

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Thị Giang

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA
POUZOLZIA PENTANDRA (ROXB.) BENN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HOÁ HỌC 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



Vũ Thị Giang

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH GÂY
ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA
POUZOLZIA PENTANDRA (ROXB.) BENN**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ HOÁ HỌC HỮU CƠ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. TS. Vũ Thị Thu Lê

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Thu Lê", positioned to the left of the name.

2. TS. Đỗ Tiên Lâm

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Lâm", positioned to the left of the name.

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả



Vũ Thị Giang

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện - Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc và kính trọng nhất tới TS. Vũ Thị Thu Lê và TS. Đỗ Tiến Lâm đã tận tâm hướng dẫn chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn .

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và các đồng nghiệp công tác tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên về sự ủng hộ to lớn, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	9
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	11
1.1. Chi Thuộc vôi (<i>Pouzolzia</i>).....	11
1.1.1. Đặc điểm thực vật [9].....	12
1.1.2. Công dụng [3]	12
1.1.3. Một số loài thuộc chi <i>Pouzolzia</i> ở Việt Nam.....	13
1.2. Thành phần hóa học	13
1.2.1. Các hợp chất flavonoid.....	13
1.2.2. Các hợp chất triterpenoid.....	14
1.2.3. Các hợp chất lignan	15
1.2.4. Các hợp chất khác	17
1.3. Hoạt tính sinh học	19
1.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm.....	19
1.3.2. Hoạt tính kháng viêm.....	19
1.3.3. Hoạt tính hạ đường huyết.....	20
1.3.4. Hoạt tính chống oxi hóa	20
1.3.5. Hoạt tính gây độc tế bào	20
1.4. Một số bài thuốc Đông y.....	21
1.5. Cây Thuộc vôi (<i>Pouzolzia pentandra</i>) [9].....	Error! Bookmark not defined.
1.6. Các phương pháp tách chiết các hợp chất phân tử nhỏ trong thực vật	23
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM	
.....	28
2.1. Đối tượng nghiên cứu	28
2.2. Phương pháp nghiên cứu	28
2.2.1. Phương pháp chiết xuất.....	28
2.2.2. Phương pháp phân lập hợp chất	29
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất	29
2.2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng viêm	30
2.3. Thực nghiệm.....	31
2.3.1. Thu nhận các dịch chiết từ cây <i>Pouzolzia pentandra</i>	31
2.3.2. Phân lập và tinh chế các chất từ cây <i>Pouzolzia pentandra</i>	31
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	36
3.1. Các hợp chất steroid.....	36
3.1.1. Hợp chất β -sitosterol (1)	36
3.1.2. Hợp chất daucosterol (6).....	38

3.1.3. Hợp chất dipterocarpol (5).....	40
3.2. Các hợp chất triterpen	43
3.2.1. Hợp chất 3 β -friedelanol (2).....	43
3.3. Các hợp chất flavonoid.....	45
3.3.1. Hợp chất quercetin (3)	45
3.3.2. Hợp chất kaempferol (4).....	47
3.4. Đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được	49
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO	53
<i>PHỤ LỤC 1. Hợp chất β-sitosterol hay stigmast-5-en-24R-3β-ol (1).....</i>	<i>60</i>
<i>PHỤ LỤC 2. Hợp chất β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside (6).....</i>	<i>63</i>
<i>PHỤ LỤC 3. Hợp chất (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one (5).....</i>	<i>68</i>
<i>PHỤ LỤC 4. Hợp chất 3β-friedelanol (2).....</i>	<i>73</i>
<i>PHỤ LỤC 5. Hợp chất quercetin (3)</i>	<i>78</i>
<i>PHỤ LỤC 6. Hợp chất kaempferol (4)</i>	<i>81</i>

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ COSY
¹³ C	Carbon-13 Nuclear Magnetic	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NMR	Resonance Spectroscopy	carbon 13
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phương pháp khối phổ ion hóa phun điện tử
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy	Quang phổ tương quan đơn lượng tử hạt nhân
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy	Quang phổ tương quan đa liên kết hạt nhân
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
MS	Mass Spectroscopic	Quang phổ khối
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân
TLC	Thin-layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
DCM	Dichloromethane	Dichloromethane
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetate
<i>G</i>	<i>Garcinia</i>	<i>Garcinia</i>
MeOH	Methanol	Methanol
Mp	Melting point	Điểm nóng chảy
IC ₅₀	Half maximal inhibitory	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
<i>J</i> (Hz)	Coupling constant	Hằng số tương tác

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
δ (ppm)	Chemical shift (part per million)	Độ dịch chuyển hóa học (phần triệu)
Hela	Human cervical cancer cell line	Dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người
NCIH187	Human lung cancer	Dòng tế bào ung thư phổi ở người
MCF-7	Breast cancer	Dòng tế bào ung thư vú
Hep-G2	Hepatocellular carcinoma	Dòng tế bào ung thư gan
A549	Human lung adenocarcinoma epithelial cells	Dòng tế bào ung thư phổi
HGC-27	Human Stomach carcinoma cell	Dòng tế bào ung thư dạ dày
Vero	kidney, African green monkey	Dòng tế bào tế bào thường
A375	Human Skin Melanoma	Dòng tế bào ung thư da
CCF-STTG1	Human Brain Astrocytoma	Dòng tế bào ung thư não
PC-3	Human Prostate Adenocarcinoma	Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt
Jukat	T cell leukemia	Dòng tế bào ung thư máu

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

<i>Hình 1.4.1: Siro eugica- chế phẩm có thành phần Thuốc vôi.....</i>	23
<i>Hình 1.4.2: Bofomax- chế phẩm chứa thành phần Thuốc vôi.....</i>	23
<i>Hình 3.1.1: Cấu trúc hóa học của 1</i>	36
<i>Hình 3.1.2: Cấu trúc hóa học của 6</i>	39
<i>Hình 3.1.3: Cấu trúc hóa học và tương tác chính HMBC (H→C) của 5.....</i>	42
<i>Hình 3.2.1: Cấu trúc hóa học của 2</i>	44
<i>Hình 3.2.2: Cấu trúc hóa học của 4</i>	48
<i>Hình 3.3.1: Cấu trúc hóa học của 3</i>	46

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 3.1.1: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>36</i>
<i>Bảng 3.1.2: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 6 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>39</i>
<i>Bảng 3.1.3: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 5 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>42</i>
<i>Bảng 3.2.2: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 2 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>44</i>
<i>Bảng 3.3.1: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 3 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>46</i>
<i>Bảng 3.3.2: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 4 và hợp chất tham khảo.....</i>	<i>48</i>
<i>Bảng 3.4.1: Tác dụng gây ức chế tế bào của dịch chiết và chất phân lập được.....</i>	<i>50</i>

MỞ ĐẦU

Cuộc sống càng phát triển kéo theo sự gia tăng của các bệnh nguy hiểm, điển hình trong số đó là ung thư. Hàng năm có hàng triệu ca tử vong do ung thư. Ung thư không chừa bất kỳ đối tượng nào, từ người lớn đến trẻ nhỏ, phụ nữ hay đàn ông. Ung thư có thể xuất hiện ở tất cả các cơ quan, bộ phận của cơ thể như ung thư vú, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư da, ung thư cổ tử cung... Nguyên nhân gây ung thư là sự biến đổi của các tế bào bình thường trở thành các tế bào ác tính [1]. Nguồn gốc của sự thay đổi này là do sự tác động giữa yếu tố di truyền và các yếu tố bên ngoài như: chất gây ung thư vật lý, chất gây ung thư hóa học, chất gây ung thư sinh học. Để điều trị ung thư, một trong những phương pháp phổ biến thường được sử dụng là hóa trị liệu. Bác sĩ chỉ định cho bệnh nhân trị liệu bằng cách nhiều sử dụng nhiều loại thuốc kết hợp, hoặc kết hợp sử dụng chung với xạ trị liệu, cũng có khi là kết hợp với phẫu thuật để làm giảm tế bào ung thư. Tuy nhiên, mặt trái của phương pháp này là làm yếu đi các tế bào bình thường, làm giảm bạch cầu, tiểu cầu, làm cho cơ thể bị suy yếu, giảm sức đề kháng [2].

Chi *Pouzolzia* thuộc họ Gai (Urticaceae), có 37 loài, thường phân bố ở vùng nhiệt đới các nước Nam Á, Đông Nam châu Á và những vùng nước ấm trên thế giới. Ở Việt Nam, theo thống kê ở Việt Nam chi *Pouzolzia* có 6 loài: *Pouzolzia zeylanica* (Thuốc vôi), *Pouzolzia auriculata* (Thuốc vôi tai), *Pouzolzia elegans* (Thuốc vôi thanh), *Pouzolzia sanguinea* (Thuốc vôi rừng, Nhót nháo), *Pouzolzia hirta* (Thuốc vôi lông) và *z* (Thuốc vôi ngũ hùng): Cây cỏ cao 60-80cm, thân có 5 cạnh, to 1- 5mm, không lông; Cây mọc tự nhiên dựa theo bờ nước, nơi ẩm, ở độ cao 900-1200m, Phân bố ở Ninh Bình, Thanh Hóa [3,4,5]. Mặt khác, thành phần hóa học chính của các loài thuộc chi *Pouzolzia* là các hợp chất chủ yếu thuộc nhóm triterpenoid (khoảng 15 hợp chất), flavonoid (10 hợp chất), lignan (10 hợp chất) ngoài ra còn có các thành phần khác như phenolic,... Nhóm flavonoid, triterpenoid và lignan đã được khẳng định có nhiều tác dụng sinh học quý như kháng viêm, làm bền thành mạch, chống độc, làm giảm thương tổn gan, chống oxi hoá, virus và ung thư.... [6,7] Hiện nay, ở nước ta chưa có công trình nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học cây *Pouzolzia pentandra*, đề tài được theo định hướng: “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của *Pouzolzia pentandra* (Roxb.) Benn” nhằm tìm ra các hoạt

chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt, góp phần nâng cao giá trị cây thuốc địa phương và phục vụ công tác chăm sóc sức khỏe cũng như phát triển kinh tế đất nước.

Mục đích nghiên cứu

- Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3-4 hợp chất sạch từ cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) ở Việt Nam.

- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* (các dòng A549, PC3 và HepG2) của các cặn chiết và hợp chất sạch phân lập được.

Nội dung nghiên cứu

- Thu thập mẫu cây, xác định tên khoa học.

- Nghiên cứu xử lý mẫu, chiết xuất tạo các cao chiết.

- Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất sạch từ phân đoạn có hoạt tính.

- Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các cao chiết và hợp chất sạch phân lập được.

Những đóng góp của luận văn

Qua quá trình nghiên cứu hóa thực vật của cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) ở Nho Quan - Ninh Bình, chúng tôi rút ra được những kết luận chính như sau:

1. Lần đầu tiên từ Cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) ở Nho Quan - Ninh Bình, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 6 hợp chất: β -sitosterol (1), dipterocarpol (5), daucosterol (6), 3β -friedelanol (2), quercetin (3) và kaempferol (4).

2. Đã đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư gan HepG2, tuyến tiền liệt PC3 và phổi A549 của các cặn chiết và các hợp chất sạch phân lập được. Kết quả cho biết:

- ✓ Đối với cặn tổng và các cặn chiết của cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) thì đề tài thấy rằng cặn chiết n-hexan (PPH) thể hiện hoạt tính tốt nhất trên dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC_{50} vào khoảng 47,23 μ g/ml hơn hẳn cặn tổng (PP) và cặn nước (PPW).
- ✓ Đối với các hợp chất sạch phân lập được thì qua quá trình thử hoạt tính sinh học ta thấy rằng hợp chất kaempferol (4) thể hiện hoạt tính tốt nhất với dòng tế bào ung thư gan HepG2 với giá trị IC_{50} là 14,65 μ g/ml.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Chi Thuộc vôi (*Pouzolzia*)

Chi *Pouzolzia* là một chi trong họ Urticaceae, phân bố tập trung ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [7,8]. Theo như sự tìm hiểu của đề tài thì được biết rằng hiện tại Chi *Pouzolzia* khoảng gần 60 loài nhưng ở Việt Nam chỉ khoảng 7 loài [3,7].

Theo hệ thống phân loại của tác giả TakhtaJan Armen [7], chi *Pouzolzia* được phân loại như sau:

Giới: Thực vật bậc cao (Plantae)

Ngành: Ngọc lan (Maganoliophyta)

Lớp: Ngọc lan (Magnoliopsida)

Phân lớp: Sô (Dilleniidae)

Liên bộ: Bông (Malvanae)

Bộ: Gai (Urticales)

Họ: Gai (Urticaceae)

Chi: *Pouzolzia* L.

1.1.1. Đặc điểm thực vật [9]

Chi *Pouzolzia* là chi thực vật thuộc cây thân thảo hoặc cây bụi cùng gốc, hiếm khi cùng gốc. Là một loài thực vật có hoa, lá của cây thì là loại lá có 3-4 cạnh, chúng được mọc so le hoặc đối xứng nhau,

Các nhánh hoá của cây là các cụm hoa xim được mọc ở nách lá, chúng thường không có cuống. Cây thì có 2 loại hoa là hoa đực và hoa cái. Đối với hoa đực thì chúng có cuống mặt khác thì hoa cái không cuống đến cuống ngắn. Phần đài hoa có 5-6 thùy ở hoa đực; thùy hoa có hình dạng là hình van, có dáng nhọn, thường lõm xuống hoặc bị uốn cong đột ngột và chúng được xếp nếp ngang bên ngoài; hoa hình ống, có 3-4 răng ở mở và hoa cái thì miệng hoa rất là hẹp. Nhị hoa của cây tương đối nhiều như thùy ở đài hoa. Bầu nhụy của cây không có đài hoa; kiểu đầu cuối, dạng sợi, có nhung mao bên và đầu nhụy, rụng lá. Quả bé hình trứng, được bao bọc bởi đài hoa hầu như không thay đổi hoặc hiếm khi có cánh hoặc có gân.

1.1.2. Công dụng [3]

Các thực vật chi *Pouzolzia* theo tìm hiểu của đề tài thì nó là một nguồn dược liệu quý được ông bà ta sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền như *Pouzolzia zeylanica* trị cảm, viêm họng và ruột, nhiễm trùng đường tiết niệu, đau răng, nấm da đầu, trị đình nhọt, viêm mủ da; *Pouzolzia sanguinea* trị lưng gối đau phong thấp và gãy xương, chữa ho và sỏi, thiếu máu; *Pouzolzia elegans* trị đòn ngã tổn thương.

1.1.3. Một số loài thuộc chi *Pouzolzia* ở Việt Nam

Theo thống kê của tác giả Phạm Hoàng Hộ ở Việt Nam chi *Pouzolzia* có tới 6 loài [4]:

* *P. pentandra* (Roxb.) Benn (Thuốc vôi ngũ hùng): Cây cỏ cao 60-80cm, thân có 5 cạnh, to 1-5mm, không lông; cây mọc ở nơi ẩm, ở độ cao 900-1200m.

* *P. zeylanica* (Roxb.) Benn (Thuốc vôi): Loại cây cỏ có cành mềm, thân có lông; phân bố ở ruộng, ven rừng, nơi ẩm [4].

* *P. auriculata* Wight (Thuốc vôi tai): Cây cỏ cao 30-50 cm, thân có 4 cạnh; phân bố ở Miền Nam, Việt Nam.

* *P. elegans* (Thuốc vôi thanh): Cây bụi nhỡ cao tới 1,5m phân cành nhiều, cành non có lông mịn dày; mọc trong rừng ẩm, ở độ cao 1500m.

* *P. sanguinea* (Blume) Merr (Thuốc vôi rừng, Nhót nháo): Cây nhỡ mọc cao 2-3m hay hơn, thân và cành mảnh; mọc ven rừng, nơi sáng, ven các suối, ở độ cao đến 1500m.

* *P. hirta* Hassk (Thuốc vôi lông): Cây cỏ nhám, thân tròn, gần như không lông; mọc ở nơi ẩm, gần ruộng, rạch.

1.2. Thành phần hóa học

Các loài thuộc chi *Pouzolzia* có thành phần hóa học chính là các hợp chất thuộc nhóm flavonoid, triterpenoid, steroid, lignan, rotenoid... Trong đó, các hợp chất flavonoid, lignan và triterpenoid được phân lập nhiều nhất.

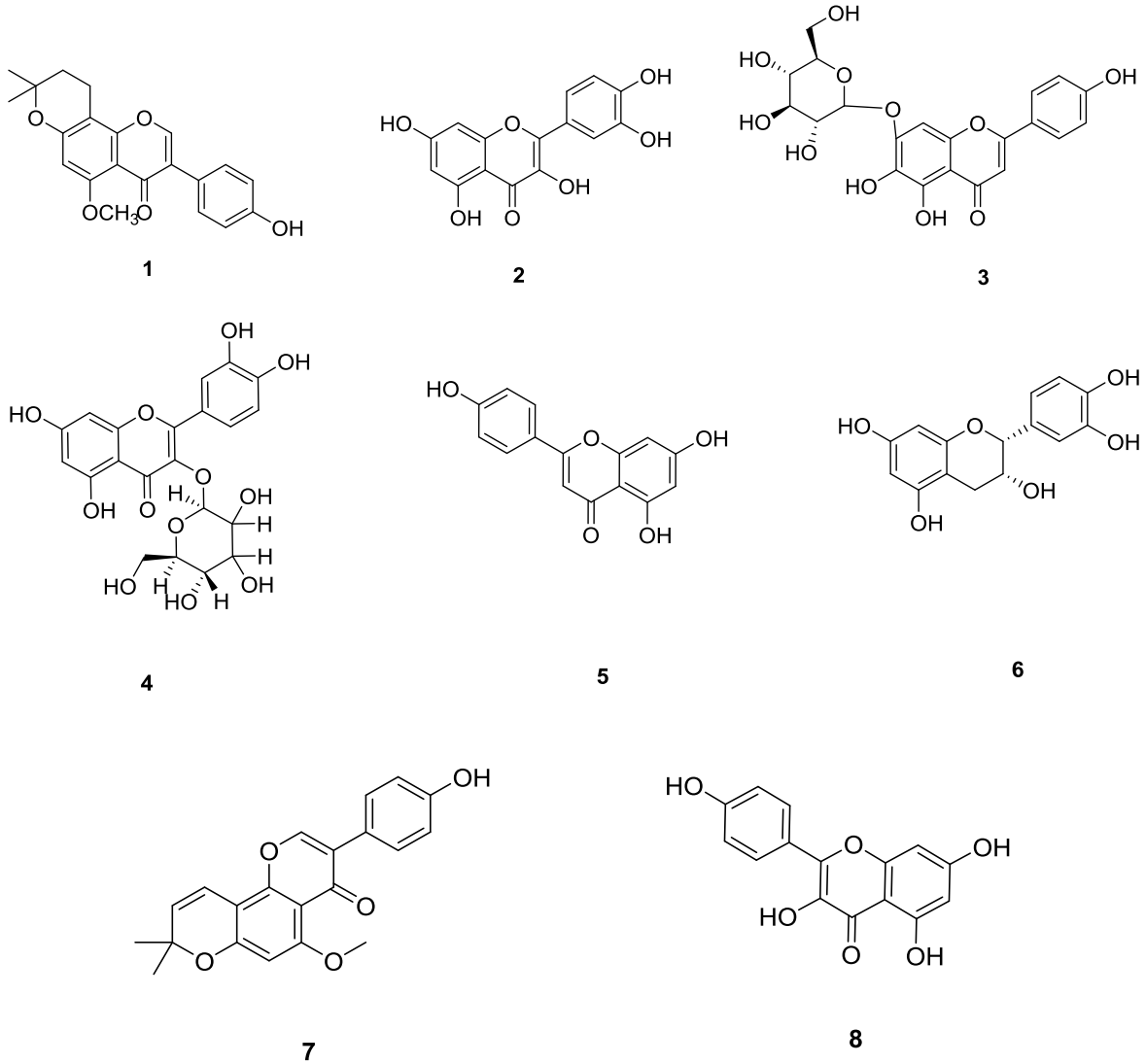
1.2.1. Các hợp chất flavonoid

Năm 2003, theo kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học Bangladesh thì trong *P. pentandra* (Roxb.) Benn có chứa isoflavon: 5-methoxy-4'-hydroxy-2'',2''-dimethoxyprano (3'', 4'',7,8) isoflavone (1) [6].

Năm 2012, nhóm nghiên cứu của Fu đã phân lập được 14 hợp chất từ cây *Pouzolzia pentandra*, trong đó có 5 hợp chất flavonoid là quercetin (2), scutellarin-7-O- α -L-rhamnoside (3), quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (4), apigenin (5) và epicatechin (6) [10].

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Chanyapat Sangsuwon đã tìm ra hợp chất lanceolone (7) từ loài *Pouzolzia indica* [11].

Năm 2015, nhà khoa học LuJun Wang và đồng nghiệp cũng đã phát hiện ra một hợp chất flavonoid khác là kaempferol từ *P. pentandra* (Roxb.) Benn (**8**) [12].

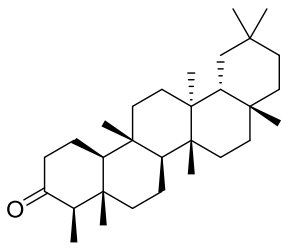


1.2.2. Các hợp chất triterpenoid

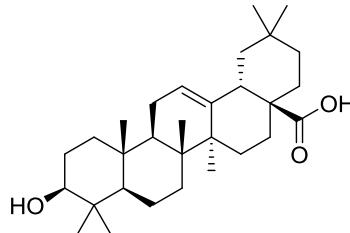
Từ dịch chiết methanol của *P. pentandra* (Roxb.) Benn, Brazendranath Sarkar và cộng sự đã phân lập được friedelin (**9**) [13].

Nhóm nghiên cứu của Fu đã phân lập được 4 hợp chất friedelan triterpen ester từ cây *P. Pentandra* (Roxb.) Benn bao gồm: acid oleanolic (**10**), α -amyrin (**11**), $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28- oic (**12**), 2α -hydroxyursolic acid (**13**) [10].

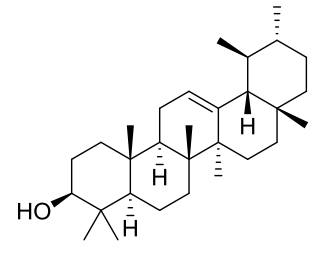
IndraJit Sil Sarma và cộng sự đã phân lập được hợp chất friedelin (**9**), 28-hydroxy-3-fridelanone (**14**), 7β -hydroxy-3-oxo-28-đoecyl-friedelan-28-oate (**15**), myricyl palmitate (**16**), myricylalcohol (**17**) được phân lập từ loài từ *Pouzolzia indica* [14].



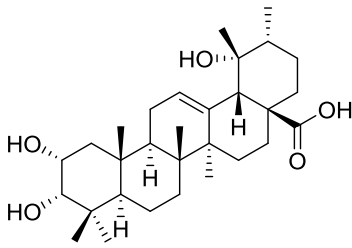
9



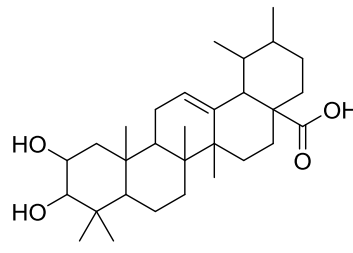
10



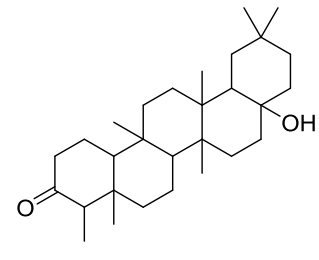
11



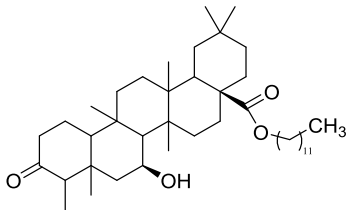
12



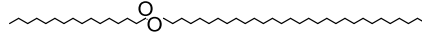
13



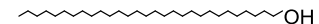
14



15



16



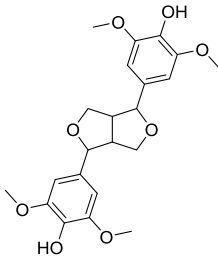
17

1.2.3. Các hợp chất lignan

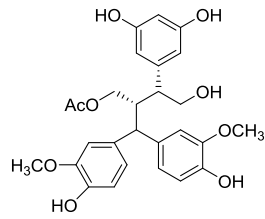
Nhóm nghiên cứu của Wang LuJun đã phân lập được một hợp chất lignan trong cây Thuộc vôi (*Pouzolzia pentandra* là syringaresinol (**18**) [12].

Từ dịch chiết ethanol của cây *P. pentandra* (Roxb.) Benn, Zhuo Han Chen và cộng sự đã phân lập được 5 hợp chất mới có khung norlignan là: pouzolignan F, G, H, I và J (**19- 24**) [15]. Bên cạnh đó, pouzolignan L (**25**) và M (**26**) cũng tìm thấy từ dịch chiết này. Nhóm nghiên cứu cũng phát hiện ra hai stibene mới pouzolignan D (**27**) và K (**28**) [16]. Nhóm nghiên cứu phân lập được pouzolignan A (**29**) từ *Pouzolzia occidentalis* và pouzolignan B (**30**) từ *Pouzolzia indica* [17].

