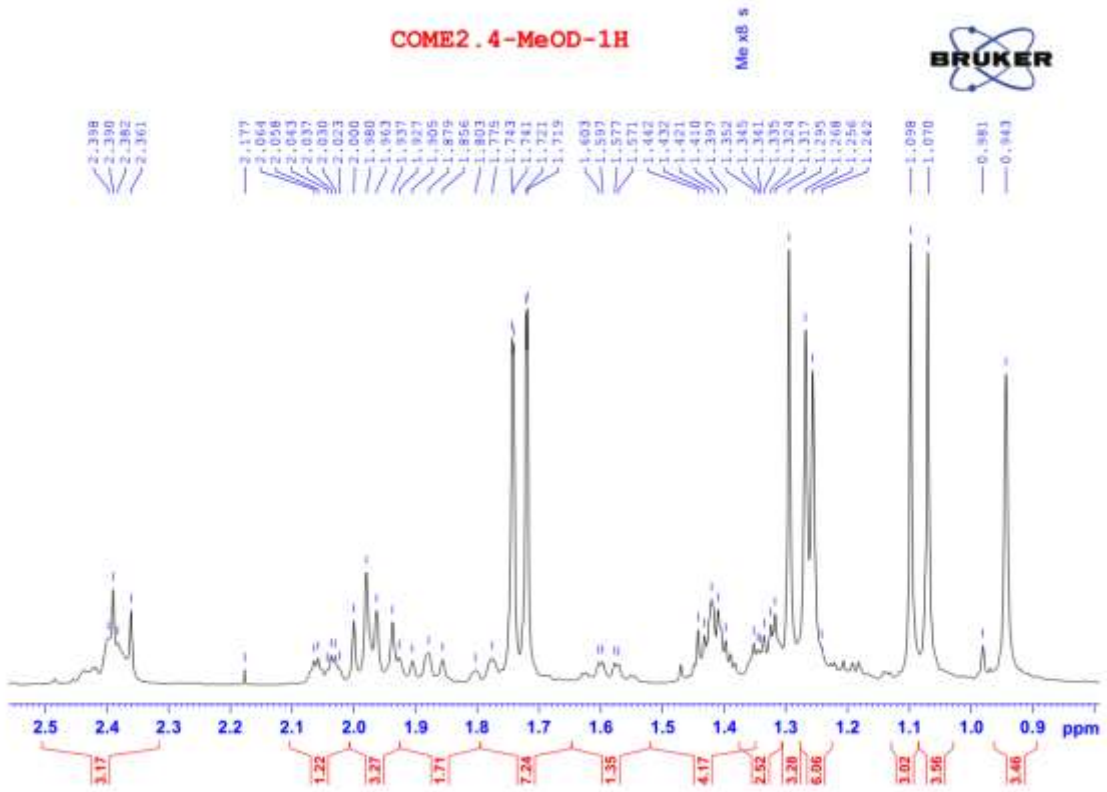


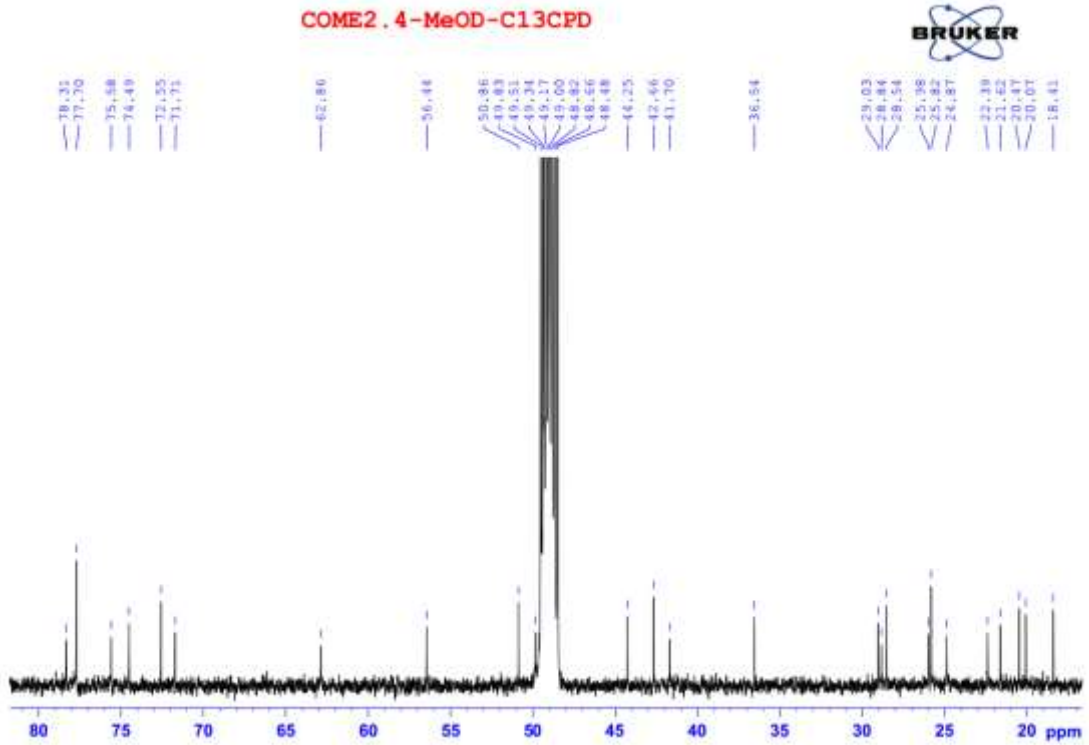
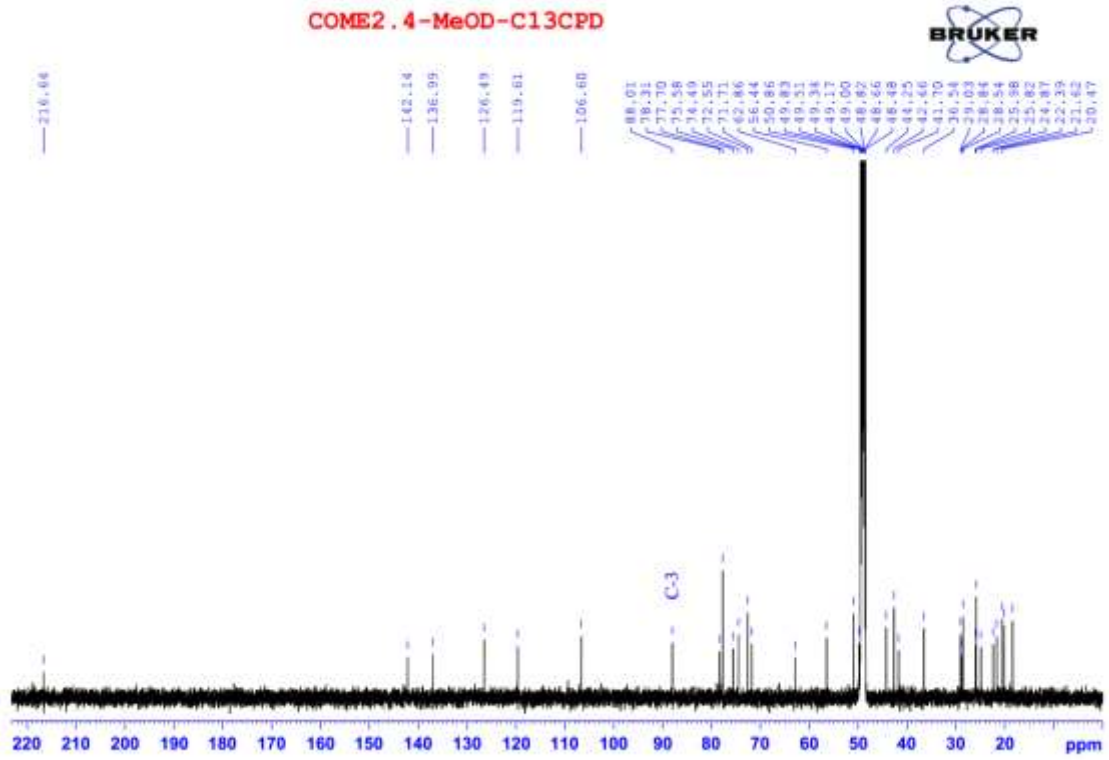
17. Phổ của hợp chất **EH7**

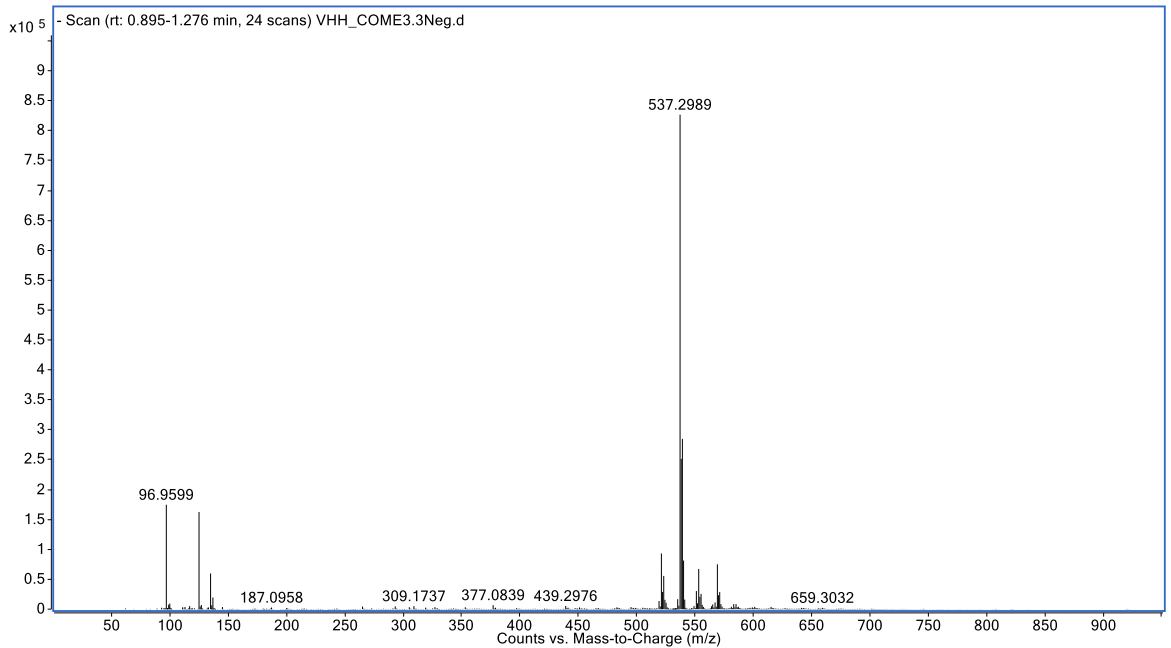
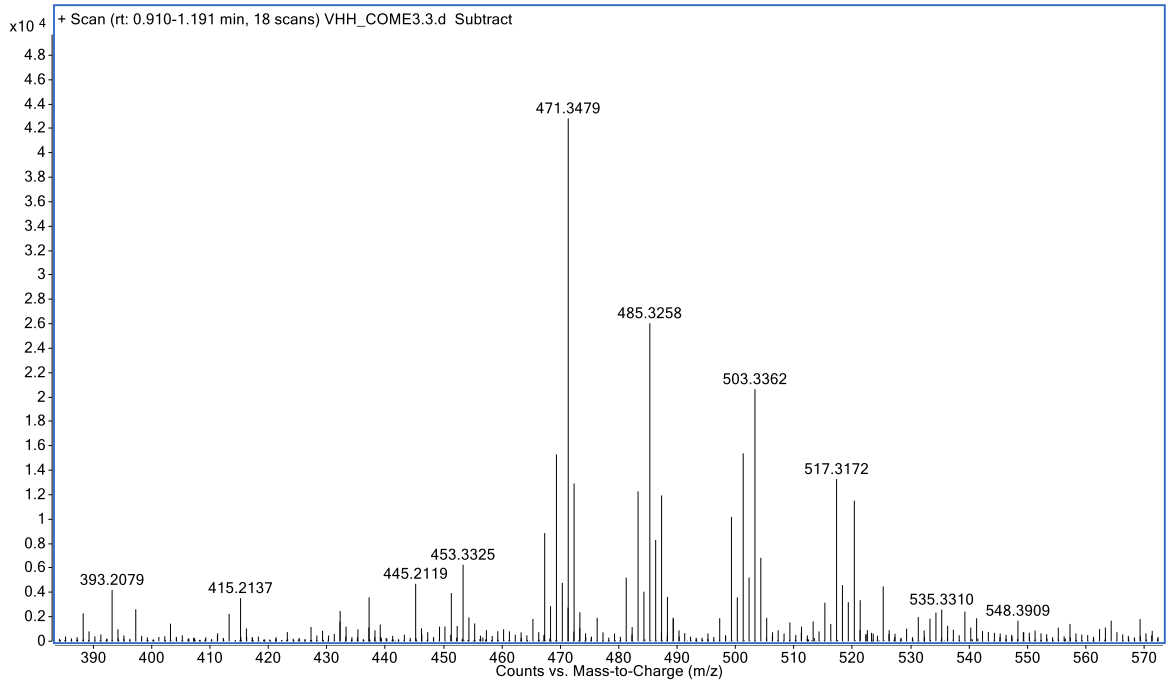
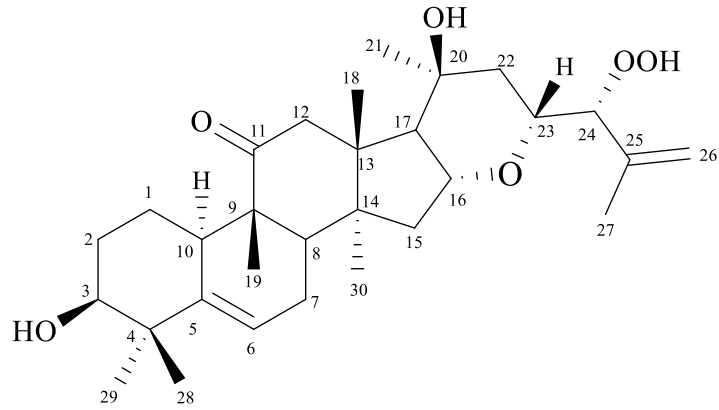
4P #26 RT: 0.12 AV: 1 NL: 1.15E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1200.0000]

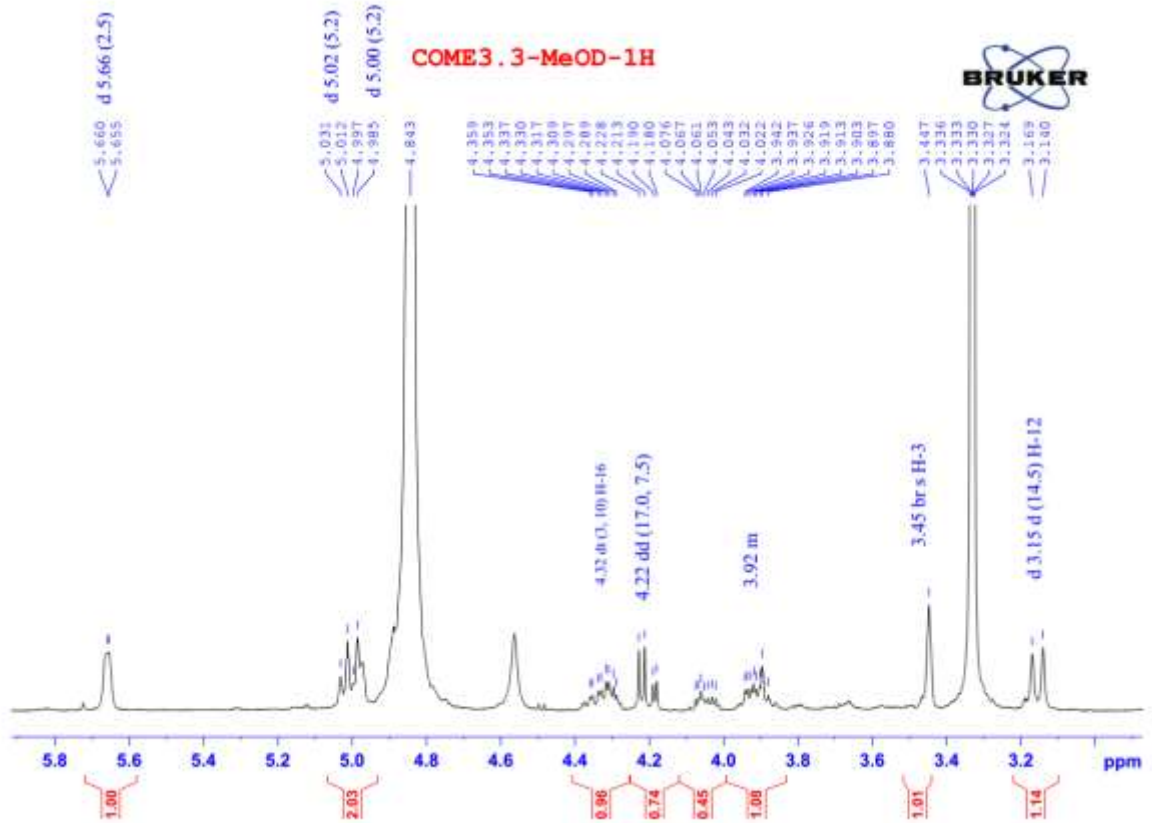
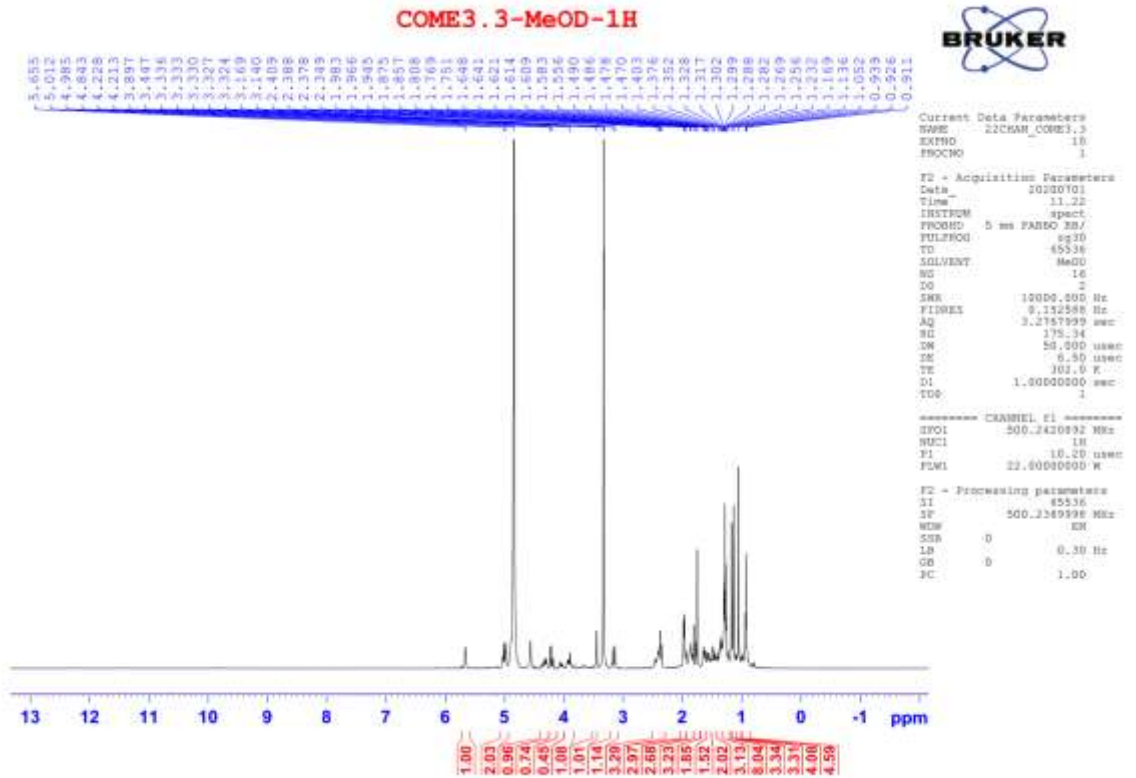


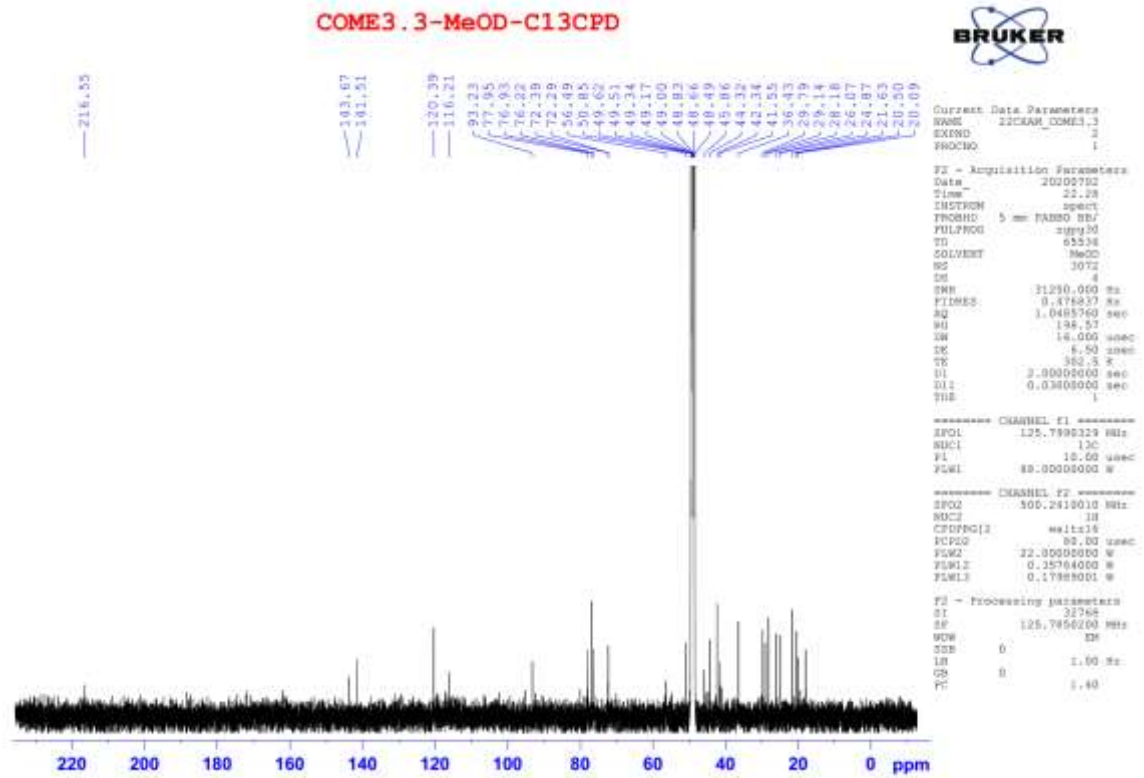
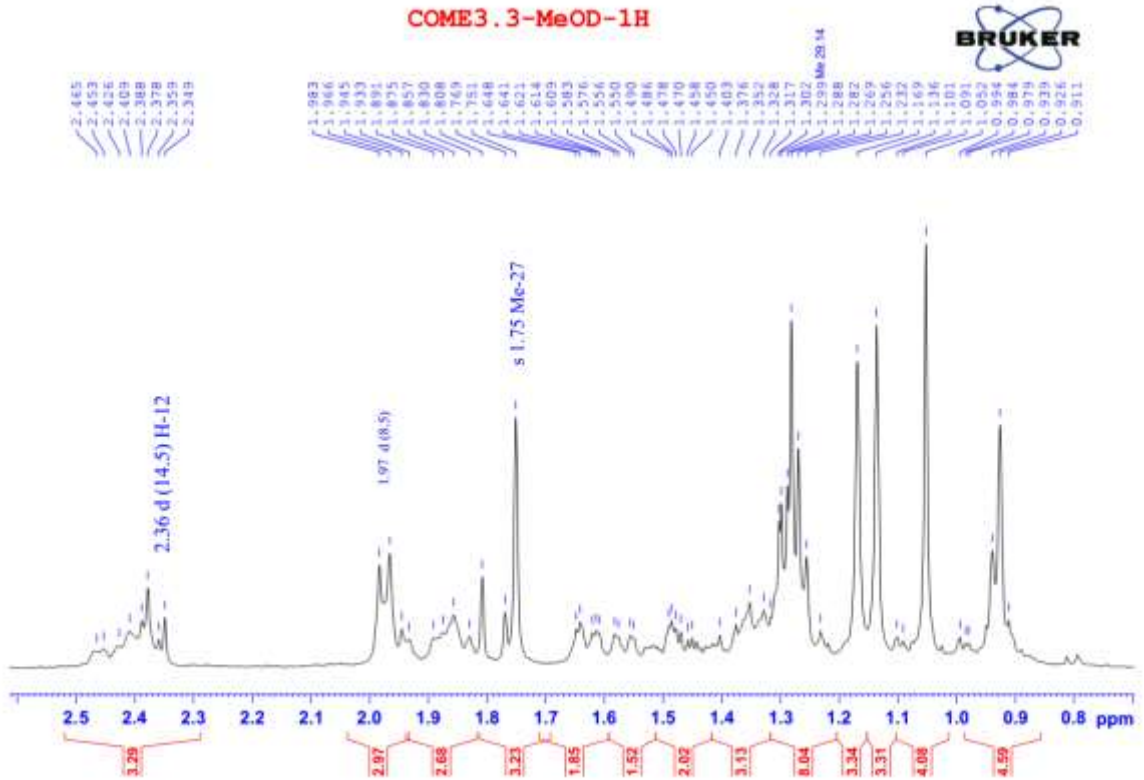


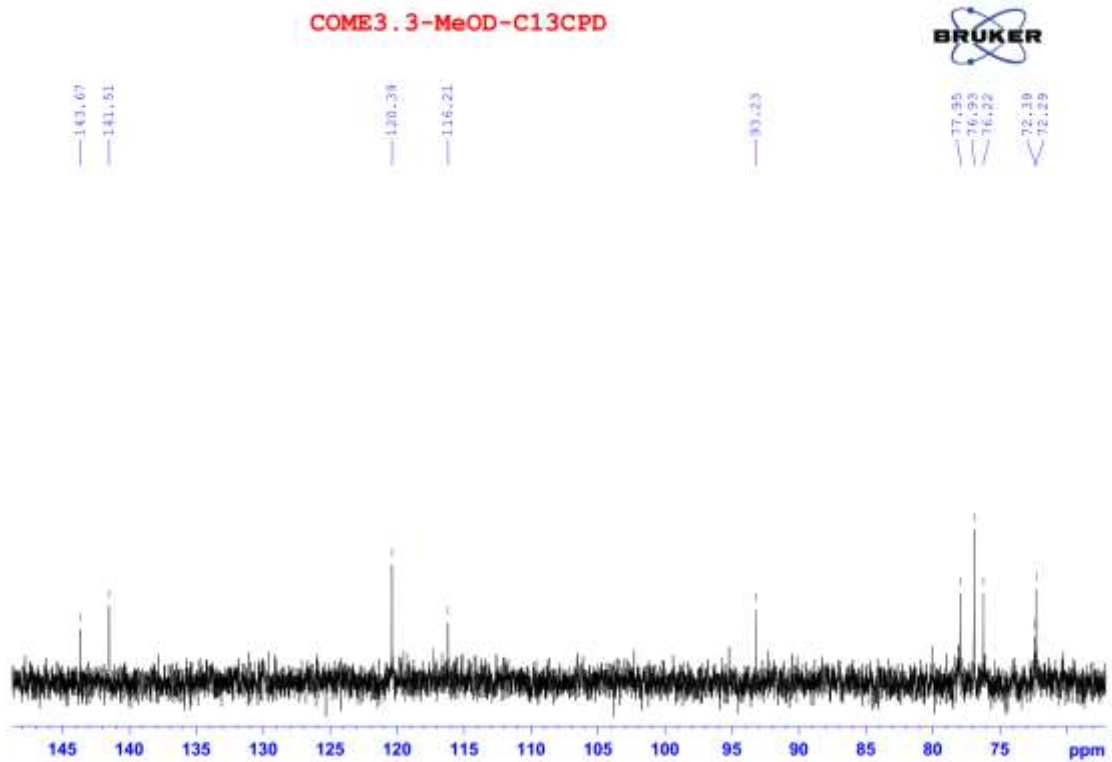
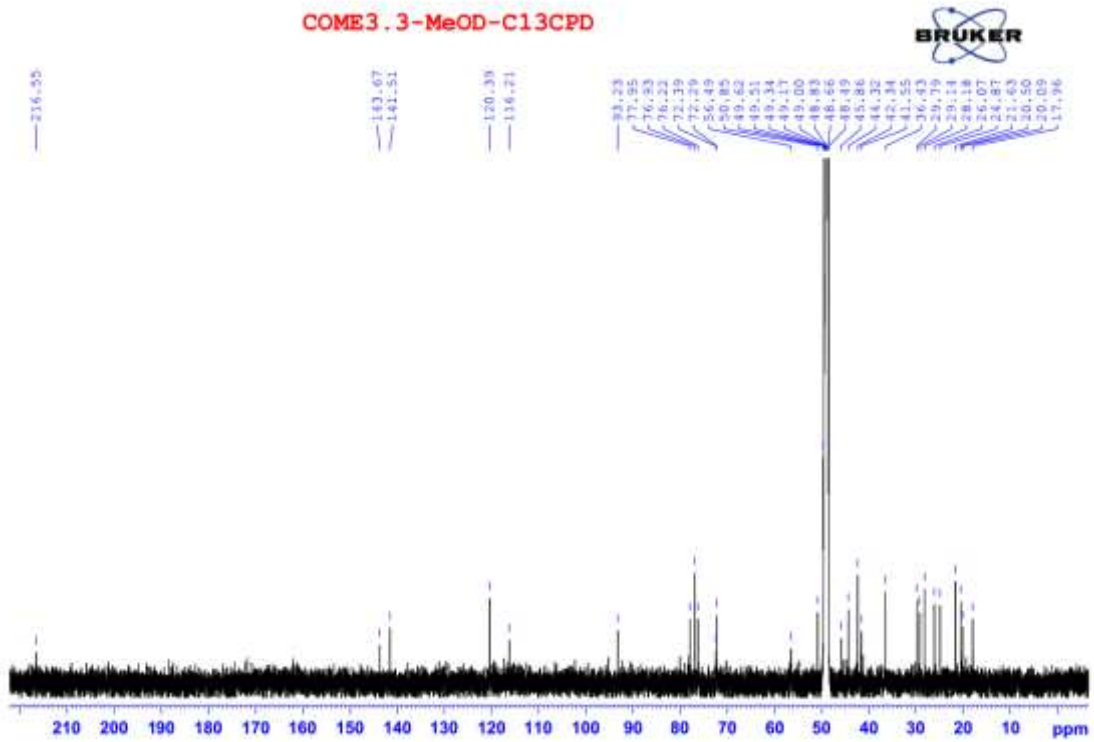