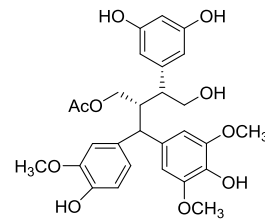
Năm 2020, Le Thi Hong Nhung và cộng sự đã phân lập được 7 hợp chất norlignan, pouzolignan N (**31**), pouzolignan O (**32**), pouzolignan F (**33**), pouzolignan G (**34**), pouzolignan H (**35**), pouzolignan L (**36**) và gnetifolin F (**37**) từ phần trên mặt đất loài *Pouzolzia sanguinea* [18].



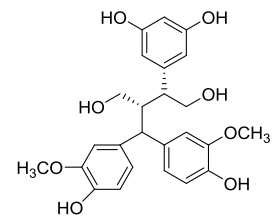
18



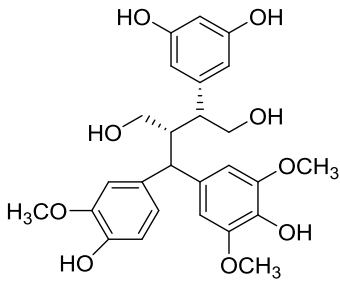
19



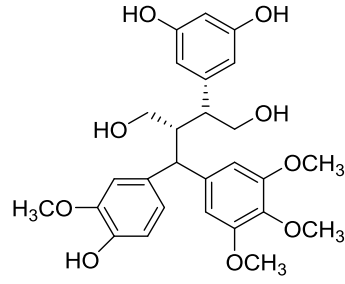
20



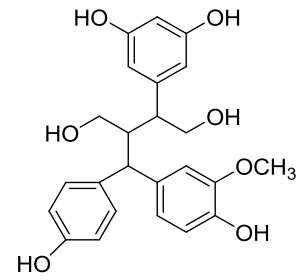
21



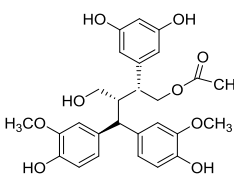
22



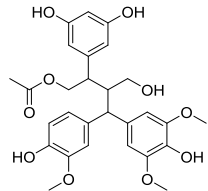
23



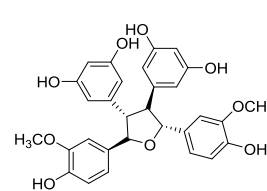
24



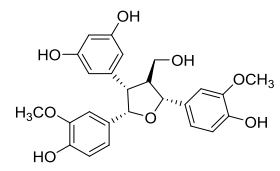
25



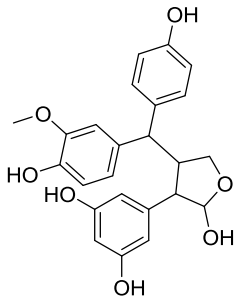
26



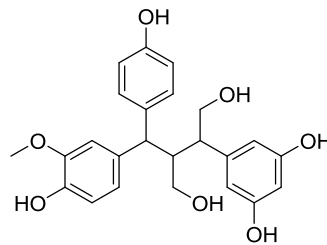
27



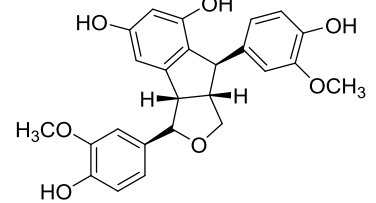
28



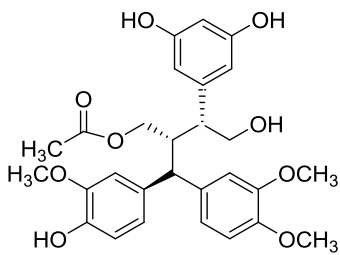
29



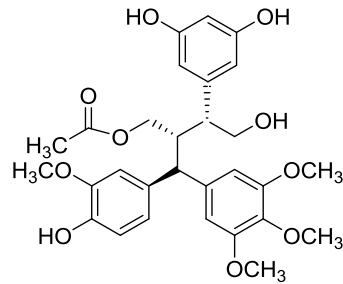
30



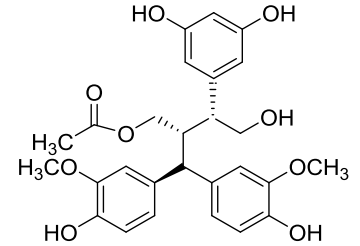
37



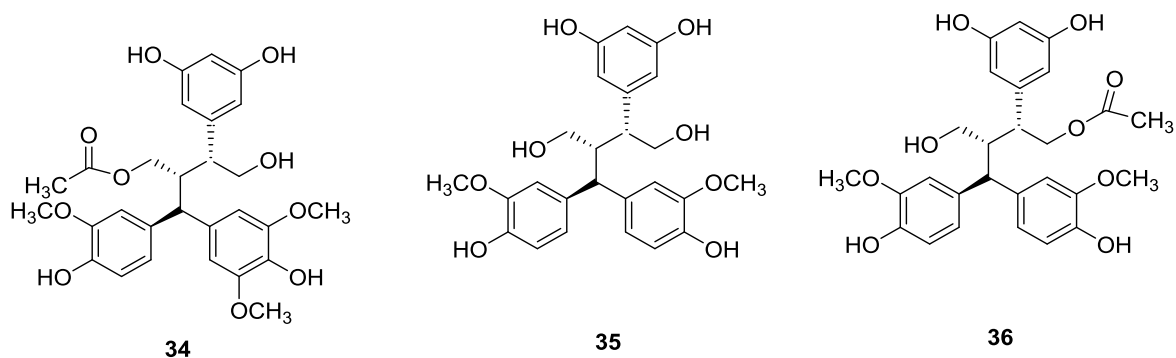
31



32



33



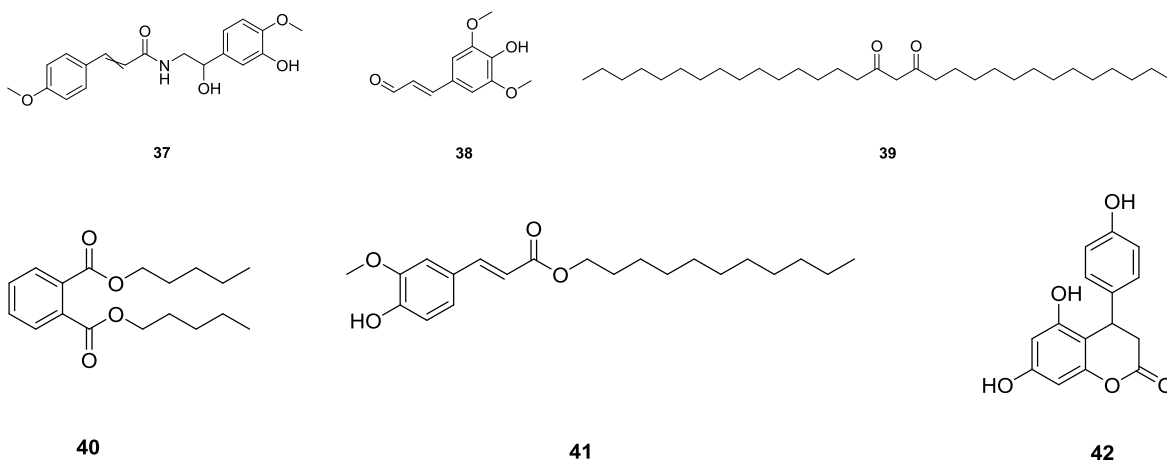
1.2.4. Các hợp chất khác

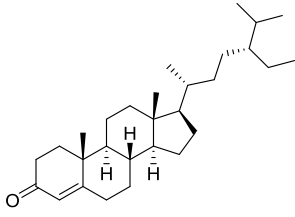
Ngoài thành phần chính là flavonoid, lignan và triterpenoid thì các loài trong chi *Pouzolzia* còn chứa các nhóm chất khác như steroid, coumarin, lipid, các hợp chất có nitơ hay các dẫn xuất của phenol.

Tác giả Wang LuJun và nhóm nghiên cứu đã tìm ra một số hoạt chất từ cây *Pouzolzia pentandra* như: *N*-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enamide (**37**), sinapaldehyde (**38**), 14,16-hentriacontanedione (**39**), dipentylphthalate (**40**), undecyl ferulate (**41**), 3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)coumarin (**42**), stigmast-4-en-3-one (**43**) [12].

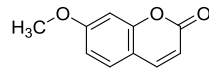
Chanyapat Sangsuwon và cộng sự đã phân lập được 3 hợp chất coumarin: 7-methoxy coumarin (**44**), scopoletin (**45**) và 6,7-dimethyl coumarin (**46**); 1 hợp chất phenolic: methyl caffeate (**47**); 1 hợp chất glycolipid: glycosphingolipid (**48**) từ *Pouzolzia indica* [11].

Từ *Pouzolzia pentandra*, Lê Thanh Thủy và cộng sự đã xác định được sự có mặt của 7 hợp chất sau: phyllanthin (**49**), methyl stearat (**50**), daucosterol (**51**), β -sitosterol (**52**), scopolin (**53**), scopoletin (**45**), eugenyl- β -rutinoside (**54**), isovitexin (**55**), vitexin (**56**) và quercetin (**2**) [19].

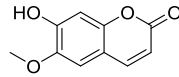




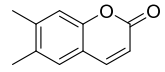
43



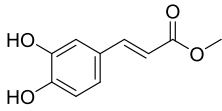
44



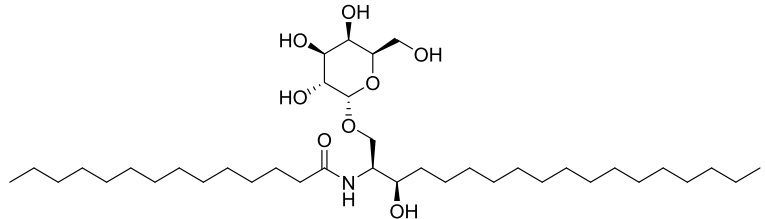
45



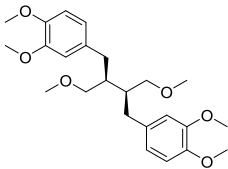
46



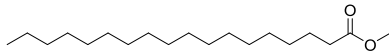
47



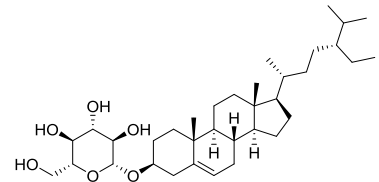
48



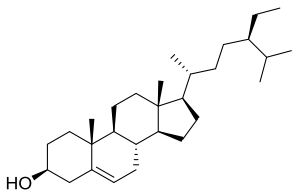
49



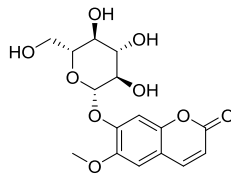
50



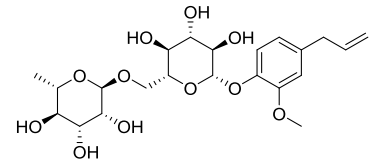
51



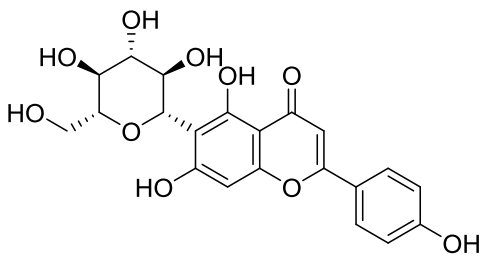
52



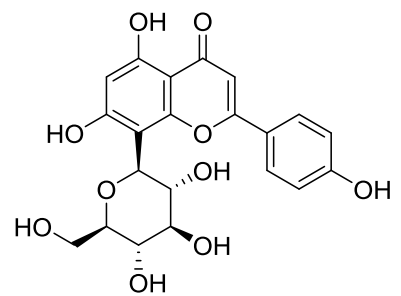
53



54



55



56

1.3. Hoạt tính sinh học

1.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Để đánh giá tác dụng kháng khuẩn của dịch chiết cỏ của *Pouzolzia pentandra*, nhóm nghiên cứu đã được sử dụng phương pháp đục lỗ trên đĩa thạch. Kết quả dịch chiết cỏ với nồng độ 1000 mg/ml cho thấy tác dụng kháng khuẩn trên cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) như *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*. Dịch chiết cỏ cho thấy tác dụng kháng khuẩn rất tốt với *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* [20].

Các nghiên cứu mở rộng về hoạt tính kháng khuẩn của *Pouzolzia pentandra* vẫn đang được tiếp tục tiến hành. Năm 2012, Saha và cộng sự đã nghiên cứu đánh giá tác dụng kháng nấm của dịch chiết cỏ từ cây Thuộc vôi. Để đánh giá tác dụng kháng nấm, phương pháp đĩa thạch đã được sử dụng. Tác dụng kháng nấm của dịch chiết cỏ được so sánh với Griseofulvin (500 mcg/đĩa). Dịch chiết cỏ từ cây Thuộc giò cho thấy tác dụng kháng khuẩn rất tốt trong vùng ức chế (7,0-26) mm và *Aspergillus niger* là loài nấm nhạy cảm nhất với dịch chiết cỏ từ Thuộc vôi [21].

1.3.2. Hoạt tính kháng viêm

Nhiều nghiên cứu trên thể giới chỉ ra rằng loài *Pouzolzia pentandra* có tác dụng kháng viêm tốt. Hiệu quả điều trị được đánh giá thông qua các thông số: đường kính vết loét, yếu tố bệnh học, chỉ số tủy ức và lách, TNF- α và Interleukin (IL-1) trong huyết thanh. Kết quả nghiên cứu cho thấy *Pouzolzia pentandra* làm giảm thể tích vết loét (P 0,05 hay P 0,01), cải thiện bệnh học, tăng chỉ số lách (P 0,05). Từ đó đưa đến kết luận dịch chiết *Pouzolzia pentandra* có thể cải thiện và làm lành vết thương loét da gây ra do thương tích. Cơ chế có thể liên quan đến ức chế sự phóng thích yếu tố gây viêm và điều hoà chức năng miễn dịch. Cặn chiết methanol của loài *Pouzolzia pentandra* còn thể hiện tác dụng làm giảm sưng, lành vết loét [22].

Nhằm nghiên cứu hiệu quả kháng viêm và giảm đau của những dịch chiết khác nhau từ *Pouzolzia pentandra* var. *microphylla*, 1 mô hình chuột được gây phù tai bằng xylen, gây đau bởi acid acetic và vật nóng đã được sử dụng. Theo dõi hiệu quả kháng viêm và giảm đau thông qua việc sử dụng đường uống và dùng ngoài, kèm theo là hiệu quả của các dịch chiết khác nhau. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt rõ về hiệu

quả kháng viêm và giảm đau khi dùng ngoài, trong khi dùng đường uống cho thấy hiệu quả giảm đau mạnh do làm giảm có ý nghĩa số lần chuột vận mình và phù nề tai do xylen. Dịch chiết nước cho hiệu quả tốt hơn dịch chiết cồn. Cũng theo nghiên cứu này, dịch chiết chloroform và dịch chiết nước cho hiệu quả kháng viêm tốt hơn, trong khi tỷ lệ của chloroform và *n*-butanol cho hiệu quả giảm đau tốt hơn [23].

1.3.3. Hoạt tính hạ đường huyết

Nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm tác dụng hạ đường huyết của dịch thuốc sắc loài *Pouzolzia pentandra* trên chuột thí nghiệm. Kết quả cho thấy, sau 2 tuần điều trị mức đường huyết của chuột thí nghiệm sử dụng liều thấp và trung bình có mức hạ đường huyết giảm khá tốt, đường huyết gần như trở lại như mức đường huyết ở chuột bình thường. Điều này cho thấy, loài *Pouzolzia pentandra* có khả năng ứng dụng vào điều trị hạ đường huyết, nên có nhiều nghiên cứu sâu hơn nữa về tác dụng này của loài *Pouzolzia pentandra* [24].

1.3.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Để đánh giá tác dụng chống tia phóng xạ và tác dụng chống oxy hoá, 4 thử nghiệm *in vitro* đã được tiến hành, đó là DPPH, ABTS và thử nghiệm gốc tự do hydroxyl và thử nghiệm khả năng khử với dịch chiết các dung môi khác nhau từ cây Thuốc vòi (aceton, ethyl acetat và ether dầu hoả). Tất cả dịch chiết đều cho tác dụng chống oxy hoá trong đó dịch chiết ethyl acetat cho tác dụng chống oxy hoá tốt nhất. Dịch chiết ethyl acetat của *Pouzolzia pentandra* có khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH khá cao, lên đến 64,9%. Dịch chiết ethyl acetat của *Pouzolzia pentandra* có khả năng bắt giữ gốc tự do ABTS trên 50%. Dịch chiết ethyl acetat có khả năng bắt giữ các gốc hydroxyl rất cao, hiệu quả ức chế là 10,9% ở nồng độ thấp hơn 0,2 mg/ml, nhưng tác dụng đã tăng lên đến 90,5% khi nồng độ thử là 1,2 mg/ml. Kết quả này cũng cho thấy, dịch chiết ethyl acetat của cây Thuốc vòi có thể mở ra hướng nghiên cứu mới về hợp chất chống oxy hoá tự nhiên, có thể ứng dụng trong điều trị những bệnh gây ra bởi những tác nhân oxy hoá [25].

1.3.5. Hoạt tính gây độc tế bào

Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết toàn phần từ cây thuốc vòi trên tôm nước mặn cho thấy kết quả tốt với giá trị LC₅₀ là 6,1 µg/ml và LC₉₀ là 12,2 µg/ml [26].

Khả năng chống lại tế bào ung thư cũng được quan tâm khi phối hợp thuốc với *Cananga latifolia*. Một nghiên cứu khác về tác dụng gây độc tế bào của các căn chiết và hợp chất tinh khiết cũng được Brazendranath Sarkar và các cộng sự thực hiện năm 2014 trên tôm nước mặn. Nghiên cứu đã thu được kết quả là dịch chiết ethyl acetat, *n*-butanol và hợp chất friedelin cho hoạt tính tốt với giá trị LC₅₀ lần lượt là 3,32; 3,44 và 2,80 µg/ml [26].

Kết quả bước đầu gợi ý đến tiềm năng phát triển nguồn nguyên liệu cũng như hoạt chất có tác dụng kháng ung thư mới sử dụng trong công nghệ dược phẩm.

Ở nồng độ 30 mM, các hợp chất **1-7** biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào yếu đối với các dòng tế bào ung thư miệng (CAL27) và ung thư vú (MDA-MB-231) với khả năng sống của tế bào từ $65,3 \pm 0,86$ đến $98,8 \pm 1,23\%$) và ức chế hoạt động của anoctamin-1 với tỷ lệ ức chế từ $8,1 \pm 0,87$ đến $24,3 \pm 1,41\%$ [18].

1.4. Cây Thuốc với (*Pouzolzia pentandra*) [9]

Pouzolzia pentandra như chúng ta biết thì nó là một loài cây lâu năm, có rất nhiều sự thể hiện sự độc đáo và hấp dẫn trong thực vật. Cây có một khả năng rất hay là nó có thể mọc thẳng đến khi nó già và chết, tuy là thân cây mềm nhưng nó có thể cao từ 80cm- 1,2 m. Điều đặc biệt là với hình dáng là một cây thân thảo mọc thưa thớt với thân cây hình trụ. Lá của cây được mọc so le xen kẽ bên dưới và đi dần đều lên phía trên. Điều này tạo ra một sự sắp xếp thú vị cho cây, khiến cho cây *Pouzolzia pentandra* trở nên độc đáo trong cả hình dáng và cấu trúc làm cho người nhìn rất thích mắt với sự sắp xếp này

Phiến lá của cây có hình dạng từ mũi mác hoặc thẳng đến hình thuôn dài, với chiều dài dao động từ 3 đến 9cm và chiều rộng từ 0.6 đến 1,9 cm. Các bông hoa có hình dạng xim thưa được mọc đối xứng nhau ở nách lá phía trên, với màu trắng ngà hoặc xanh phớt hồng. Cây hoa cái thì thường không có cuống, còn đối với hoa đực có cuống dài 2.6-3.6mm. Đài hoa đực bao gồm 4-5 thùy, thùy của hoa thì có hình dạng ngắn và nhọn.



Hình 1.4.1: Hình ảnh cây Thuốc vòi

Tính đến hiện tại, nghiên cứu về loài *Pouzolzia pentandra* vẫn chưa đề cập đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây. Điều này mở ra một miền trời kỳ vĩ để khám phá tiềm năng dược lý mà loài cây này có thể đem lại trong y học cổ truyền. Nghiên cứu này có thể mang đến thông tin quý báu về những hợp chất có khả năng ứng dụng trong lĩnh vực y học hiện đại, đồng thời khám phá những bí mật của loài cây này và tăng cường sức khỏe con người.

- Để chữa ho, ho lâu ngày: dùng 8-16g *Pouzolzia pentandra* sắc nước uống hoặc dùng để nấu cao.
- Đinh nhọt và viêm mủ da: giã tươi *Pouzolzia pentandra*, rau má, lá rau muống đắp lên vết thương.
- Viêm tuyến vú: kết hợp các loại thảo dược gồm *Pouzolzia pentandra*, Tử hoa địa đinh, Phù dung, Bồ công anh giã tươi đắp.
- Chống lại bệnh lao khi sắc *Pouzolzia pentandra* với cây long thảo dơi *Christia vespertillionis*.
- Sử dụng trong mỹ phẩm: từ dịch chiết nước hay acit của cây *Pouzolzia pentandra* có tác dụng chống lại tác nhân gây hại xấu cho da phụ nữ.
- Vết thương đung giập: Sau khi cố định các bộ phận bị thương, dùng cây tươi giã đắp hoặc bột cây khô thêm rượu mà đắp, bó.
- Chữa tắc tia sữa, đái buốt: Dùng 30- 40g cây *Pouzolzia pentandra* sắc uống mỗi ngày.
- Chữa viêm mũi sưng đau: Dùng 15-20g lá hoặc hoa *Pouzolzia pentandra* mang đi giã nát thêm ít hạt muối, gạn lấy nước, sau đó dùng bông y tế thấm bôi vào mũi nơi bị viêm, dùng 3-4 lần/ngày.

- Sâu răng: Dùng loài *Pouzolzia pentandra* nấu nước súc miệng hoặc giã nát đắp vào chỗ răng đau [1].
- * *Một số chế phẩm từ loài Pouzolzia pentandra:*
 - Cao bổ phổi là sản phẩm được điều chế gồm *Pouzolzia pentandra*, bách bộ, thạch xương bồ, tinh dầu bạc hà, cam thảo, vỏ quýt, cát cánh.
 - Siro Eugica: Thuốc giòi, núc nác, viễn chí, vỏ quýt, an túc hương, húng chanh... điều trị các trường hợp ho có đờm, ho mất tiếng, ho kinh niên; viêm đau họng, viêm khí quản, viêm phế quản, sổ mũi; làm loãng dịch nhày đường hô hấp, long đờm.



Hình 1.4.2: Siro eugica- chế phẩm có thành phần Thuốc vòi



Hình 1.4.3: Bofomax- chế phẩm chứa thành phần Thuốc vòi

1.5. Các phương pháp tách chiết các hợp chất phân tử nhỏ trong thực vật

Mẫu thực vật được thu hái, xử lý và chiết với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Sau đó hoạt tính sinh học của các cặn chiết được đánh giá sơ bộ và cặn chiết nào thể hiện hoạt tính tốt sẽ được tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học để phân lập các chất sạch. Kiểm tra lại hoạt tính sinh học của các chất phân lập được.

- **Mẫu thực vật:**

Mẫu thực vật có thể được sử dụng để chiết xuất ở dạng tươi, khô và đông lạnh (lý tưởng nhất là ở dạng tươi). Tuy nhiên do điều kiện thu hái mẫu thường ở xa phòng thí nghiệm, do vậy mẫu thường được sấy khô ở nhiệt độ khoảng

40 °C. Tên khoa học của mẫu thực vật phải được xác định chính xác bởi các nhà thực vật có kinh nghiệm và tiêu bản mẫu thực vật phải được lưu giữ.

- ***Các phương pháp chiết xuất***

Việc lựa chọn phương pháp chiết phù hợp với các dung môi hữu cơ tùy thuộc vào tính chất mẫu nghiên cứu, mục đích nghiên cứu mà sử dụng các phương pháp chiết sau với các dung môi hữu cơ thích hợp.

- Chiết nóng: đun nóng mẫu thực vật với dung môi và mức nhiệt độ phù hợp

- Chiết Soxhlet: hơi của dung môi dùng để chiết được ngưng vào một bộ phận chứa mẫu đến khi đầy lại được quay trở lại bình đun. Quy trình này được lặp lại liên tục cho đến khi mẫu được chiết kiệt.

- Chiết lạnh: ngâm mẫu thực vật với dung môi phù hợp ở mức nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian từ 10h - 20h, sau đó chúng ta lọc lấy phần dịch chiết, bã thực vật này lại tiếp tục được ngâm trong dung môi. Quá trình này được chiết từ 3 - 5 lần. Gộp dịch chiết, cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu cặn chiết.

- Chiết siêu âm: cho dung môi vào mẫu rồi sau đó cho vào máy siêu âm vào có tác dụng nâng cao tác dụng hòa tan chất và hạ thời gian chiết.

Mẫu thực vật được chiết bằng nhiều phương pháp khác nhau như đã nêu trên, các dịch chiết sẽ được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết.