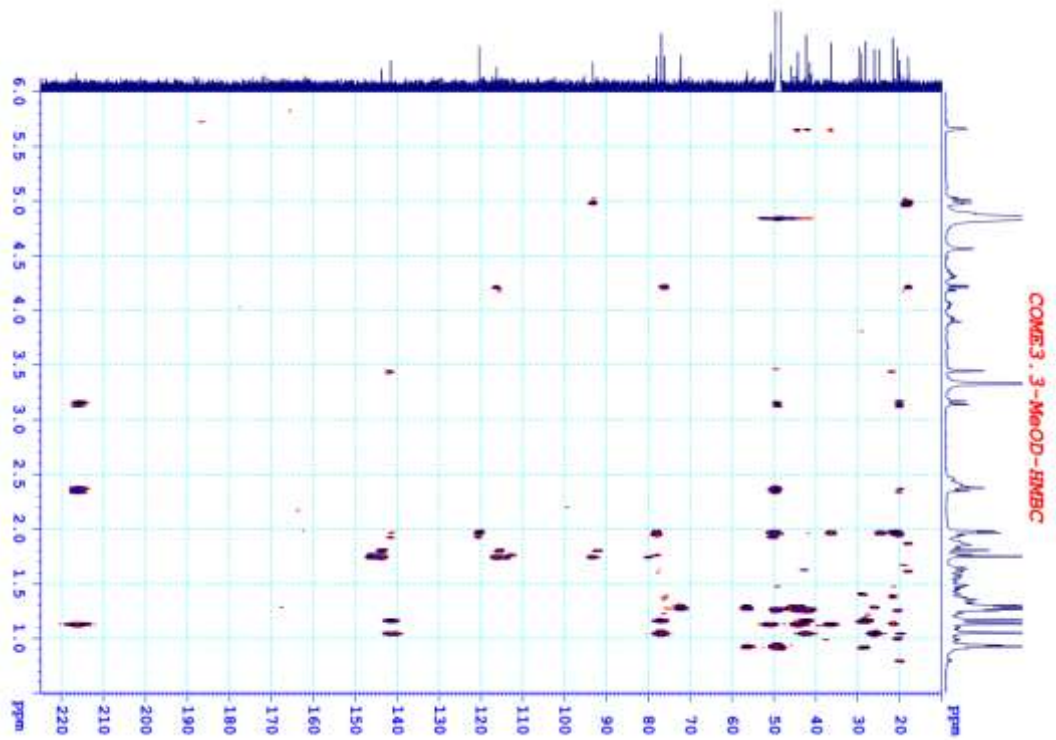
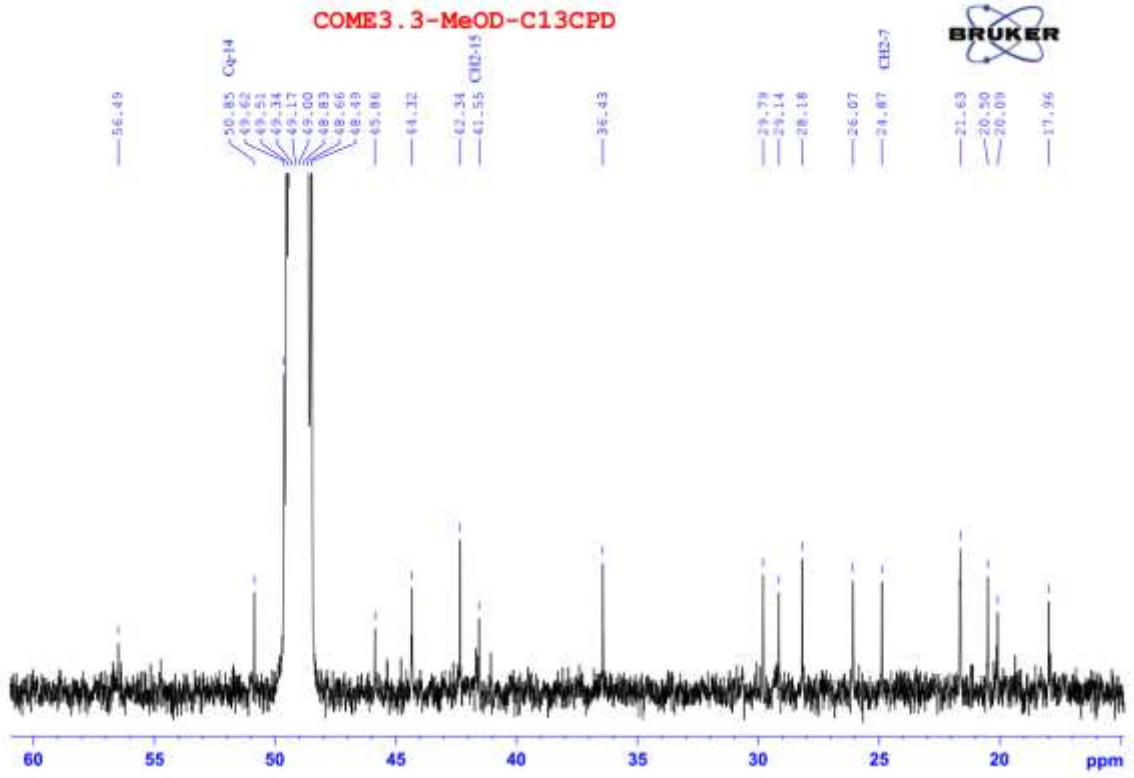


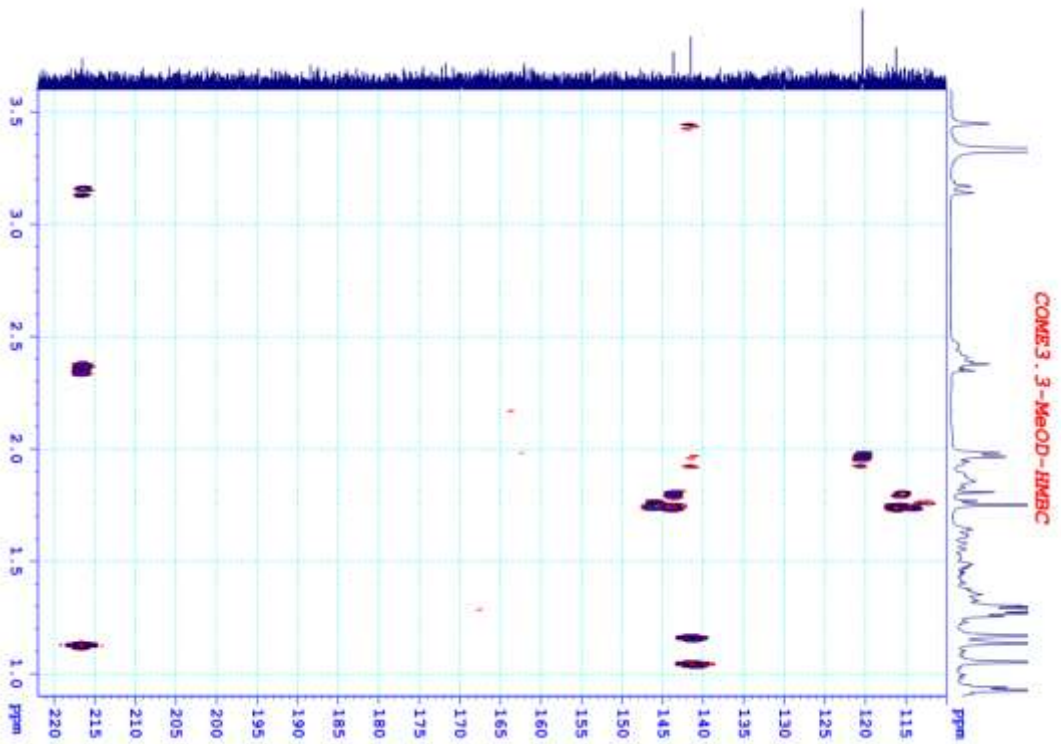
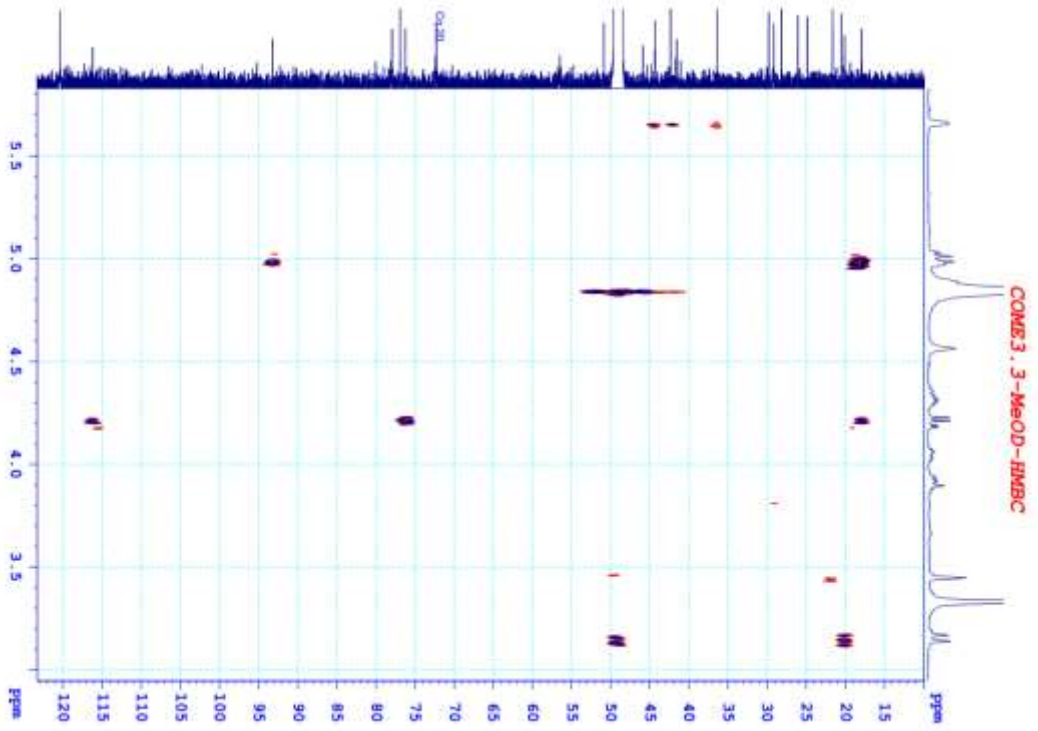
18. Phổ của hợp chất **EH8**

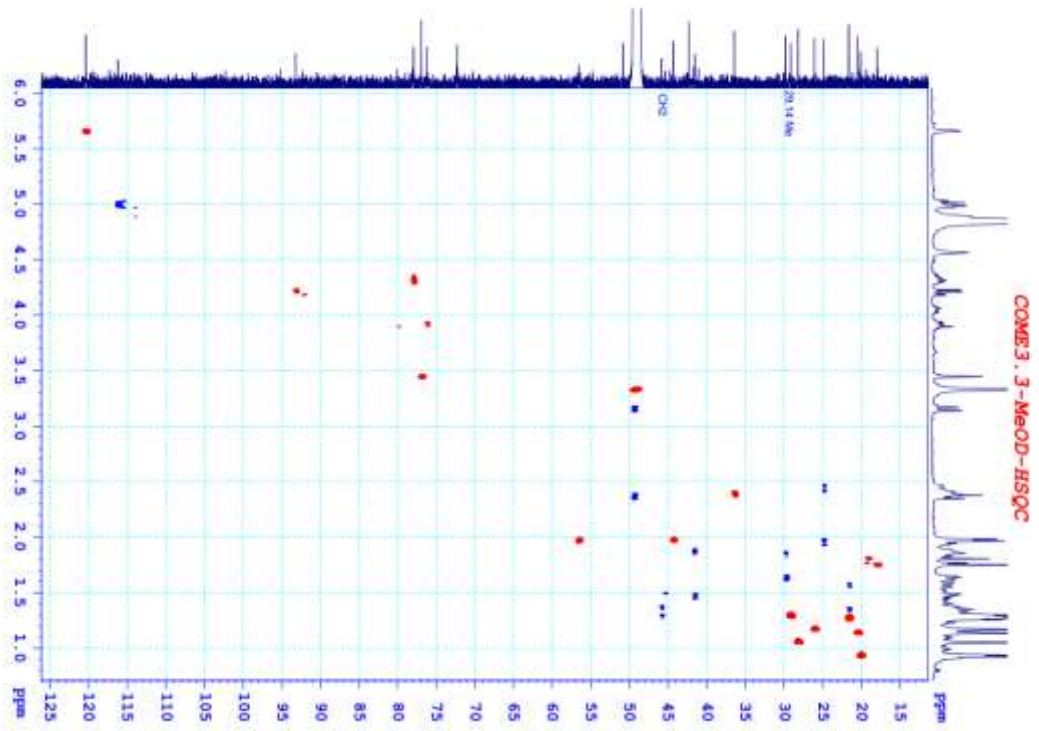
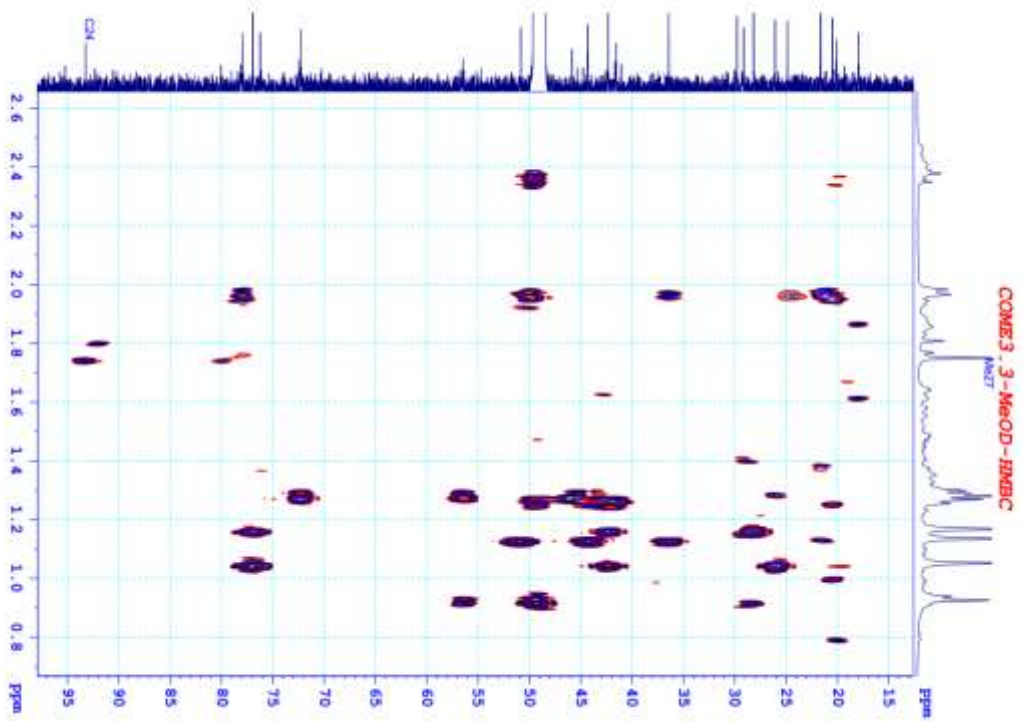


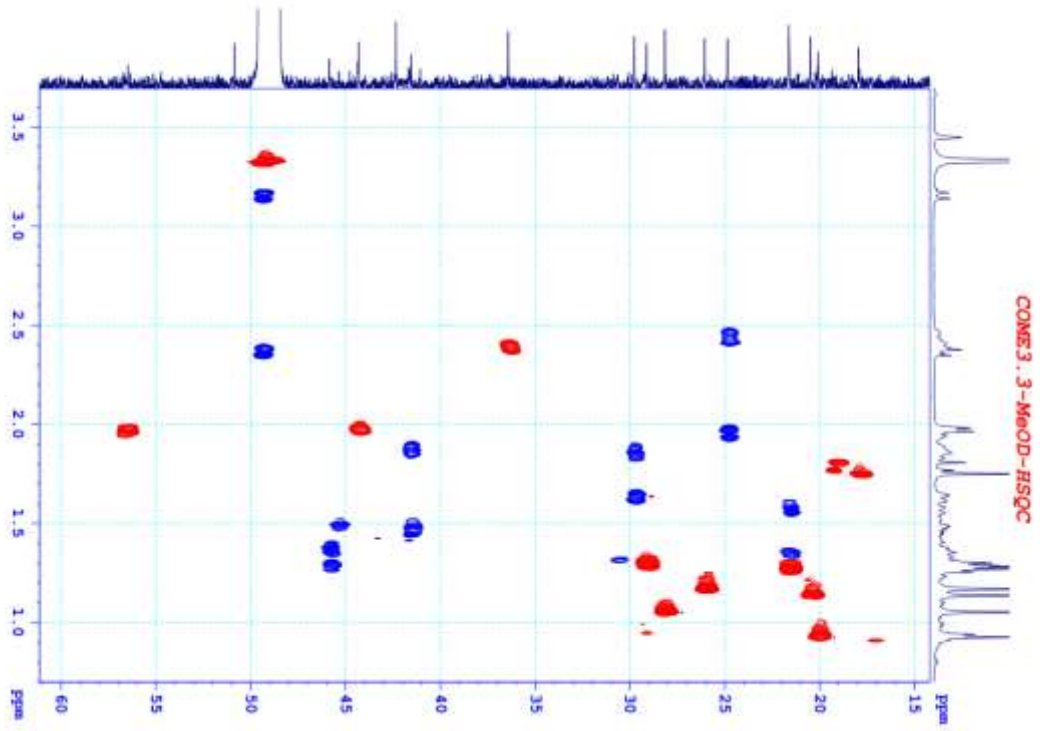
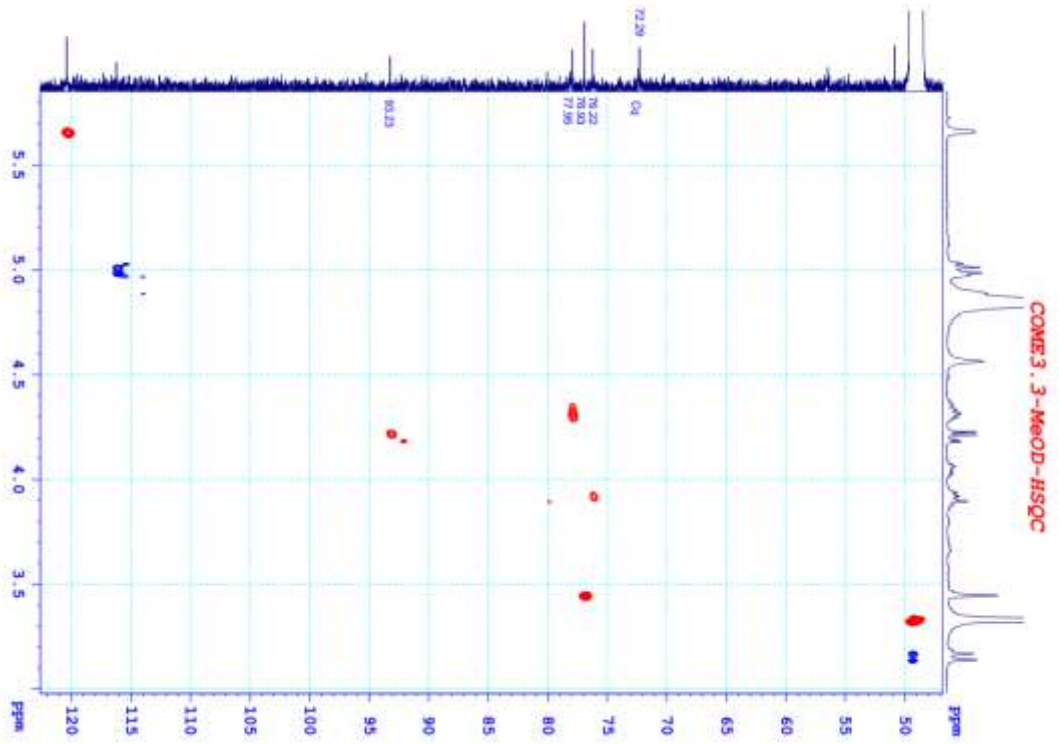


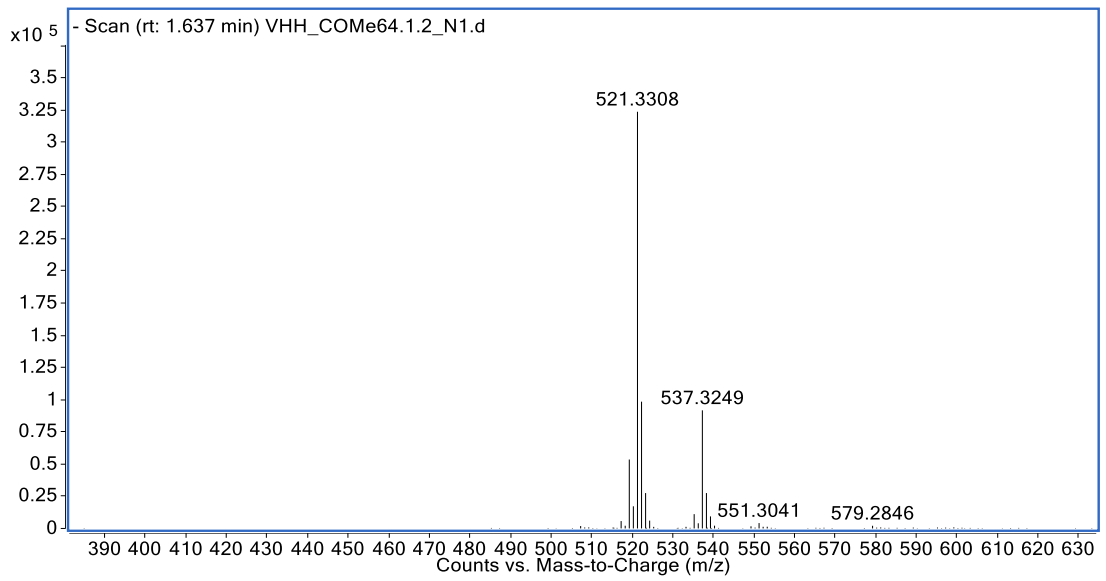
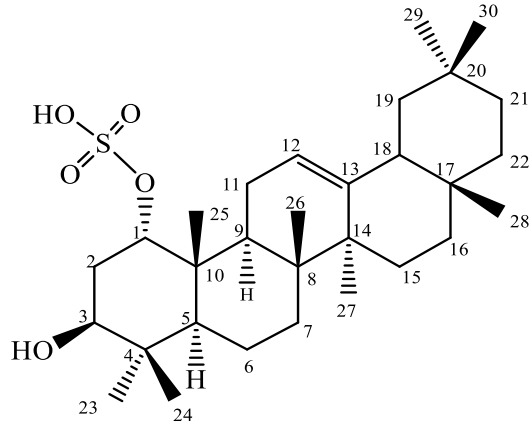




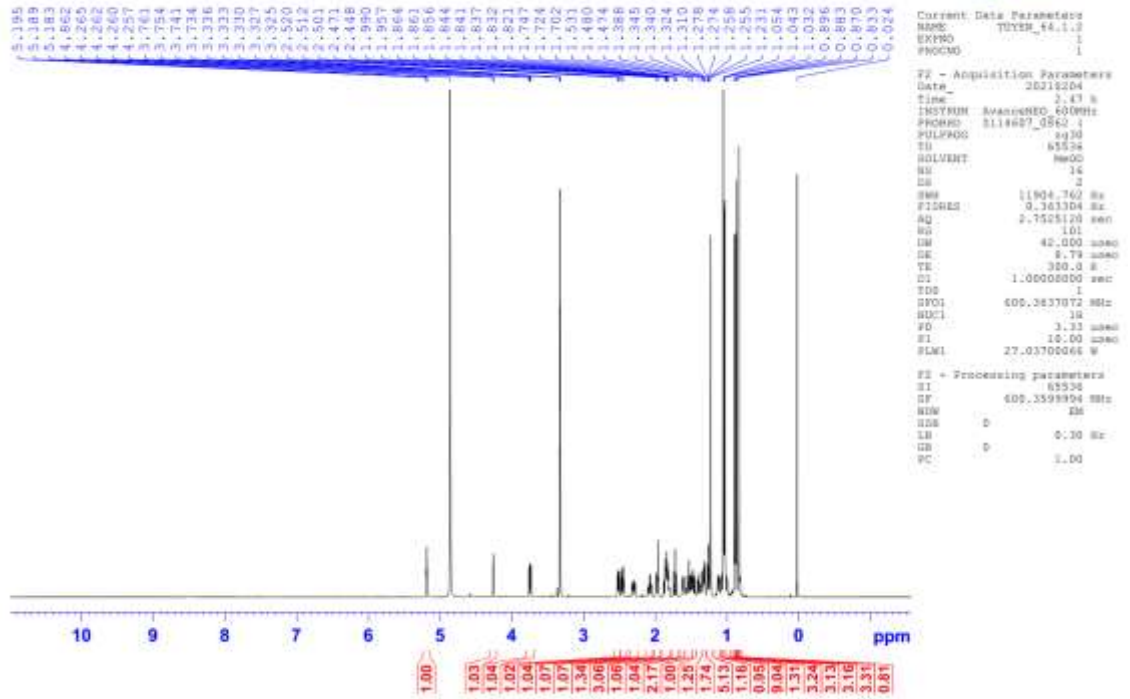




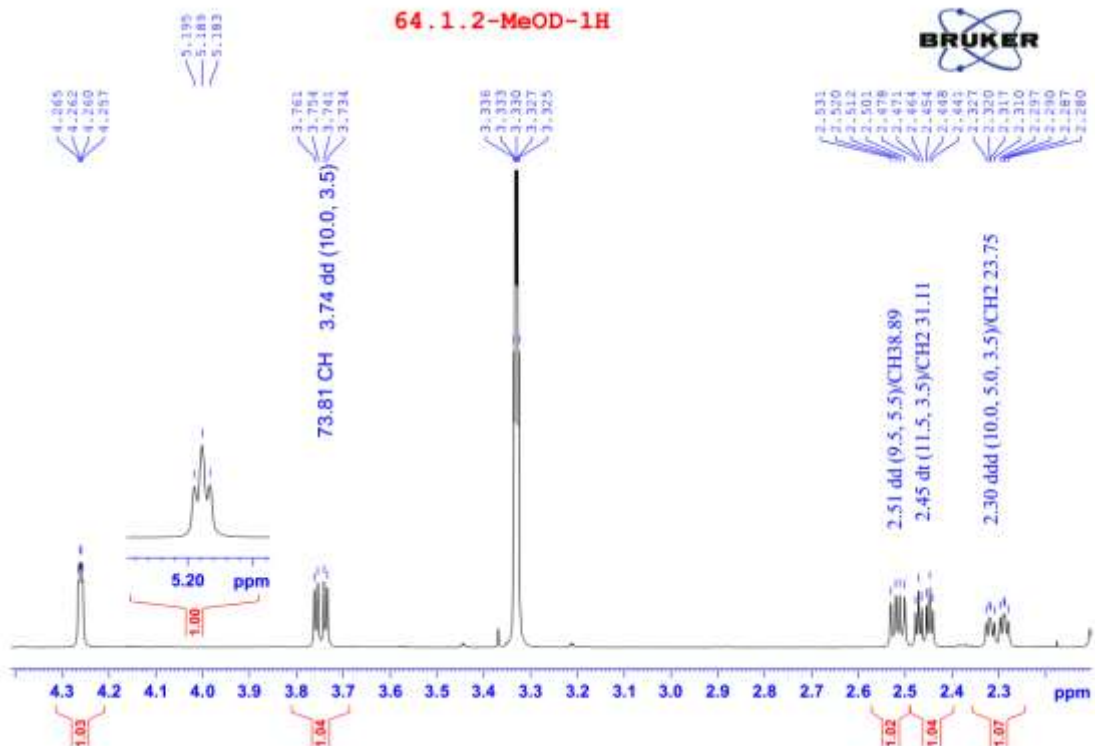


19. Phổ của hợp chất **EH9**

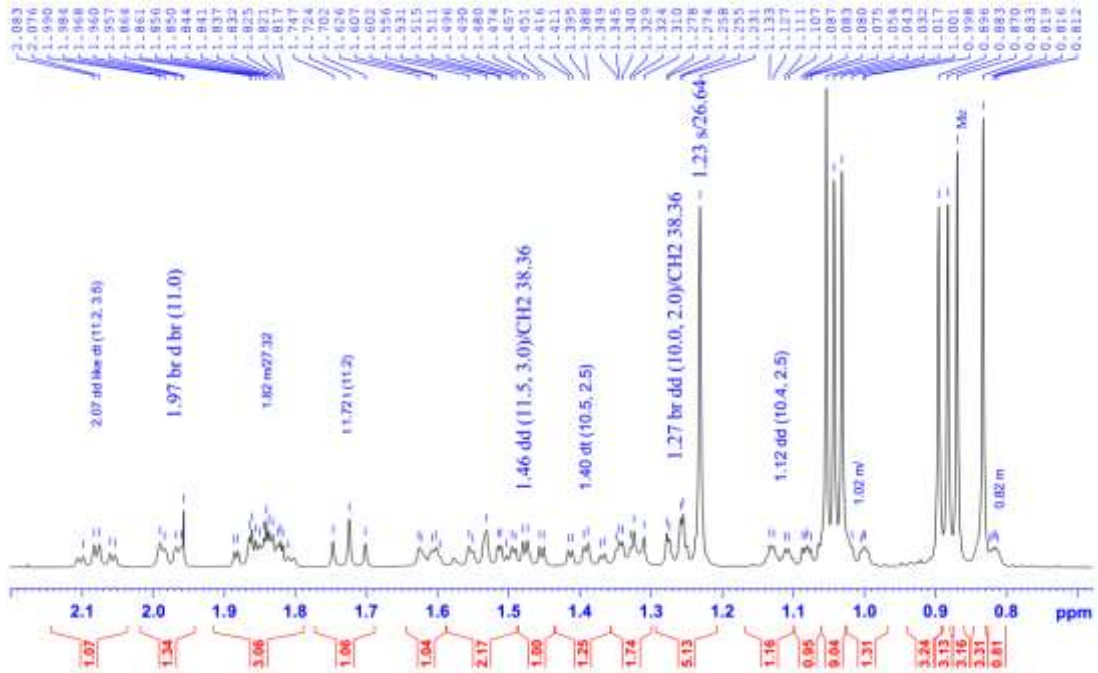
64.1.2-MeOD-1H



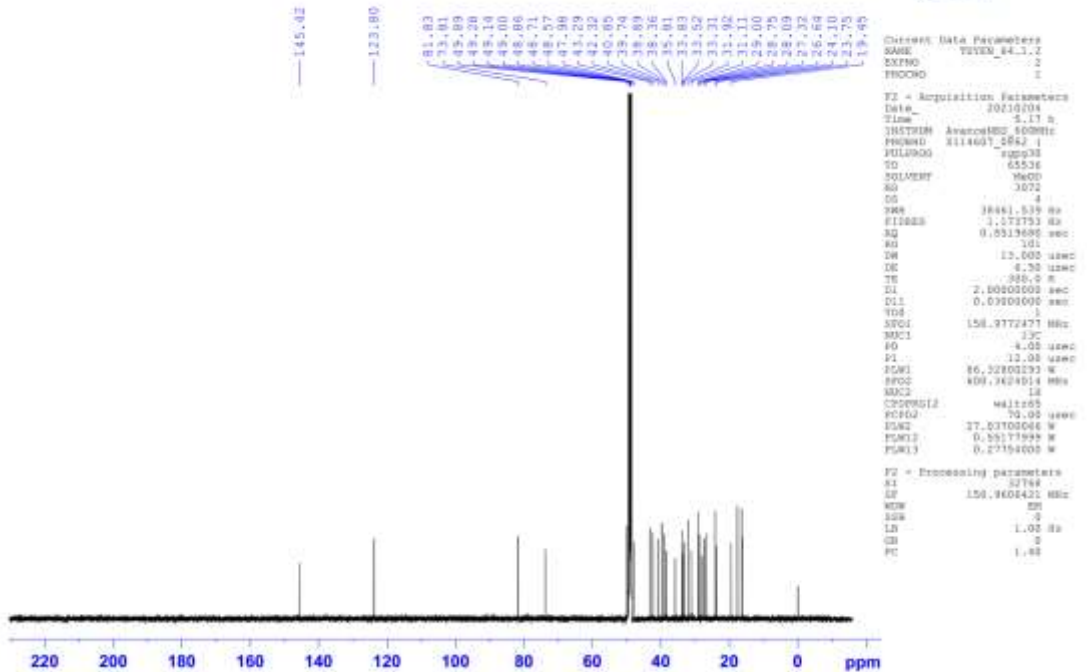
64.1.2-MeOD-1H

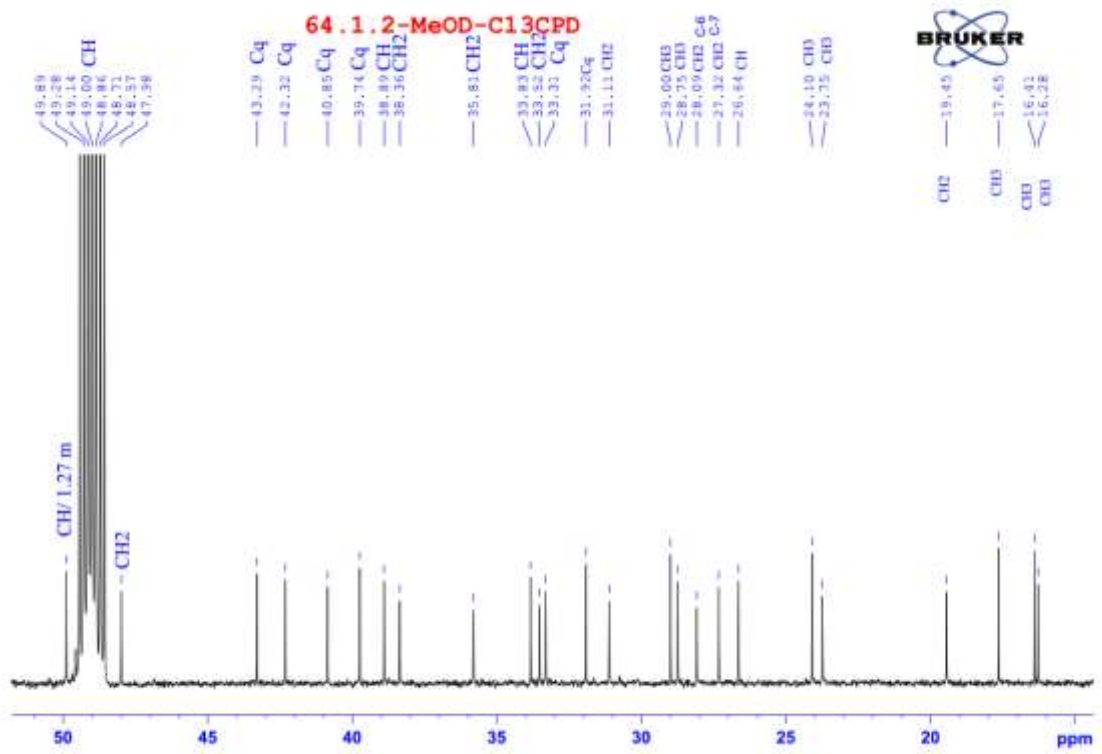
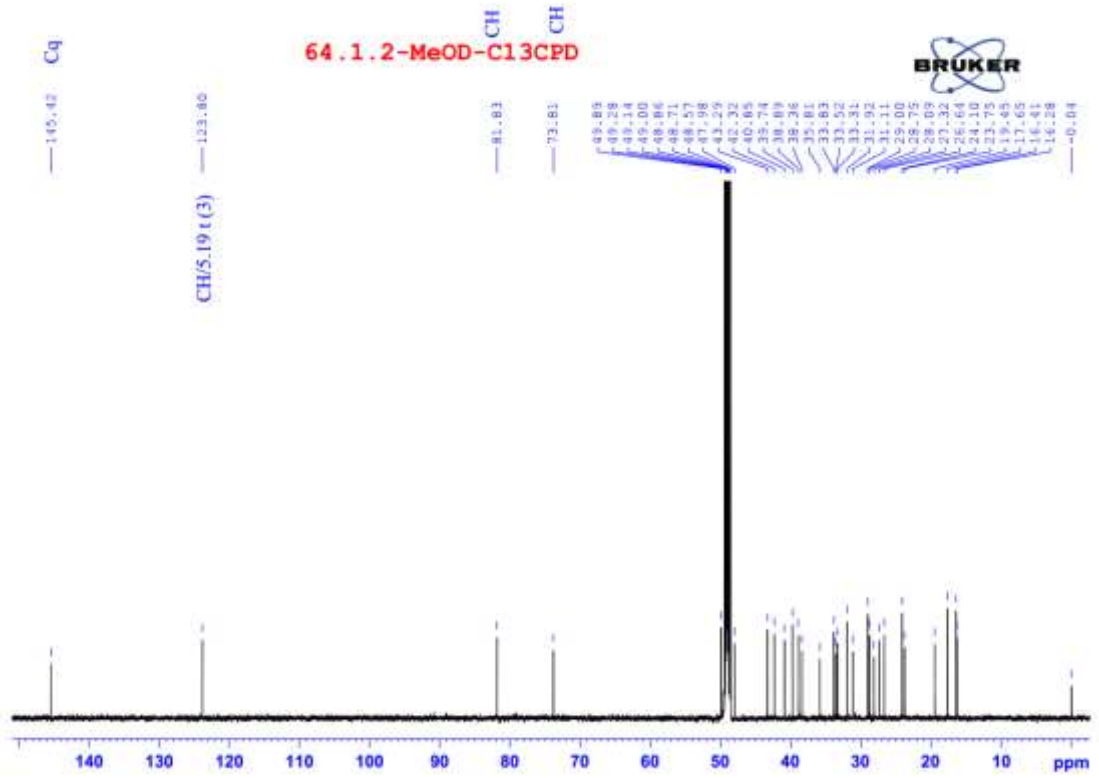


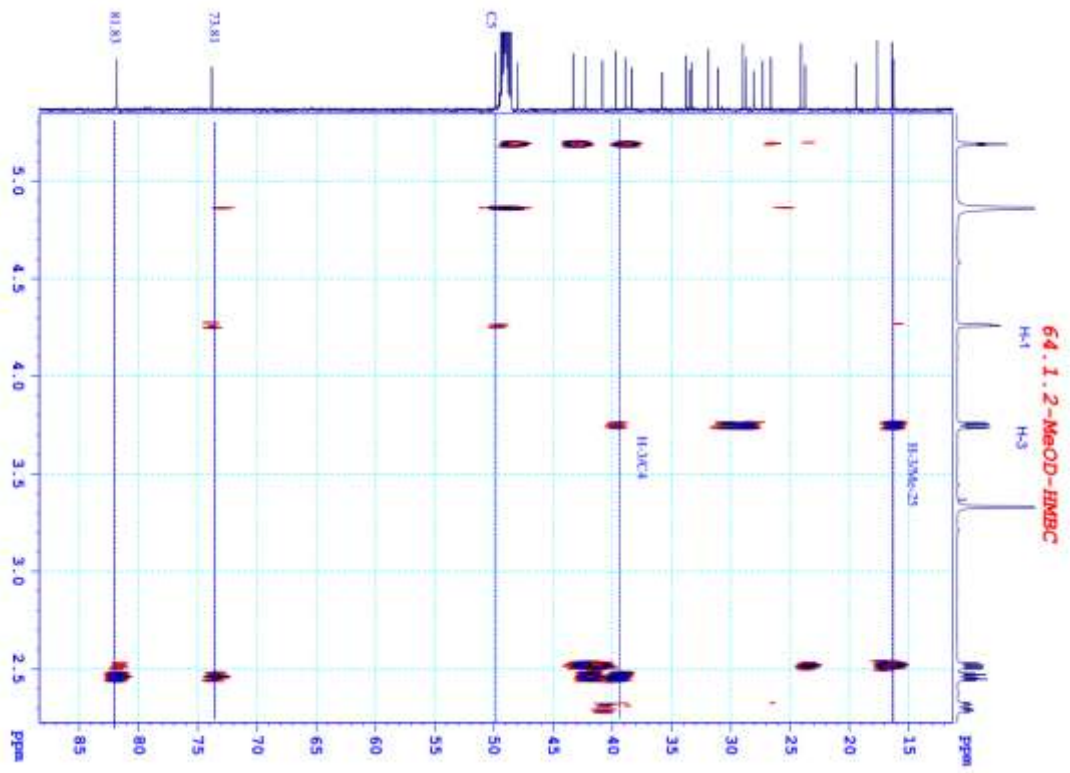
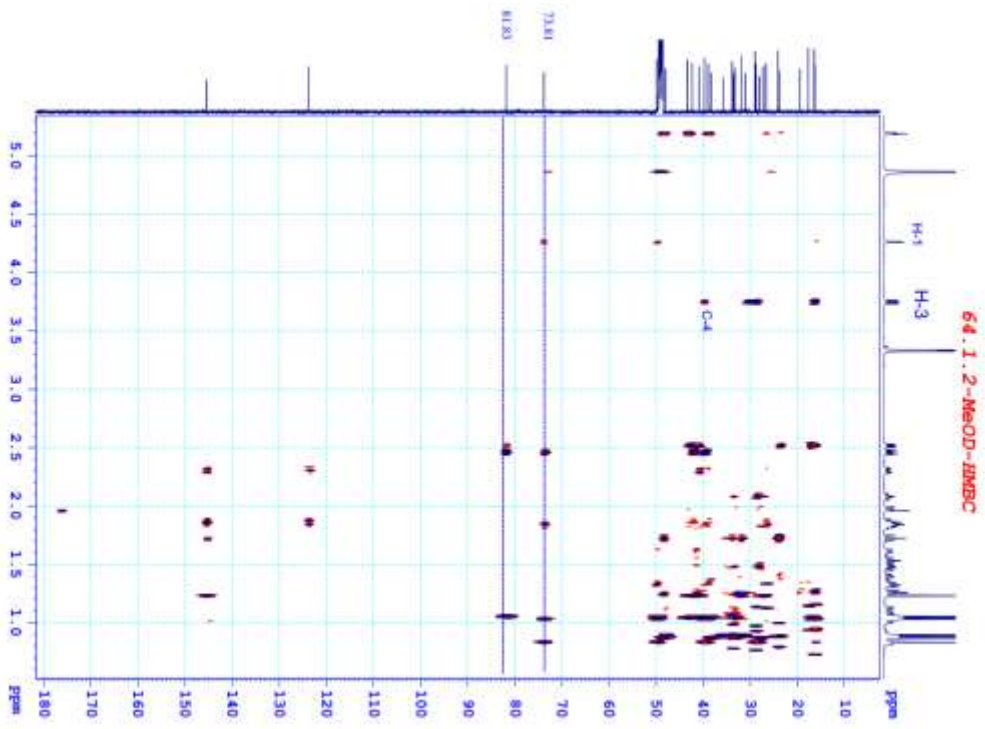
64.1.2-MeOD-1H

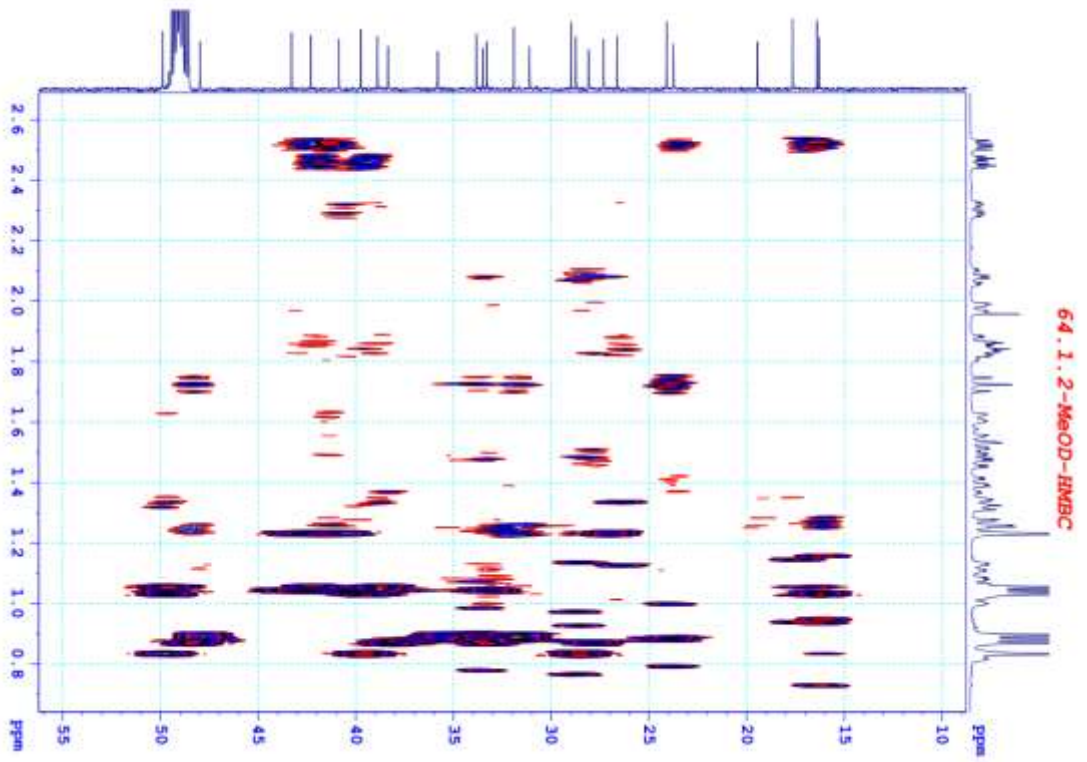
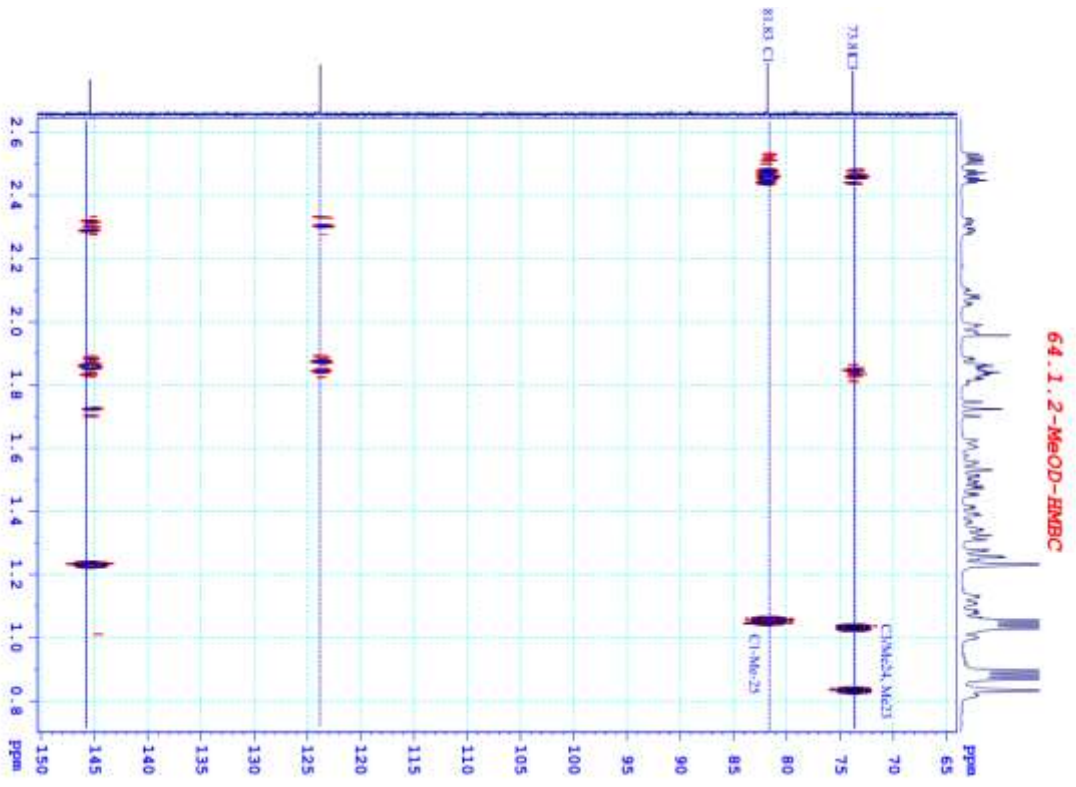


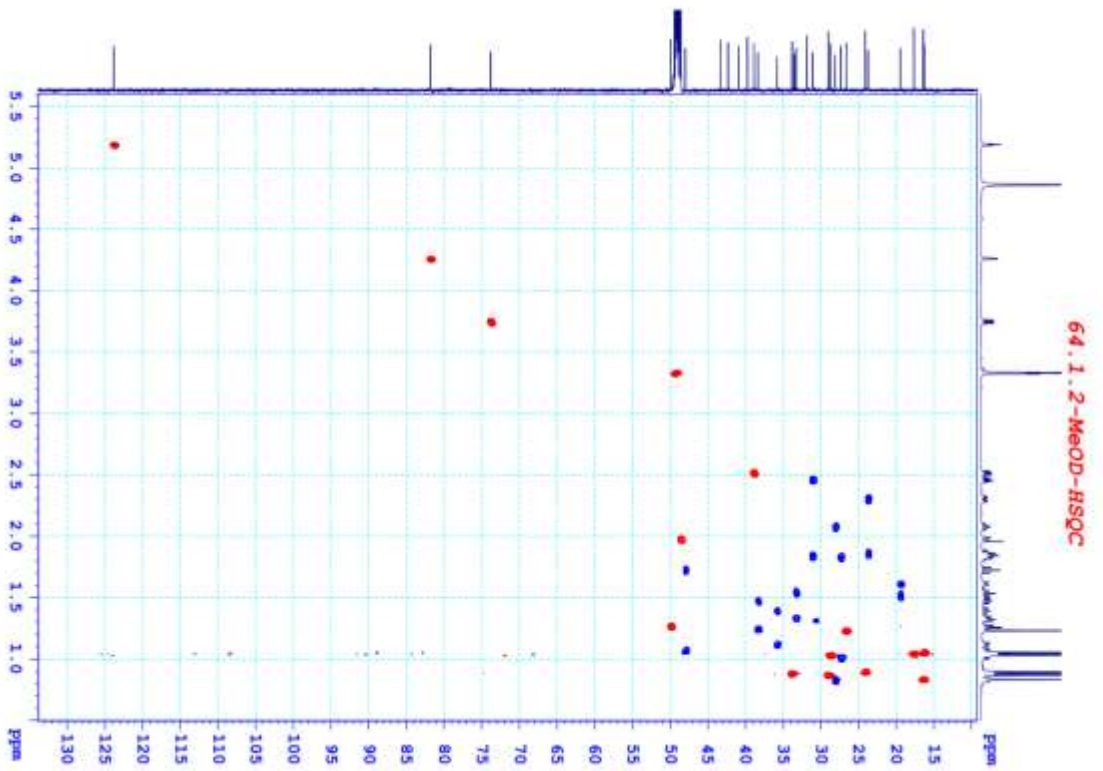
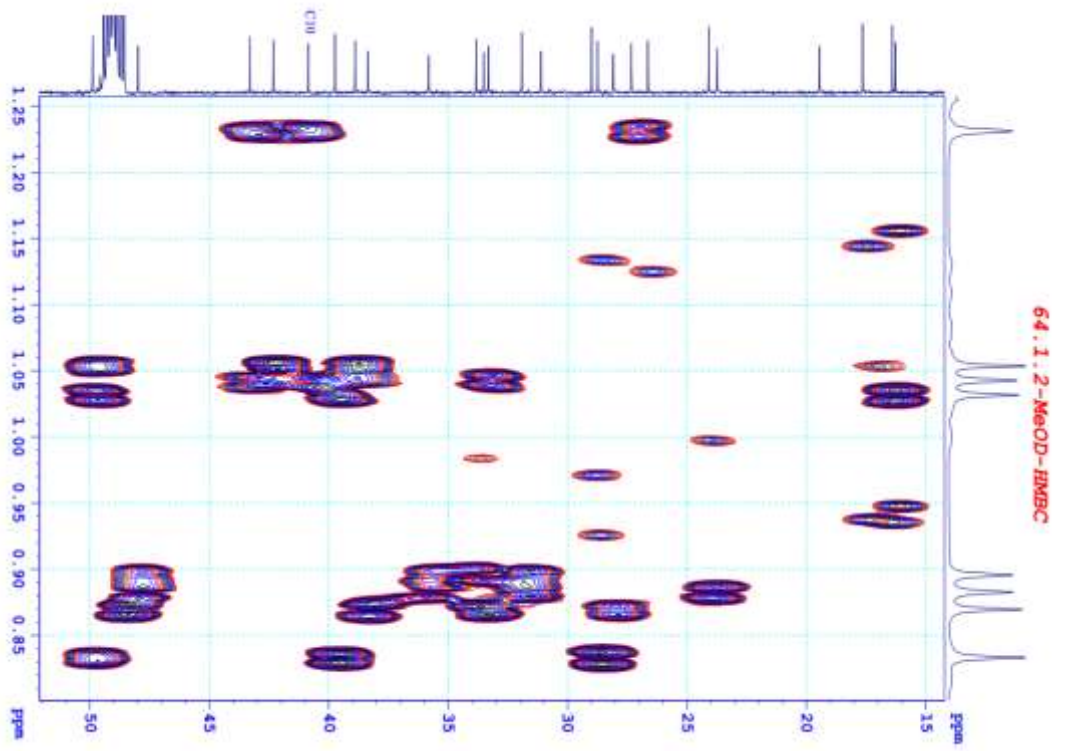
64.1.2-MeOD-C13CPD

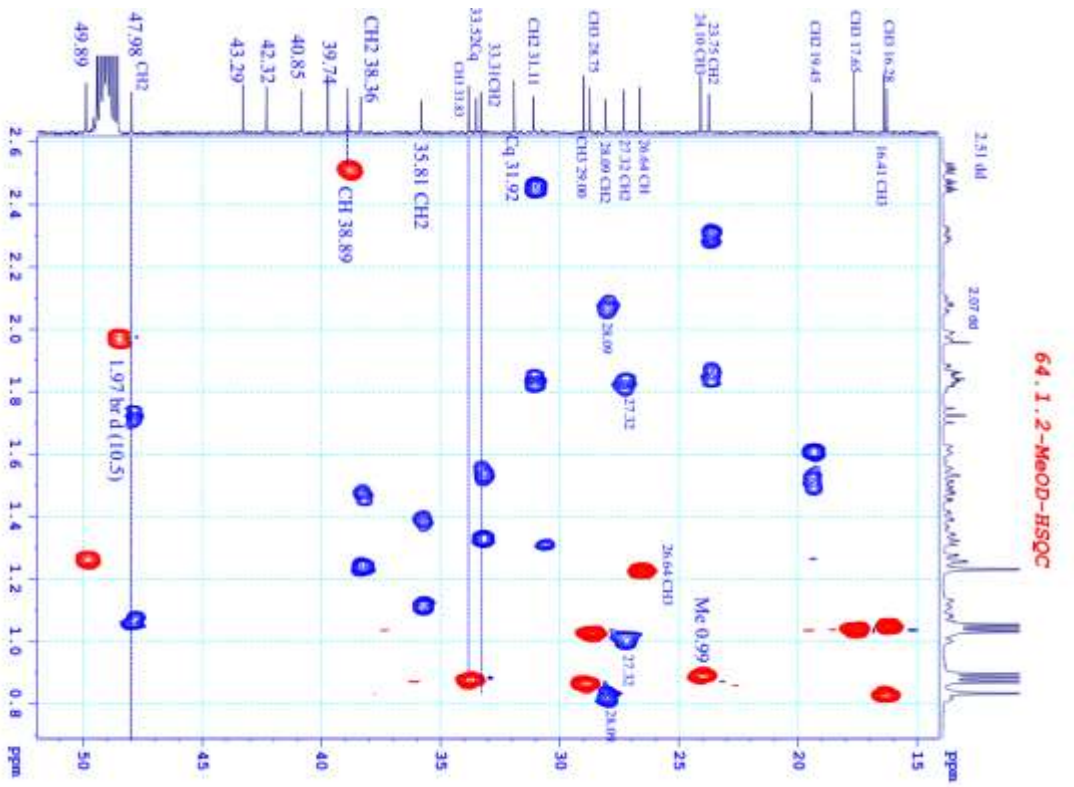
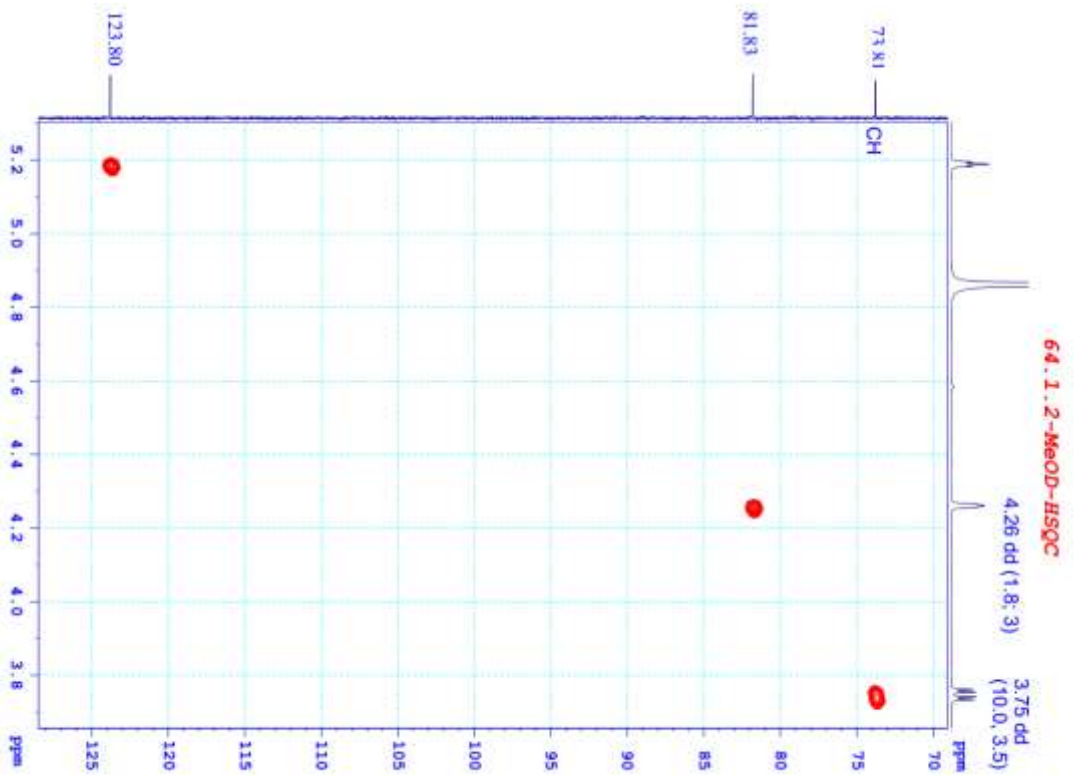