- ***Các phương pháp tách, tinh chế***

Kết tinh: là một quá trình chất rắn được tạo ra và tủa xuống từ dung dịch, dạng nóng chảy hay đôi khi từ dạng khí. Kết tinh là kỹ thuật tách rắn-lỏng, mà chất chuyển từ dạng chất tan trong dung dịch thành dạng tinh thể rắn tinh khiết. Trong công nghiệp hóa chất, việc kết tinh được thực hiện trong thiết bị kết tinh. Quá trình kết tinh là một hình thức của sự kết tủa, xảy ra nhờ hàng loạt các điều kiện về tính tan của chất trong dung môi phù hợp.

Sắc ký: Để tách và tinh chế các hợp chất ở trong cây các phương pháp sắc ký sau thường được sử dụng: sắc ký giấy (PC), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký khí lỏng

(GLC), sắc ký cột (CC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Tính tan và độ bay hơi của các cấu tử là yếu tố chủ yếu để quyết định việc lựa chọn phương pháp thích hợp.

Ngoài các phương pháp như đã trình bày trên, các phương pháp khác cũng được sử dụng trong việc nghiên cứu hóa thực vật. Một số ví dụ như, chất carotenoid sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng hay kỹ thuật lọc gel để tách các hợp chất protein và nucleic acid.

- ***Phương pháp phân lập một số lớp chất:***

- **Triterpenoid và steroid**

- Triterpen là các hợp chất có khung carbon từ 6 đơn vị isopren. Chúng có cấu trúc vòng phức tạp, thường có nhóm ancol, aldehyd hoặc cacboxylic acid. Triterpenoid được chia ít nhất làm 4 nhóm chính: triterpen, steroid, saponin và glycosid tim. Trong đó 2 nhóm sau thường là các hợp chất triterpen và steroid glycosid

Giới thiệu một số kỹ thuật tách

- Thuốc thử Liebermann-Burchard (hỗn hợp của 1ml H₂SO₄ đặc, 20ml acetic anhydrid và 50ml CHCl₃, sau khi phun hơi nóng 15 phút ở 85 – 90⁰C) thường được dùng để nhận biết các hợp chất triterpen và sterol, cho các vết màu xanh da trời.

- Từ mẫu thực vật, để tách triterpen, thường loại chất béo trước bằng ete, sau đó chiết với methanol nóng. Dịch chiết methanol có thể được khảo sát trực tiếp hoặc thủy phân bằng acid để tạo ra aglycon từ các hợp chất glycosid có trong cặn chiết. Bản mỏng TLC thường được sử dụng các hệ dung môi điển hình như dung môi n-hexane/EtOAc (1/1) hay CHCl₃/MeOH (10/1). Một số hợp chất betulinic, oleanolic và ursolic acid đòi hỏi các dung môi đặc biệt như etepetrol/dichloroethylen/acetic acid (50/50/0.7) hay etepetrol/ethyl formate/acid formic (93/7/0.7).

- Đối với các hợp chất saponin và sapogenin: Sự xuất hiện bọt bền vững trong quá trình chiết hay quay cất dịch chiết thể hiện sự có mặt của saponin. Một phép thử đơn giản có thể thực hiện như sau: lắc một ống nghiệm chứa dịch chiết ethanol mẫu cây và bọt bền vững sẽ xuất hiện trên bề mặt. Để kiểm tra sự có mặt của các sapogenin, cần phải thủy phân dịch chiết với HCl 1M trong khoảng 2 – 6h, sau đó trung hòa và chiết với etepetrol. Thử bản mỏng với các hệ dung môi như aceton/n-hexane (4:1), CHCl₃/CCl₄/aceton (2:2:1). Các sapogenin khác nhau không dễ phân tách trên bản mỏng.

- Đối với các hợp chất glycoside tim: các phương pháp tách rất tùy thuộc vào độ phức tạp về cấu trúc của các hợp chất này. Có thể sử dụng các hệ dung môi sau: EtOAc/pyridin/H₂O (5:1:4, pha trên); EtOAc/MeOH/H₂O (16:1:1); CHCl₃/Pyridin (6:1).

- **Flavonoid**

Flavonoid được chia thành các nhóm dựa vào cấu trúc khung của chúng, khoảng 10 nhóm thuộc lớp chất này đã được biết đến. Nhiều flavonoid là các chất tan trong nước. Chúng có thể được chiết với dung dịch 70% ethanol.

Flavonoid là các hợp chất phenolic, nó sẽ bị chuyển màu khi xử lý với kiềm hoặc ammoniac, vì vậy chúng dễ dàng bị phát hiện trên bản mỏng hoặc trong dung dịch. Flavonoid có chứa hệ nối đôi liên hợp, vì vậy cũng dễ dàng được phát hiện trong đèn UV. Nói chung, các hợp chất flavonoid thường tồn tại trong cây ở dạng glycosid, tức là nối với một hoặc vài đơn vị đường. Flavonoid có mặt trong tất cả các cây vascular, nhưng một vài lớp chất flavonoid tồn tại phổ biến hơn các lớp chất khác.

Đối với từng lớp chất như anthocyanin, flavon, flavonol,... sẽ có các quy trình tách đặc hiệu.

- **Alkaloid**

Không có một định nghĩa nào hoàn toàn thỏa đáng cho các hợp chất alkaloid, nhưng các hợp chất alkaloid nói chung là các hợp chất có tính bazơ, chứa 1 hoặc nhiều hơn nguyên tố nitơ, thường kết hợp như là một phần của hệ vòng.

Alkaloid thường có tính độc với con người, nhưng nhiều hợp chất có hoạt tính cao nên được sử dụng rộng rãi trong y học.

Các hợp chất alkaloid có mặt nhiều trong thực vật hạt kín, nhưng không có hoặc rất ít trong thực vật hạt trần, rêu, dương xỉ và thực vật bậc thấp.

Chức năng của alkaloid trong cây vẫn chưa được biết rõ ràng. Tuy nhiên một số chất được công bố là có vai trò là chất điều hòa sinh trưởng, xua đuổi côn trùng,...

Giới thiệu một số kỹ thuật tách

Do tính kiềm của alkaloid mà nó được chiết với dung dịch HCl 1M hay acid acetic 10% trong dung môi alcol, sau đó kết tủa bằng ammoniac đặc. Để xác định sự

có mặt của các hợp chất alkaloid trong căn chiết, một số thuốc thử đặc hiệu cho lớp chất này được sử dụng, thông thường nhất là thuốc thử Dragendorff.

Điều chế thuốc thử Dragendorff: gồm 2 phần (a): 0,6g bismuth nitrate trong 2ml HCl đặc và 10ml H₂O; (b): 6g KI trong 10ml H₂O. Hai phần trên được trộn với nhau cùng với 7ml HCl đặc và 15ml H₂O, và toàn bộ hỗn hợp lại hòa tan trong 400ml H₂O.

Có nhiều quy trình tách và phát hiện sự có mặt của các hợp chất alkaloid. Quy trình sau là QT thường được sử dụng nhất:

Mẫu cây được chiết với dung dịch acid yếu trong dung môi metanol hoặc etanol, sau đó pha nước được trung hòa với NH₄OH đặc rồi chiết với CHCl₃ và CHCl₃-EtOH. cất loại dung môi, sử dụng thuốc thử Dragendorff để phát hiện chất alkaloid.

HPLC là các phương pháp thường dùng để tách các hợp chất alkaloid. Ngoài ra còn nhiều phương pháp khác cũng được dùng như sắc ký cột silicagel, sắc ký cột ngược pha. Một số hệ dung môi dùng để tách các hợp chất alkaloid có khung khác nhau: 15% MeOH in Et₂O:2-5% NH₄OH (50:1); hexan/CHCl₃/EtOH/Et₂NH (60:6:8:0.1); CHCl₃/MeOH (17:3);...

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng mà đề tài sử dụng để nghiên cứu là cây bọ mắm bộ phận của cây để sử dụng nghiên cứu là các bộ phận ở phía trên mặt đất của cây thuốc vôi được nhà nghiên cứu TS. Nguyễn Quốc Bình công tác tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã thu hái tại Nho Quan, Ninh Bình vào hồi tháng 08 năm 2022 và đã được Ông giám định tên khoa học là *Pouzolzia pentandra*, họ Urticaceae. Mẫu tiêu bản của cây hiện đang được lưu trữ tại Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu tiêu bản được ký hiệu : PP08102022.NB



Hình 2.1.1: Hình ảnh cây thuốc vôi bên ngoài tự nhiên và ở phòng thí nghiệm

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

Mẫu thuốc vôi *Pouzolzia pentandra* sau khi thu hái về được nhóm nghiên cứu mang đi rửa sạch, sau đó được phơi khô ở trong bóng râm với nhiệt độ thường sau đó được xay nhỏ thành bột mịn. Mẫu khô xay nhỏ đó được nhóm nghiên cứu mang đi ngâm trong methanol với thiết bị siêu âm, quá trình này được thực hiện 3 lần ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng sau quá trình chiết được cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và nhiệt độ dưới 50°C, tạo ra cặn cô methanol. Cặn cô methanol này sau đó được sử dụng làm nguyên liệu để tiến hành quá trình phân lập và tinh chế các hoạt chất.

2.2.2. Phương pháp phân lập hợp chất

Để phân lập được hợp chất thì đề tài đã sử dụng các phương pháp sắc ký khác nhau để phân lập các cao chiết từ cây thuốc vôi như phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với sử dụng pha tĩnh là silica gel (Merck), sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là YMC RP 18 (Merck), và sắc ký ray phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck).

Đối với phương pháp sắc ký lớp mỏng, đề tài sẽ sử dụng bản mỏng trắng sẵn bao gồm DC-Alufolien 60 F254 (0,26 mm; Merck) và RP-18 F254S (0,26 mm; Merck).

Còn đối với phương pháp sắc ký cột thường thì đề tài thường sử dụng pha tĩnh là silica gel 60 có kích thước hạt từ 0,036 - 0,062 mm (232 - 410 mesh) của Merck. Mặt khác, phương pháp sắc ký cột ray phân tử sử dụng pha tĩnh là sephadex LH-20.

Khi đề tài sử dụng phương pháp sắc ký cột pha đảo, thì loại YMC RP-18 được sử dụng với kích thước hạt là 25-52 μm (Fuji silica Chemical Ltd.). Đề tài sử dụng các phương pháp này để phân lập và tinh chế các cao chiết của cây, mục đích chính là giúp xác định và nắm bắt chính xác các thành phần hóa học có trong cây.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất

Để xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất thì đề tài sử dụng các phương pháp hiện đại dựa trên cơ sở đó thì sự sử dụng của các thiết bị tiên tiến như:

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR): Các phân tích NMR được thực hiện trên máy Bruker avance 500 MHz tại Viện Hoá học - VAST. Chất chuẩn nội được sử dụng là TMS. Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được áp 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, HMBC và các phương pháp tương tự.

Dung môi được sử dụng trong quá trình này bao gồm $\text{DMSO-}d_6$, CD_3OD và CDCl_3 , nhằm tạo điều kiện tối ưu để thực hiện các phân tích NMR một cách chính xác và hiệu quả.

Các phương pháp này và thiết bị này đóng vai trò chủ chốt trong việc phân tích và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất, đồng thời mang lại thông tin cụ thể về thành phần và tạo hình của chúng.

2.2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Đề thử nghiệm được hoạt tính gây độc tế bào được tiến hành tại Phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

Trong thử nghiệm này, các dòng tế bào được cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection, USA; <https://www.atcc.org>) và CLS (Cell Lines Service GmbH, CHLB Đức - <https://clsgmbh.de>) được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - VAST. Các dòng tế bào được sử dụng trong thử nghiệm bao gồm:

Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma - ung thư gan)

A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cells - ung thư phổi)

PC-3 (Human Prostate Adenocarcinoma – ung thư tuyến tiền liệt)

Các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 38°C, CO₂ 6% trong môi trường thích hợp sử dụng các dung môi như DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, CHLB Đức).

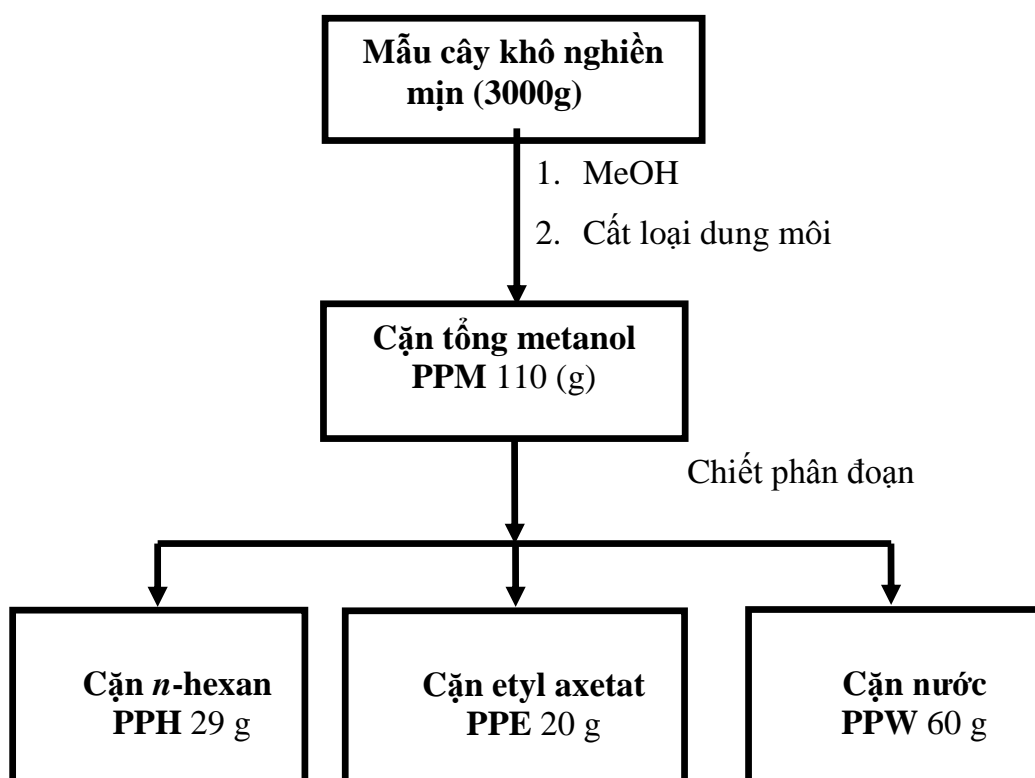
Tất cả các môi trường này đều được bổ sung L-glutamine 2 mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 9-11%. Tế bào sau đó được chuyển lên phiến vi lượng 96 giếng với mật độ 1.5×10^5 tế bào/giếng. Quá trình ủ tế bào với mẫu thử được thực hiện với dải nồng độ từ 100 đến 6.25 $\mu\text{g/ml}$, và mỗi nồng độ được thử nghiệm 3 lần. Chất chuẩn dương tính (+) bao gồm Ellipticine hoặc Paclitaxel (Taxol) trong DMSO. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan sau đó được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), và mật độ quang được đo tại $\lambda = 540/720\text{nm}$ bằng thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ).

Các mẫu có hoạt tính gây độc tế bào với ức chế $\geq 50\%$ sự sống sót được xác định giá trị IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$ hoặc μM), tức là nồng độ của mẫu thử mà tại đó tế bào còn sống sót 50%. Giá trị này được tính toán bằng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

2.3. Thực nghiệm

2.3.1. Thu nhận các dịch chiết từ cây *Pouzolzia pentandra*

Mẫu cây *Pouzolzia pentandra* sau khi thu hái về được rửa sạch, phơi khô, sau đó được xay nhỏ thành bột mịn. Mẫu được ngâm chiết siêu âm trong methanol 3 lần, quá trình này được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết tổng được cất loại dung môi dưới áp suất giảm và nhiệt độ dưới 50°C, tạo ra cặn cô methanol (90g). Cặn MeOH thêm nước và chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, EtOAc, sau đó cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn tương ứng. Việc thu nhận các dịch chiết từ cây *Pouzolzia pentandra* được tóm tắt trong sơ đồ sau:



Hình 2.3.1: Sơ đồ thu nhận các dịch chiết từ cây *Pouzolzia pentandra*

2.3.2. Phân lập và tinh chế các chất từ cây *Pouzolzia pentandra*

Từ sự khảo sát trên bản mỏng, Đề tài thấy rằng nhóm hợp chất chính của hai cặn chiết *n*-hexane và ethyl acetate có sự phân chia không rõ ràng nên dồn chúng lại với nhau. Ký hiệu chung là *n*-hexane **PPH** (49 g).

Chúng ta sử dụng tiếp cận chiết *n*-hexane **PPH** với khối lượng là 25g được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải HE 0→100% (tỷ lệ Etyl axetat tăng từ 0→100%) thu được 6 phân đoạn lần lượt là từ (**PPH1**→**PPH6**). Để tài tiếp tục kiểm tra các phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) và hiện màu bằng thuốc thử vanilin - H₂SO₄ 5%, sau đó các phân đoạn giống nhau được gộp lại rồi đuổi kiệt dung môi

Ở Phân đoạn **PPH** có khối lượng là 1,0 g tiếp tục được phân tách lại trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane: ethylacetate (100:0 đến 99:1) thu được 3 phân đoạn nhỏ từ (**PPH1.1** đến **PPH1.3**). tiếp tục ở phân đoạn **PPH1.1** được kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất **1** có khối lượng là 30,0 mg.

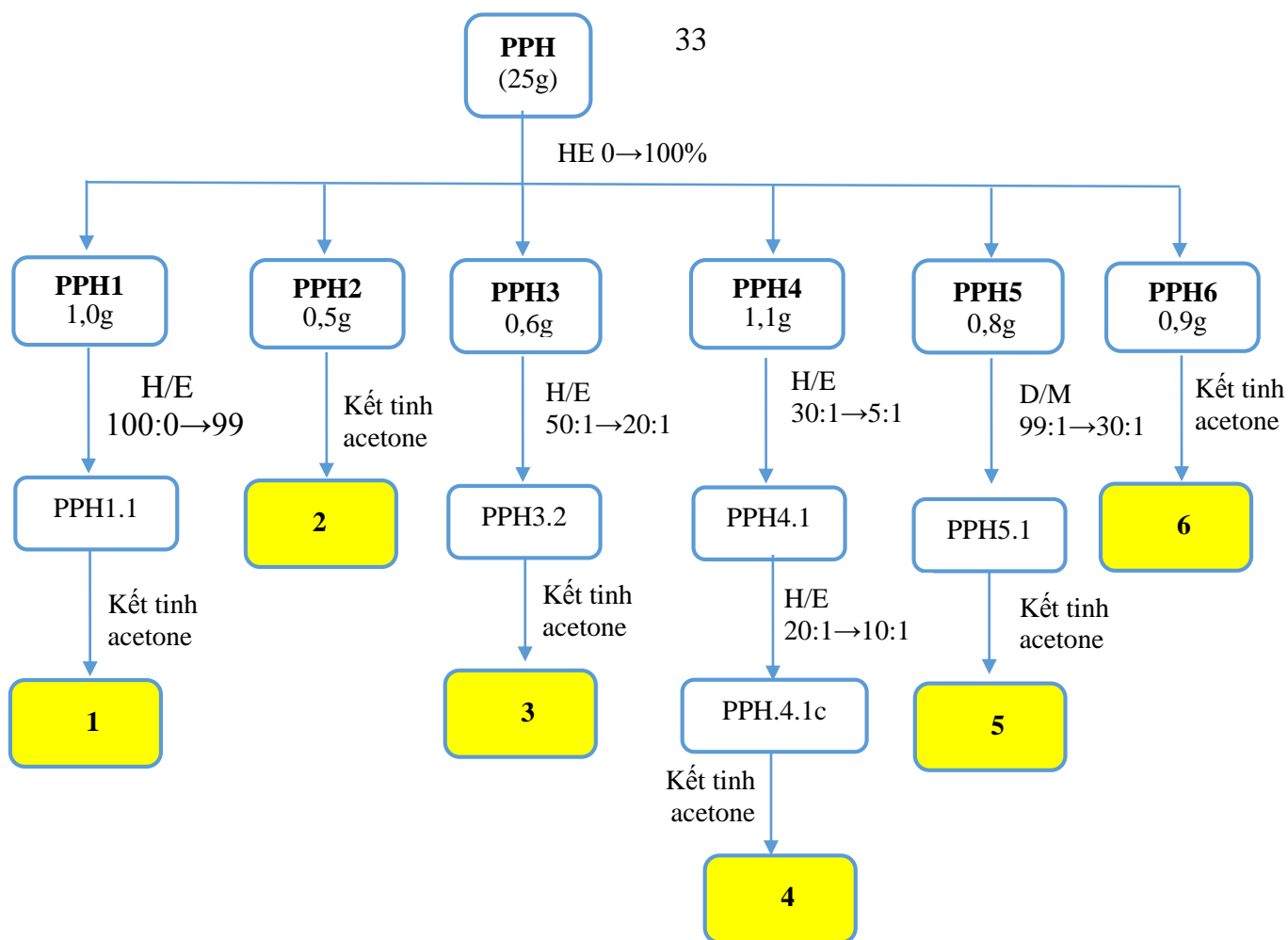
Đối với phân đoạn **PPH2** (0,5 g) thì tiếp tục được kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất **2** có khối lượng 11,2 mg.

Ở Phân đoạn **PPH3** (0,6 g) để tài tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (50:1→20:1). Tạo thành phân đoạn **PPH3.2** ở phân đoạn này được kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất **3** có khối lượng là 10,5 mg.

Tiếp tục đối với Phân đoạn **PPH4** (1,1 g) thì vẫn được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (30:1→5:1), phân đoạn này thu được tiếp tục tách lại trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (20:1→10:1), sau đó được kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất **4** có khối lượng là 9,5 mg.

Mặt khác khi ở Phân đoạn **PPH5** (0,8g) thì vẫn được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (99:1→20:1). Tạo thành phân đoạn **PPH5.1**, phân đoạn này lại tiếp tục được kết tinh lại trong metanol thu được hợp chất **5** có khối lượng là 8,8 mg.

Cuối cùng khi ở Phân đoạn **PPH6** (0,9 g) được kết tinh lại trong dung môi metanol thu được hợp chất **6** có khối lượng là 13,0 mg.



Hình 2.3.2: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây *Pouzolzia pentandra*

- *Hợp chất β -sitosterol (1)*

Hợp chất **1** thu được có dạng hình tinh thể hình kim và không có màu (10,6 mg), điểm nóng chảy 139-141 °C, $R_f = 0,42$ (hệ dung môi HE 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, δ_{ppm}): 0,68 (3H, s, Me-18); 1,01 (3H, s, 19-Me); 0,81-0,88 (2×3H, d, $J = 7,7$ Hz, 26- CH_3 và 27- CH_3); 0,83 (3H, t, $J = 7,32$ Hz, 29- CH_3); 0,92 (3H, d, $J = 10,0$ Hz, 21- CH_3); 3,52 (1H, m, H-3 α); 5,35 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS, δ (ppm)): 37,4 (C-1); 31,8 (C-2); 71,9 (C-3); 42,4 (C-4); 140,9 (C-5); 121,8 (C-6); 31,8 (C-7); 33,8 (C-8); 50,3 (C-9); 36,6 (C-10); 21,2 (C-11); 39,9 (C-12); 42,4 (C-13); 56,9 (C-14); 24,4 (C-15); 28,4 (C-16); 56,2 (C-17); 11,8 (C-18); 19,5 (C-19); 36,3 (C-20); 18,9 (C-21); 33,8 (C-22); 26,3 (C-23); 45,8 (C-24); 29,3 (C-25); 19,9 (C-26); 19,2 (C-27); 23,2 (C-28); 11,8 (C-29).

- *Hợp chất 3β -friedelanol (2)*

Hợp chất **2** thu được tinh thể vô định hình, màu trắng (10,1 mg), $R_f = 0,40$ (HE

4:1), điểm nóng chảy 290-292 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 0,86 (3H, s, H-25); 0,93 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, H-23); 1,00 (3H, s, H-26); 0,92 (3H, s, H-29); 0,96 (3H, s, H-24); 0,994 (3H, s, H-27); 0,996 (3H, s, H-30); 1,17 (3H, s, H-28); 3,72 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 17,6 (C-1); 35,1 (C-2); 72,8 (C-3); 49,3(C-4); 37,8 (C-5); 41,9 (C-6); 15,8 (C-7); 53,3 (C-8); 37,3 (C-9); 61,5 (C-10); 36,3 (C-11); 30,8 (C-12); 39,9 (C-13); 38,6 (C-14); 32,8 (C-15); 35,5 (C-16); 30,2 (C-17); 42,8 (C-18); 35,7 (C-19); 28,3 (C-20); 32,5 (C-21); 39,5 (C-22); 11,7(C-23); 16,5 (C-24); 18,4 (C-25); 18,8 (C-26); 20,3 (C-27); 32,2 (C-28); 35,2 (C-29); 31,9 (C-30).

- *Hợp chất quercetin (3)*

Hợp chất **3** thu được dưới dạng chất bột màu vàng (11,2 mg), $R_f = 0,40$ (hệ dung môi HE 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 12,58 (1H, s, 5-OH), 10,89 (1H, s, 7-OH), 7,77 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2'), 7,64 (1H, dd, $J = 2,0$ và 8,5 Hz, H-6'), 6,97 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,50 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8), 6,28 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 175,9 (C-4); 163,8 (C-7); 160,8 (C-5); 156,2 (C-9); 147,8 (C-4'); 146,9(C-2); 145,0 (C-3'); 135,8 (C-3); 121,8 (C-1'); 119,8(C-6'); 115,7(C-5'); 115,1 (C-2'); 103,1 (C-10); 98,3 (C-6); 93,4 (C-8).

- *Hợp chất kaempferol (4)*

Hợp chất **4** thu được dạng bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 277-278°C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, TMS, δ_{ppm}): 12,47 (1H, s, 5-OH); 10,76 (s, OH); 10,01 (s, OH); 9,35 (s, OH); 8,05 (2H, d, $J = 7,0$ Hz, H-2'/H-6'); 6,93 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3'/H-5'); 6,44 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8); 6,19 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6).

$^{13}\text{CNMR}$ (125 MHz, DMSO, TMS, δ_{ppm}): 175,9 (C-4); 163,9 (C-7); 160,7 (C-5); 159,2 (C-4'); 156,2 (C-9); 146,9 (C-2); 135,7 (C-3); 129,5 (C-2'/C-6'); 121,7 (C-1'); 115,5 (C-3'/C-5'); 103,1 (C-10); 98,2 (C-6); 93,5 (C-8).

- *Hợp chất dipterocarpol (5)*

Hợp chất **5** thu được dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 187–188°C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, δ_{ppm}): 0,89 (3H, s, H-30); 0,95 (3H, s, H-19) 1,00 (3H, s, H-18); 1,04 (3H, s, H-28); 1,08 (3H, s, H-29); 1,10 (1H, m, H-15a); 1,15 (3H, s, H-21); 1,28 (1H, m, H-12); 1,31 (1H, m, H-11); 1,32 (1H, m, H-6); 1,38 (1H, m, H-10); 1,43 (1H, m, H-8); 1,46 (1H, m, H-1a); 1,46 (1H, m, H-15b); 1,47 (1H, m, H-7); 1,47 (1H, m, H-22); 1,48 (1H, m, H-16); 1,49 (1H, m, H-22); 1,51 (1H, m, H-11); 1,56 (1H, m, H-5); 1,57 (1H, m, H-6); 1,63 (3H, s, H-26); 1,66 (1H, m, H-13); 1,69 (3H, s, H-27); 1,57 (1H, m, H-16); 1,76 (1H, m, H-17); 1,84 (1H, m, H-12); 1,92 (1H, m, H-1b); 2,05 (2H, m, H-23); 2,43 (1H, m, H-2a); 2,52 (1H, m, H-2b); 5,12 (1H, ddd, $J = 10,5, 5,5, 1,0$ Hz, H-24).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS, δ_{ppm}): 15,2 (C-18); 16,0 (C-19); 16,3 (C-30); 17,7 (C-26); 19,7 (C-10); 21,0 (C-28); 22,1 (C-11); 22,6 (C-23); 24,8 (C-16); 25,5 (C-21); 25,7 (C-27); 26,7 (C-29); 27,5 (C-12); 31,2 (C-15); 34,1 (C-2); 34,6 (C-6); 36,7 (C-9); 39,9 (C-1); 40,3 (C-7); 40,5 (C-22); 42,4 (C-13); 47,4 (C-4); 49,9 (C-17); 50,0 (C-8); 50,3 (C-14); 55,4 (C-5); 75,4 (C-20); 124,7 (C-24); 131,7 (C-25); 218,1 (C-3).

- *Hợp chất daucosterol (6)*

Hợp chất **6** thu được dưới dạng vô định hình, không màu (9,0 mg), nóng chảy ở nhiệt độ 270-271 °C, $R_f = 0,43$ (DM 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS, δ ppm): 3,67 (1H, m, H-3); 5,44 (1H, dd, $J = 2,0/5,0$ Hz, H-6); 0,66 (3H, s, H-18); 0,94 (3H, s, H-19); 0,95 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-21); 0,84 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H-26); 0,86 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-29); 0,81 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-28).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO-d_6 , TMS, δ ppm): 37,7 (C-1); 29,8 (C-2); 76,9 (C-3); 39,2 (C-4); 140,7 (C-5); 121,4 (C-6); 32,3 (C-7); 32,4 (C-8); 50,8 (C-9); 37,2 (C-10); 21,5 (C-11); 40,2 (C-12); 42,7 (C-13); 57,2 (C-14); 23,9 (C-15); 28,5 (C-16); 56,5 (C-17); 12,0 (C-18); 19,3 (C-19); 35,7(C-20); 19,1 (C-21); 34,5 (C-22); 26,8 (C-23); 46,5 (C-24); 29,8 (C-25); 19,8 (C-26); 19,6 (C-27); 23,6 (C-28); 12,2 (C-29); 100,8 (C-1'); 74,1 (C-2'); 76,3 (C-3'); 70,9 (C-4'); 76,8 (C-5'); 61,2 (C-6').

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các hợp chất steroid

3.1.1. Hợp chất β -sitosterol (1)

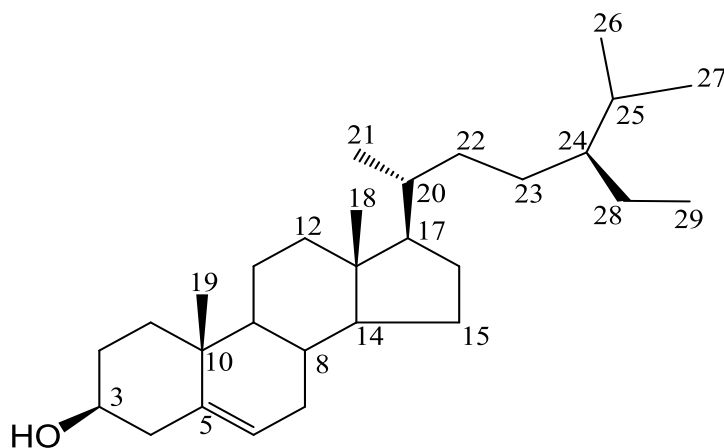
Hợp chất **1** thu được có hình dạng tinh thể hình kim có màu trắng từ dịch chiết ethyl acetate, nóng chảy ở 135-136 °C, điểm nóng chảy không thay đổi gì so với chất mẫu.

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **1** cho thấy tín hiệu của sáu nhóm methyl tại độ chuyển dịch hóa học lần lượt là δ 0,68; 1,01; 0,81; 0,83; 0,88; 0,92 ppm.

Dựa vào các thông tin của phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ đã cho thấy sự xuất hiện của một nhóm hydroxyl tại độ chuyển dịch hóa học δ_{H} tại 3,53 ppm (proton của CH liên kết với OH), δ_{C} tại 71,7ppm. Tín hiệu proton olefin đặc trưng cho sterol tại δ_{H} 5,35 (1H, d, $J= 5,0$ Hz) gợi ý sự hiện diện một liên kết đôi. Nối đôi C5/C6 được thể hiện qua tín hiệu tại $\delta_{\text{C-5}}$ tại 140,7 ppm, s và $\delta_{\text{C-6}}$ tại 121,7 ppm.

Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất **1** có 29 nguyên tử carbon.

So sánh với tài liệu phổ, ta có thể khẳng định chất **1** là β -sitosterol hay stigmaster-5-en-24R-3 β -ol [33].



Hình 3.1.1: Cấu trúc hóa học của **1**

Bảng 3.1.1: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **1** và hợp chất tham khảo

Vị trí	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , ppm)	$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , ppm)	$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm) [33]	$^1\text{H-NMR TLTK}$ (150 MHz, CDCl_3 , ppm) [33]

V _i trí	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃ , ppm)	¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃ , ppm)	¹³ C-NMR (600 MHz, CDCl ₃ , ppm) [33]	¹ H-NMR TLTK (150 MHz, CDCl ₃ , ppm) [33]
1		37,3	37,5	
2	-	31,7	40,0	-
3	3,52 (1H, m)	71,8	72,1	3,50 (1H, m)
4	-	42,3	42,6	-
5	-	140,8	141,0	-
6	5,35 (1H, d, <i>J</i> = 5Hz)	121,7	121,9	5,33 (t, 1H)
7	-	31,9	32,2	-
8	-	33,9	31,9	-
9	-	50,2	50,4	-
10	-	36,5	36,8	-
11	-	21,1	21,3	-
12	-	39,8	40,0	-
13	-	42,33	42,6	-
14	-	56,8	57,0	-
15	-	24,3	26,4	-
16	-	28,3	28,5	-
17	-	56,1	56,3	-
18	0,68 (3H, s)	11,9	364	-
19	1,01 (3H, s)	19,4	19,3	0,91 (d, 3H, <i>J</i> =6,6)
20		36,2	34,2	-
21	0,92 (3H, d, <i>J</i> = 10,0 Hz)	18,8	24,5	-
22	-	33,97	46,1	-
23	-	26,2	23,3	-
24	-	45,9	12,2	0,82 (t, 3H, <i>J</i> =7.2Hz)

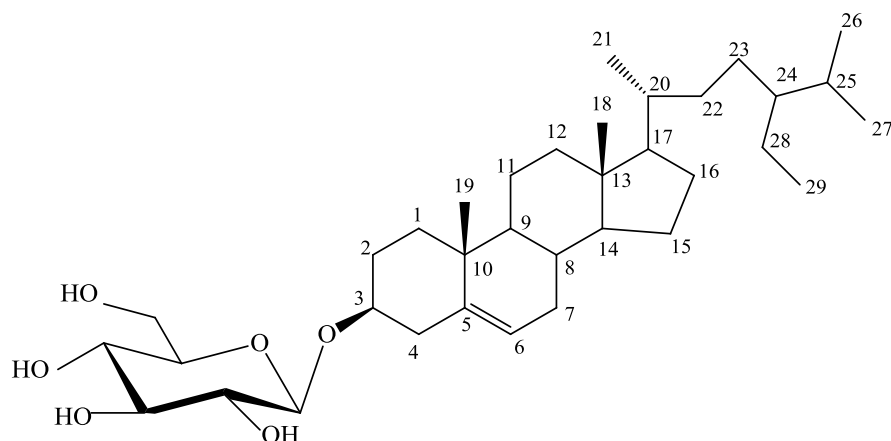
Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃ , ppm)	¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃ , ppm)	¹³ C-NMR (600 MHz, CDCl ₃ , ppm) [33]	¹ H-NMR TLTK (150 MHz, CDCl ₃ , ppm) [33]
25	-	29,2	29,4	-
26	0,81-0,88 (2×3H, d, <i>J</i> = 7,7 Hz)	19,8	20,0	0,81 (d, 3H, <i>J</i> =6.411Z)
27	0,81-0,88 (2×3H, d, <i>J</i> = 7,7 Hz)	19,1	19,6	0,79 (d, 3H, <i>J</i> =6.4)
28		23,1	19,0	0,66 (s, 3H)
29	0,83 (3H, t, <i>J</i> = 7,32 Hz)	11,9	12, 1	0,99 (s, 3H)

3.1.2. Hợp chất daucosterol (6)

Dựa vào phổ ¹H-NMR của hợp chất **6** đề tài nhận thấy một số thông tin như: có sự xuất hiện của các tín hiệu của các proton tại các độ chuyển dịch như δ_H 3,58 (H-3); 5,35 (H-6); 0,66 (H-18); 0,94 (H-19); 0,81 (H-28). Ngoài ra còn có các tín hiệu proton đặc trưng của một phân tử glucose với H anomer tại δ_H 4,42 ppm và bốn nhóm CH-O và một nhóm CH₂O trong vùng 3,24-3,91 ppm.

Dựa vào phổ ¹³C-NMR của hợp chất **6** cũng cho chúng ta biết công thức cấu tạo của hợp chất **6** có tổng số 35 nguyên tử carbon, trong đó có 5 nhóm CH-O, 1 nhóm CH₂O trong vùng δ_C 61,2-78,8 ppm, 2 carbon olefin tại δ_C 140,7 ppm (C-5) và 121,4 (C-6); 1 carbon anomer δ_C 100,8 ppm (C-1').

Trên cơ sở phân tích các dữ liệu phổ NMR, kết hợp so sánh dữ liệu phổ đã được công bố và điểm nóng chảy của β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside cho phép khẳng định hợp chất **6** là β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside hay daucosterol [34].



Hình 3.1.2: Cấu trúc hóa học của **6**

Bảng 3.1.2: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **6** và hợp chất tham khảo

Vị trí	¹ H-NMR (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	¹³ C-NMR (125MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	¹³ C-NMR (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm) [34]	¹ H-NMR TLTK (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm) [34]
1	-	37,6	37,02	1,0
2	-	29,9	29,6	1,24
3	3,57 (1H, m)	76,8	76,7	2,88
4	-	39,1	40,3	2,33
5	-	140,6	139,5	-
6	5,34 (1H, dd, $J = 2,0/5,0$ Hz)	121,3	121,4	5,30
7	-	32,2	31,8	1,77
8	-	32,3	29,6	-
9	-	50,7	51,1	-
10	-	37,1	34,6	-
11	-	21,4	21,44	-
12	-	40,2	40,3	-
13	-	42,7	40,5	-
14	-	57,2	55,7	0,91
15	-	23,9	21,5	1,05

Vị trí	¹ H-NMR (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	¹³ C-NMR (125MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	¹³ C-NMR (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm) [34]	¹ H-NMR TLTK (500MHz, DMSO-d ₆ , ppm) [34]
16	-	28,5	28,6	1,24
17	-	56,5	55,7	-
18	0,65 (3H, s)	12,0	12,6	0,75
19	0,93 (3H, s)	19,2	19,3	-
20	-	35,6	37,0	-
21	0,94 (3H, d, <i>J</i> = 6,6 Hz)	19,0	21,4	-
22	-	34,4	34,5	-
23	-	26,7	25,4	-
24	-	46,4	45,6	-
25	-	29,7	28,6	-
26	0,83 (3H, d, <i>J</i> = 7,1 Hz)	19,9	19,3	-
27		19,5	13,4	-
28	0,80 (3H, d, <i>J</i> = 6,6Hz)	23,5	21,5	-
29	0,85 (3H, d, <i>J</i> = 6,6Hz)	12,1	11,6	-
1'	-	100,9	101,3	4,32
2'	-	74,0	73,5	2,89
3'	-	76,2	76,7	3,28
4'	-	70,8	70,6	3,05
5'	-	76,9	76,8	3,28
6'	-	61,1	61,6	4,54

3.1.3. Hợp chất dipterocarpol (5)

Hợp chất **5** thu được dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 187–188°C. Dựa vào thông tin trên phổ ¹H-NMR cho đề tài biết tín hiệu của 8 nhóm methyl tại δ_H 0,88 (3H, s, H-30), 0,96 (3H, s, H-19); 1,01 (3H, s, H-18); 1,05 (3H, s, H-28); 1,09 (3H, s, H-29); 1,16 (3H, s, H-21); 1,64 (3H, s, H-26); 1,68 (3H, s, H-27).

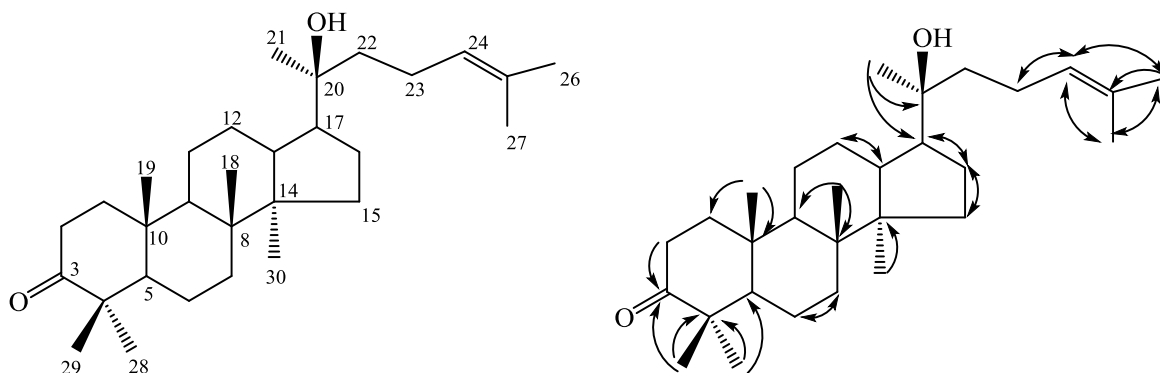
Dựa vào thông tin trên phổ $^1\text{H-NMR}$ cũng cho đề tài thấy có sự xuất hiện tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi tại δ_{H} 5,13 (1H, ddd, $J= 10,6; 5,6; 1,1$ Hz, H-24) tương ứng với các nguyên tử carbon tại δ_{C} 124,8 (C-24).

Từ những dữ liệu này cho thấy hợp chất **5** thuộc khung sterol có một liên kết đôi ở mạch nhánh trong cấu trúc.

Từ những thông tin trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của hợp chất **5 một lần nữa khẳng định hợp chất 5** có 30 tín hiệu carbon, bao gồm 8 nhóm methyl, 10 nhóm methylene, 5 nhóm methine, 7 carbon bậc 4. Trong đó, xuất hiện tín hiệu của carbon carbonyl đặc trưng tại δ_{C} 218,2 (C-3) và tín hiệu carbon của hai liên kết đôi trong vùng trường thấp tại δ_{C} 124,8 (C-24) và 131,8 (C-25).

Phổ HMBC của của hợp chất **5** cho thấy rằng giữa proton H-24 (δ_{H} 5,12) mỗi tương quan với các nguyên tử C-22, C-23, C-26 và C-27; giữa các proton H-17 (δ_{H} 1,76) mỗi tương quan với carbon C-20, C-13, C-15 và C-16. Tương tác giữa proton H-18 (δ_{H} 1,01) mỗi tương quan với carbon C-8 (δ_{C} 50,1); H-19 (δ_{H} 0,96) với carbon C-10 (δ_{C} 19,8); H-21 (δ_{H} 1,16) với carbon C-20 (δ_{C} 75,6); H-26 (δ_{H} 1,64) và H-27 (δ_{H} 1,69) mỗi tương quan với carbon C-25 (δ_{C} 13,7); H-28 (δ_{H} 1,04) và H-29 (δ_{H} 1,08) mỗi tương quan với carbon C-4 (δ_{C} 47,5), C-3 (δ_{C} 218,2) và C-5 (δ_{C} 55,5); H-30 (δ_{H} 0,88) với carbon C-14 (δ_{C} 50,4) và C-8 (δ_{C} 50,1) khẳng định các nhóm methyl ở các vị trí lần lượt như sau 18-CH₃, 19-CH₃, 21-CH₃, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃, 29-CH₃, 30-CH₃ đính vào các vị trí C-8, C-10, C-20, C-25, C-25, C-4, C-4 và C-14 tương ứng.

Dựa trên những thông tin đã phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HSQC, HMBC và so sánh với các dữ liệu được công bố [35], hợp chất **5** được được xác định là (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one hay còn gọi là dipterocarpol.



Hình 3.1.3: Cấu trúc hóa học và tương tác chính HMBC (H→C) của 5

Bảng 3.1.3: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 5 và hợp chất tham khảo

Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm})	¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm})	¹³ C-NMR (CDCl ₃) [35]	¹ H-NMR TLTK (CDCl ₃) [35]
1	1,46 (1H, m) 1,92 (1H, m)	39,9	39,88	1,46 (1H, <i>d.d.d</i>) 1,92 (1H, <i>d.d.d</i>)
2	2,43 (1H, m) 2,52 (1H, m)	34,1	34,10	2,43 (1H, <i>d.d.d</i>) 2,51 (1H, <i>d.d.d</i>)
3	-	218,1	218,11	-
4	-	47,4	47,42	-
5	1,56 (1H, m)	55,4	55,33	1,47 (1H, <i>m</i>) 1,56 (1H, <i>m</i>)
6	1,57 (1H, m) 1,32 (1H, m)	34,6	34,53	1,57 (1H, <i>m</i>) 1,32 (1H, <i>m</i>)
7	1,47 (1H, m)	40,3	40,26	-
8	1,43 (1H, m)	50,0	49,99	1,43 (1H, <i>d.d</i>)
9	-	36,7	36,81	-
10	1,38 (1H, m)	19,7	19,64	1,38 (1H, <i>d.d</i>)
11	1,51 (1H, m) 1,31 (1H, m)	22,1	22,02	1,51 (1H, <i>m</i>) 1,31 (1H, <i>d.d.d.d</i>)
12	1,84 (1H, m) 1,28 (1H, m)	27,5	27,52	1,85 (1H, <i>m</i>) 1,28 (1H, <i>m</i>)
13	1,66 (1H, m)	42,4	42,36	1,66 (1H, <i>d.d.d</i>)
14	-	50,3	50,25	-
15	1,46 (1H, m) 1,10 (1H, m)	31,2	31,15	1,46 (1H, <i>m</i>) 1,10 (1H, <i>d.d.d</i>)
16	1,48 (1H, m) 1,57 (1H, m)	24,8	24,79	1,48 (1H, <i>m</i>) 1,57 (1H, <i>m</i>)
17	1,76 (1H, m)	49,9	49,79	1,76 (1H, <i>d.t</i>)

Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm})	¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃ , δ _{ppm})	¹³ C-NMR (CDCl ₃) [35]	¹ H-NMR TLTK (CDCl ₃) [35]
18	1,00 (3H, s)	15,2	15,20	1,0 (3H, s)
19	0,95 (3H, s)	16,0	16,03	0,94 (3H, s)
20	-	75,4	75,34	-
21	1,15 (3H, s)	25,5	25,47	1,15 (3H, s)
22	1,47 (1H, m) 1,49 (1H, m)	40,5	40,45	1,47 (1H, m) 1,49 (1H, m)
23	2,05 (2H, m)	22,6	22,55	2,02 (1H, m) 2,08 (1H, m)
24	5,12 (1H, ddd, <i>J</i> = 10,5, 5,5, 1,0 Hz)	124,7	124,68	5,12 (1H, <i>d.d.d</i>)
25	-	131,7	131,63	-
26	1,63 (3H, s)	17,7	17,72	1,63 (3H, <i>d</i>)
27	1,69 (3H, s)	25,7	25,75	1,69 (3H, <i>d</i>)
28	1,04 (3H, s)	21,0	21,01	1,04 (3H, s)
29	1,08 (3H, s)	26,7	26,69	1,08 (3H, s)
30	0,89 (3H, s)	16,3	16,34	0,89 (3H, s)

3.2. Các hợp chất triterpen

3.2.1. Hợp chất 3β-friedelanol (2)

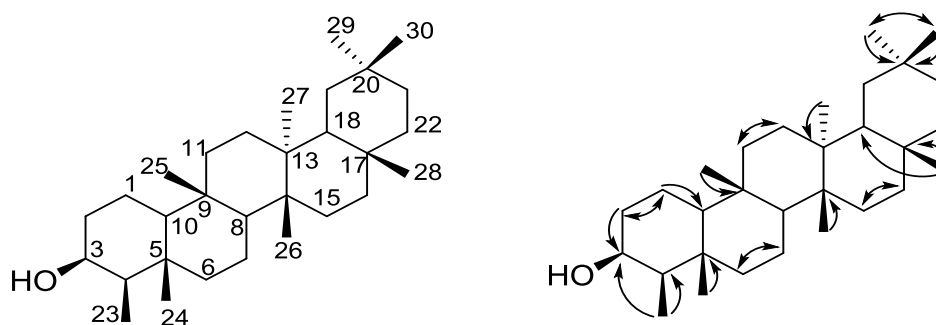
Chất kết tinh hình kim (11,6 mg), $R_f = 0,48$ (hệ dung môi *n*-hexan-etyl axetat 8:1), điểm nóng chảy 290-292 °C.

Trên phổ ¹H-NMR của **2** quan sát được tín hiệu của 8 nhóm methyl, trong đó có 7 nhóm methyl bậc 3 dạng singlet tại δ_H 0,86 (3H, s, H-25); 0,92 (3H, s, H-29); 0,96 (3H, s, H-24); 0,996 (3H, s, H-30); 0,994 (3H, s, H-27); 1,00 (3H, s, H-26); 1,17 (3H, s, H-28) và một nhóm methyl dạng double tại δ_H 0,93 (3H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-23). Những tín hiệu này cũng đặc trưng cho hợp chất triterpenoid có dạng khung friedelan. Trên phổ ¹H-NMR còn xuất hiện tín hiệu của 01 proton đặc trưng cho nhóm metin có liên kết với nhóm hydroxyl ở độ chuyển dịch δ_H 3,71 (1H, *brs*, H-3) với carbon tương

ứng tại δ_C 72,70 ppm.

Trên phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT cũng cho biết trong phân tử có 30 nguyên tử carbon, bao gồm 8 nhóm methyl (CH_3), 5 nhóm metin (CH); 11 nhóm methylen (CH_2) và 6 nguyên tử carbon bậc 4. Trên phổ ^{13}C -NMR quan sát thấy tín hiệu đặc trưng của carbon thuộc nhóm CH-OH ở δ_C 72,78 ppm (C-3), ngoài ra là tín hiệu của nhóm methyl tại $\delta_{\text{C-23}}$ 11,61/ $\delta_{\text{H-23}}$ 0,93 (d, $J = 7,5$ Hz) đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với C-4 của khung friedelan. Và như vậy trong phân tử **2** có 1 nhóm hydroxyl.

Kết quả phân tích các dữ kiện phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và DEPT đã xác định được nhóm OH liên kết với carbon tại vị trí C-3. So sánh các dữ kiện phổ của **2** với 3β -friedelanol thấy hoàn toàn phù hợp [36]. Như vậy hợp chất **2** được khẳng định là 3β -friedelanol được phân lập từ loài *Pouzolzia pentandra*.