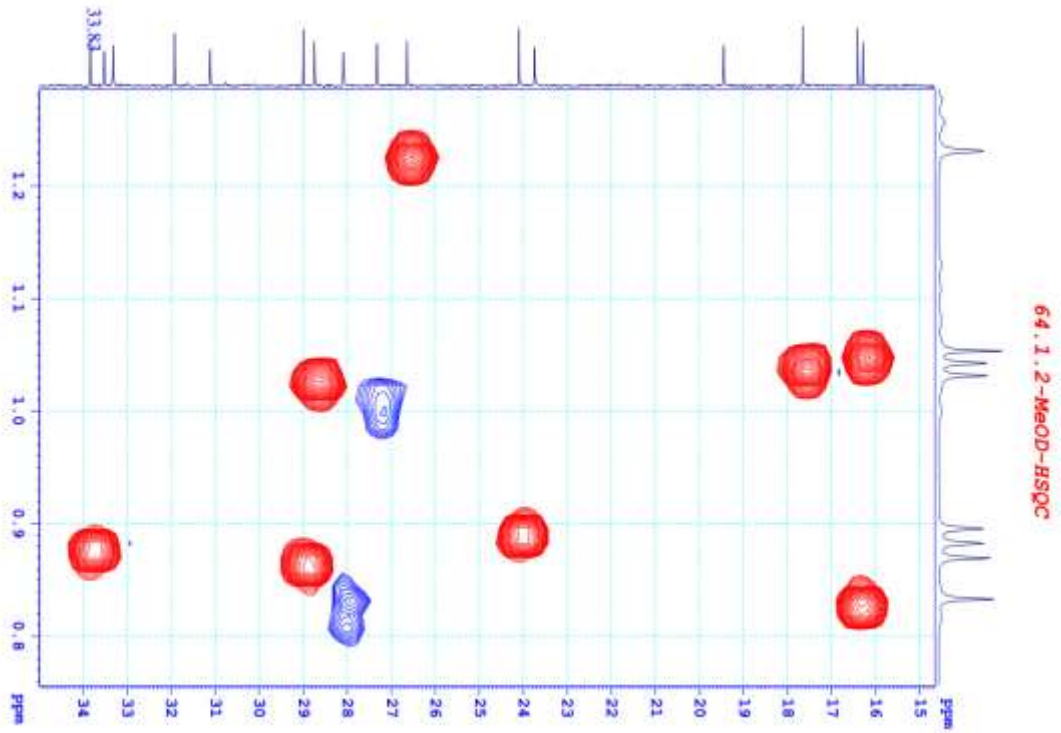
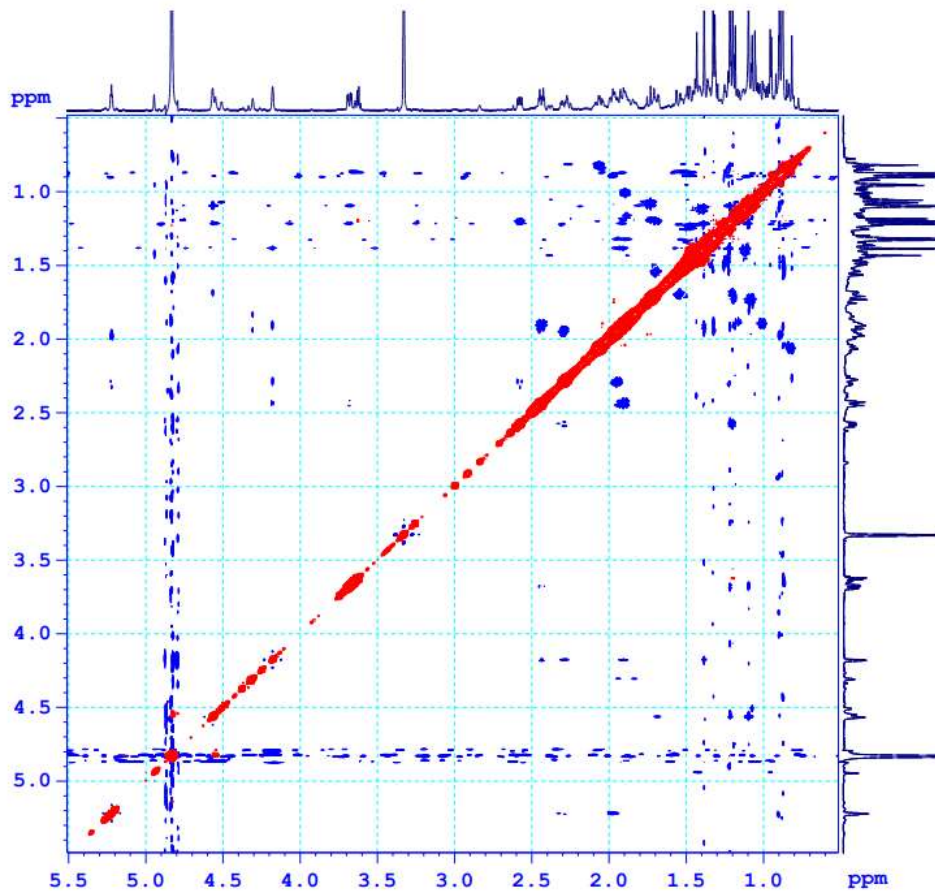


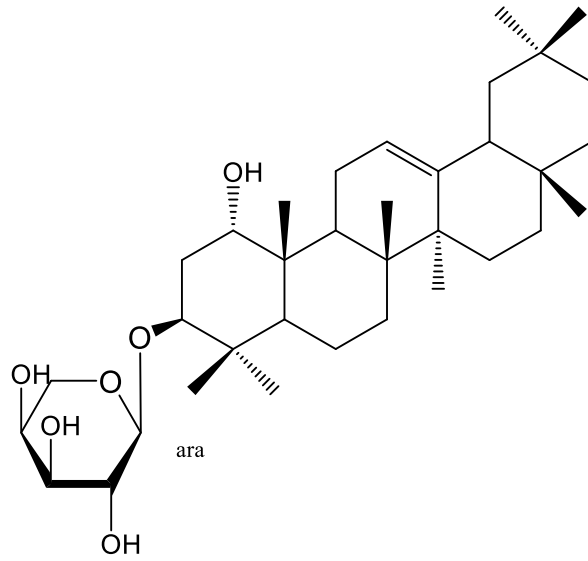




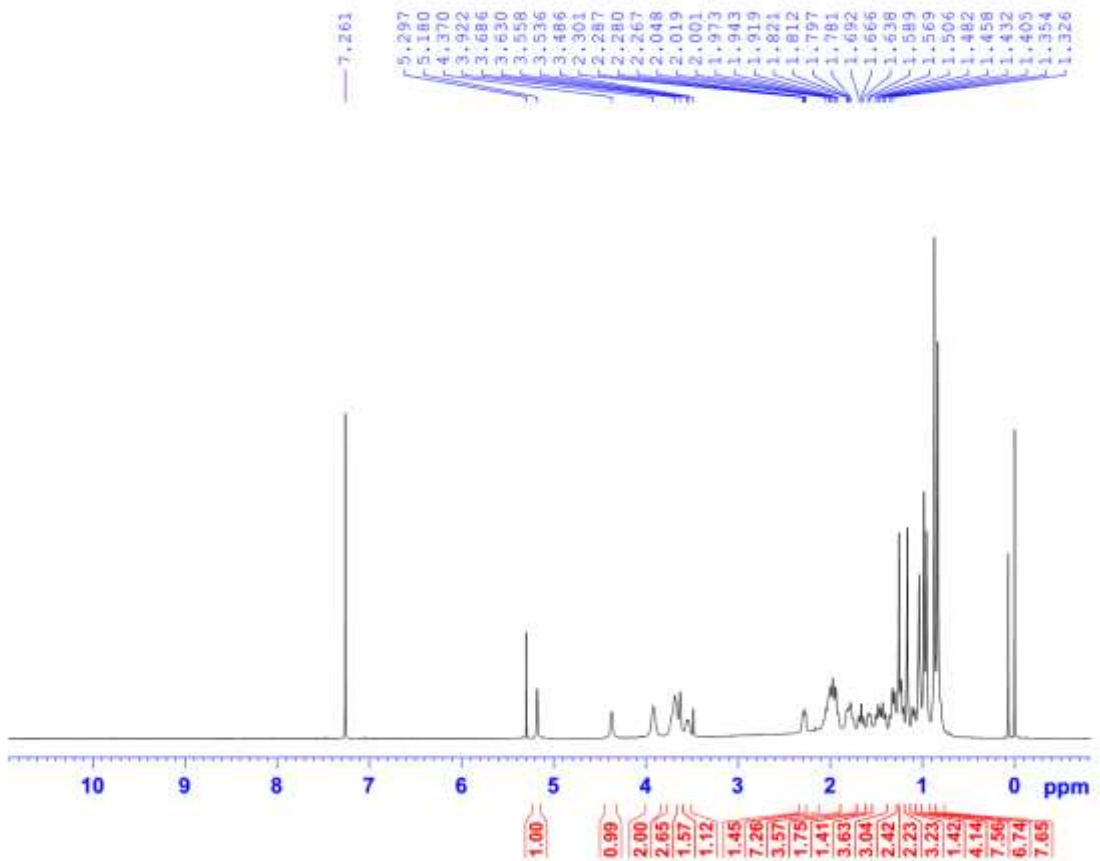




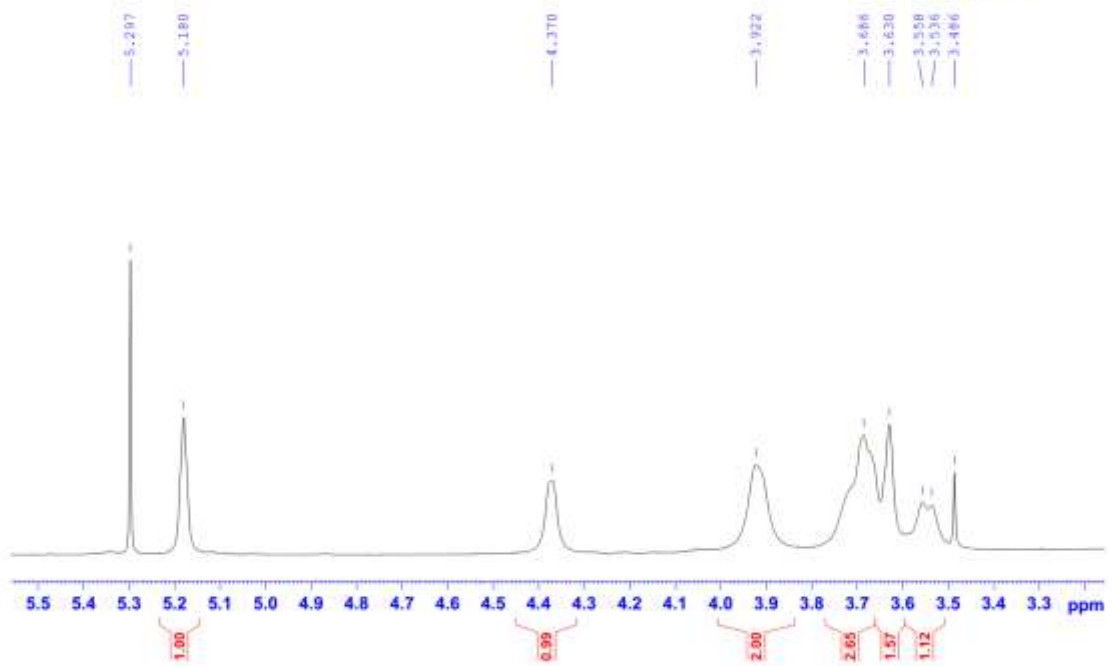
*COME64.1.2-MeOD-NOESY*

20. Phổ của hợp chất **EH10**

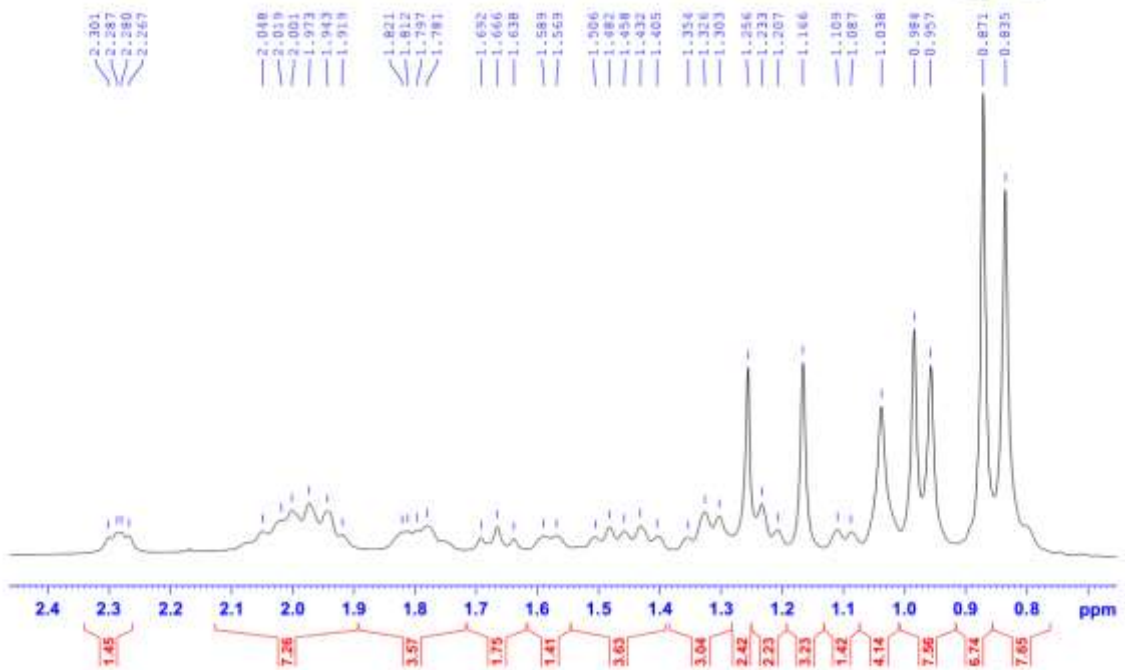
QCCH43.3C-CDC13-1H



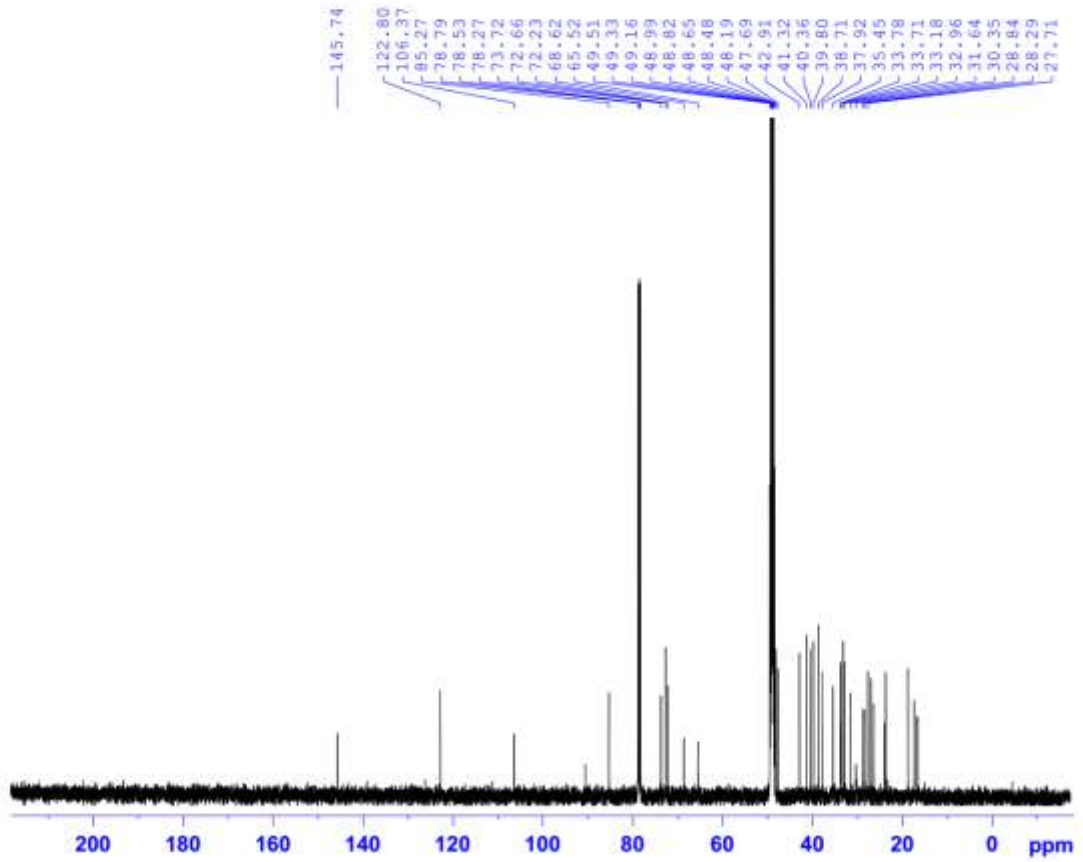
QCCH43.3C-CDC13-1H



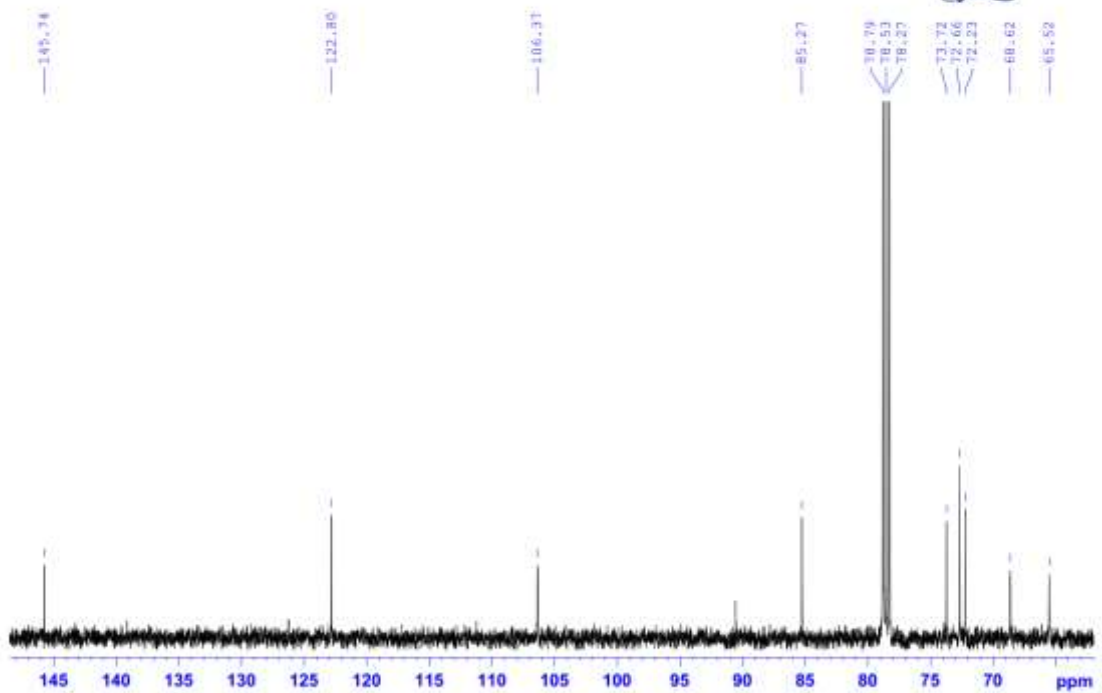
QCCH43.3C-CDC13-1H



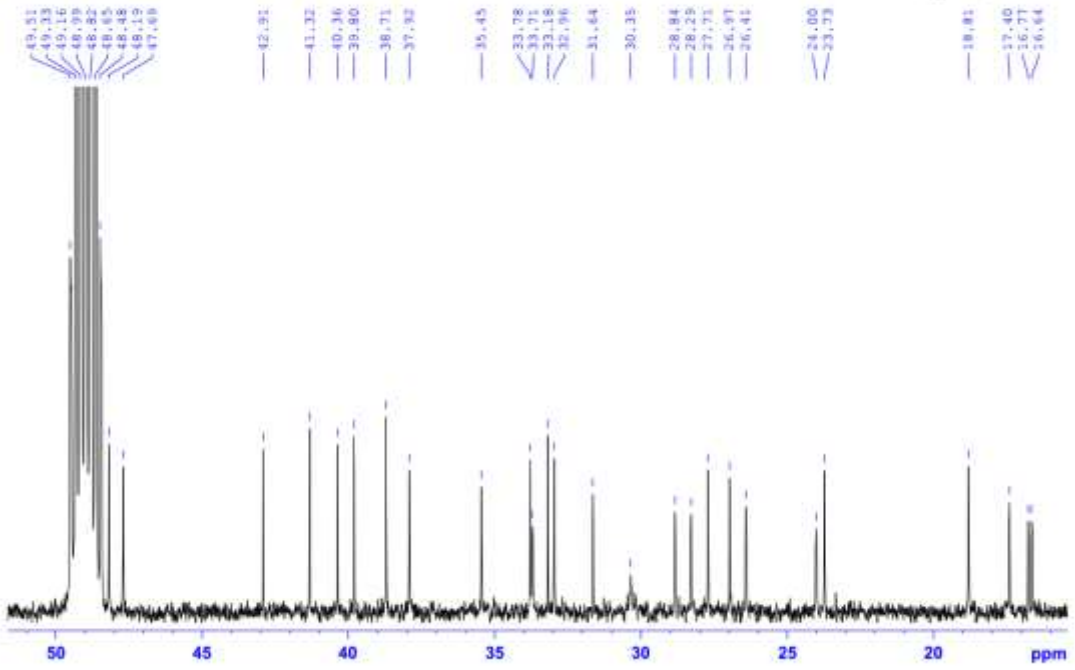
QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-C13CPD

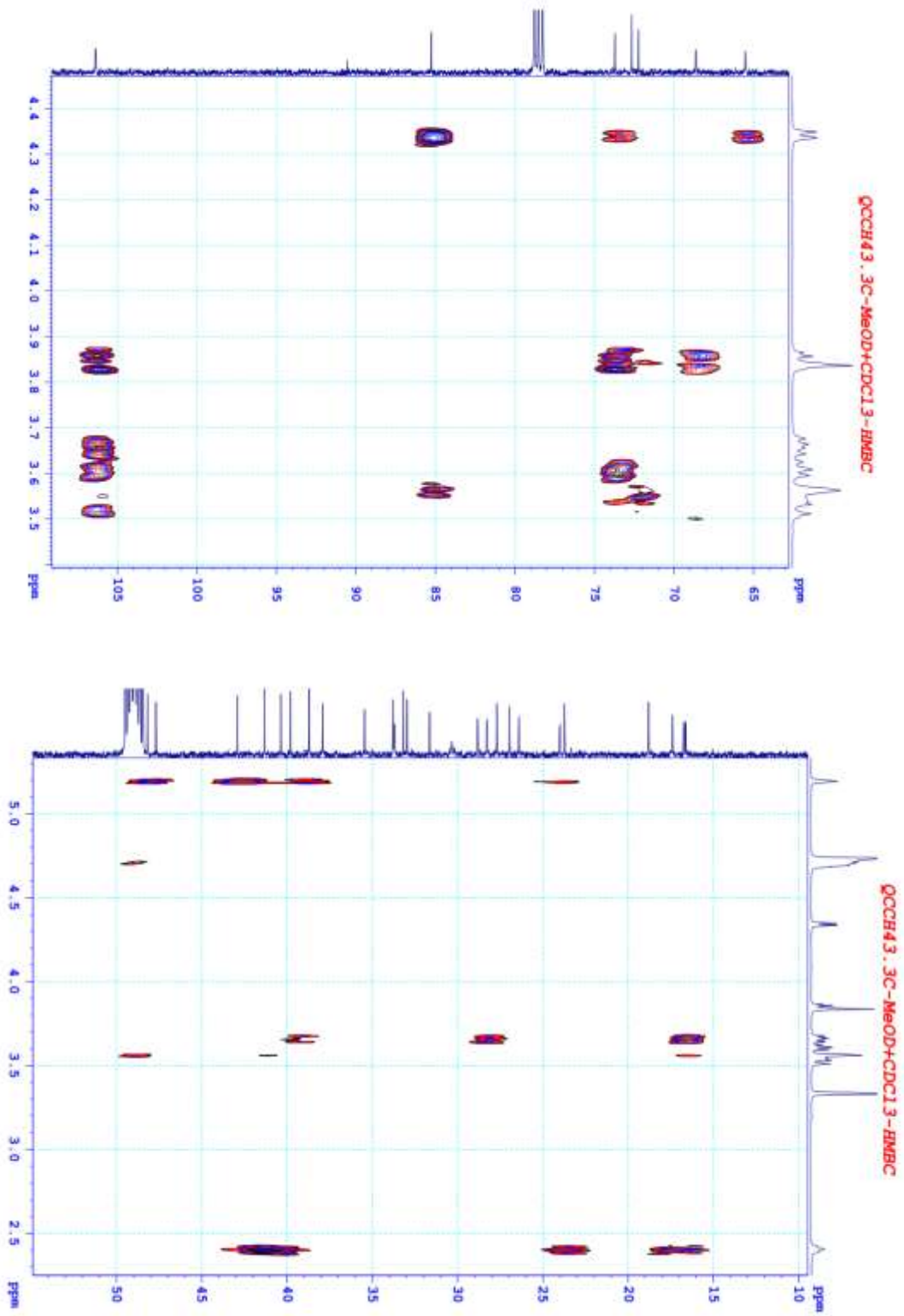


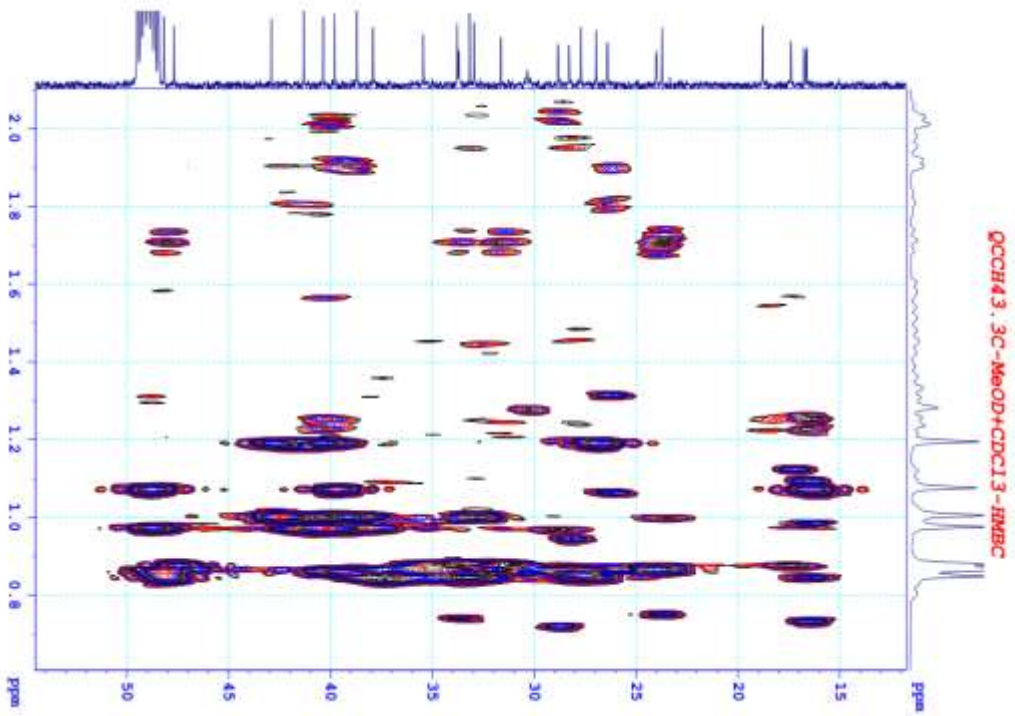
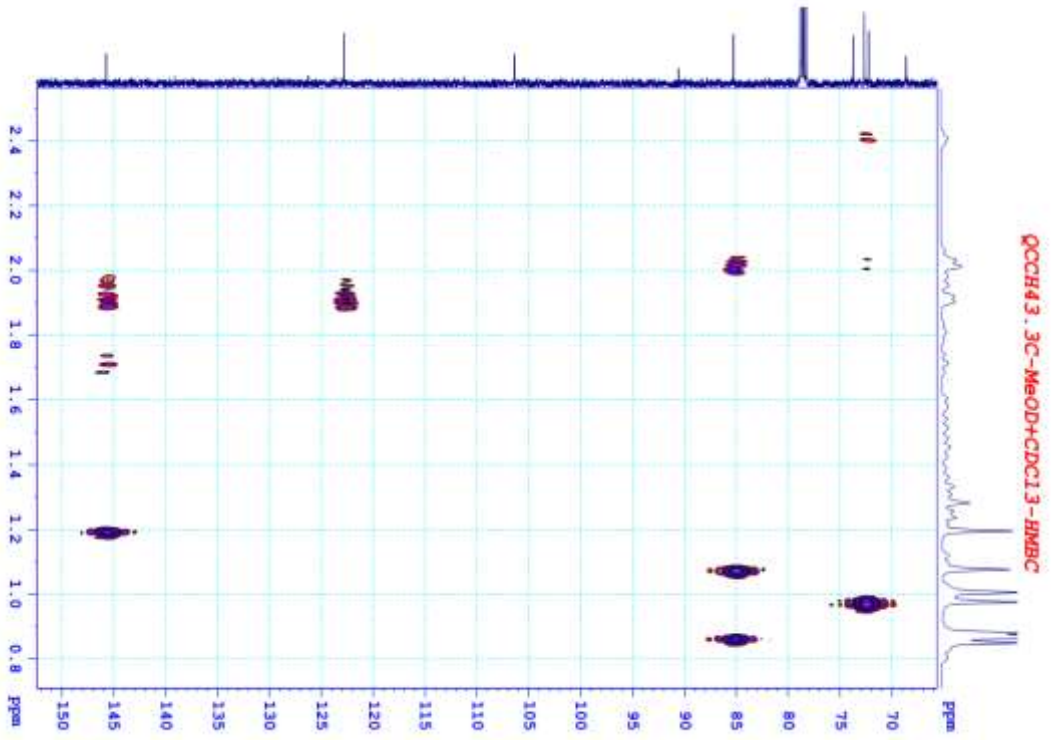
QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-C13CPD