Hình 3.2.1: Cấu trúc hóa học và tương tác chính HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) của **2**

Bảng 3.2.1: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **2** và hợp chất tham khảo

Vị trí	^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm)	^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm)	^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) [36]
1		15,9	15,81
2		35,1	35,23
3	3,72 (1H, d, $J = 2,5$ Hz)	72,7	72,77
4		49,2	49,21
5		37,9	37,13
6		41,8	41,76

Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃ , δ ppm)	¹³ C-NMR (500 MHz, CDCl ₃) [36]
7		17,6	17,57
8		53,2	53,22
9		37,2	38,40
10		61,4	61,39
11		36,2	35,36
12		30,7	30,66
13		38,5	37,86
14		39,8	39,70
15		32,9	32,36
16		35,4	36,11
17		30,1	30,04
18		42,9	42,86
19		35,6	35,58
20		28,2	28,19
21		32,4	32,85
22		39,4	39,30
23	0,93 (3H, d, $J = 7,5$ Hz)	11,6	11,62
24	0,96 (3H, s)	16,4	16,41
25	0,86 (3H, s)	18,3	18,26
26	1,00 (3H, s)	18,7	18,65
27	0,994 (3H, s)	20,2	20,13
28	1,17 (3H, s)	32,1	31,81
29	0,92 (3H, s)	35,1	35,03
30	0,996 (3H, s)	31,8	32,10

3.3. Các hợp chất flavonoid

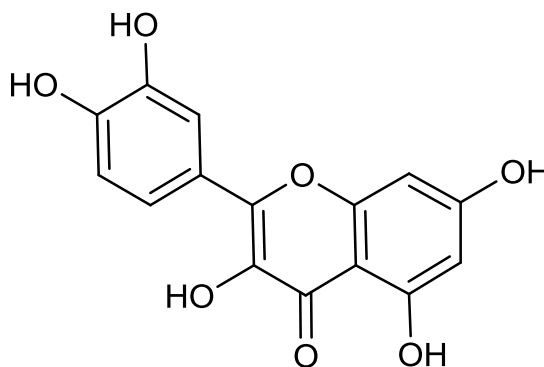
3.3.1. Hợp chất quercetin (3)

Hợp chất **3** thu được dưới dạng bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 314-316°C.

Phổ ^1H -NMR cho thấy sự xuất hiện của các tín hiệu đặc trưng cho proton thơm ở độ dịch chuyển nằm trong vùng 7,68 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H-2'), 7,55 (1H, dd, $J=2,0$ và 8,5 Hz, H-6'), 6,88 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-5'), 6,41 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-8), 6,19 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6). Bên cạnh đó, các tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxyl xuất hiện ở trong vùng 12,49 (1H, s, 5-OH), 10,78 (1H, s, 7-OH), 9,58 (1H, s), 9,37 và 9,31.

Dựa vào thông tin của Phổ ^{13}C -NMR cho thấy hợp chất **3** có chứa 15 carbon, trong đó tín hiệu đặc trưng cho nhóm C=O nằm trong độ dịch chuyển 175,9 ppm, 7 carbon bậc 4 của vòng thơm mang oxygen tại các δ_{C} 146,8 (C-2); 135,7 (C-3); 160,7 (C-5); 163,9 (C-7); 156,1 (C-9); 145,0 (C-3') và 147,7 (C-4'); 2 carbon bậc 4 vòng thơm không mang oxygen tại δ_{C} 103,0 (C-10); 121,9 (C-1'); 5 carbon methine vòng thơm tại δ_{C} 93,3 (C-8); 98,2 (C-6); 115,0 (C-2'); 119,9 (C-5') và 115,6 (C-6').

Dựa vào dữ liệu phổ trên có thể thấy hợp chất **3** là một flavonoid. So sánh các dữ kiện phổ với các tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **3** là quercetin [37].



Hình 3.3.1: Cấu trúc hóa học của **3**

Bảng 3.3.1: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **3** và hợp chất tham khảo

Vị trí	^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6)	^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)	^{13}C -NMR (500 MHz, DMSO- d_6), [37]	^1H -NMR (125 MHz, DMSO) [37]
2	-	146,8	156,9	-
3	-	135,7	134,6	-
4	-	175,8	178,2	-
5	12,48 (1H, s, 5-OH)	160,7	161,8	-

Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	¹³ C-NMR (125 MHz, DMSO)	¹³ C-NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆), [37]	¹ H-NMR (125 MHz, DMSO) [37]
6	6,18 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	98,2	99,2	6,15(1H; d; <i>J</i> = 2,2 Hz)
7	10,79 (1H, s, 7-OH)	163,9	164,7	-
8	6,40 (1H, d, <i>J</i> =1,5Hz)	93,3	94,1	6,36 (1H; d; <i>J</i> = 2,2 Hz)
9	-	156,1	157,8	-
10	-	103,0	104,6	-
1'	-	121,9	121,2	-
2'	7,67 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	115,0	115,9	7,35 (1H; d; <i>J</i> = 2,2 Hz)
3'	-	145,0	145,7	-
4'	-	147,7	148,9	-
5'	6,87 (1H, d, <i>J</i> =8,5Hz)	119,9	116,2	6,95 (1H; d; <i>J</i> = 8,2 Hz)
6'	7,54 (1H, dd, <i>J</i> = 2,0 và 8,5Hz)	115,6	121,6	7,25 (1H; dd; <i>J</i> = 8,2; 2,2 Hz)

3.3.2. Hợp chất kaempferol (4)

Hợp chất **4** đề tài thu được dạng bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 277-278°C.

Dựa vào thông tin trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **4** cho đề tài biết các tín hiệu của proton vòng thơm, bao gồm có tín hiệu của 2 proton dưới dạng doublet ở vùng trường thấp thể ở vị trí *meta* tại δ_{H} 6,45 (1H, d, *J* = 1,6 Hz, H-8) và 6,18 (1H, d, *J* = 1,5Hz, H-6); 2 tín hiệu proton cường độ cao hơn dưới dạng doublet có tương tác thể *ortho* tại δ_{H} 8,06 (2H, d, *J*=7,0Hz, H-2'/H-6') và 6,94 (2H, d, *J*=7,5Hz, H-3'/H-5').

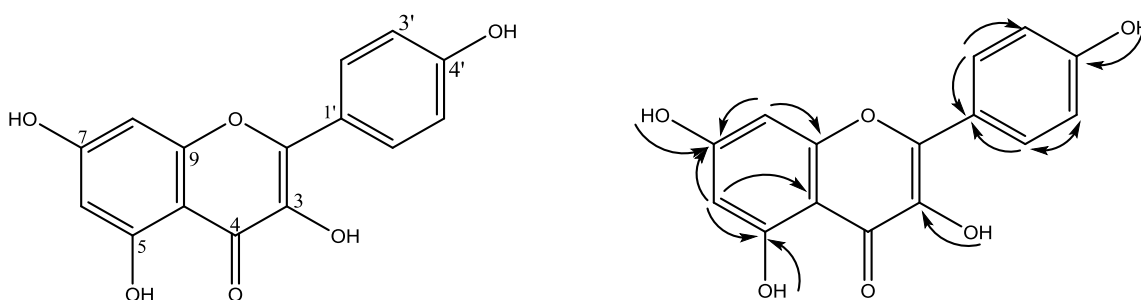
Thông tin trên phổ ¹³C-NMR của của hợp chất **4** cũng cho đề tài thấy được 13 tín hiệu của 15 carbon, trong đó 2 tín hiệu tại δ_{C} 129,6 (C-2'/C-6') và 115,6 (C-3'/C-5') có cường độ carbon gấp đôi, 1 nhóm carbonyl (C=O) tại 175,8 (C-4), các tín hiệu carbon vòng thơm tại δ_{C} 163,8 (C-7); 160,8 (C-5); 156,3 (C-9); 129,6 (C-2'/C-6'); 121,8 (C-1'); 115,6 (C-3'/C-5'); 103,2 (C-10); 98,3 (C-6); 93,6 (C-8) và 2 carbon olefin gắn với oxy tại δ_{C} 146,8(C-2); 135,8 (C-3). Từ những thông tin trên dữ liệu

phổ ^1H NMR, ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất một lần nữa chứng tỏ đây là một hợp chất flavonoid khung flavone.

Các thông tin trên phổ DEPT kết hợp ^{13}C -NMR cho thấy hợp chất **4** có 6 nhóm $-\text{CH}=\text{}$ và 9 nhóm C tứ cấp. Mặt khác thì phổ HMBC của hợp chất **4** cũng cho biết tương tác chính giữa H-2',6' (δ_{H} 8,06) với C-1' (δ_{C} 121,8), C-3',6' (δ_{C} 115,6); tương tác giữa H-3',5' (δ_{H} 6,93) với C-2',6' (δ_{C} 129,5) và C-4' (δ_{C} 177,3 ppm), H-5' tương tác xa với C-4' (δ_{C} 159,3) và C-2',6' (δ_{C} 129,3); H-6 với C-5 (δ_{C} 160,8) và C-7 (δ_{C} 163,8) và H-8 (δ_{H} 6,45) với C-7 (δ_{C} 163,8) và C-9 (δ_{C} 156,3).

Tín hiệu dưới dạng singlet tại δ_{H} 12,48 (1H, s, 5-OH) đặc trưng cho nhóm-OH phải gắn vào vị trí C-5 trên khung flavone. Dựa vào thông tin trên phổ HMBC còn quan sát được tín hiệu proton của nhóm hydroxyl tương quan với carbon tại δ_{C} 162,4; δ_{C} 104,2; δ_{C} 99,3 và δ_{C} 159,3 tương ứng vị trí C-5, C-7 và C-3 và C-4'. Proton H-6 (δ_{H} 6,18) ghép *meta* với proton δ_{H} 6,45, nên proton này chỉ có thể là H-8. Trên phổ HMBC có sự tương quan giữa hai proton H-6 và H-8 với carbon δ_{C} 163,8 (C-7), điều này khẳng định carbon này phải là C-7. Carbon δ_{C} 156,3 cũng cho tương quan với proton H-8 nên carbon này là C-9.

Từ các biện luận trên, kết hợp với tài liệu tham khảo, hợp chất **4** được xác định với tên gọi là kaempferol [38].



Hình 3.2.2: Cấu trúc hóa học của **4**

Bảng 3.3.2: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **4** và hợp chất tham khảo

Vị trí	^1H -NMR (500 MHz, DMSO, ppm)	^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO, ppm)	^{13}C -NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) [38]

Vị trí	¹ H-NMR (500 MHz, DMSO, ppm)	¹³ C-NMR (125 MHz, DMSO, ppm)	¹³ C-NMR (500 MHz, CD ₃ OD, ppm) [38]
1			
2		146,9	148,5
3		135,7	135,4
4		175,9	177,4
5	12,47 (1H, s, 5-OH)	160,7	161,5
6	6,19 (1H, d, <i>J</i> = 1,5Hz)	98,2	99,25
7		163,9	166,1
8	6,44 (1H, d, <i>J</i> = 1,5 Hz)	93,5	94,8
9		156,2	159,0
10		103,1	104,3
1'		121,7	122,7
2'	8,05 (2H, d, <i>J</i> =7,0Hz);	129,5	132,3
3'	6,93 (2H, d, <i>J</i> =7,5Hz)	115,5	117,2
4'		159,2	158,4
5'	6,93 (2H, d, <i>J</i> =7,5Hz)	115,5	117,2
6'	8,05 (2H, d, <i>J</i> =7,0Hz);	129,5	132,2

3.4. Đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

Đề tài đã phân lập ra được 6 hợp chất, tuy nhiên 2 hợp chất 3 β -friedelanol (**2**), daucosterol (**6**) đã được phân lập rất nhiều từ các cây khác rất phổ biến rồi nên

không cần phải thử hoạt tính thêm trong giới hạn cho phép của đề tài thực hiện thử hoạt tính tác dụng gây độc tế bào ung thư gan HepG2, ung thư tuyến tiền liệt PC3, ung thư phổi A549 của các cặn tổng (PP), *n*-hexan (PPH), etyl axetat (PPE) và cặn nước (PPW); và các hợp chất sạch phân lập được β -sitosterol (1), quercetin (3), kaempferol (4), dipterocarpol (5) thu được kết quả như bảng 3.4.1:

TT	Ký hiệu mẫu	Tế bào HepG2		Tế bào PC3		Tế bào A549	
		Tỷ lệ ức chế tế bào	IC ₅₀	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀
1	PP	86,81 ± 0,9	56,13 µg/mL	76,95 ± 2,5	44,91 µg/mL	78,01 ± 0,4	48,79 µg/mL
2	PPH	91,32 ± 2,4	52,52 µg/mL	81,33 ± 1,8	64,46 µg/mL	92,22 ± 2,1	47,23 µg/mL
3	PPW	65,02 ± 0,9	66,7 µg/mL	77,48 ± 0,6	61,18 µg/mL	55,63 ± 2,7	80,88 µg/mL
4	1	54,49 ± 1,2	94,53 µg/mL	46,64 ± 2,1	>100 µg/mL	22,15 ± 2,4	>100 µg/mL
5	4	42,25 ± 2,4	>100 µg/mL	43,29 ± 2,6	>100 µg/mL	30,11 ± 3,5	>100 µg/mL
6	5	99,16 ± 0,1	14,65 µg/mL	96,34 ± 0,4	23,87 µg/mL	92,45 ± 4,4	56,21 µg/mL
7	6	97,16 ± 0,5	19,54 µg/mL	90,34 ± 0,8	25,43 µg/mL	91,34 ± 1,4	40,32 µg/mL
	Paclitaxel 50nM	54,2 ± 1,8	47,2 nM	64,09 ± 2,4	40,74 nM	59,54 ± 3,6	43,23 nM

Bảng 3.4.1: Tác dụng gây độc chế tế bào của dịch chiết và chất phân lập được

* **nồng độ thử cao nhất: 100 µg/ml với mẫu thô 50 µg/ml với mẫu tinh.**

Đối với cặn chiết tổng và các phân đoạn: Các cặn chiết đều thể hiện hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư ung thư gan HepG2, ung thư tuyến tiền liệt PC3, ung thư phổi A549 với giá trị IC₅₀ vào khoảng 47,23 -80,88 µg/ml. Trong đó, cặn chiết *n*-hexan (PPH) thể hiện hoạt tính tốt nhất trên dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC₅₀ vào khoảng 47,23 µg/ml. Cặn chiết tổng (PP) thể hiện hoạt tính gây độc trên cả 3 dòng tế bào ung thư (với giá trị IC₅₀ từ 44,91 -56,13 µg/ml) tốt hơn cặn nước (PPW) (với giá trị IC₅₀ từ 61,18 - 80,88 µg/ml). Do vậy, các hoạt chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2, tuyến tiền liệt PC3 và phổi A549 chủ yếu ở phân đoạn phân cực trung bình và yếu.

Đối với các hợp chất sạch phân lập được, các hợp chất được thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính ức chế với ba dòng tế bào ung thư gan HepG2, tuyến tiền liệt PC3 và

phôi A549 ở các mức độ khác nhau. Trong đó, hợp chất kaempferol (**4**) thể hiện hoạt tính tốt nhất với cả ba dòng tế bào với tỷ lệ ức chế tế bào HepG2 là $99,16 \pm 0,1\%$ và giá trị IC_{50} là $14,65 \mu\text{g/ml}$; với dòng PC3 thì tỷ lệ ức chế tế bào là $96,34 \pm 0,4\%$ và giá trị IC_{50} là $23,87 \mu\text{g/ml}$; với dòng A549 thì tỷ lệ ức chế là $92,45 \pm 4,4\%$ và giá trị IC_{50} là $56,21 \mu\text{g/ml}$.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu hóa thực vật của cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) ở Nho Quan - Ninh Bình, chúng tôi rút ra được những kết luận chính như sau:

1. Từ dịch chiết cạn chiết *n*-hexan của cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) bằng các phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp tinh chế kết tinh lại trong dung môi thích hợp, 6 hợp chất: β -sitosterol (1), dipterocarpol (5), daucosterol (6), 3β -friedelanol (2), quercetin (3) và kaempferol (4). Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Các phân đoạn còn lại được tiếp tục phân lập và xác định cấu trúc hóa học.

2. Kết quả đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư gan HepG2, tuyến tiền liệt PC3 và phổi A549

✓ Đối với căn tổng và các cạn chiết của cây thuốc vòi (*Pouzolzia pentandra*) thì đề tài thấy rằng cạn chiết *n*-hexan (PPH) thể hiện hoạt tính tốt nhất trên dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC_{50} vào khoảng 47,23 μ g/ml hơn hẳn căn tổng (PP) và cạn nước (PPW).

✓ Đối với các hợp chất sạch phân lập được thì qua quá trình thử hoạt tính sinh học ta thấy rằng hợp chất kaempferol (4) thể hiện hoạt tính tốt nhất với dòng tế bào ung thư gan HepG2 với giá trị IC_{50} là 14,65 μ g/ml.

KIẾN NGHỊ

Sau quá trình nghiên cứu đề tài : “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của *Pouzolzia pentandra* (Roxb.) Benn” thì đề tài xin có một số kiến nghị như sau:

Nếu được phép trong khuôn khổ và có điều kiện đề tài sẽ tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như các hoạt tính sinh học của cây thuốc vôi để giải thích công dụng, ý nghĩa dùng trong Y học cổ truyền dân tộc.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Nguyen Anh Hung, Nguyen Quang Hop, Ha Thi Minh Tam, **Vu Thi Giang**, Do Tien Lam, Nguyen Thi Hue, Vu Thanh Dat, Nguyen Ngoc Linh, Vu Thi Thu Le. “*Evaluation of the anticancer activity of Pouzolzia Pentandra extracts and isolated compounds*”. TNU Journal of Science and Technology, 228(13): 476 – 482 (2023)
DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8782>.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Globocan 2020, The Global Cancer Observatory- March, 2021.
2. Seyed Hossein Hassanpour and Mohammadamin Dehghani, 2017, Review of cancer from perspective of molecular, *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129.
3. Võ Văn Chi, 2011, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà Xuất bản Y học, tập I, 189-192.
4. Đỗ Huy Bích, 2004, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà Xuất bản Khoa Học Kỹ Thuật, tập I, 529-531.
5. Nguyễn Tiến Bản, 2003, *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, tập II, 135.
6. Sayeed Abu, Sattar MA, et al., 2003, A prenylated isoflavone from *Pouzolzia zeylanica*: its *in vitro* antimicrobial activity and cytotoxic evaluation", *Oriental Journal of Chemistry*, 19(1), 35-40.
7. Xian-Mei Chen, Zhi-Hui Li, 2018, Effect of FPZ, a total flavonoids ointment topical application from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla*, on mice skin infections, *Brazilian Journal of Pharmacology*, 28(3), 732- 737.
8. MQ Ahsan, MT Alam, MMU Chowdhury, MT Nasim, and SMS Islam, 2021, *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Pharmacological Activites of *Pouzolzia sanguinea*, *Journal of Bio-Science*, 29(2).
9. Abdul ghafoor, 1981, *Urticaceae*, Flora of Pakistan, 137.
10. Fu Ming, Niu YY, 2012, Study on the chemical constituents in *Pouzolzia zeylanica*, *Zhongyaoca- Journal of Chinese medicinal materials*, 35(11), 1778-1781.
11. Chanyapat Sangsuwon, Weena Jiratchariyakul, Yaowalak U-pratya and Tanawan Kummalue, 2013, Antiproliferative Effect and the Isolated Compounds of *Pouzolzia indica*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
12. Wang LuJun, Xu Zhelong, 2015, Chemical Constituents of *Pouzolzia zeylanica* with PPAR γ and PPAR β Activities, *Chemistry of Natural Compounds*, 51(6), 1157-1159.
13. Sarkar Brazendranath, Raihan SM Abu, 2014, Phytochemical and Biological Activity Studies on *Pouzolzia zeylanica* (Linn.) Benn, *National University Journal of*

Science, 1(1), 51-58.

14. IndraJit Sil Sarma and Biswanath Dinda, 2013, A new friedelane triterpene ester from *Pouzolzia indica*, *Indian Journal of Chemistry*, 52B.

15. Zhuo-Han Chen, Hui Zhang, Shu-Hong Tao, Zhao Luo, Chu-Qian Zhong, 2015, Norlignans from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla* and their nitric oxide inhibitory activity, *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(10), 959-966, 2015.

16. Le Thi Hong Nhung, Phan Thi Quyen, Trinh Thi Thuy, Nguyen Thanh Tam, Nguyen Thi Hoang Anh, Do Thi Thanh Xuan, Nguyen Xuan Nhiem, Bui Huu Tai, and Phan Van Kiem, 2020, New Neolignan and Dihydrostilbene Derivatives from *Pouzolzia sanguinea* Inhibit NO Production in LPS-Activated BV2 Cells, *Natural Product Communications*, 15(8), 1-6.

17. M. Mohammed, A.R. Maxwell, R. Ramsewak, W.F. Reynolds, 2010, Norlignans from *Pouzolzia occidentalis*, *Phytochemistry Letters*, 3(1), 29-32.

18. Le Thi Hong Nhung, Pham Thi Mai Huong, Nguyen Tuan Anh, Bui Huu Tai, Nguyen Xuan Nhiem, Vu Van Doan, Nguyen Huy Hoang, Yohan Seo, Seung Hyun Kim, Phan Van Kiem 2020, Two new norlignans from the aerial parts of *Pouzolzia sanguinea* (Blume) Merr, *Nat Prod Res*, 5, 1-8.

19. Lê Thanh Thủy, 2007, Khảo sát thành phần hóa học của cây bộ mắt (*Pouzolzia zeylanica*), Báo cáo luận văn thạc sĩ hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên HCM.

20. Saha D, 2012, Antibacterial activity of ethanol extract of *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn, *International Journal of Pharmaceutical Innovations*, 2(1),1-5.

21. Saha D, 2012, Antifungal Activity of ethanol extract of *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn, *International Journal of Pharmaceutical Teaching & Practices*, 3(1), 272.

22. S. Klinthong, R. Khammanit, S. Phornchirasilp, R. Tamsiririrkkul and N. Siritwatanametanon, 2015, *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of a Thai traditional formula, Rid-si-duang-ma-ha-kan, for hemorrhoid treatment, *Mahidol Univ J Pharm Sci*, 42(3), 144-152.

23. Liu Xu-yang, Du Qing-tao, Li Kai-ying, Deng Qi, Guo Li-bing, 2012, Anti-inflammatory and analgesic effects of different extract fractions from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla*, *Drugs & Clinic*, 4, 356-359.

24. Birgani GA, Ahangarpour A, Khorsandi L, Moghaddam HF, 2018, Anti-diabetic effect of betulinic acid on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic male mouse model, *Braz J Pharm Sci*, 54(2), 428-440.

25. Li Peiyuan, Huo Lini, 2011, Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolzia zeylanica*, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(5), 709-717.

26. Debasish Maiti, Ashish Kumar Singha, Chaitali Sarkar, Soham Sarkar, IndraJit Sil Sarma, Kuntal Manna & Biswanath Dinda, 2018, Friedelane, isolated from *Pouzolzia indica* Gaud. exhibits toxic effect against melanoma, *Cytotechnology*, 70, 1111-1120.

33. Vitus A. Nyigo, Xolani Peter, Faith Mabiki, Hamisi M. Malebo, Robinson H. Mdegela, Gerda Fouche. *Isolation and identification of euphol and β -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens**. *The Journal of Phytopharmacology* 5(3): 100-104 (2016).

34. Nguyễn Thị Hường, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Tân Thành, Ngô Xuân Lương, Lê Thị Mỹ Châu, Phan Thị Hoa Nam. *Các hợp chất Flavonoid và Steroid từ củ cây cát sâm (*Millettia speciosa*)*. *Tạp chí khoa học* 50(3A): 16-22 (2001).

35. I. E. Smirnovaa, H. Do Thi Thub, O. B. Kazakovaa, G. A. Tolstikova, O. S. Kukovinetsa, A. N. Lobova, and K. Yu. Saponitskii *Ozonolysis of Dipterocarpol and Its Derivatives*. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 48(10), 1370–1376 (2012).

36. Pham Van Huyen, Nguyen Thi Thu Hien, Nguyen Huu Huong Duyen, Nguyen Thi Dieu Thuan, Nguyen Huu Toan Phan. *Chemical constituents from the leaves of *Alchornea Rugosa* (Lour.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae)*. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 60(6), 343-349 (2022).

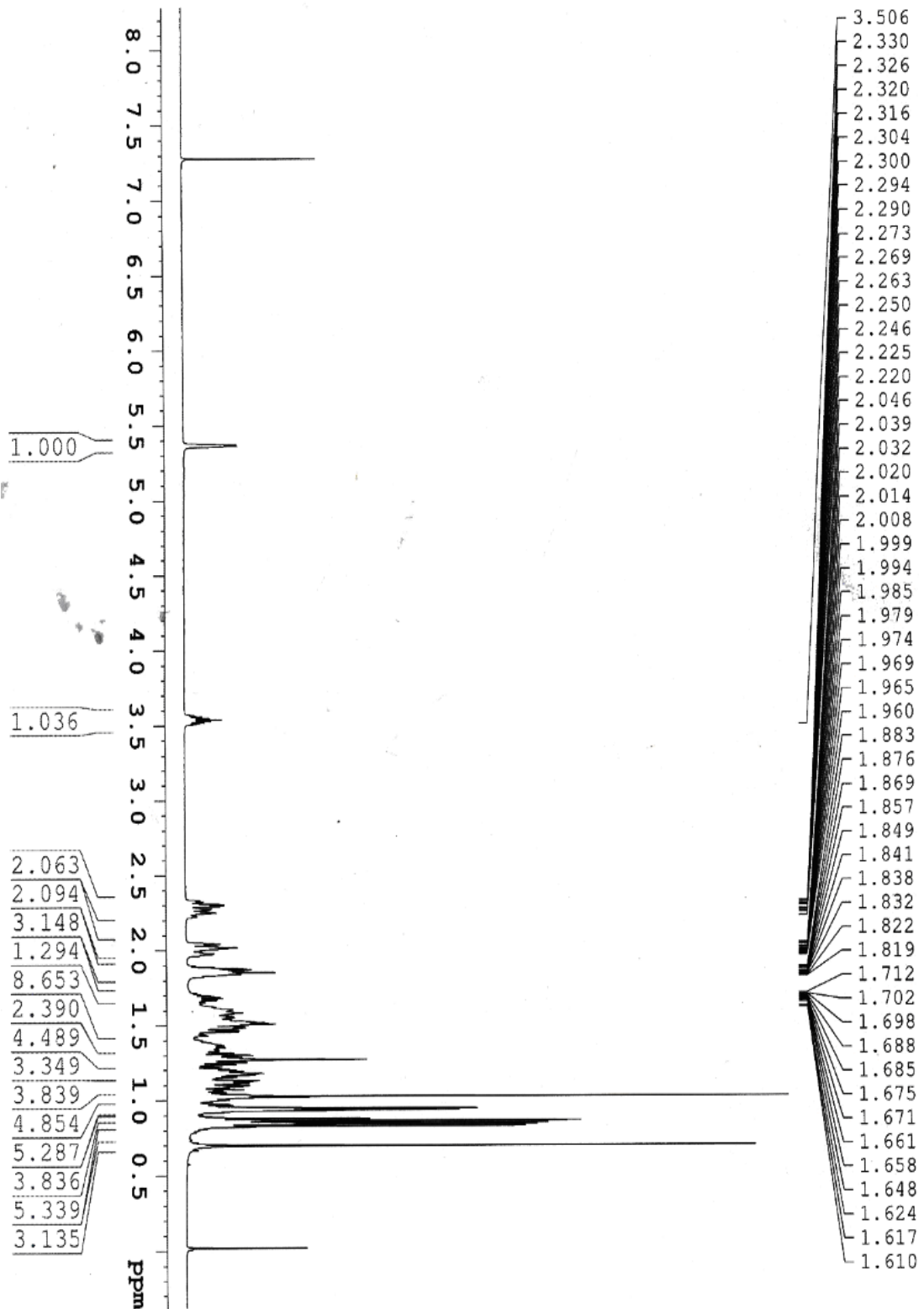
37. Nguyễn Đức Duy, Nguyễn Thị Kim Thúy, Mai Thị Như Trang, Ninh Khắc Bẩy, Quách Thị Thanh Vân, Quán Cẩm Thúy. *Một số hợp chất flavonol từ cây Giao (*Euphorbia tirucalli* L.) ở tỉnh Phú Thọ*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 22 (1), 86-91 (2021).

38. Trịnh Thị Thủy, Đào Đức Thiện, Nguyễn Thanh Tâm, Lại Thị Kim Dung, Trần Văn Sung, Domenico V. Delfino. *Kaempferol, Quercetin và dẫn xuất diglycosid của*

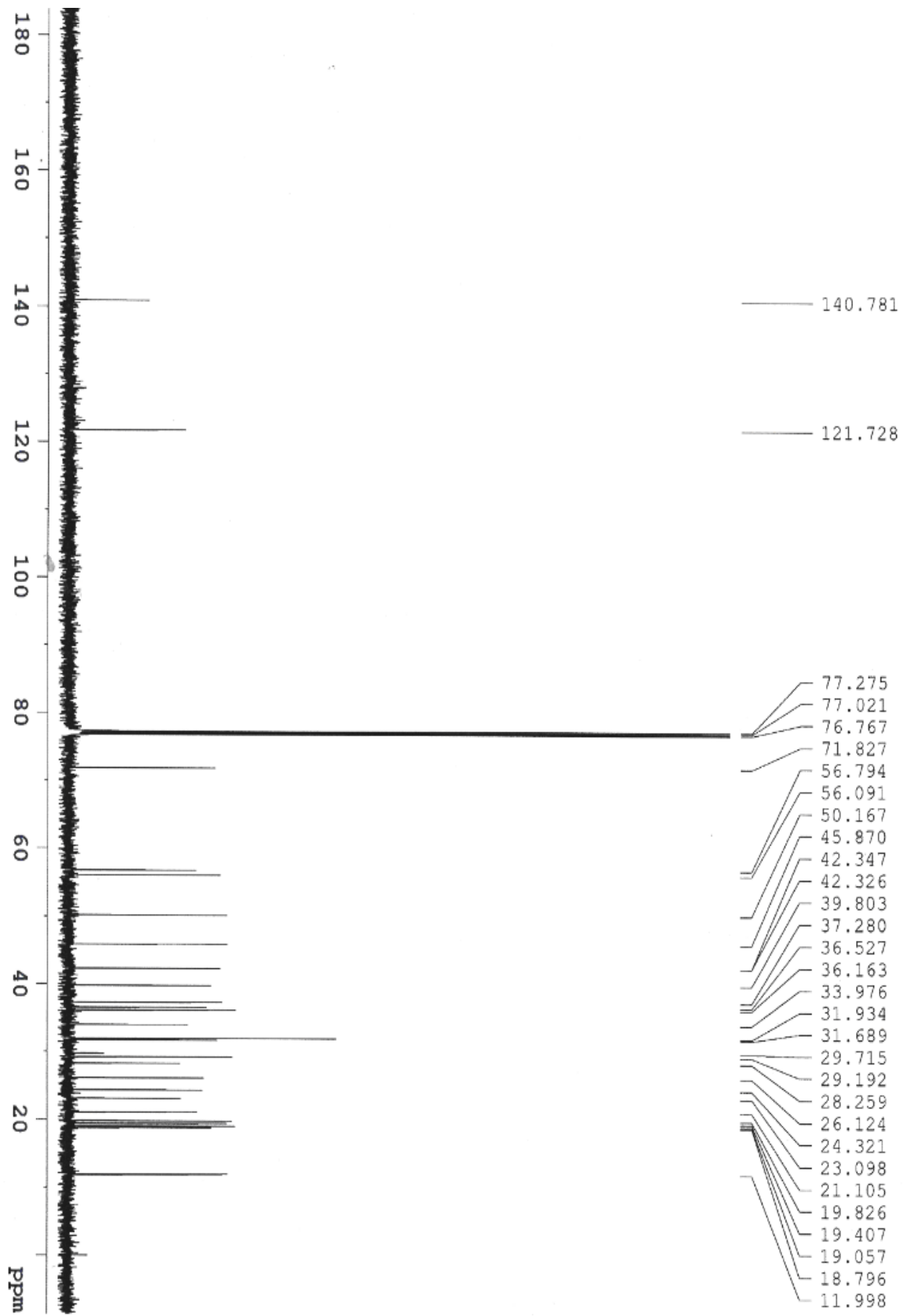
chúng tách từ lá chay Bắc Bộ (*Artocarpus tonkinensis*). Tạp chí hóa học, 56(6), 772-776 (2015).

PHỤ LỤC

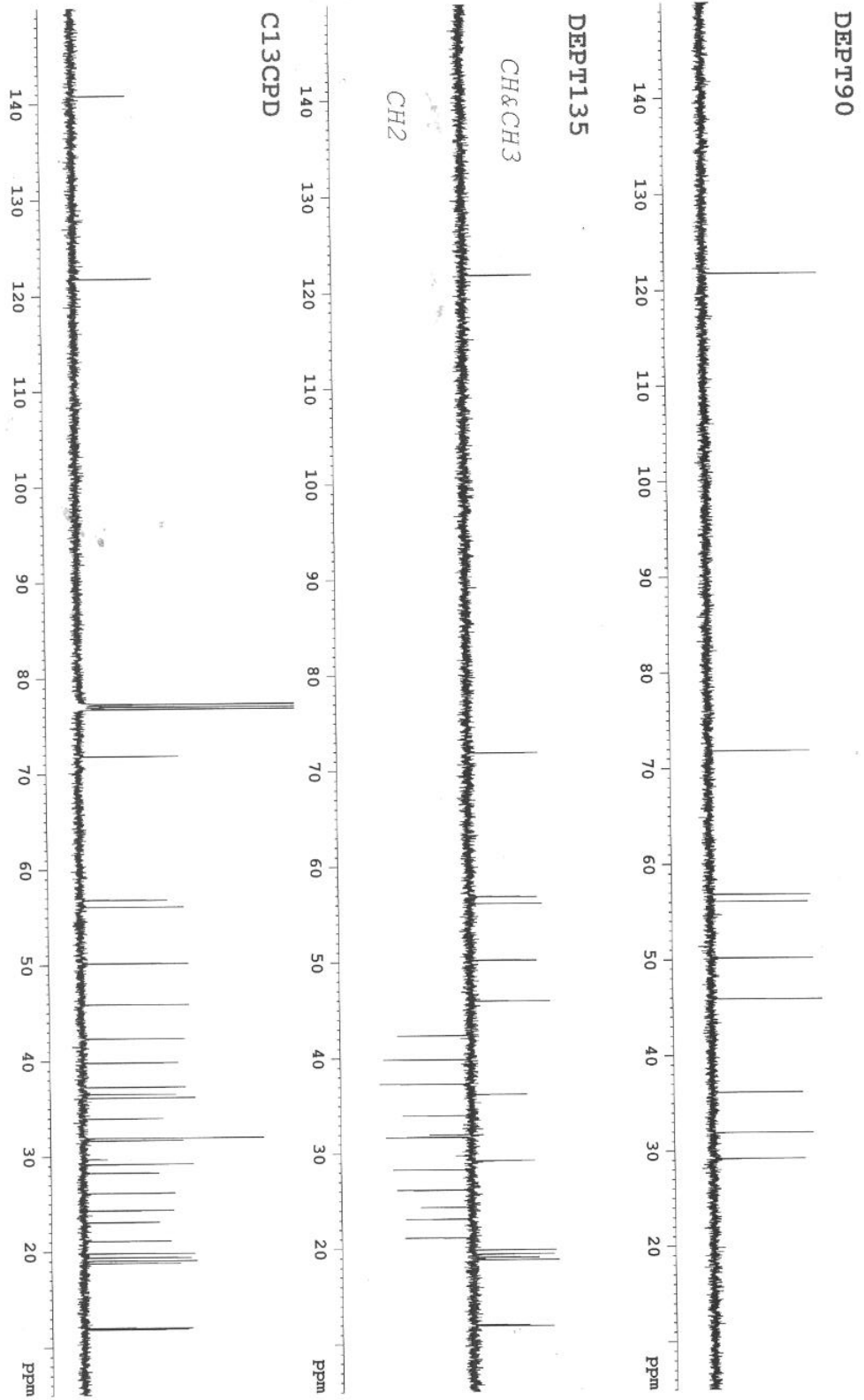
PHỤ LỤC 1. Hợp chất β -sitosterol hay stigmast-5-en-24R-3 β -ol (1)



Hình 1.1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 1

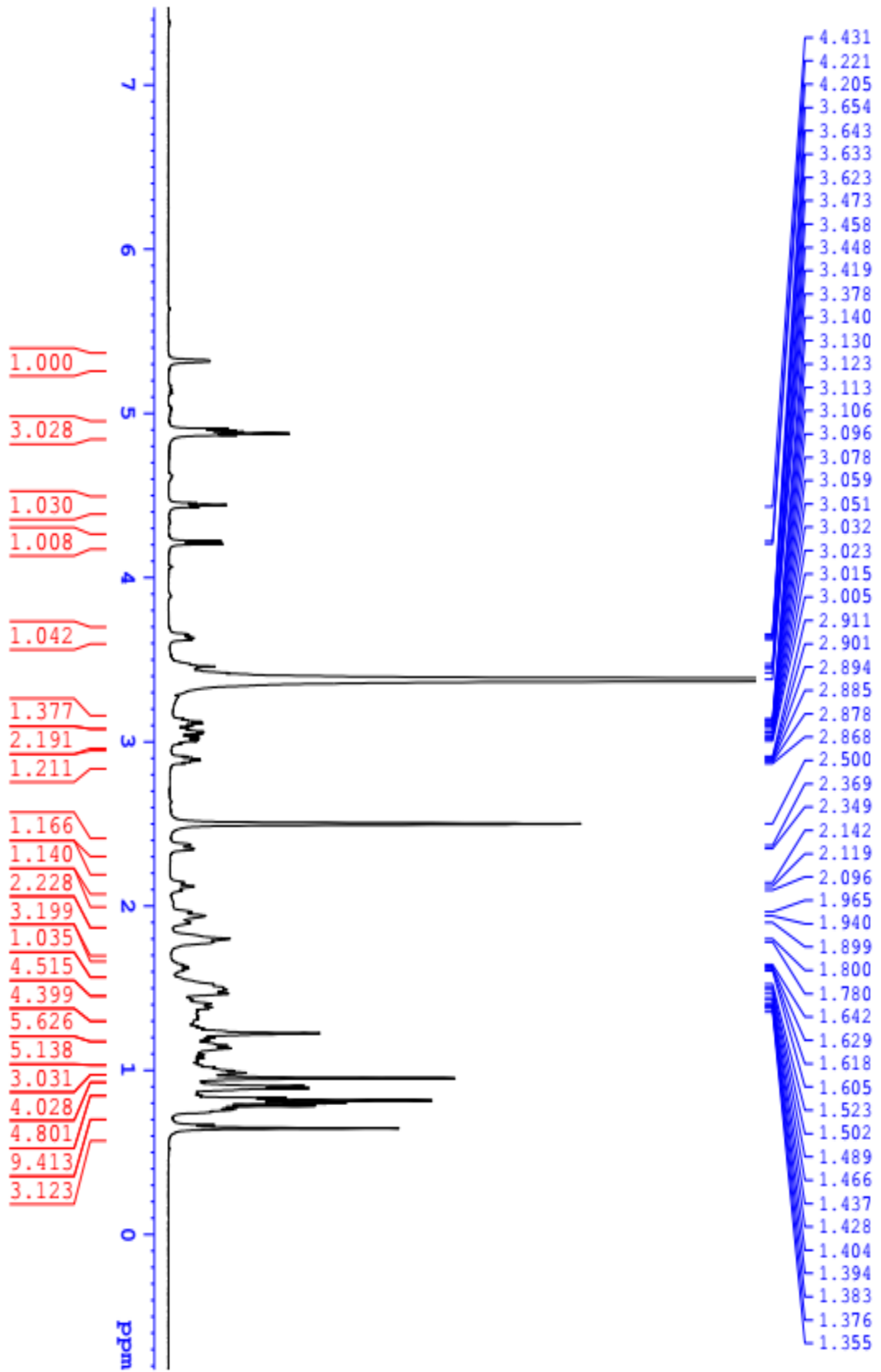


Hình 1.2: Phổ ^{13}C -NMR của **1**

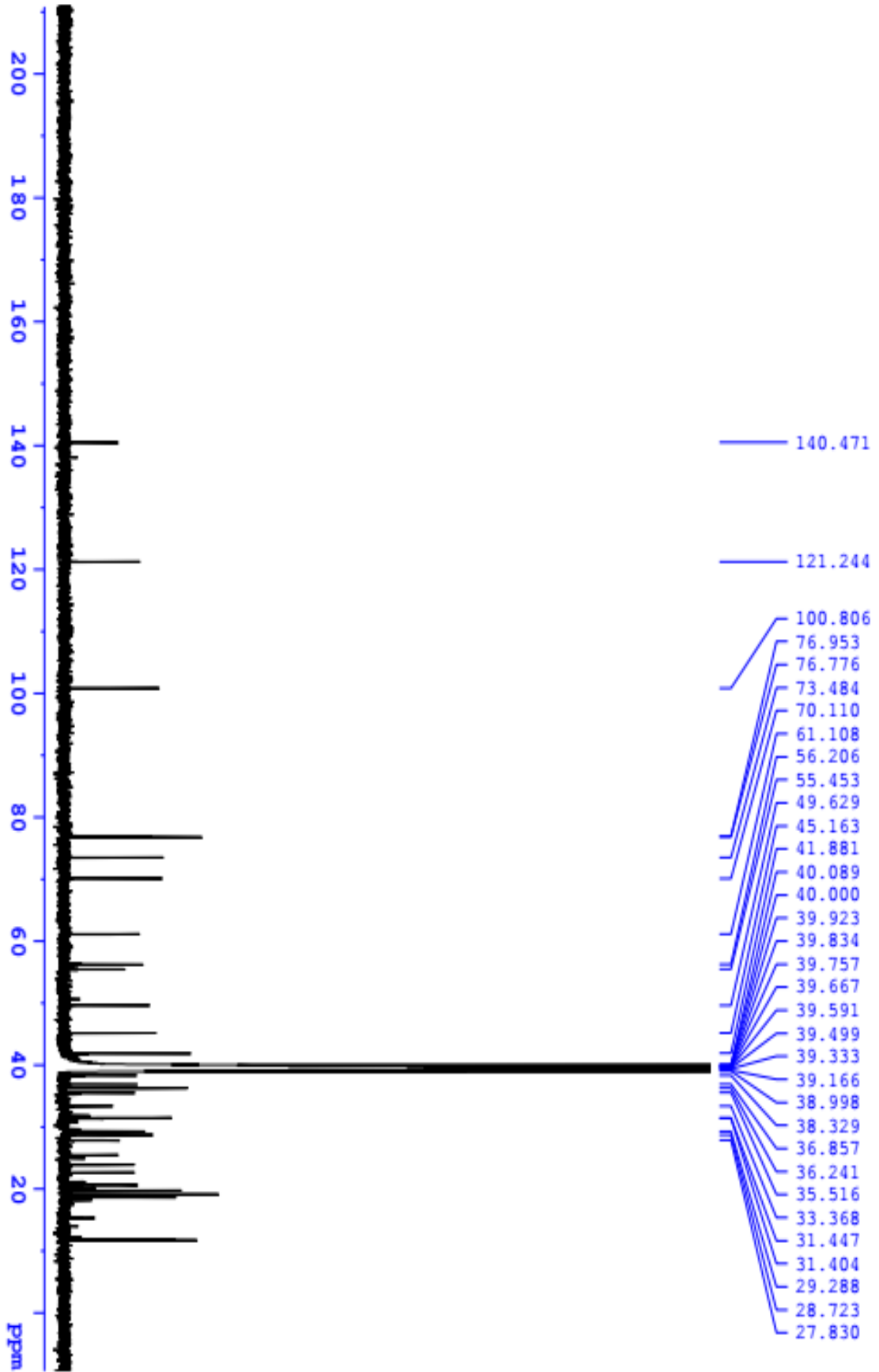


Hình 1.3: Phổ DEPT-NMR của 1

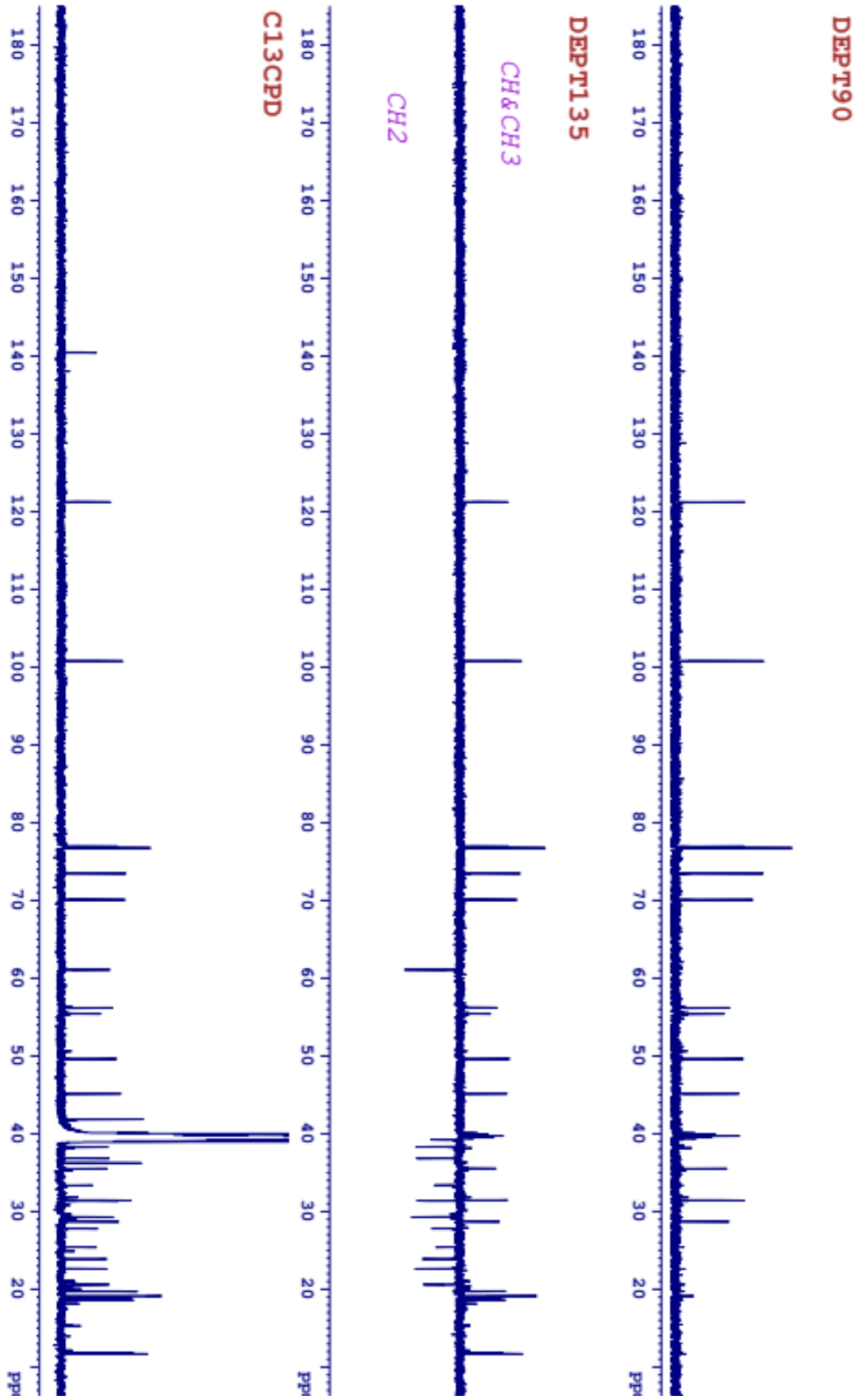
PHỤ LỤC 2. Hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (6)



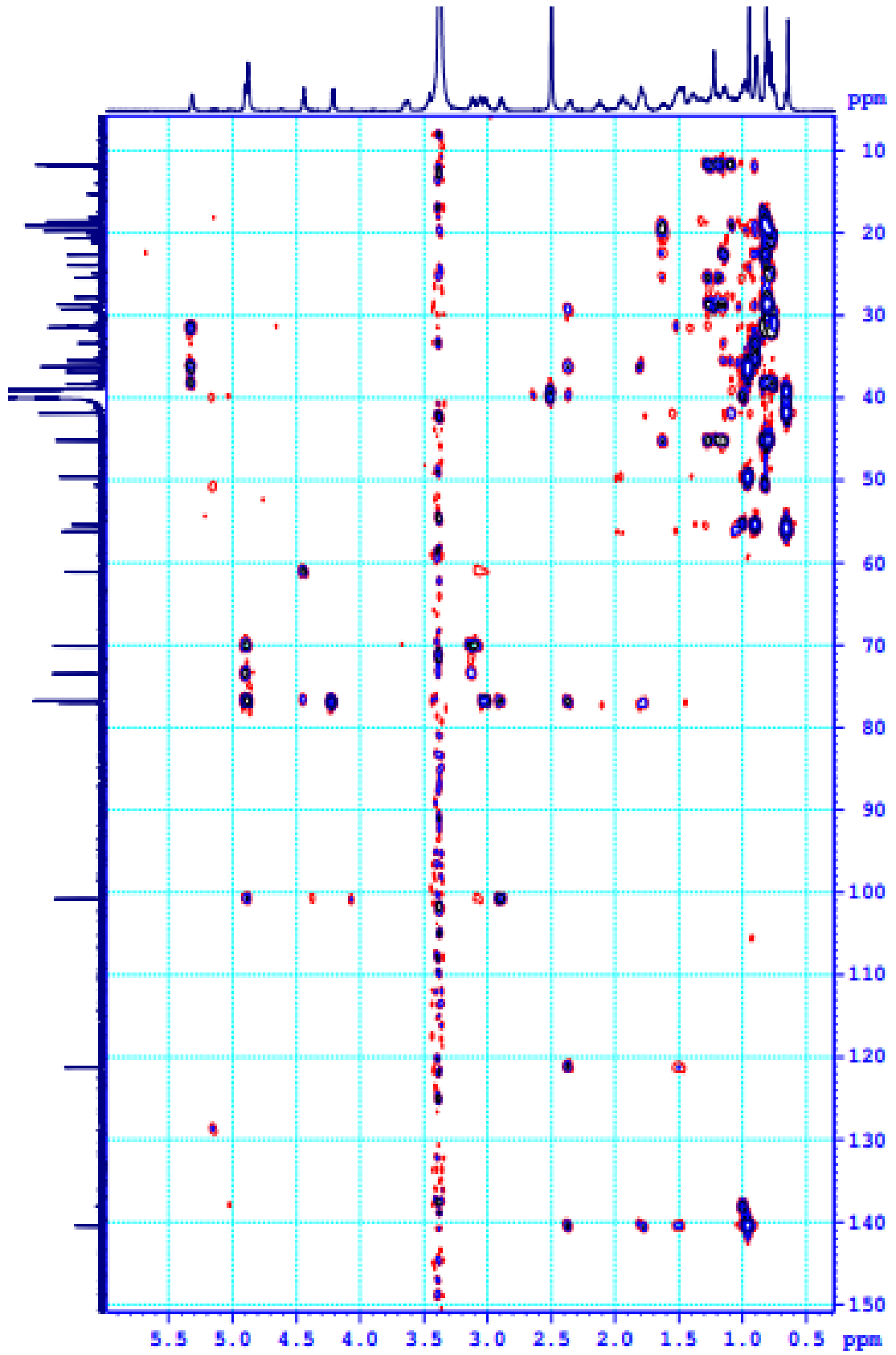
Hình 2.1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 6