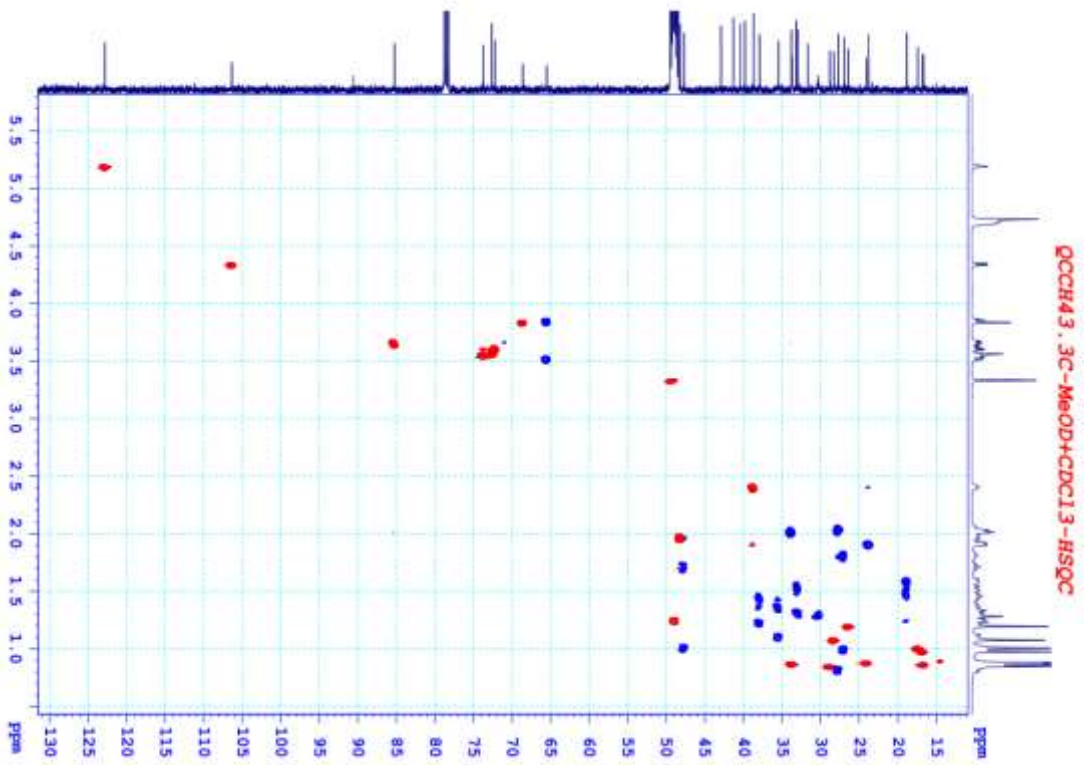
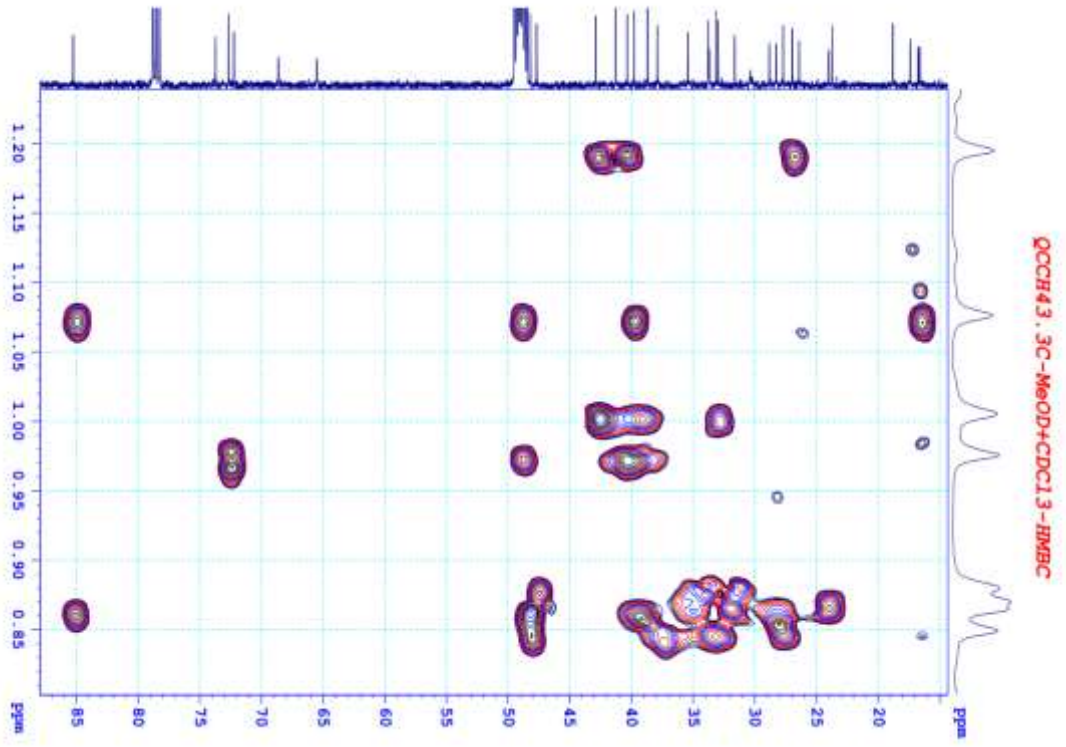


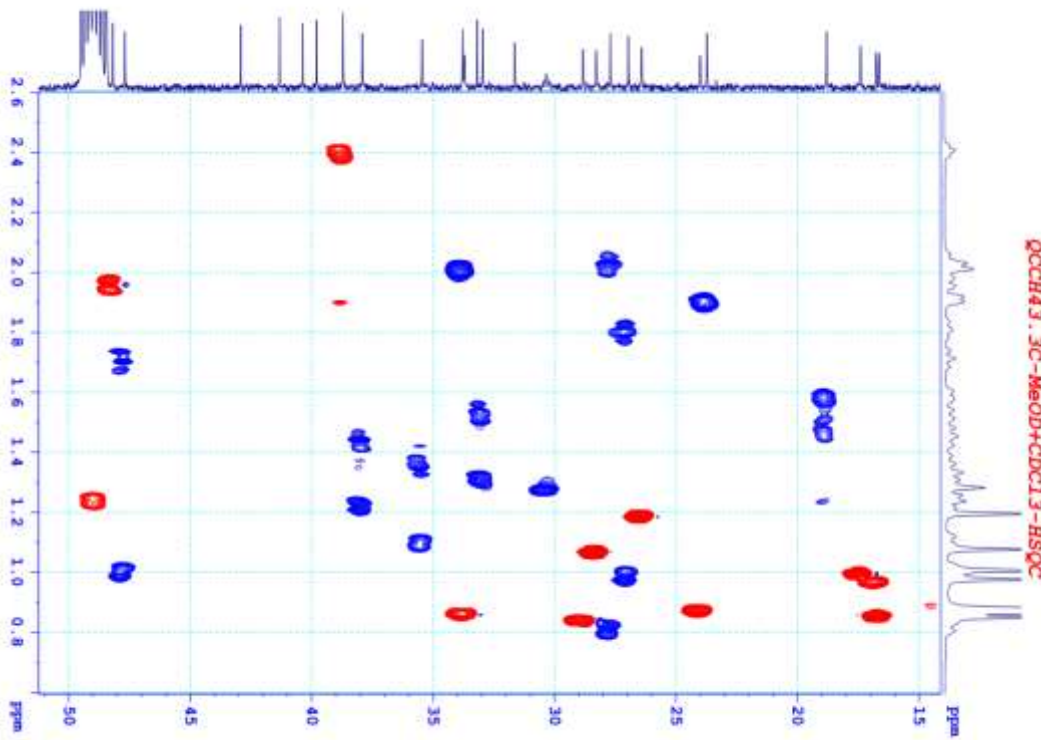
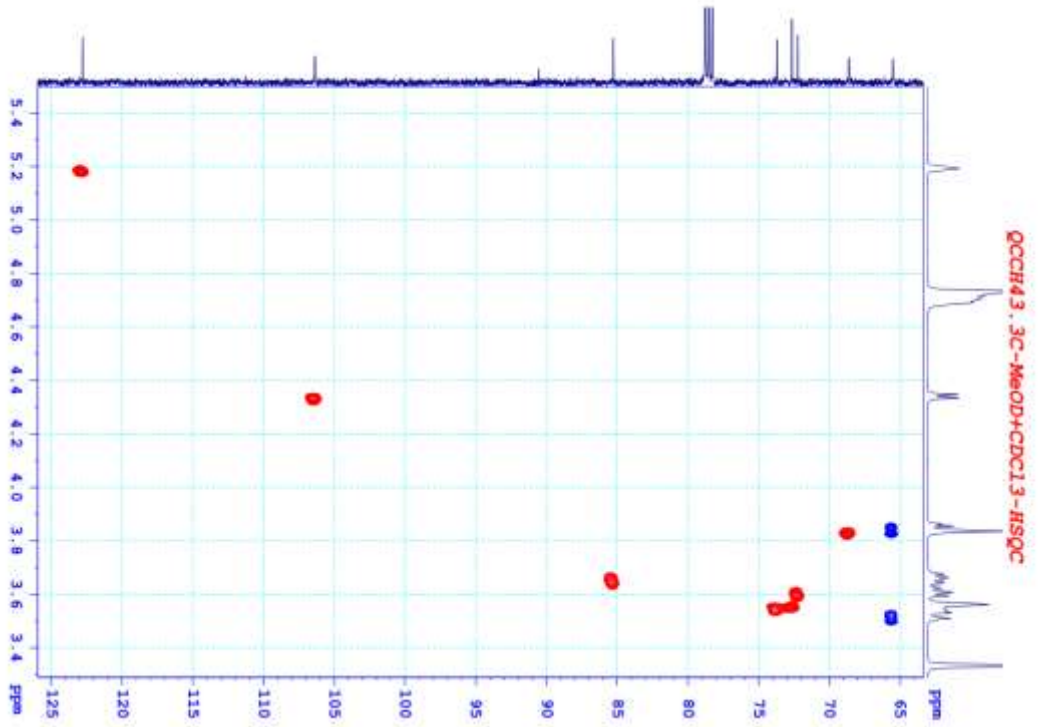
QCCH43. 3C-MeOD+CDCl3-C13CPD

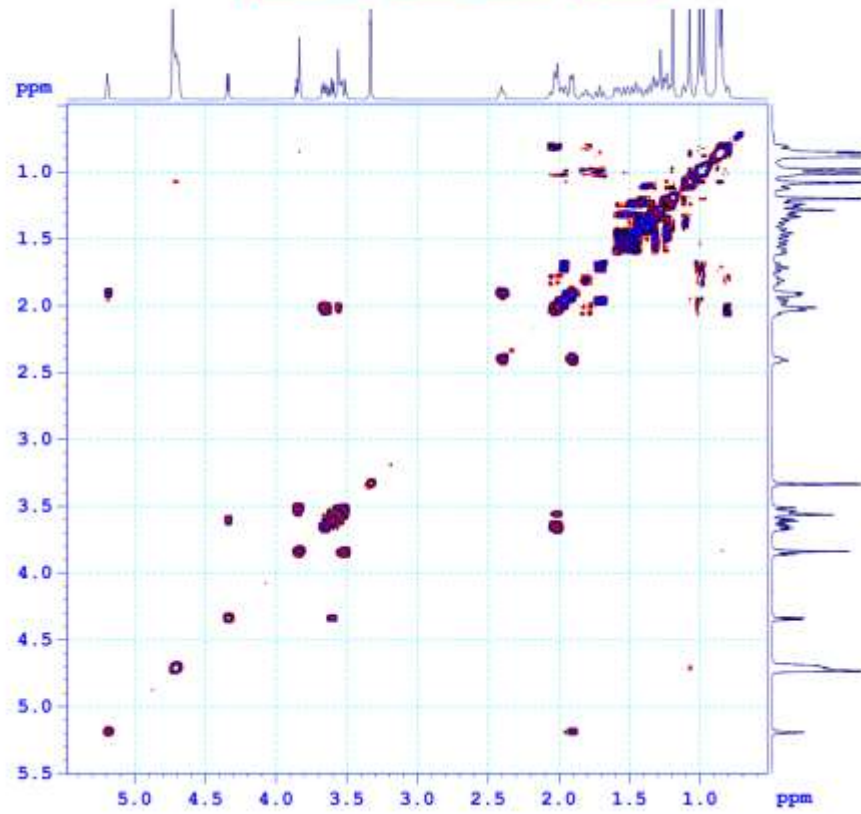
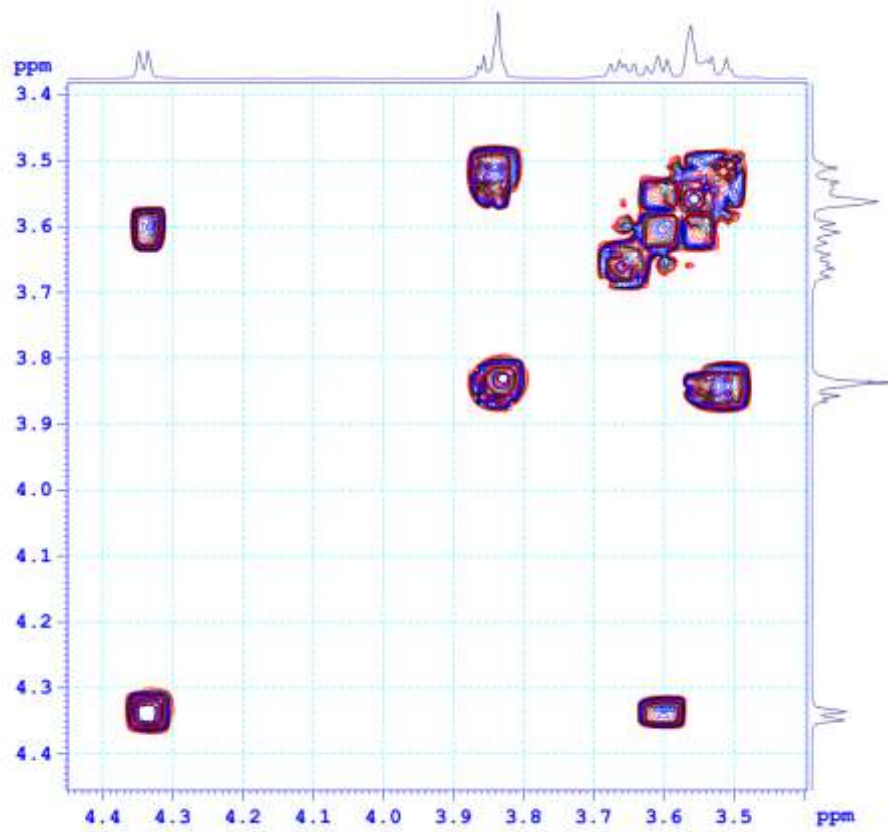




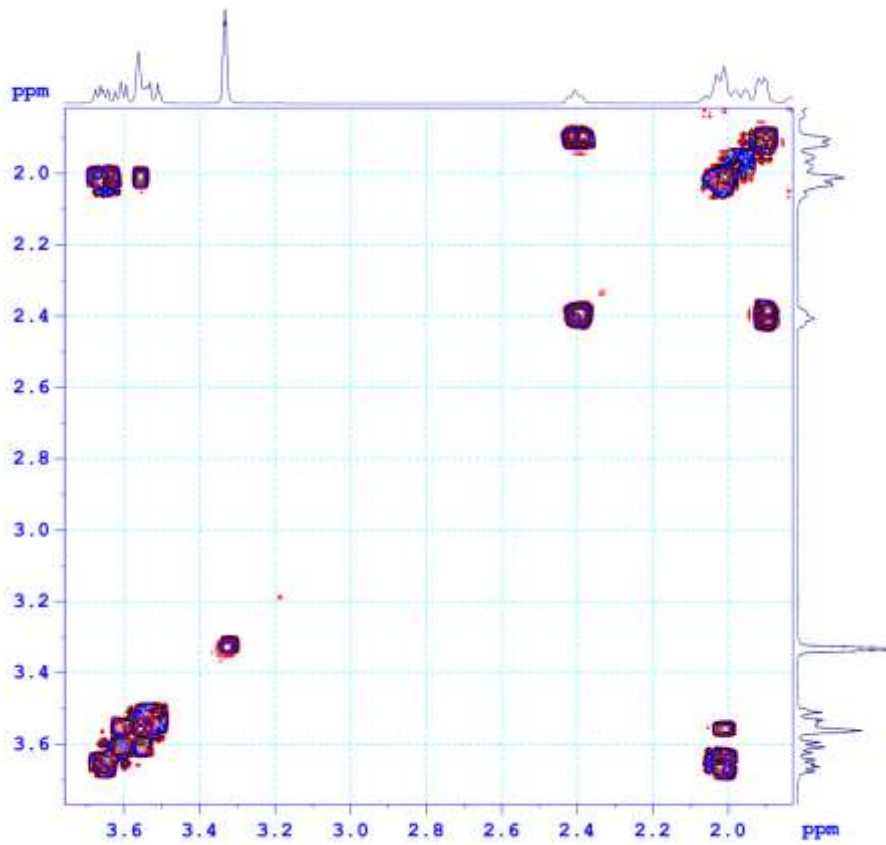




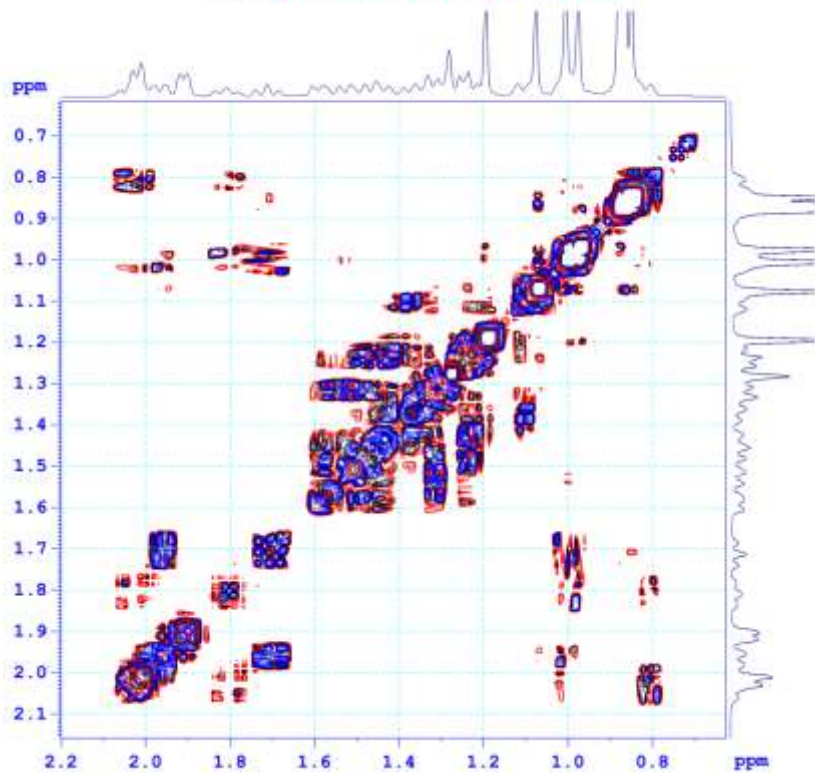


QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-COSYGP*QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-COSYGP*

QCCH43. 3C-MeOD+CDC13-COSYGP

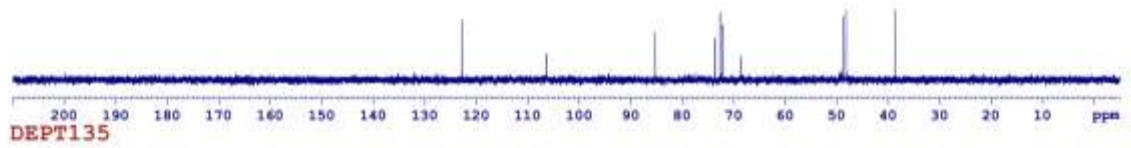


QCCH43. 3C-MeOD+CDC13-COSYGP

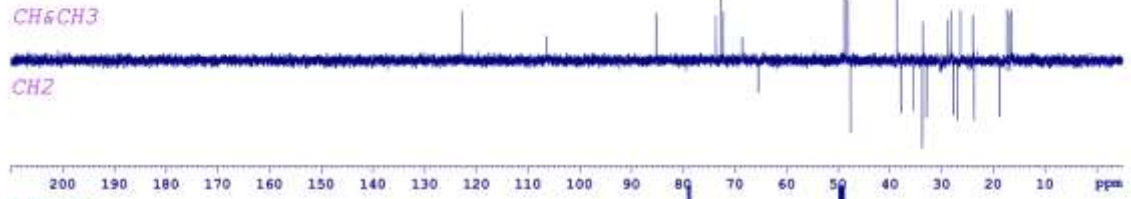


QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-C13CPD &DEPT

DEPT90



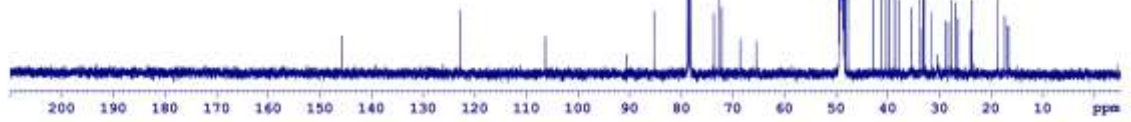
DEPT135



CH&CH3

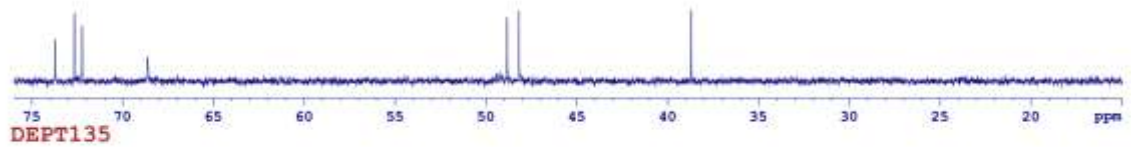
CH2

C13CPD

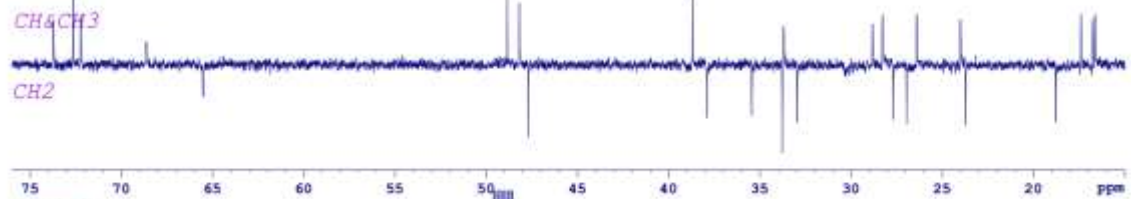


QCCH43.3C-MeOD+CDCl3-C13CPD &DEPT

DEPT90



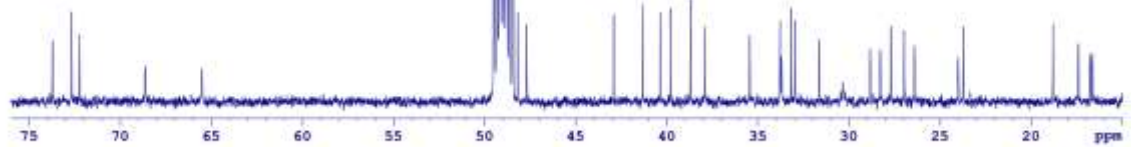
DEPT135

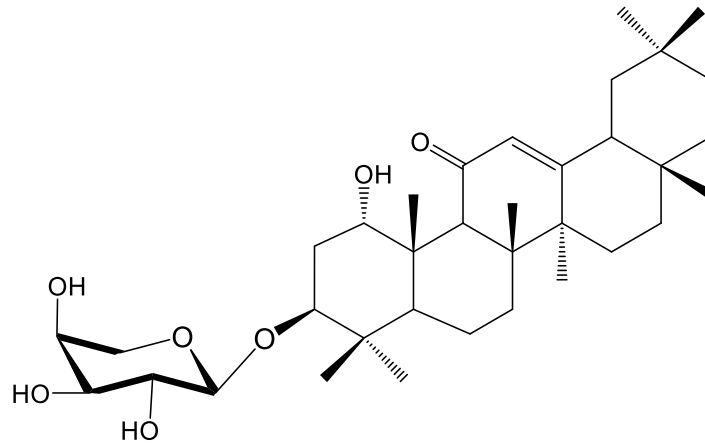


CH&CH3

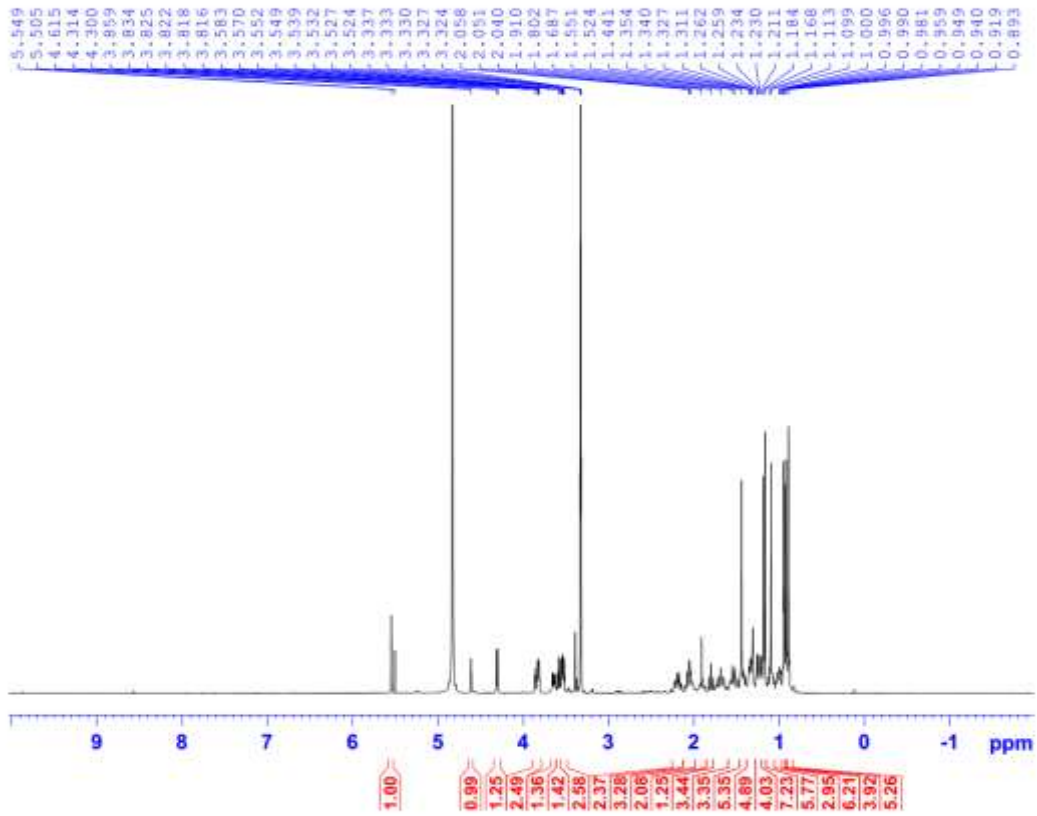
CH2

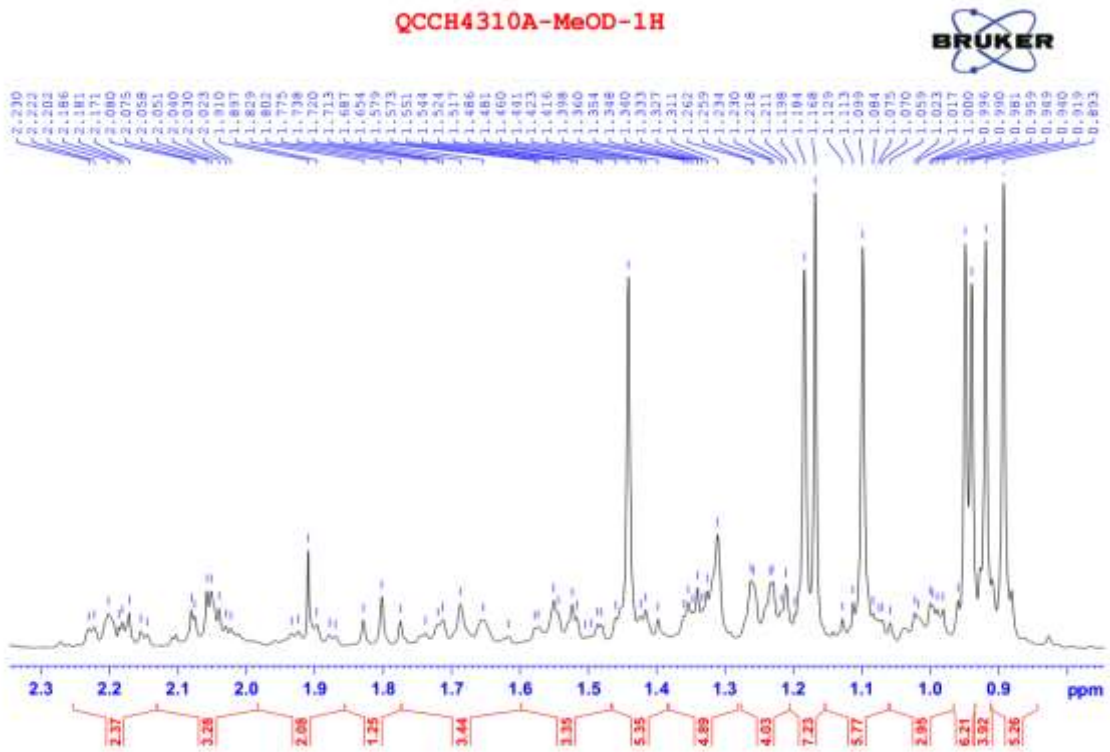
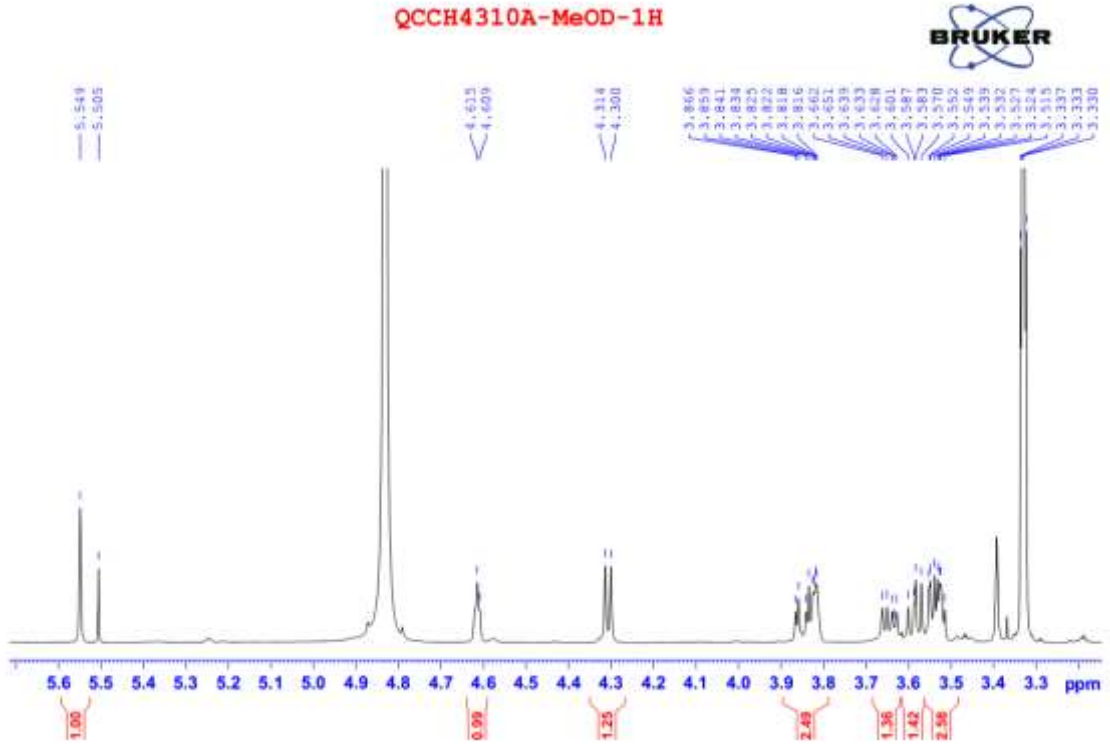
C13CPD