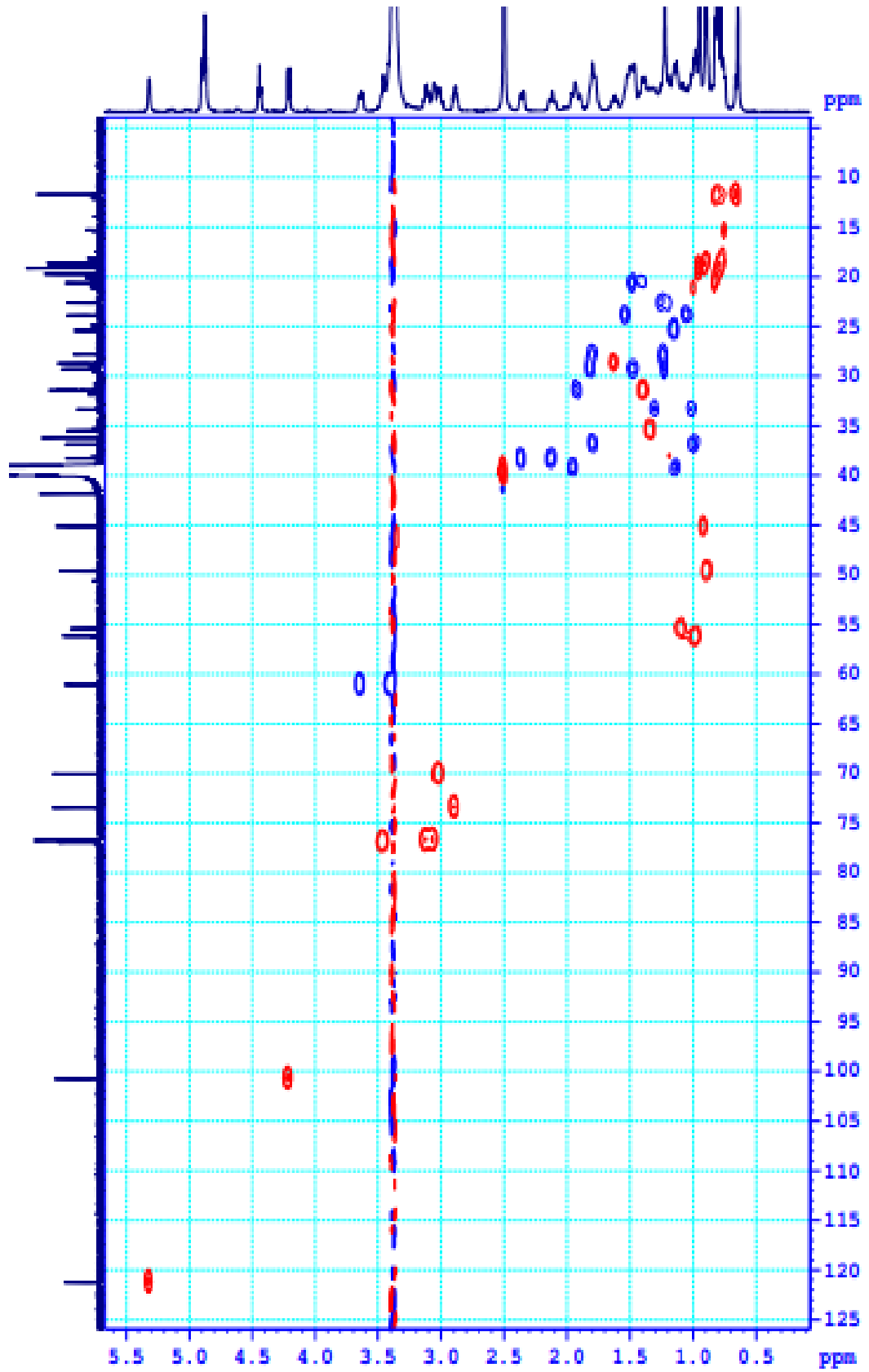
Hình 2.2: Phổ ^{13}C -NMR của 6



Hình 2.3: Phổ DEPT của 6

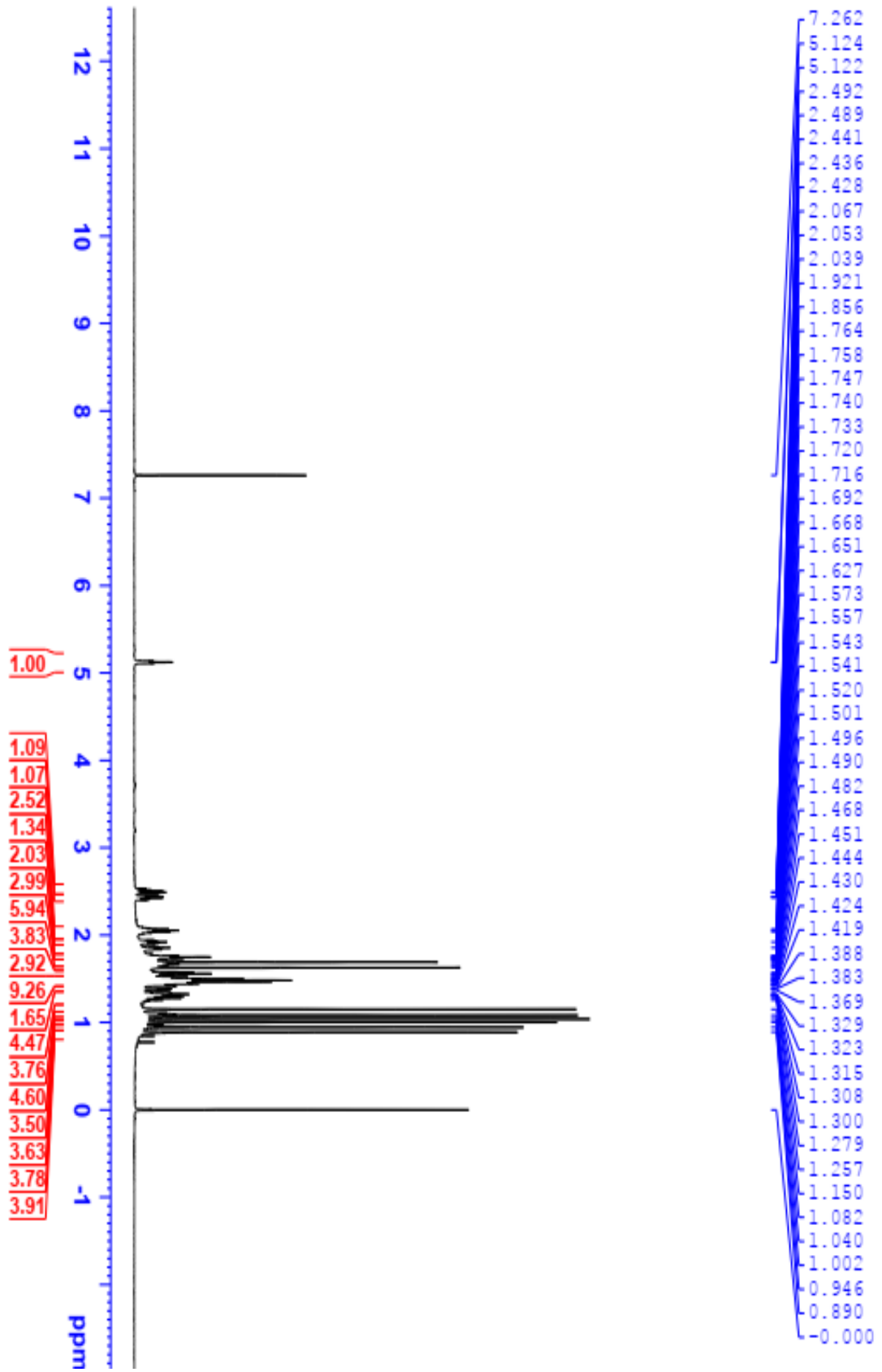


Hình 2.4: Phổ HMBC của 6

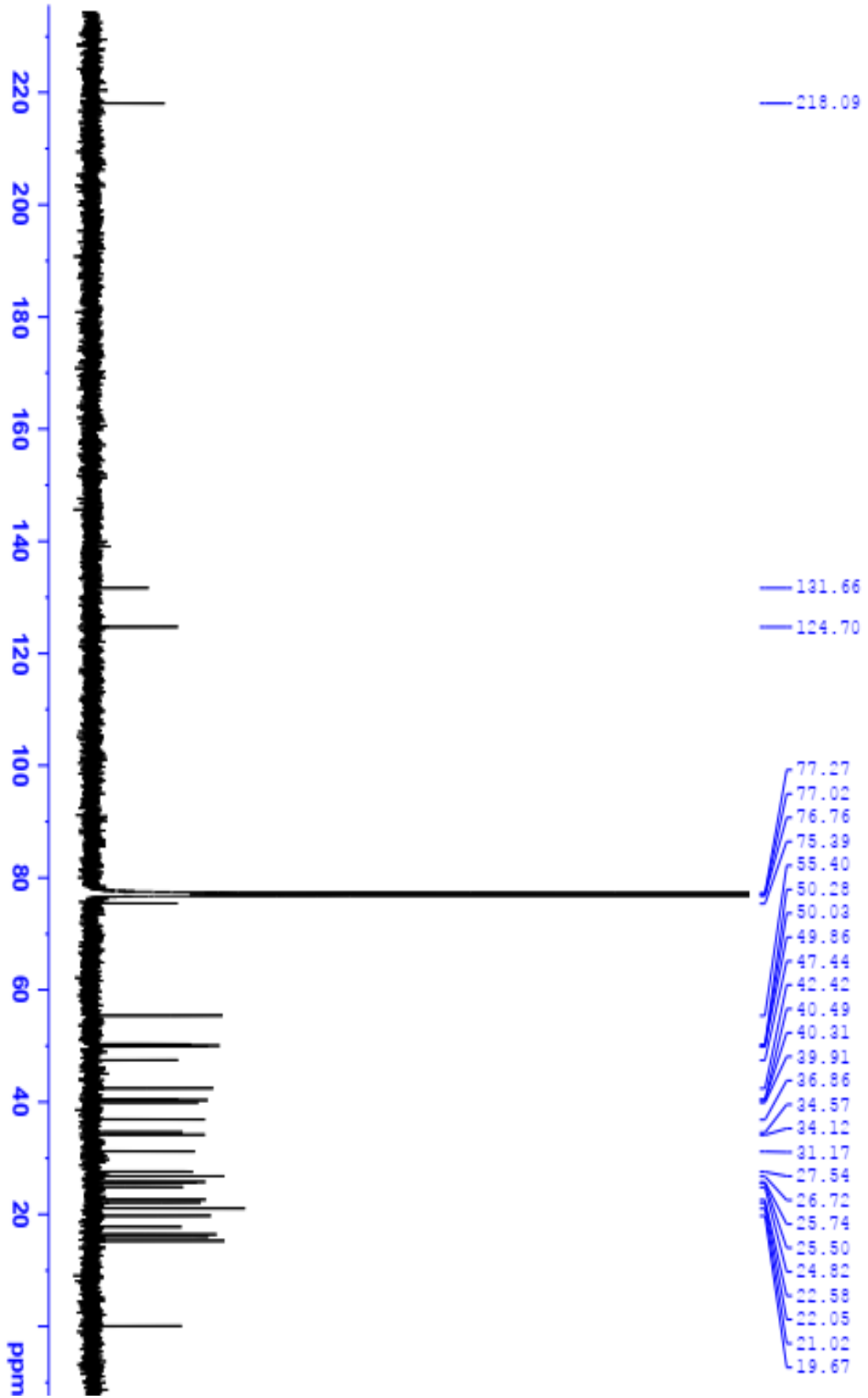


Hình 2.5: Phổ HSQC của 6

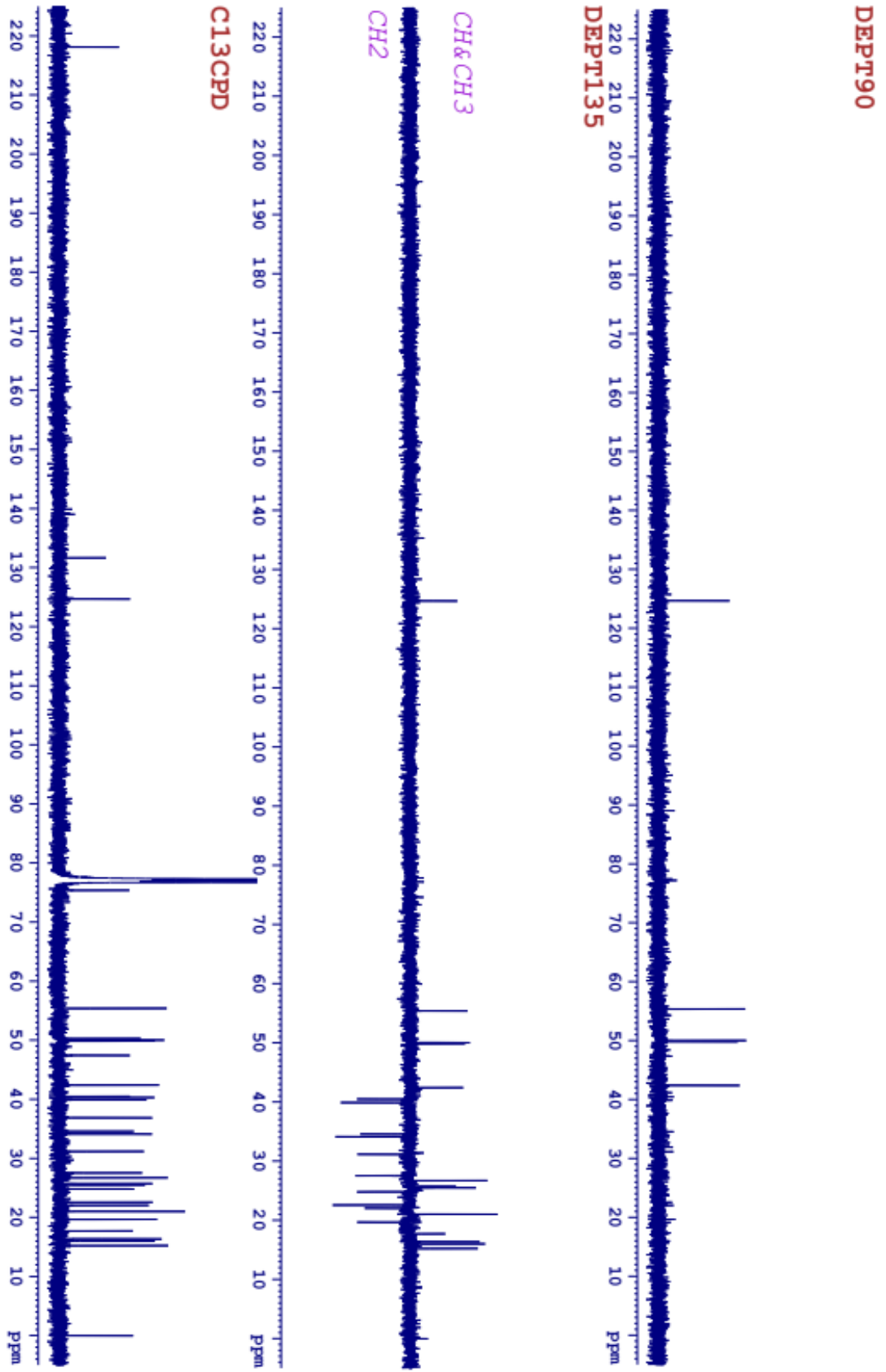
PHỤ LỤC 3. Hợp chất (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one (5)



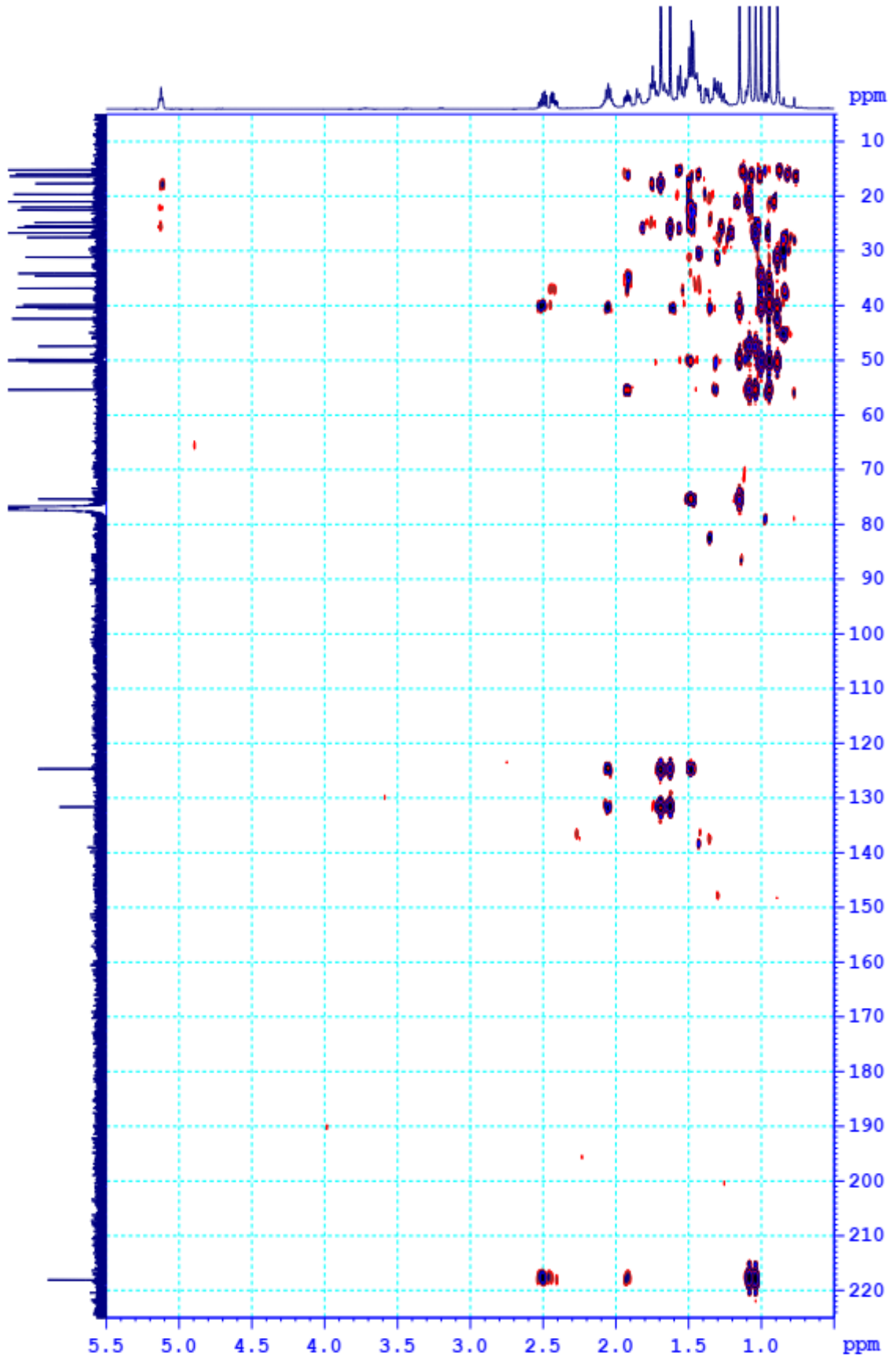
Hình 3.1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 5