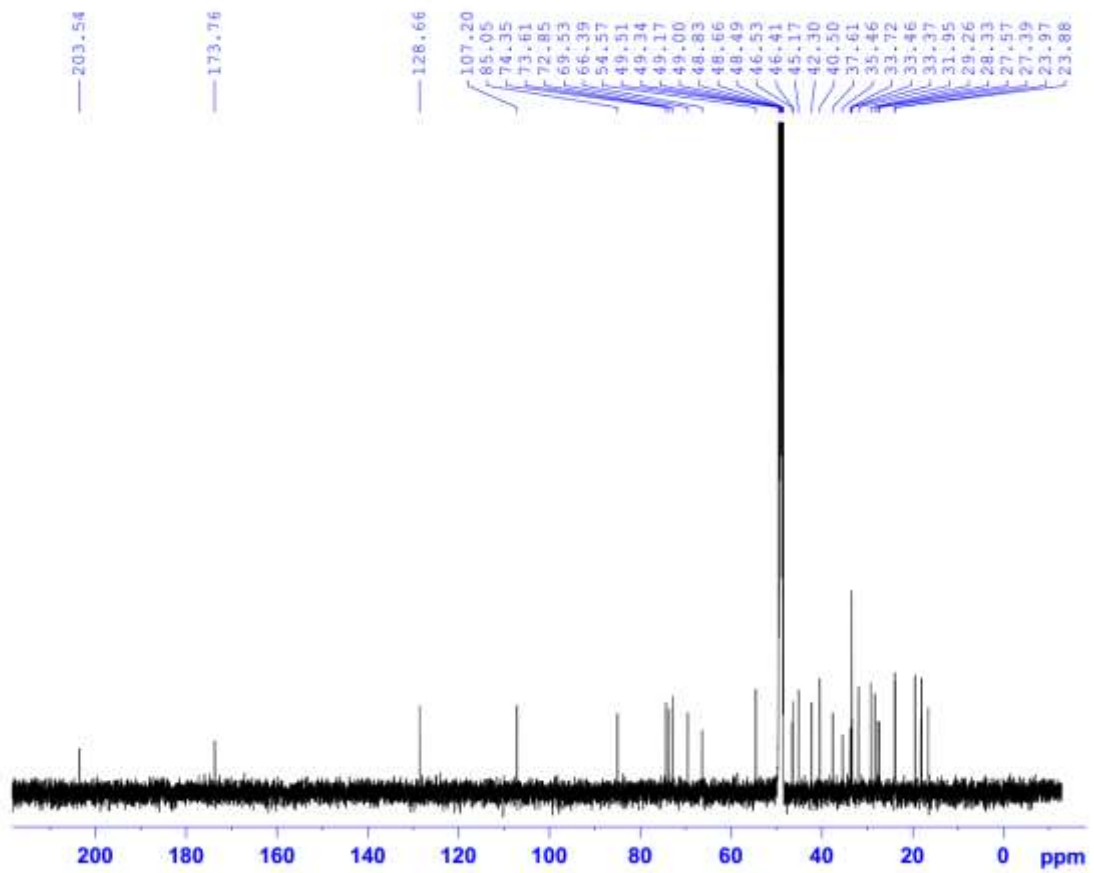
21. Phổ của hợp chất **EH11**

QCCH4310A-MeOD-1H

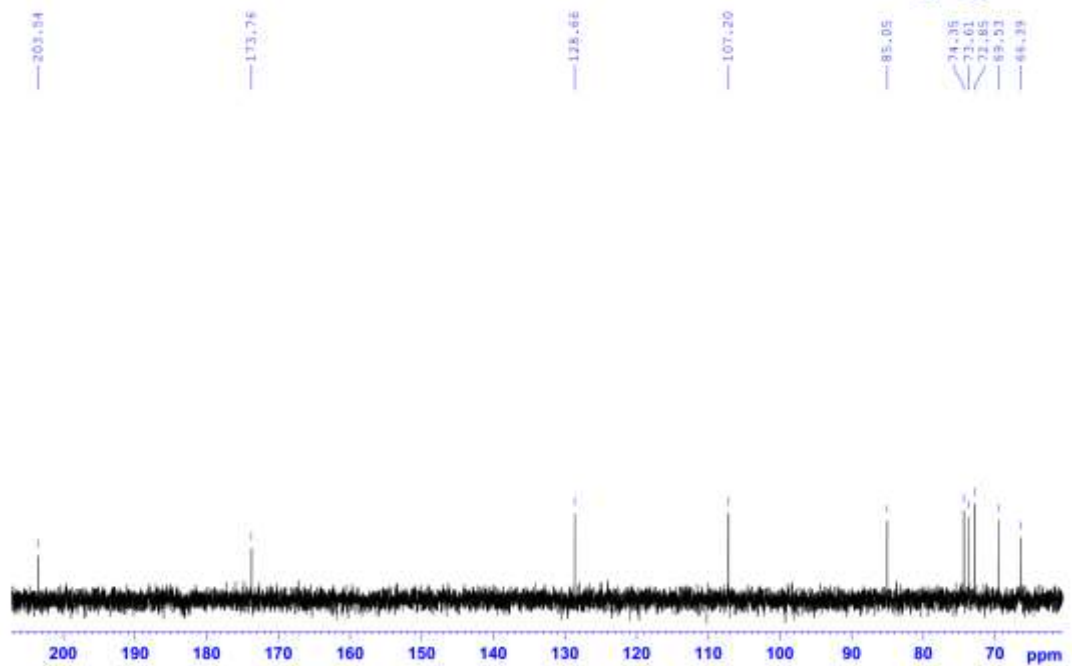


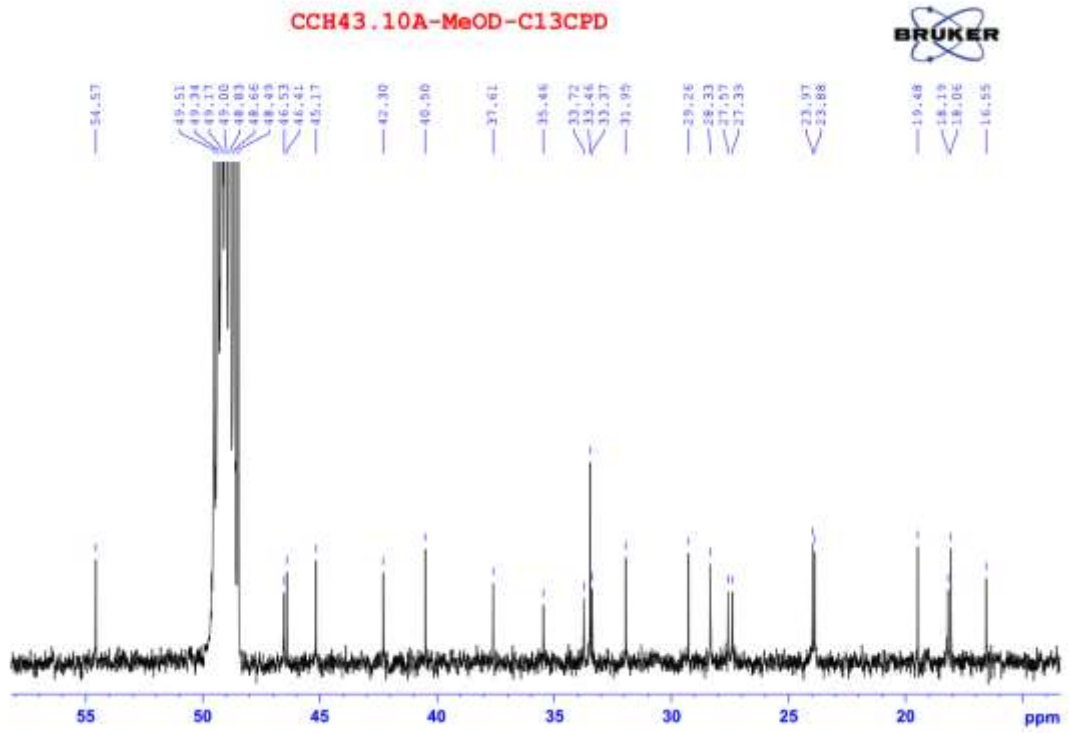


CCH43.10A-MeOD-C13CPD

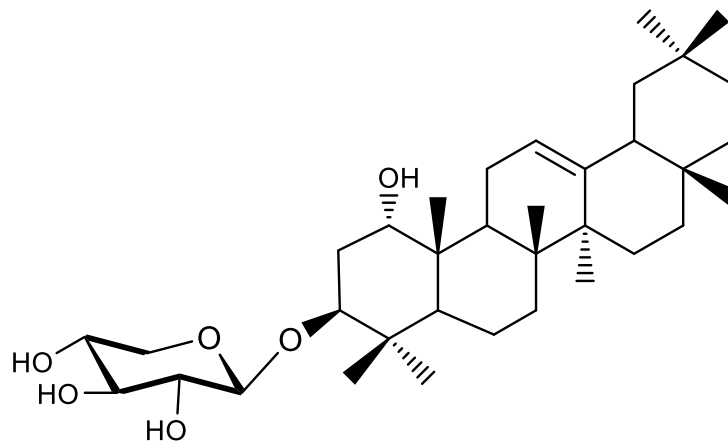


CCH43.10A-MeOD-C13CPD

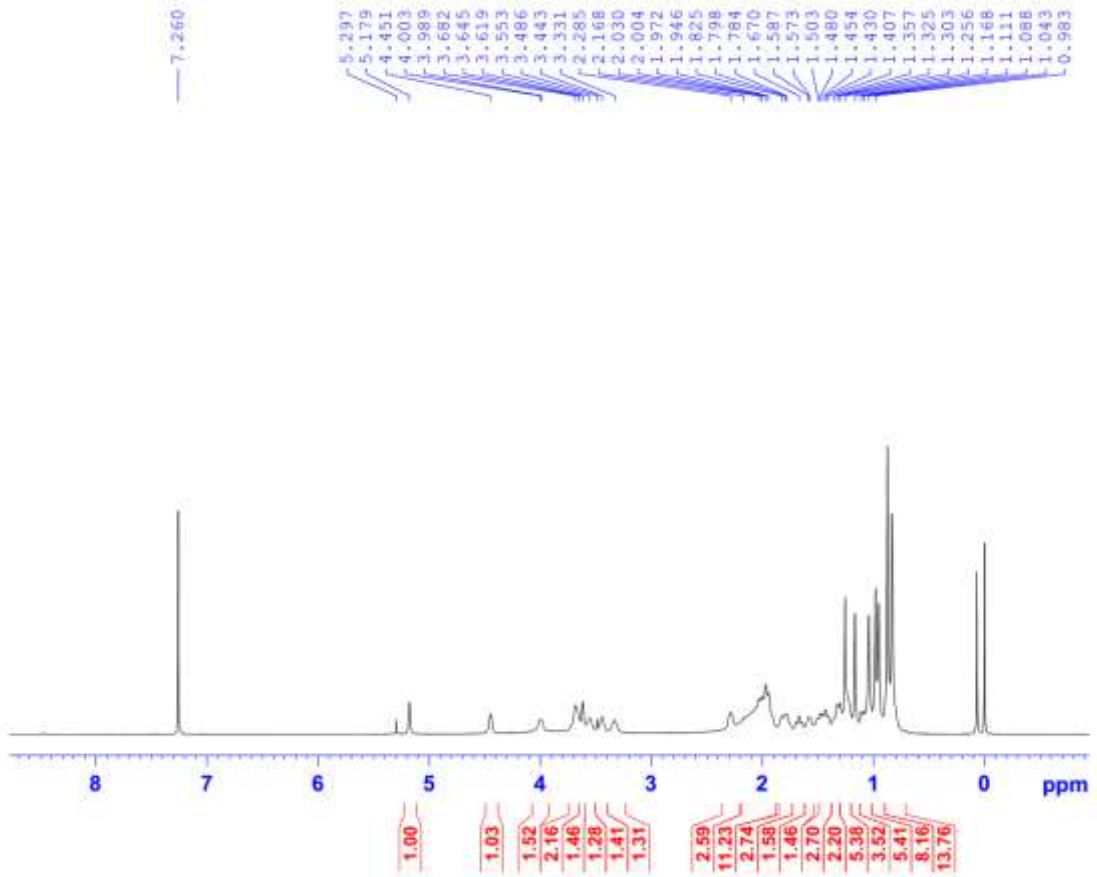




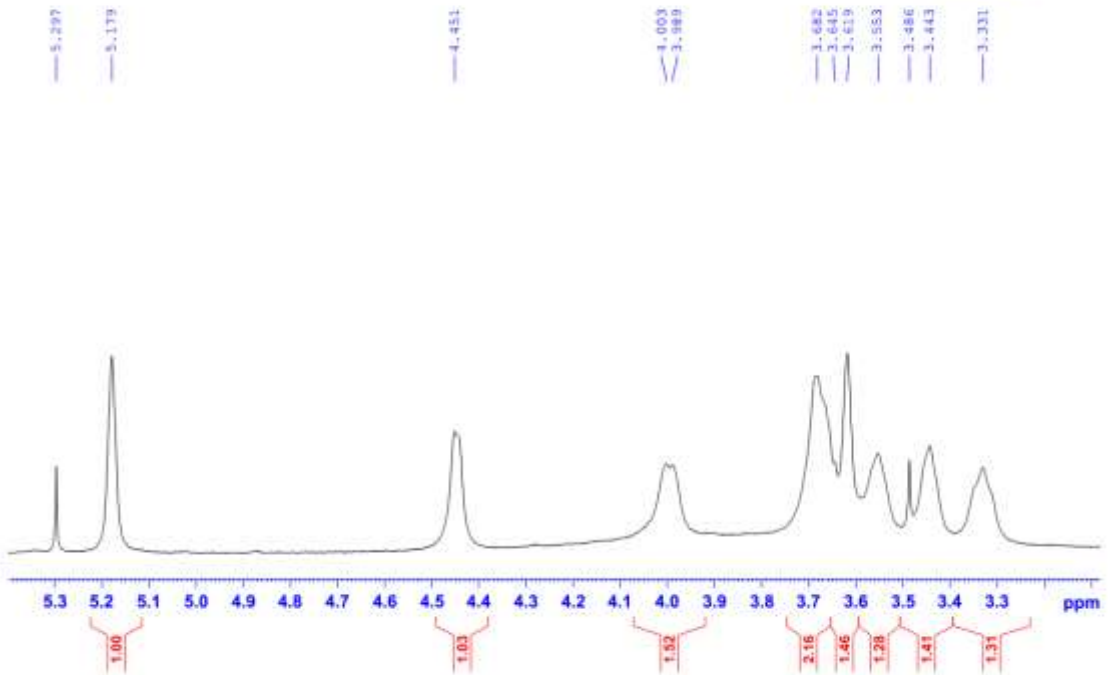
22. Phổ của hợp chất EH12



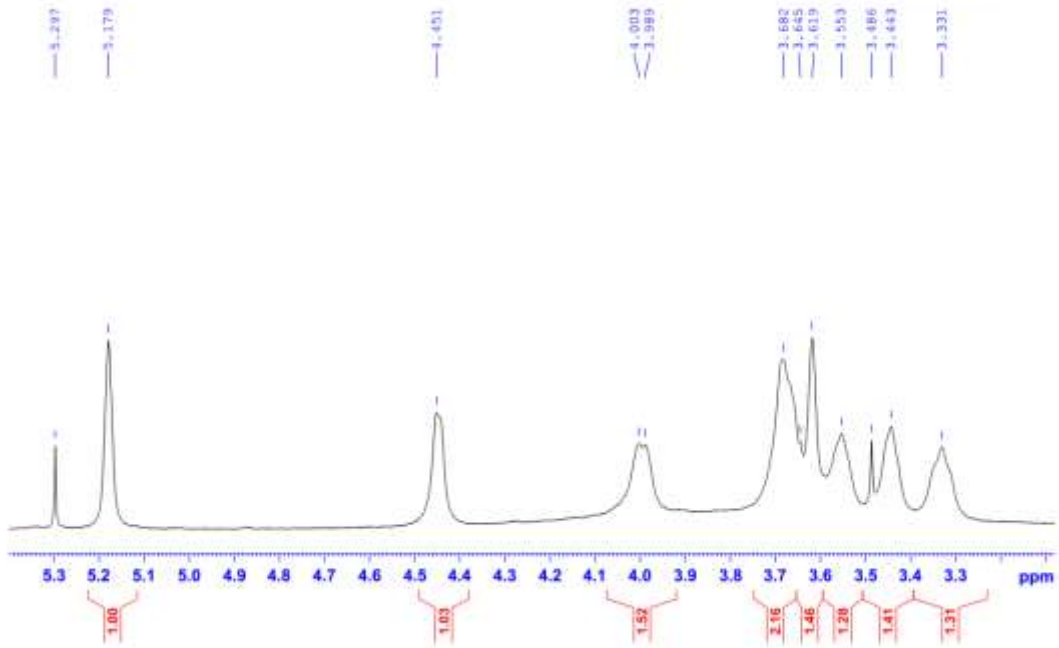
QCCH43.3B-CDC13-1H



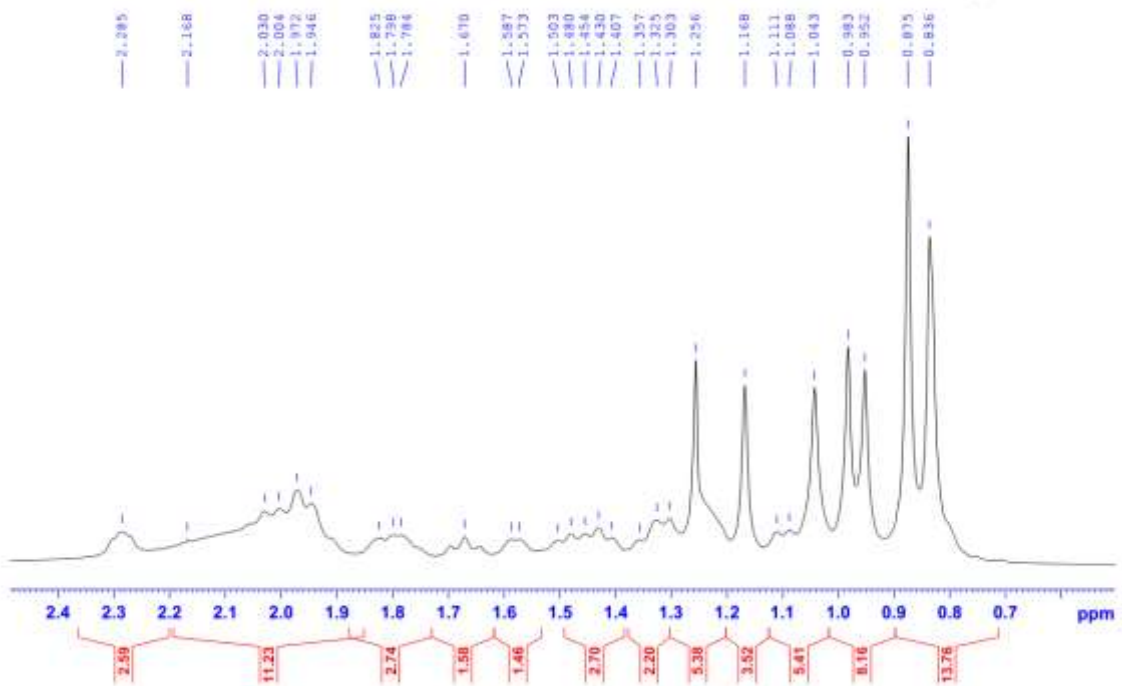
QCCH43.3B-CDC13-1H



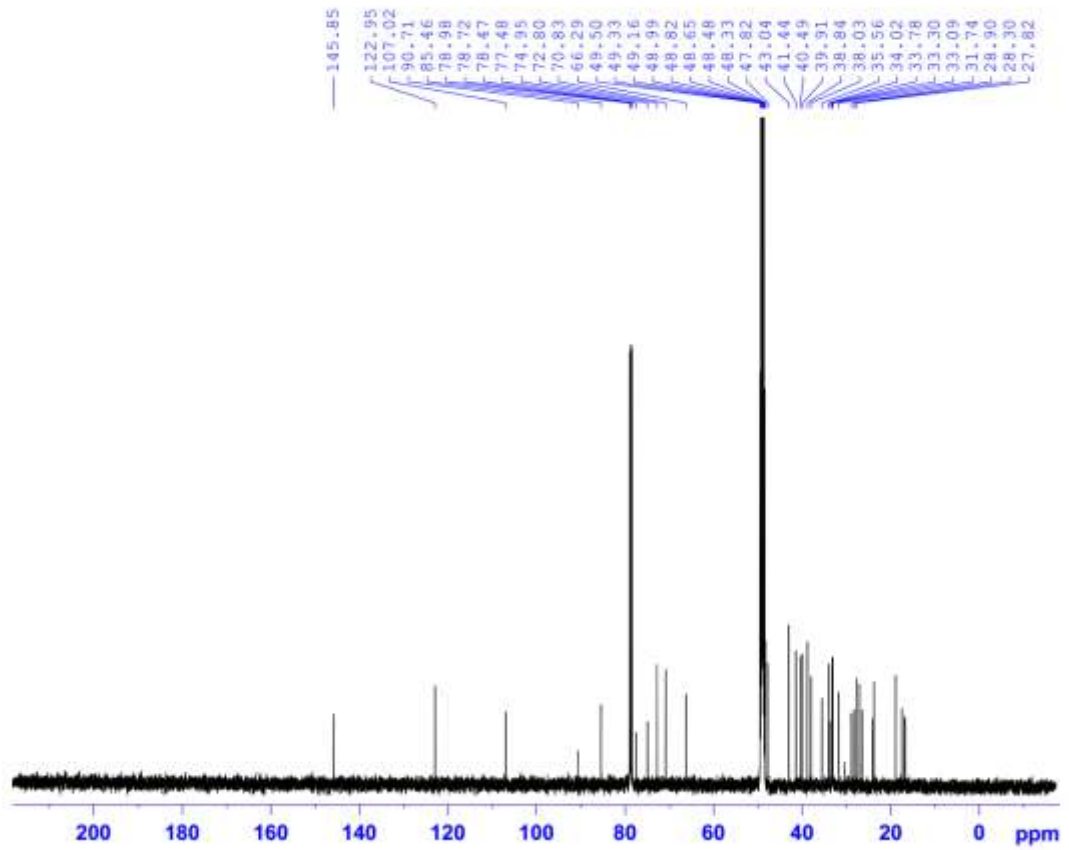
QCCH43.3B-CDC13-1H



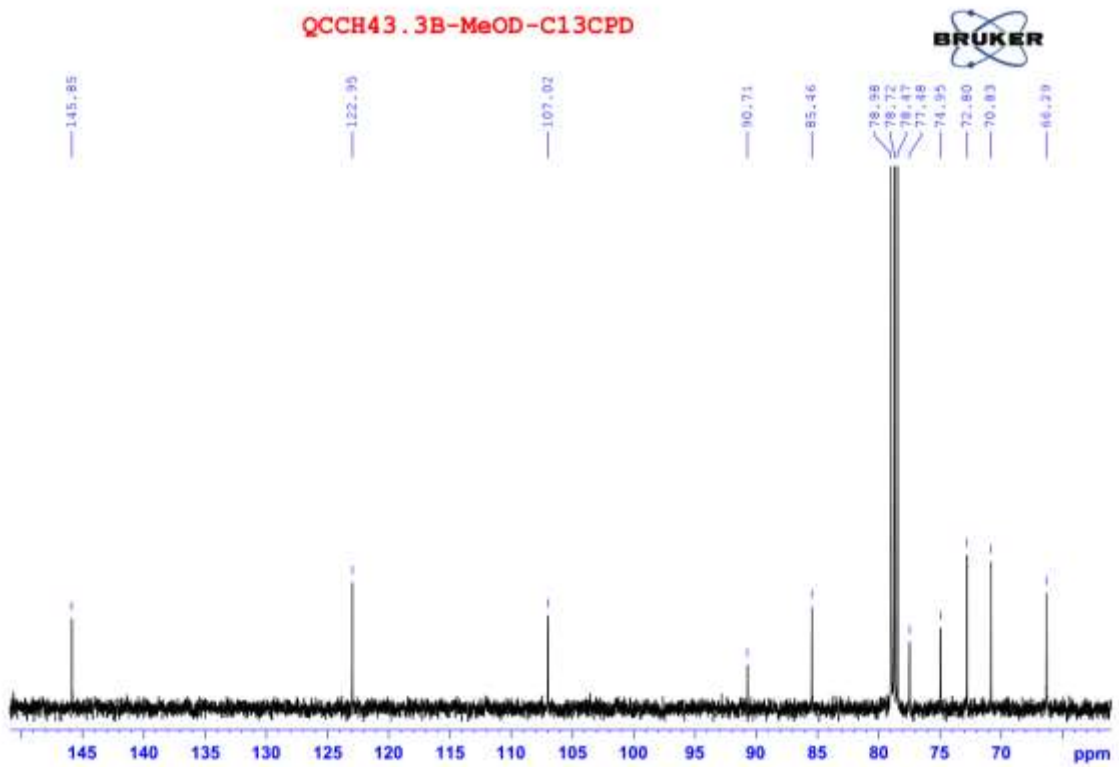
QCCH43.3B-CDC13-1H

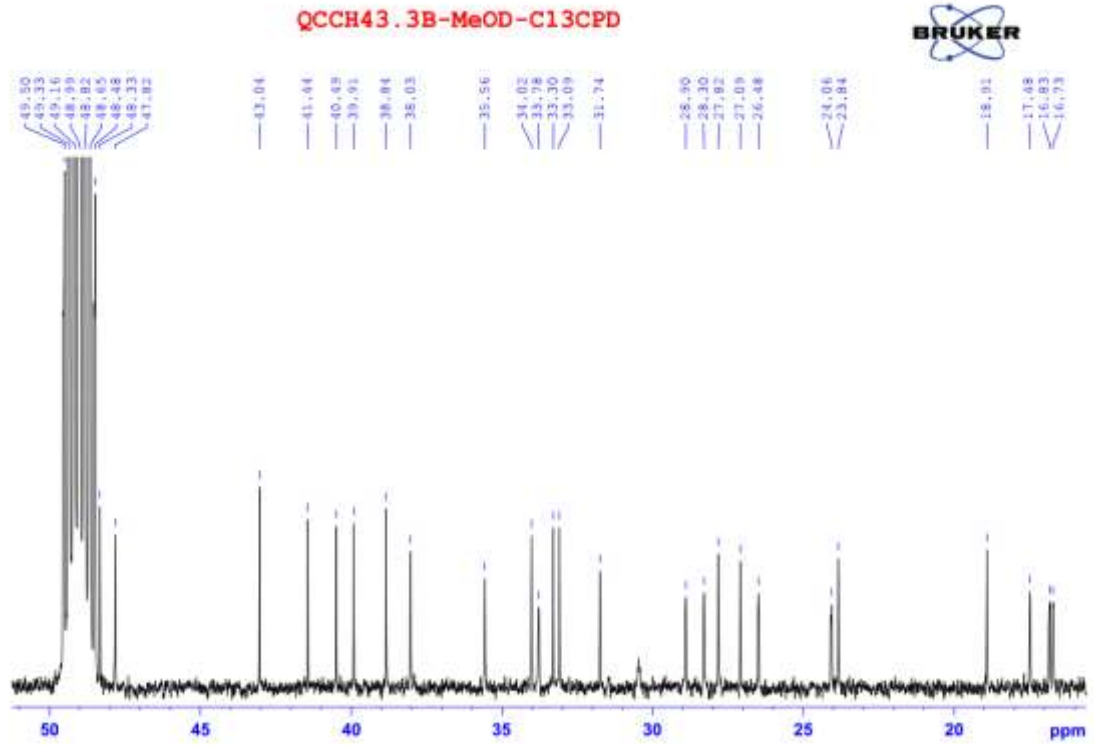


QCCH43.3B-MeOD-C13CPD

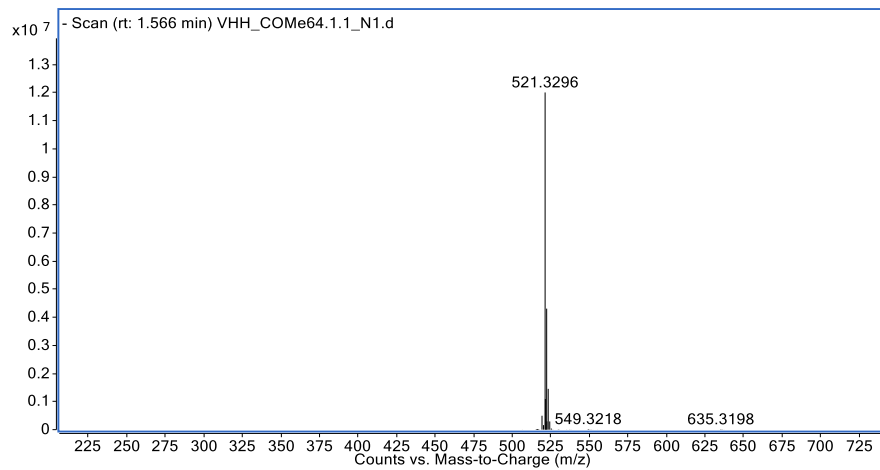
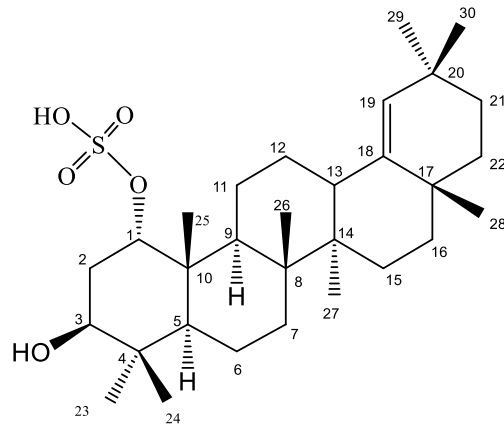


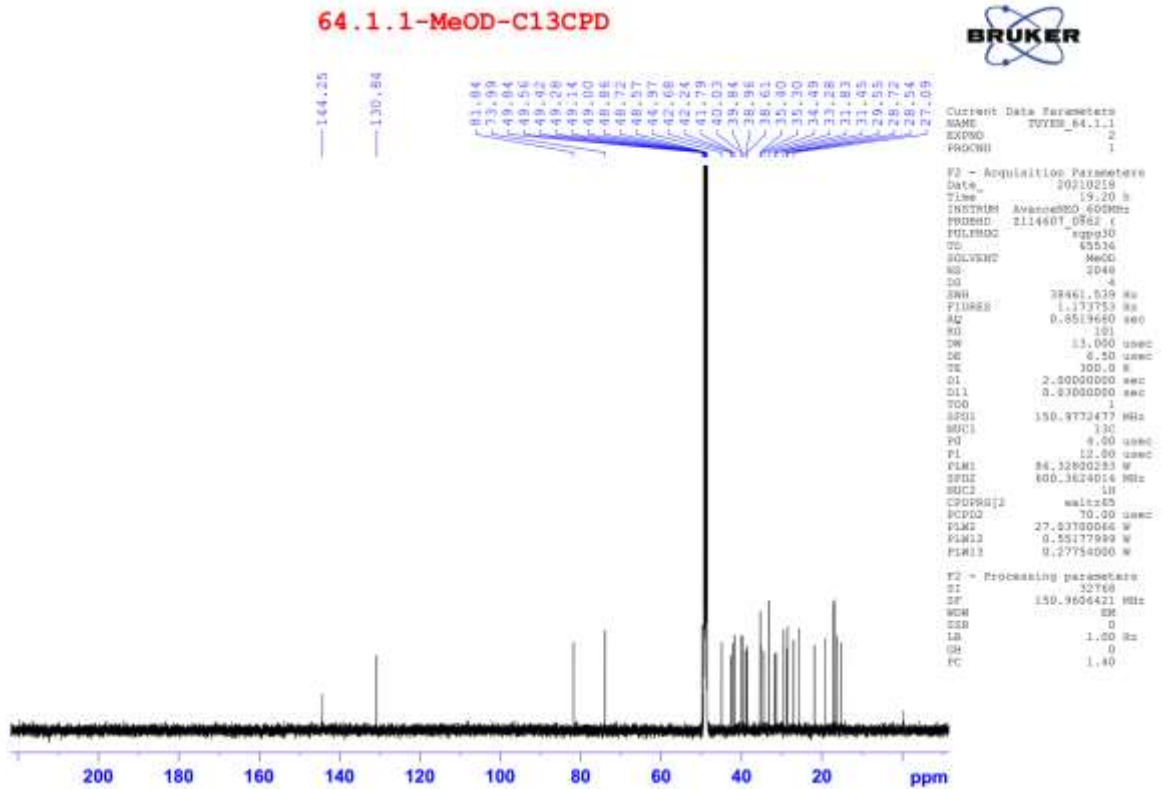
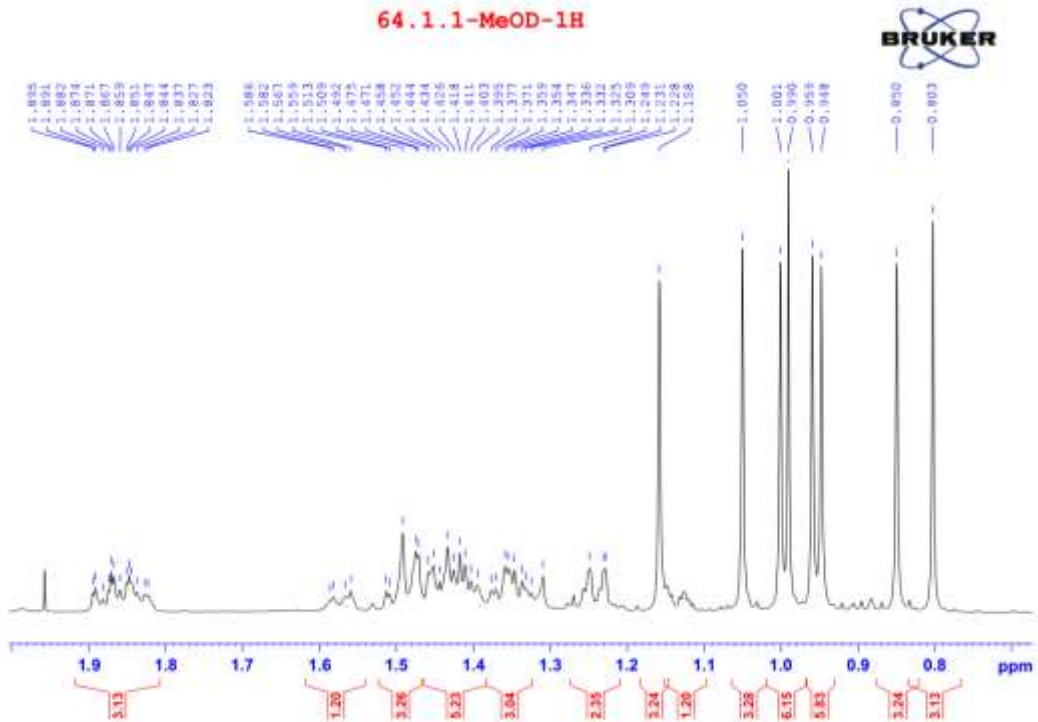
QCCH43.3B-MeOD-C13CPD

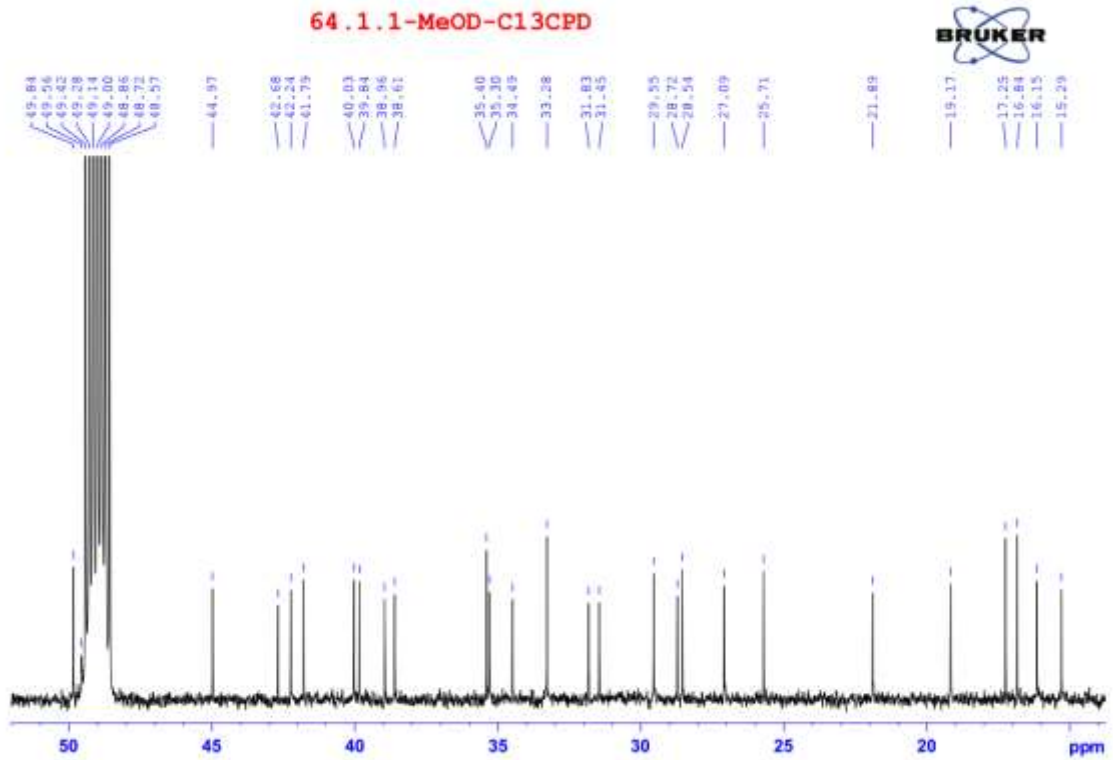
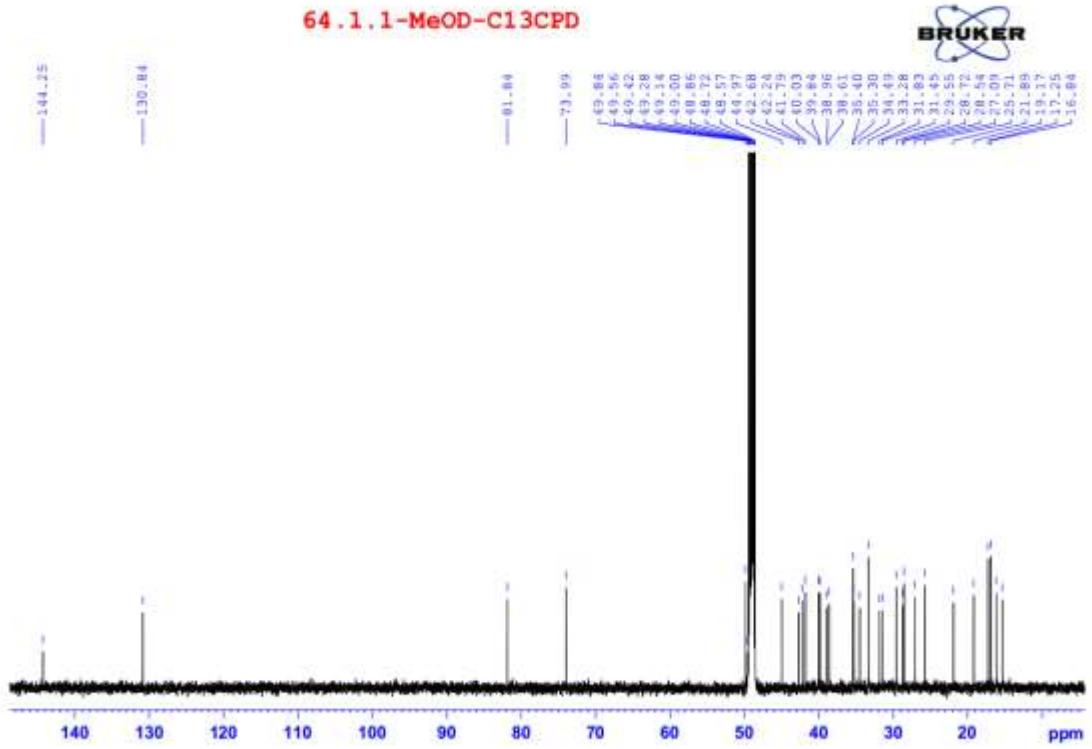


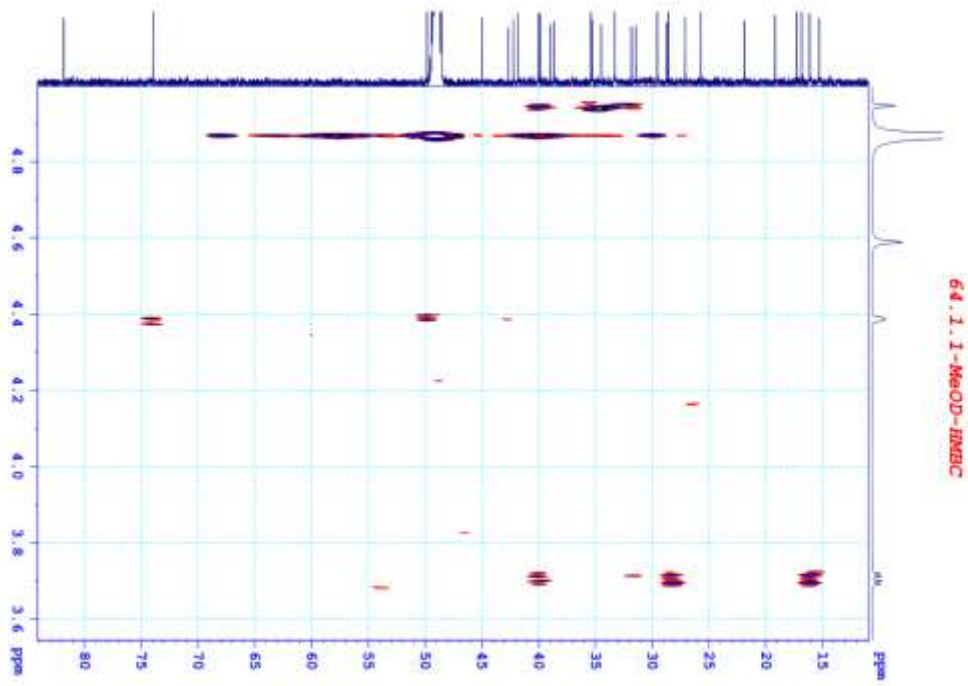
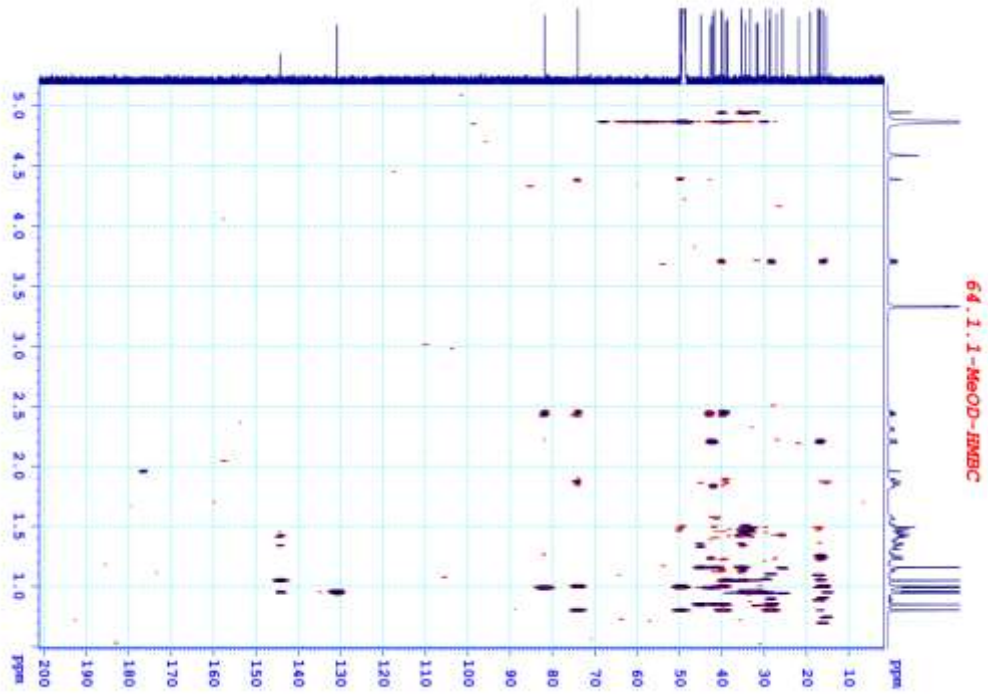


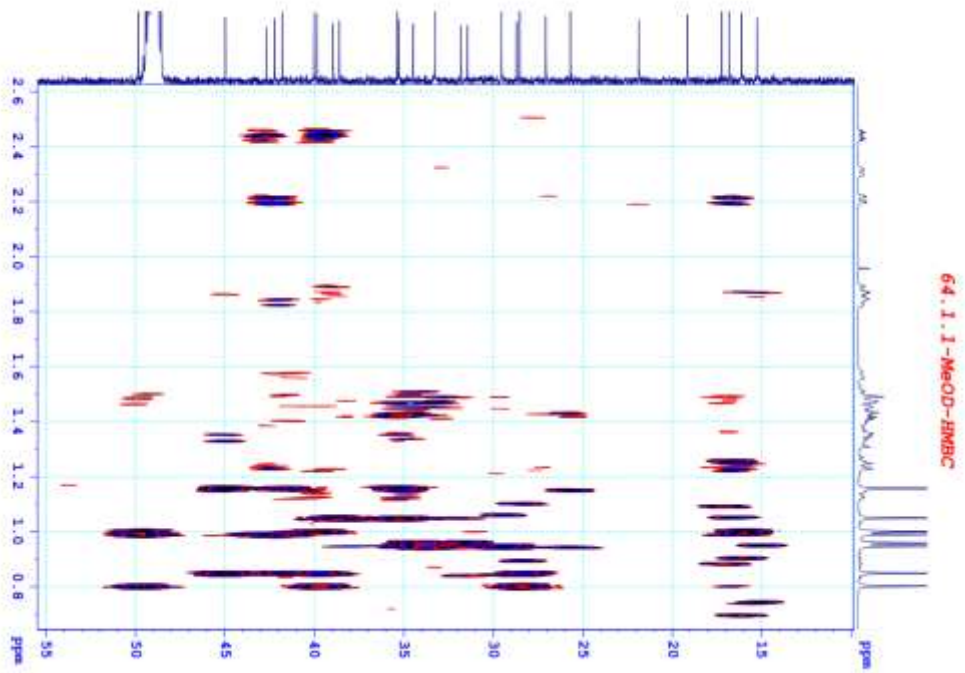
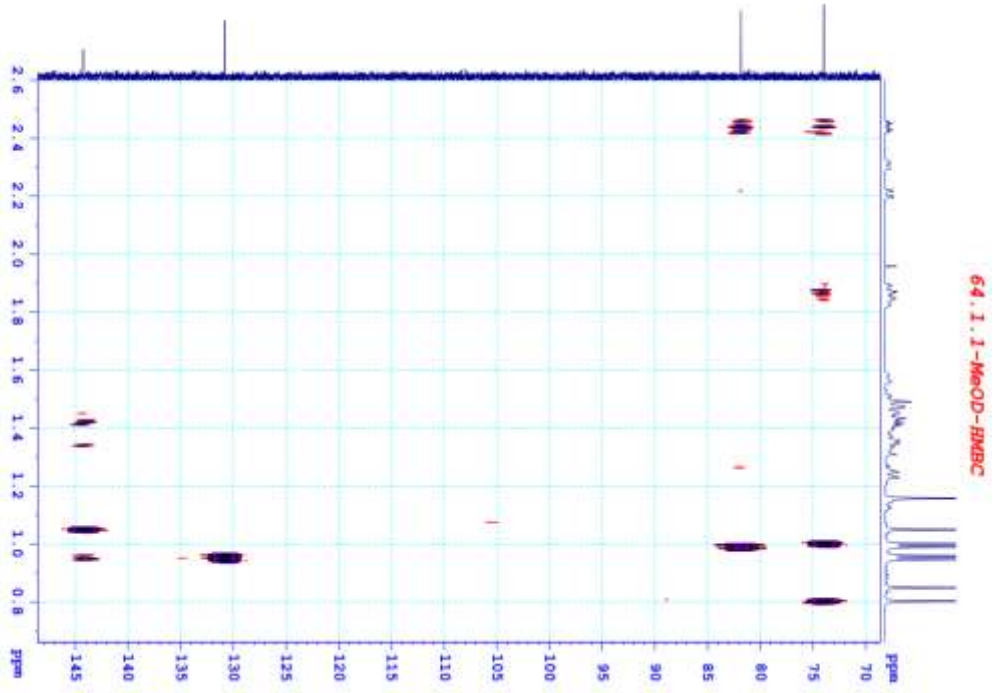
23. Phổ của hợp chất **EH13**

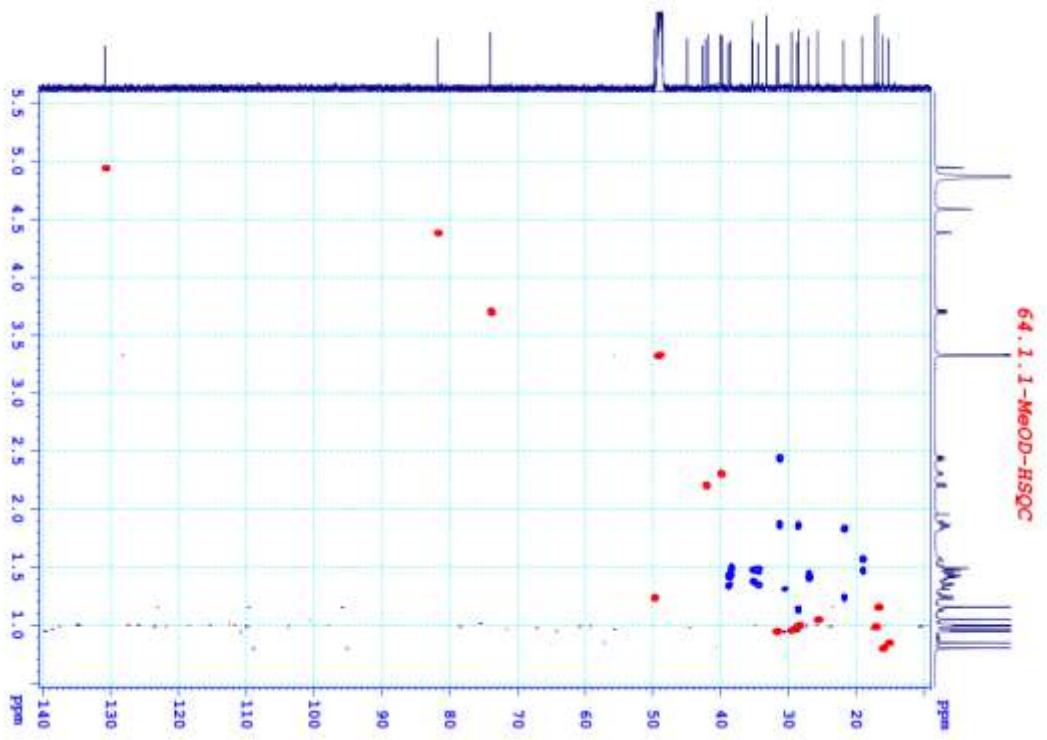
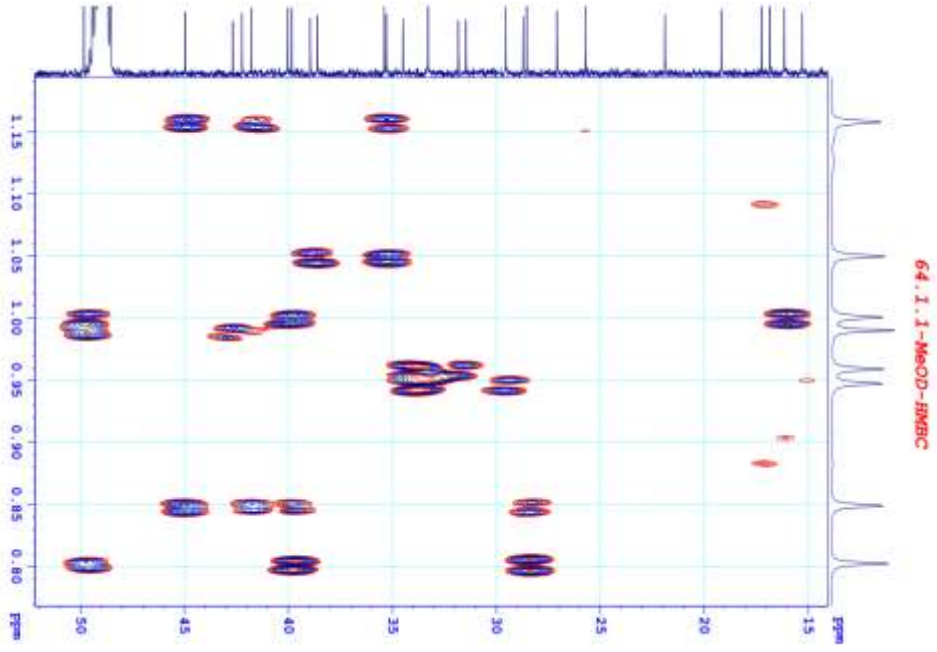


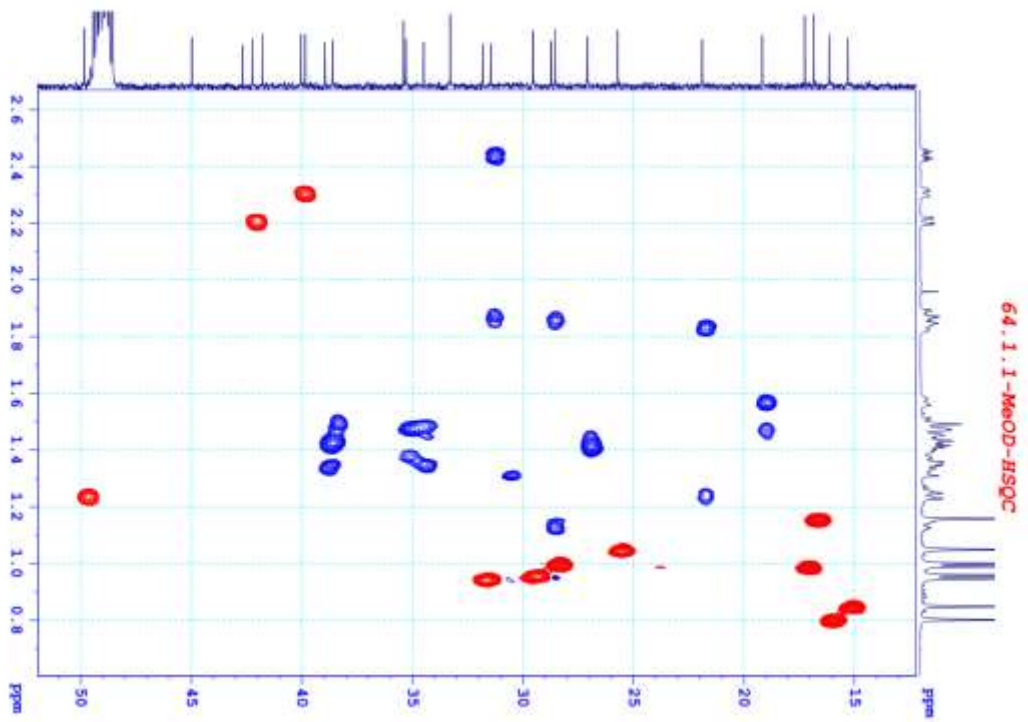
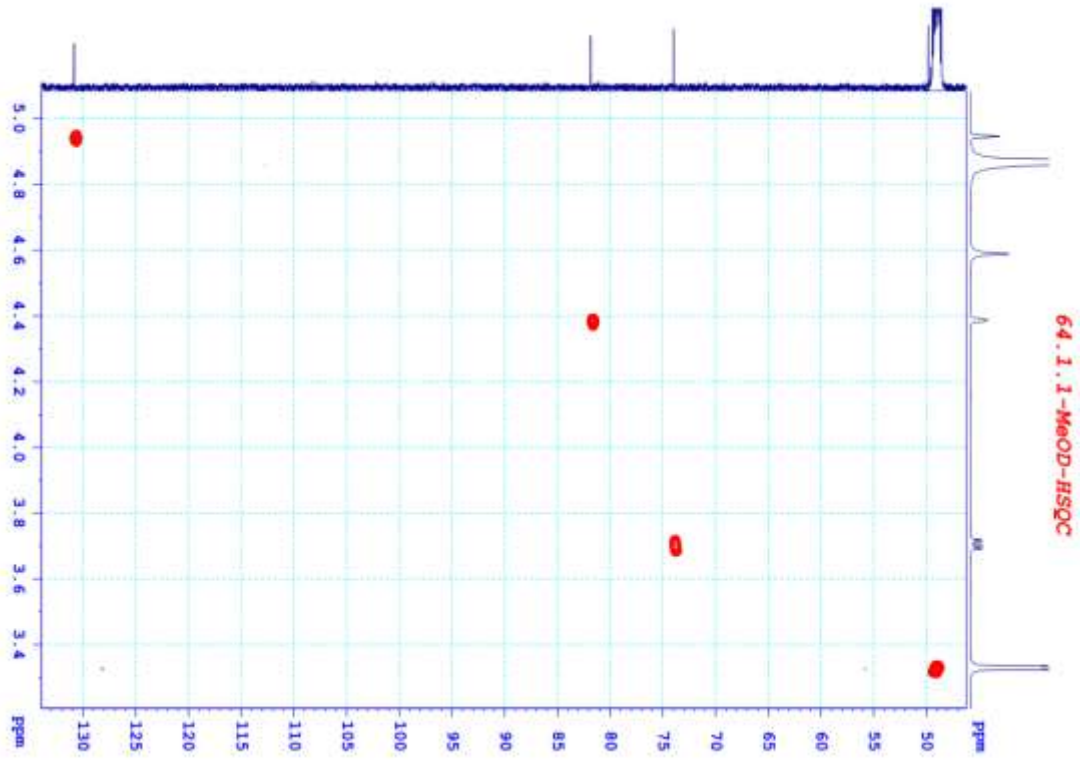




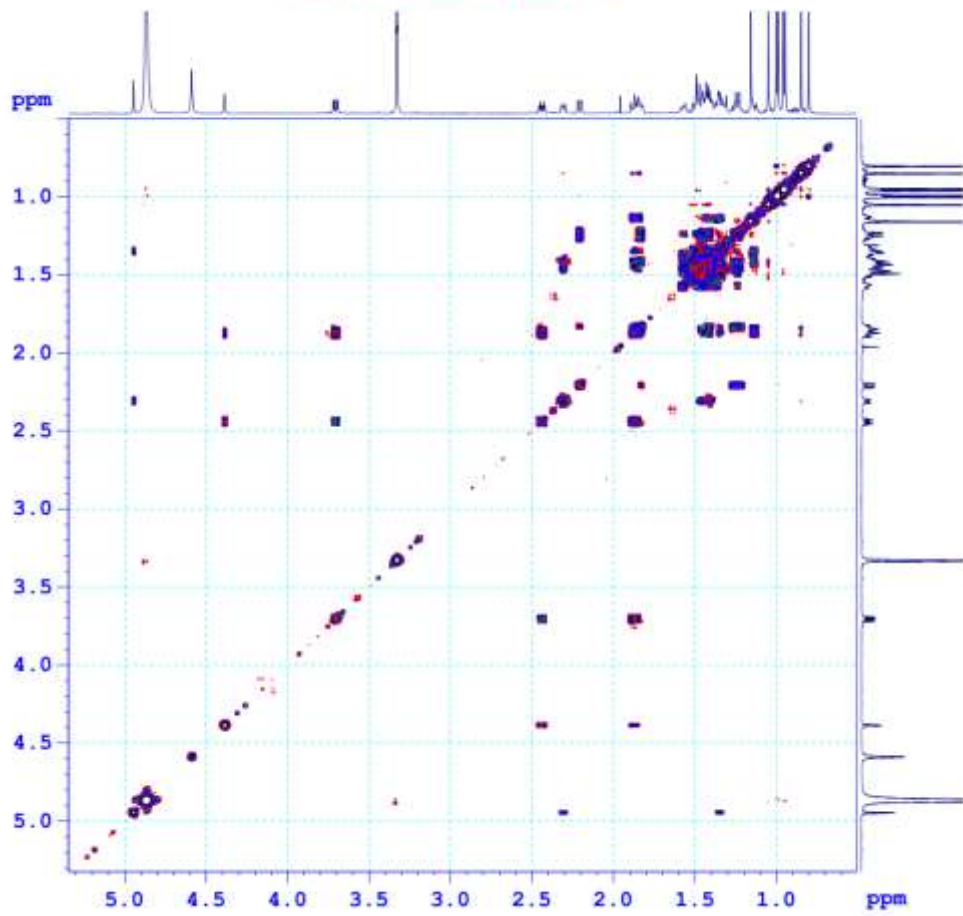




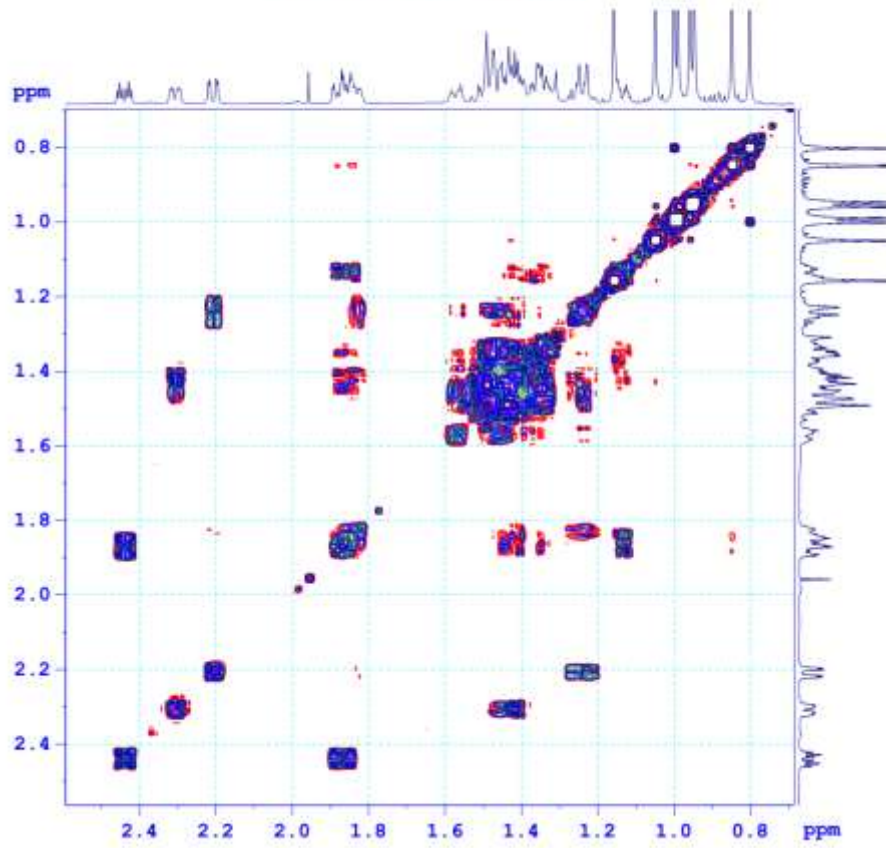




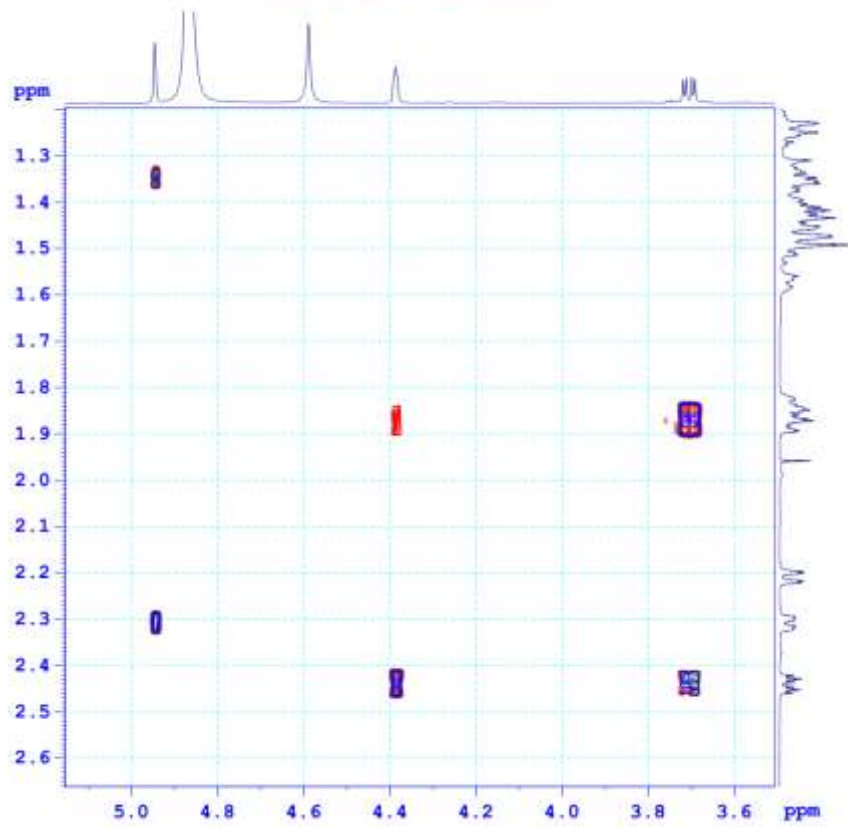
64.1.1-MeOD-COSYGP



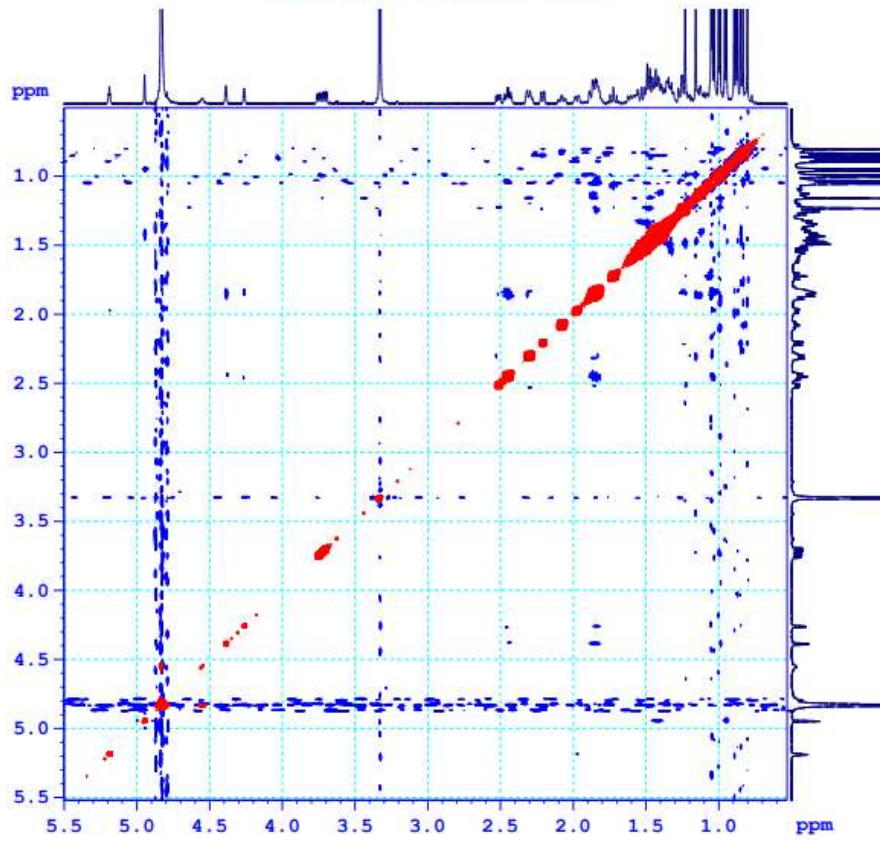
64.1.1-MeOD-COSYGP



64.1.1-MeOD-COSYGP

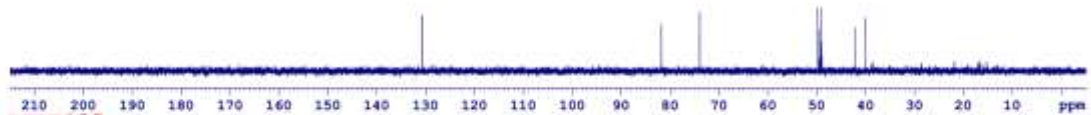


COME64.1.1-MeOD-NOESY



64.1.1-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



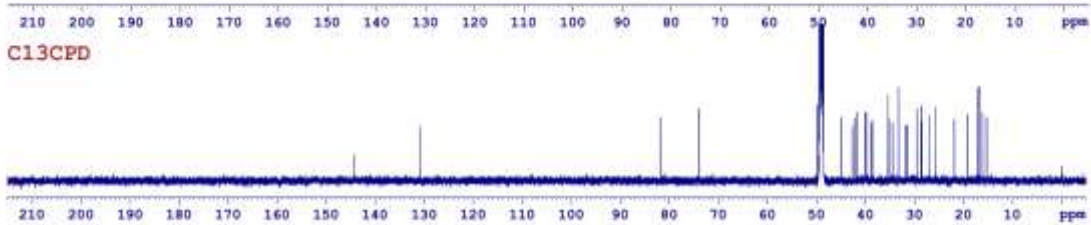
DEPT135



CH&CH3

CH2

C13CPD



64.1.1-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



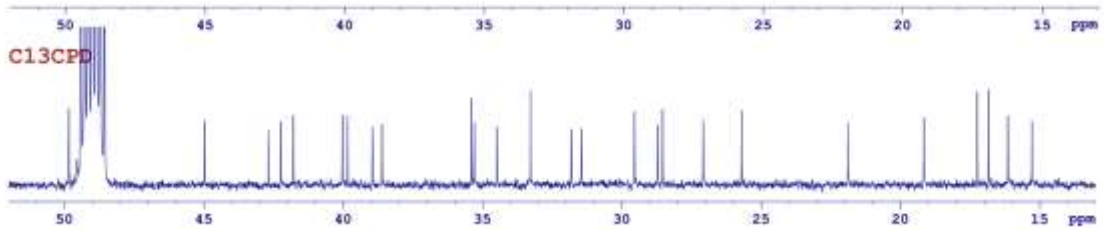
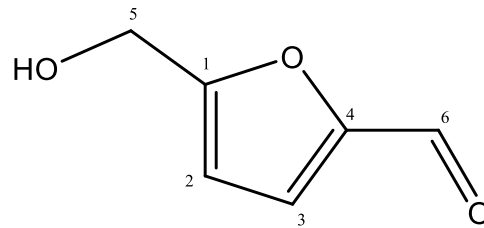
DEPT135

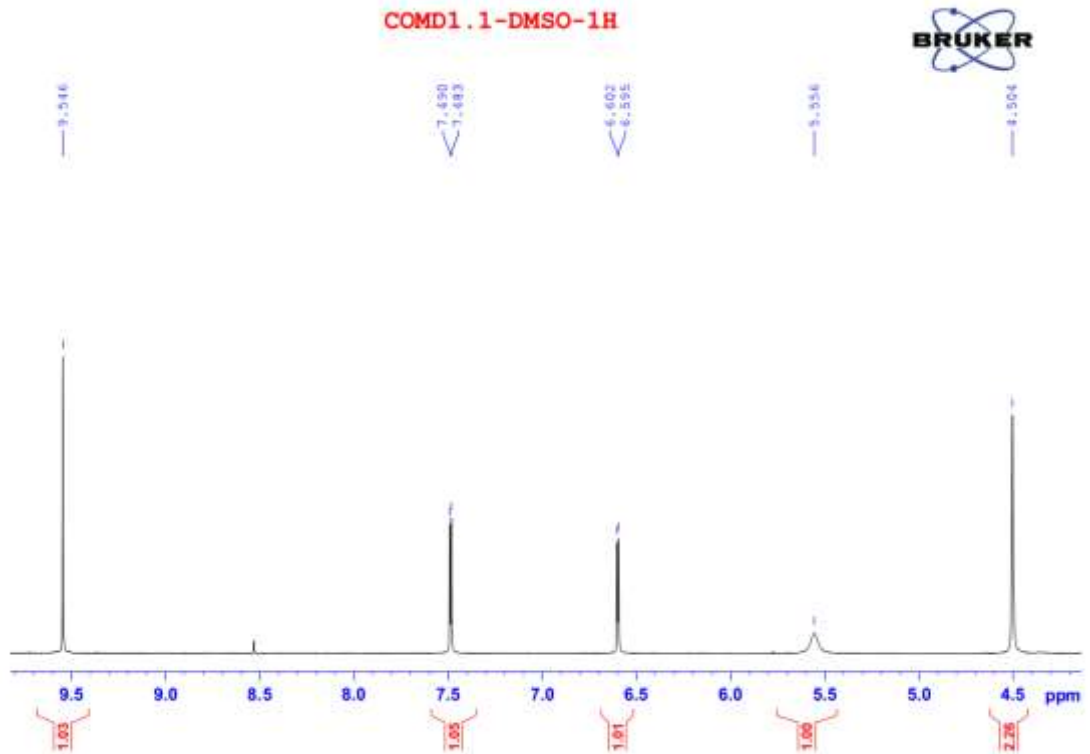
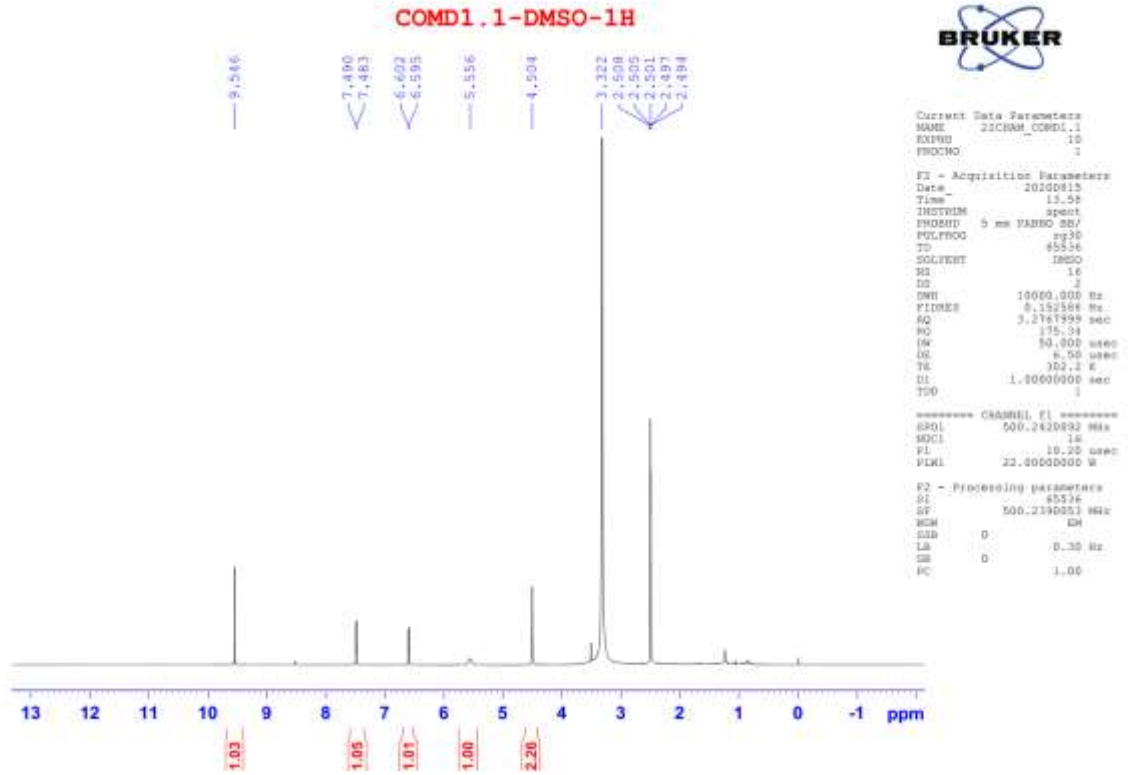


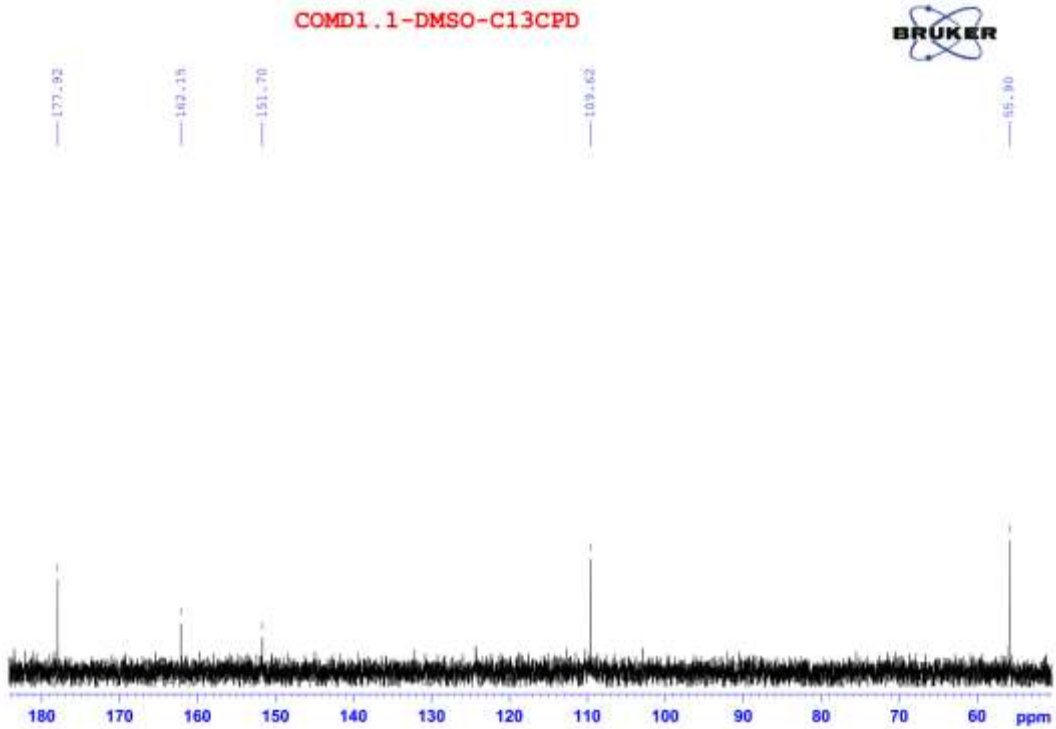
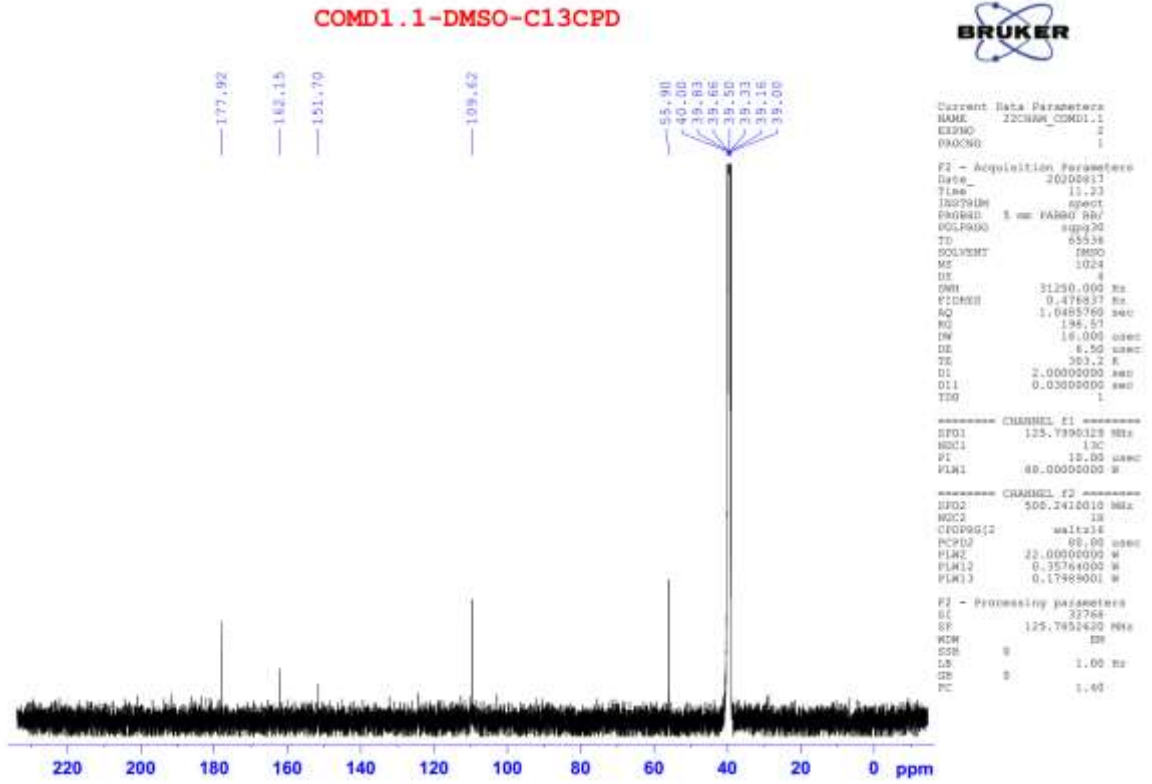
CH&CH3

CH2

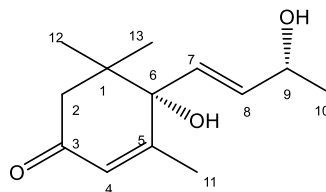
C13CPD

24. Phổ của hợp chất **EH14**

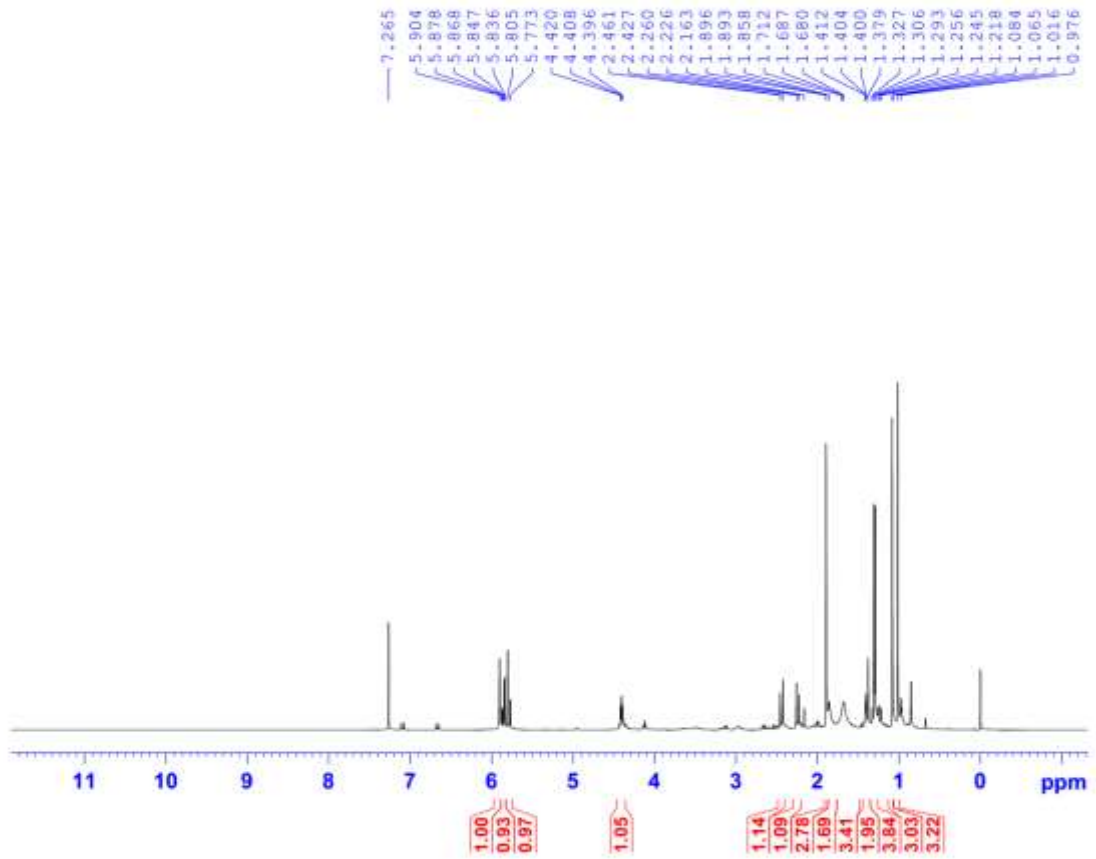




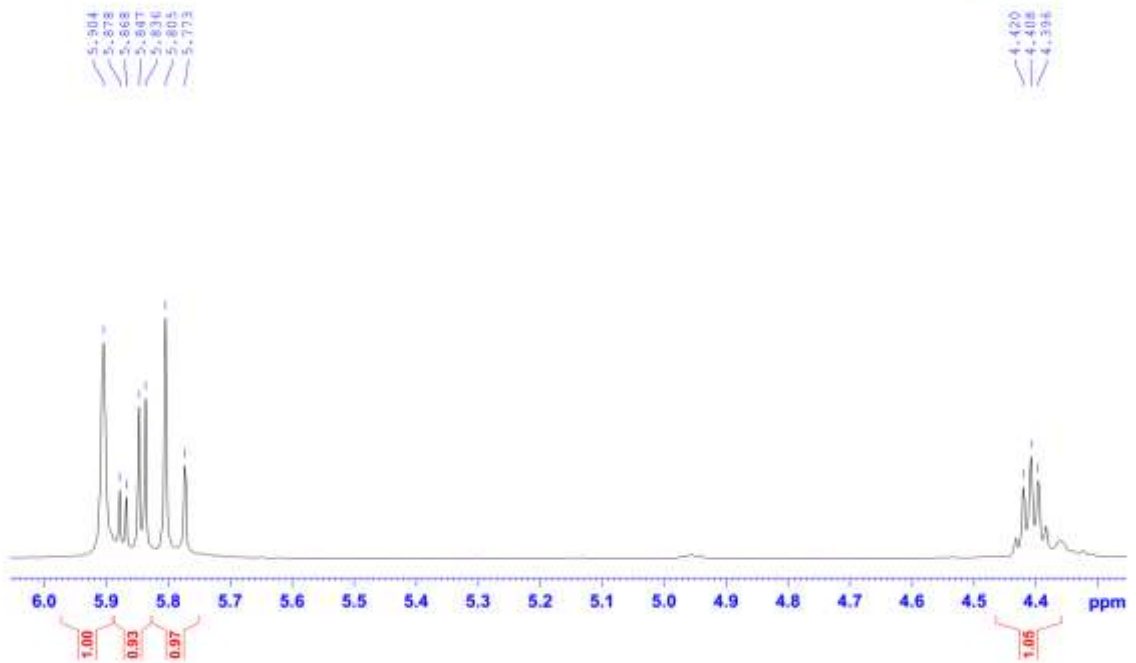
25. Phổ của hợp chất **EH15**



QCCH427-CDC13-1H



QCCH427-CDC13-1H



QCCH427-CDCl3-1H