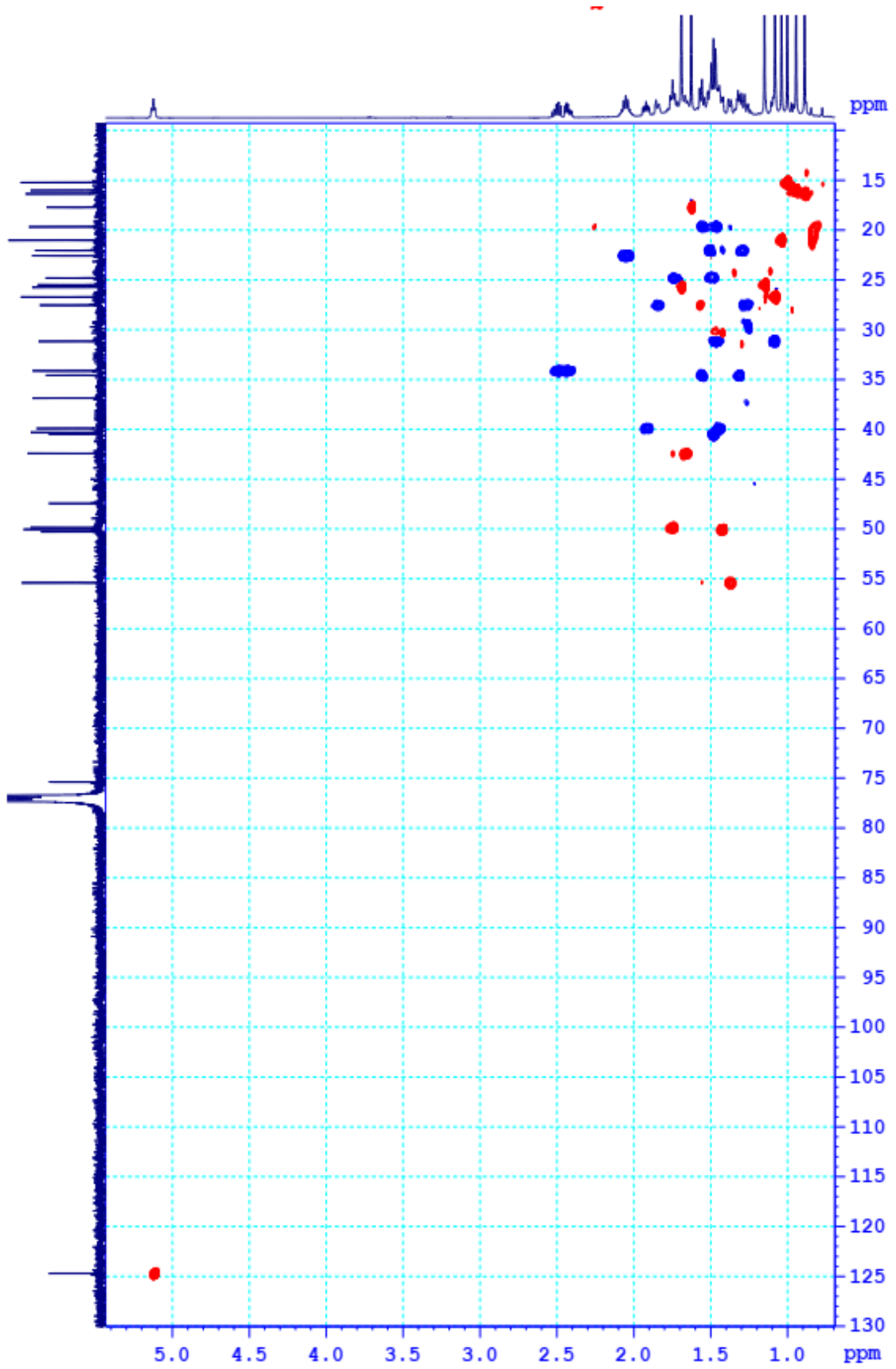
Hình 3.2: Phổ ^{13}C -NMR của 5



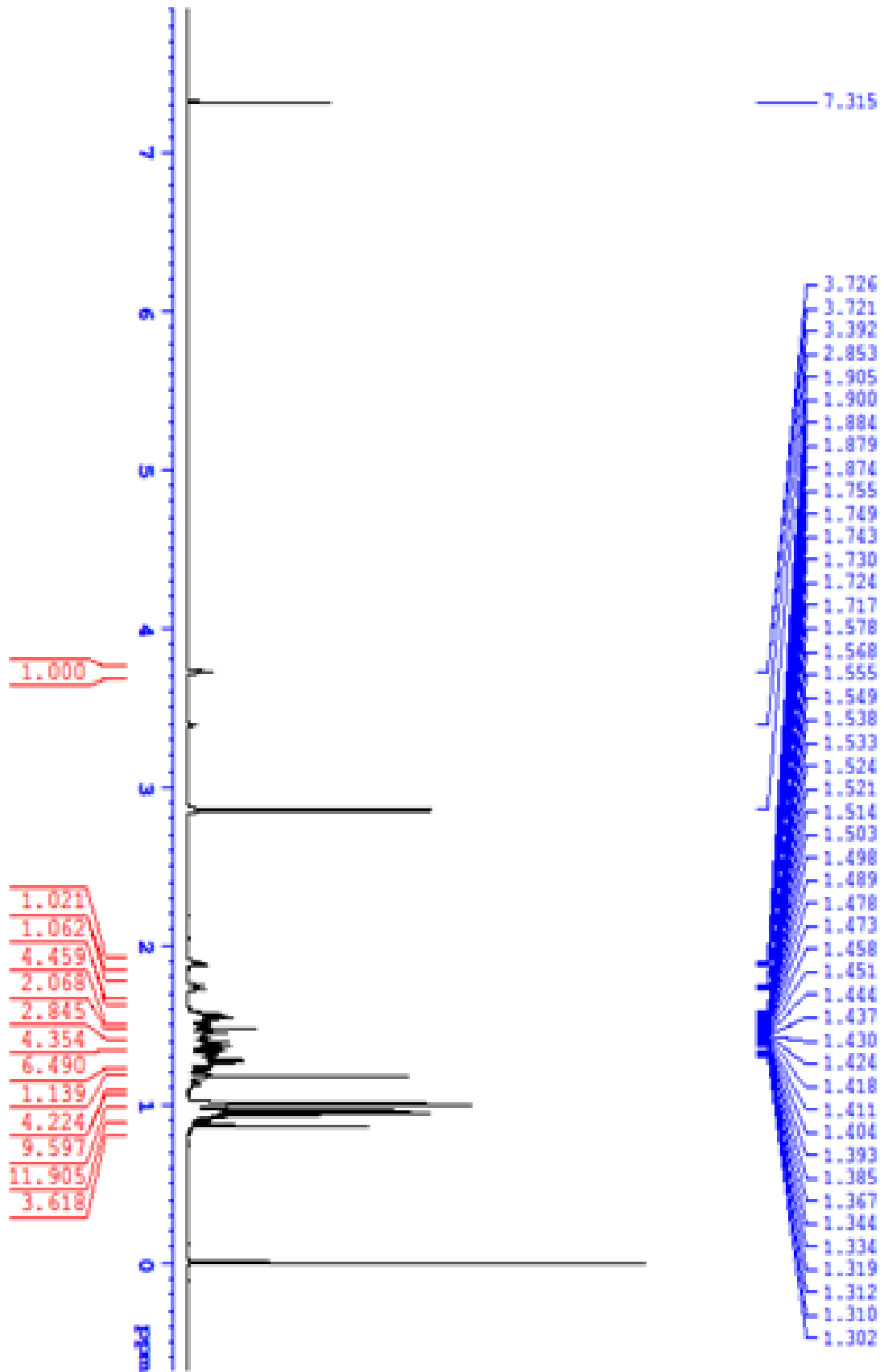
Hình 3.3: Phổ DEPT của 5

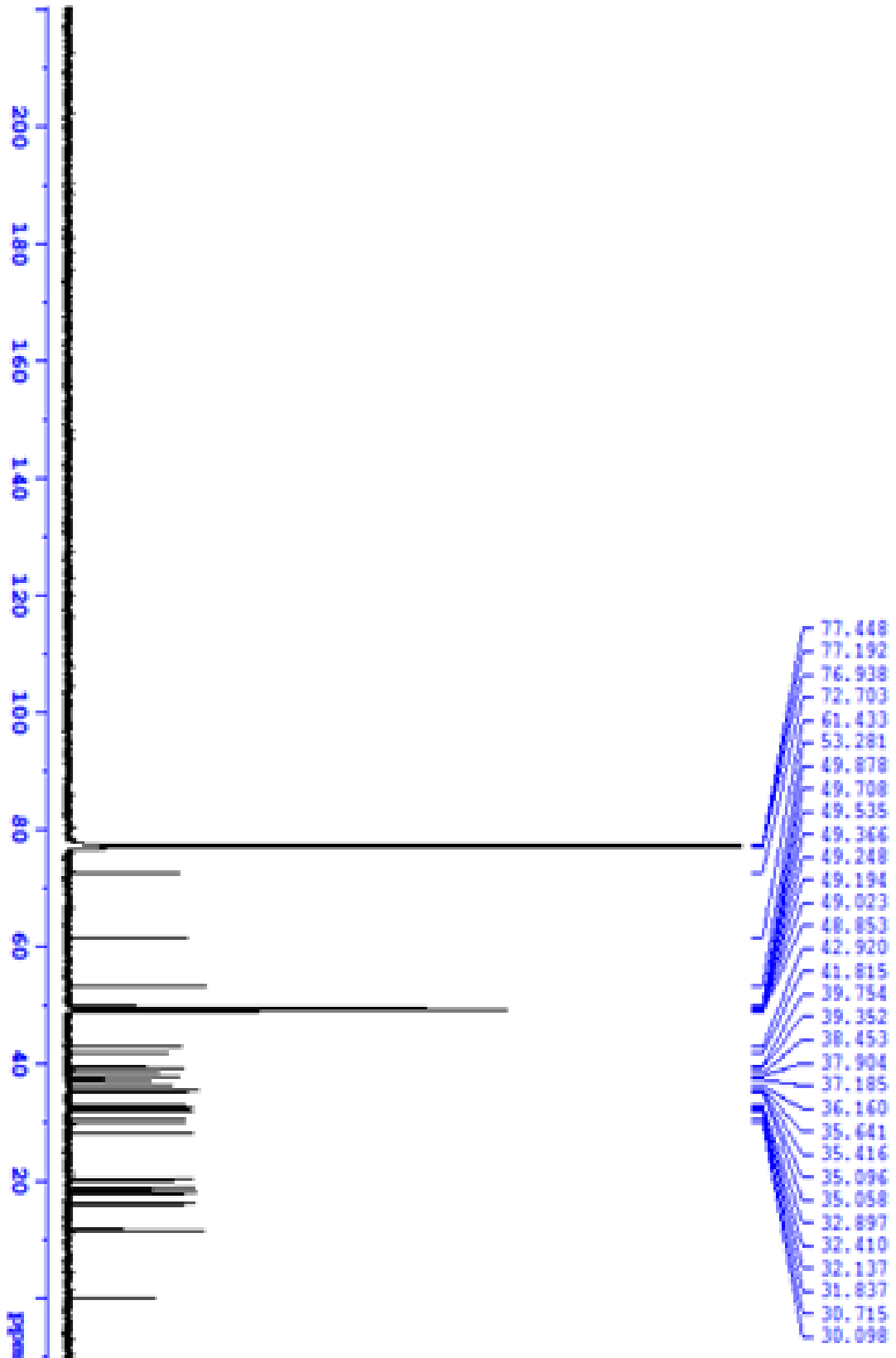


Hình 3.4: Phổ HMBC của 5

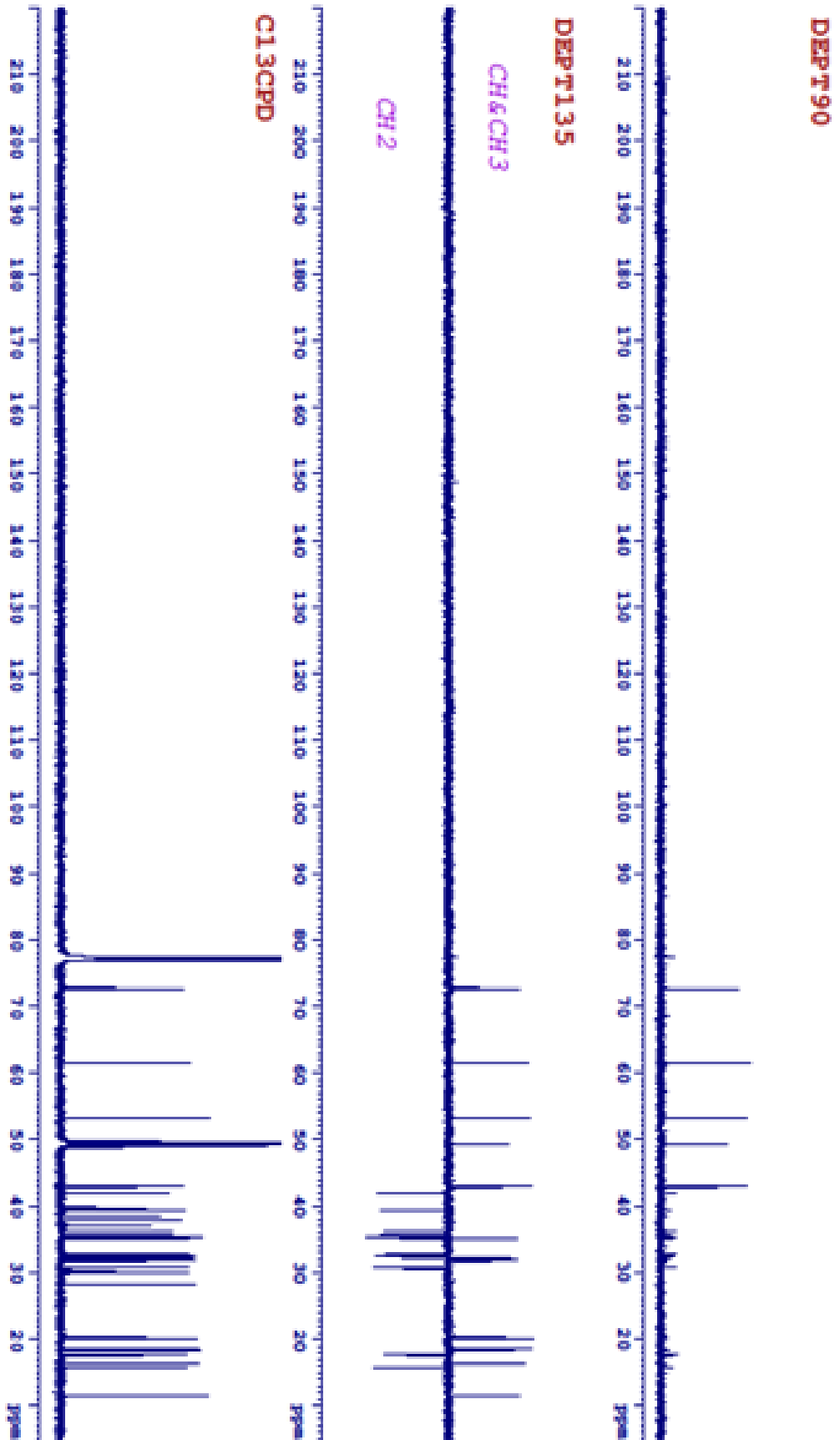


Hình 3.5: Phổ HSQC của 5

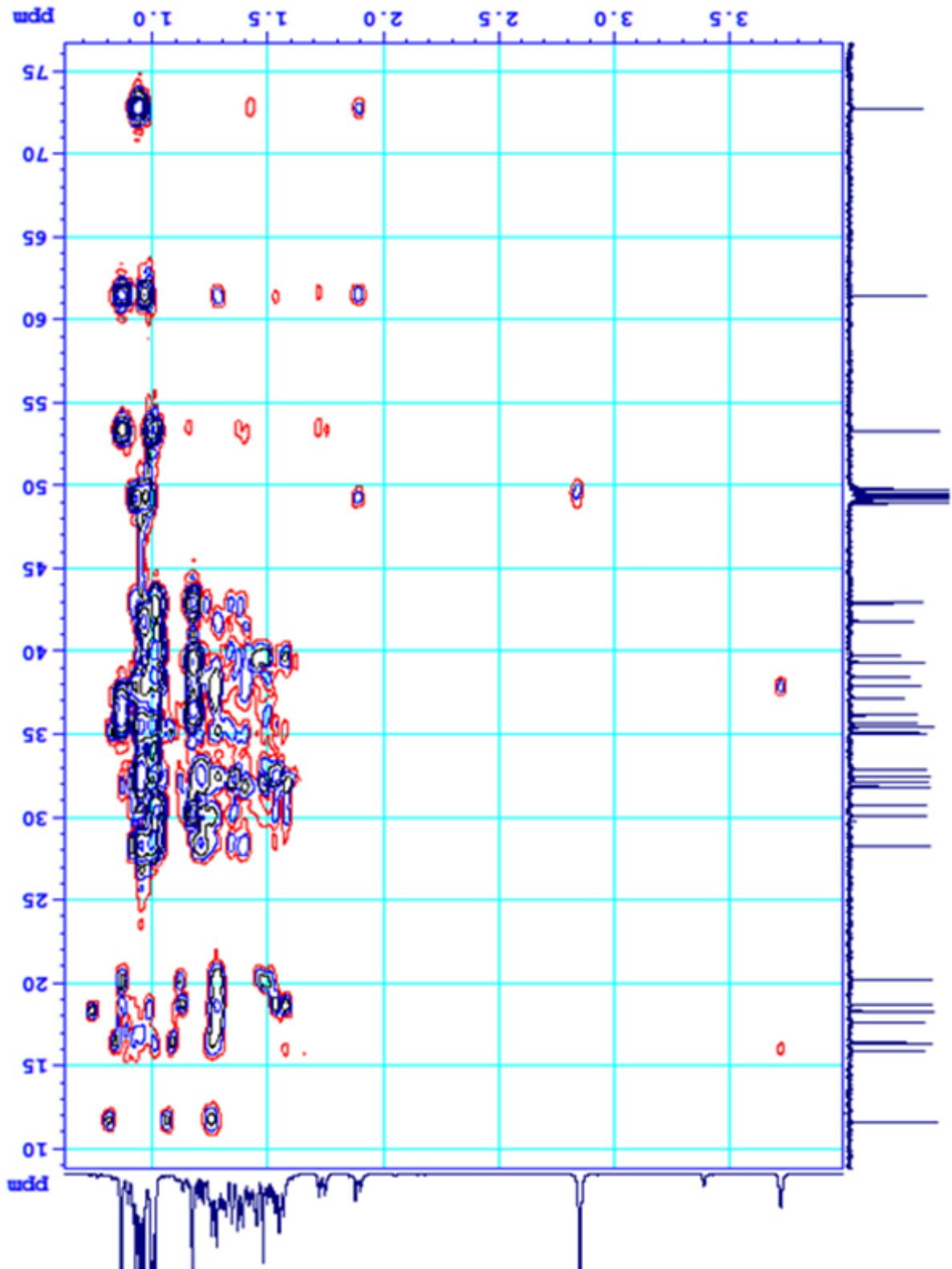
PHỤ LỤC 4. Hợp chất 3 β -friedelanol (2)Hình 4.1: Phổ ^1H -NMR của 2



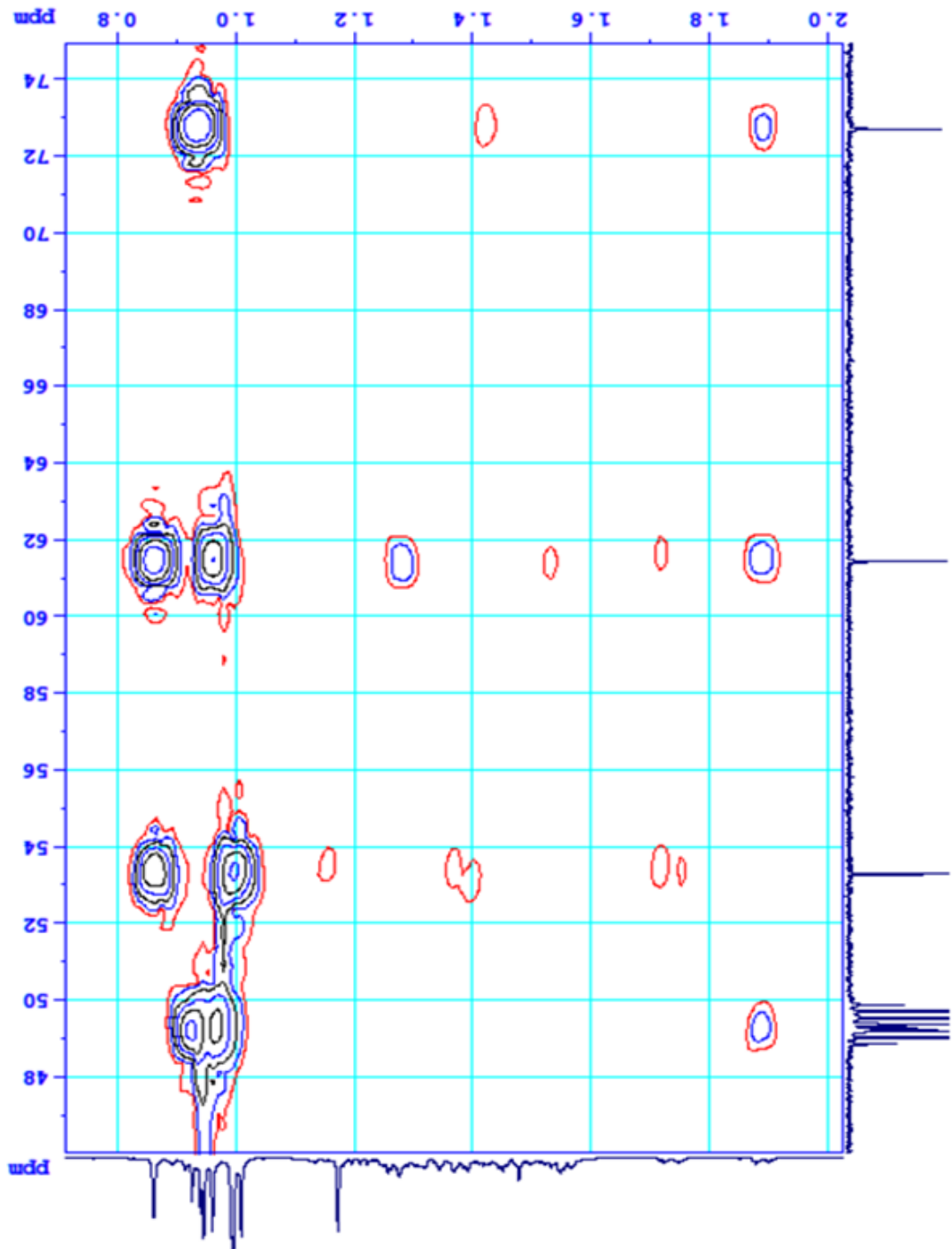
Hình 4.2: Phổ ^{13}C - NMR của 2



Hình 4.3: Phổ DEPT của 2

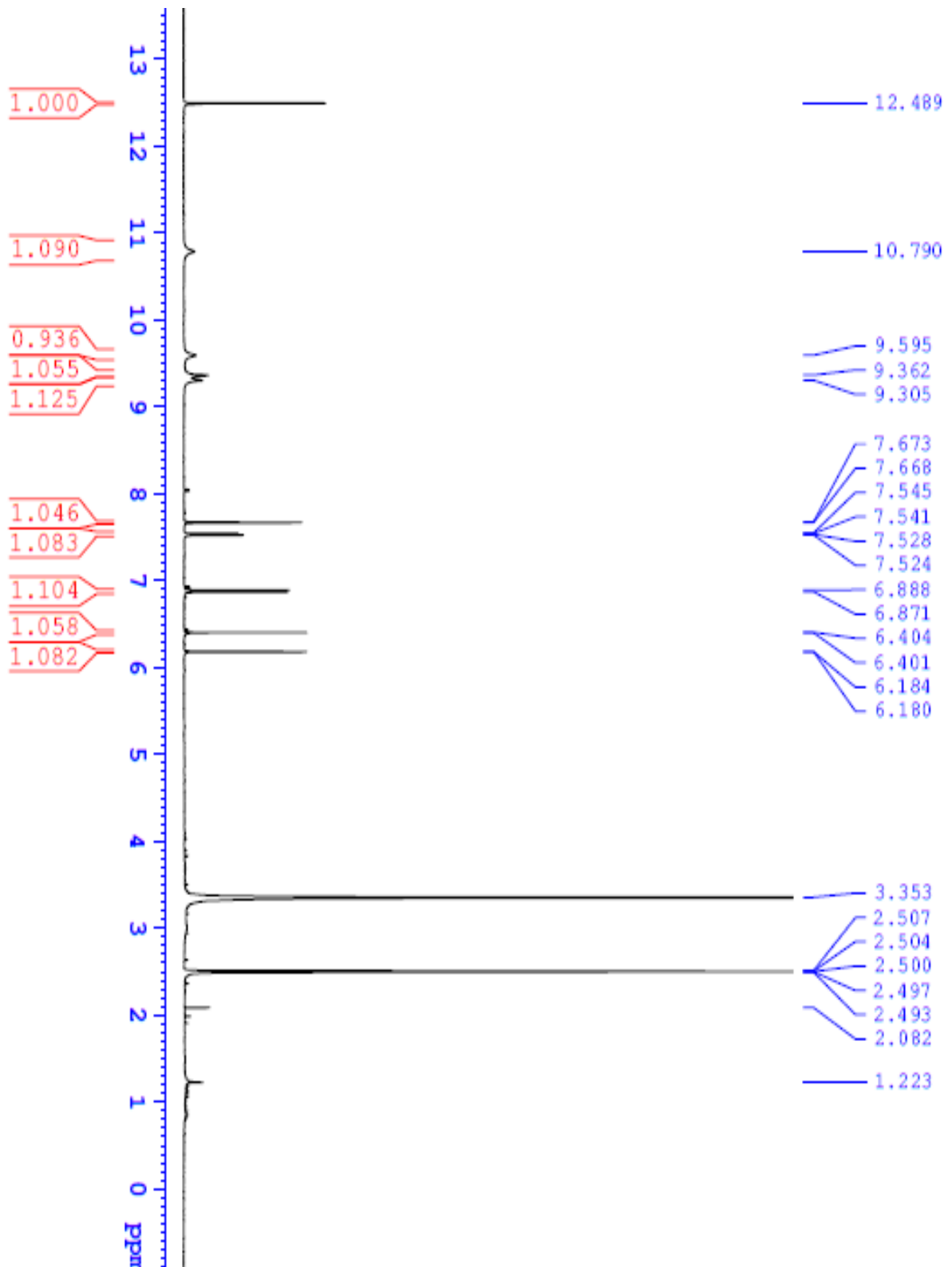


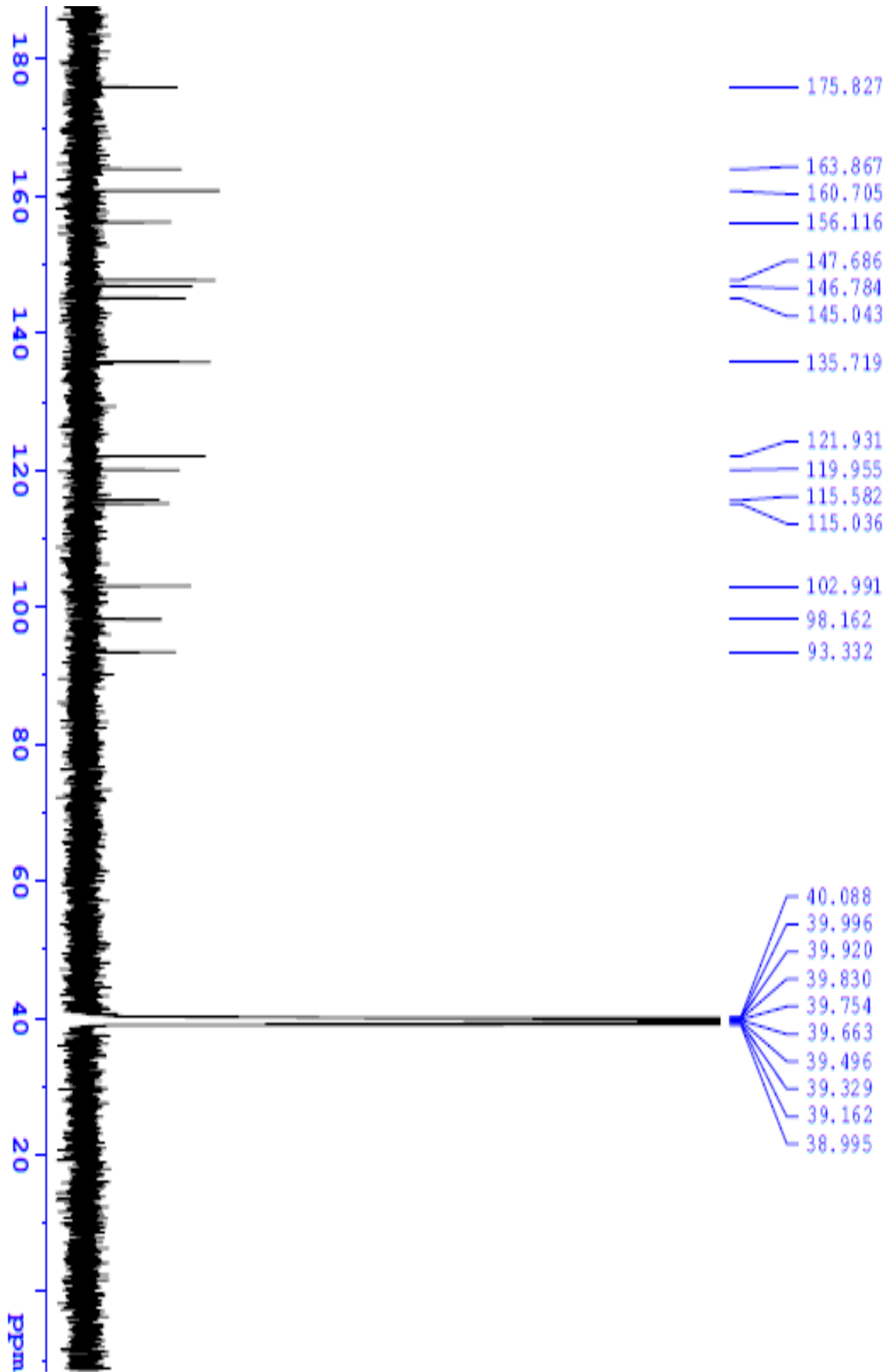
Hình 4.4: Phổ HSQC của 2



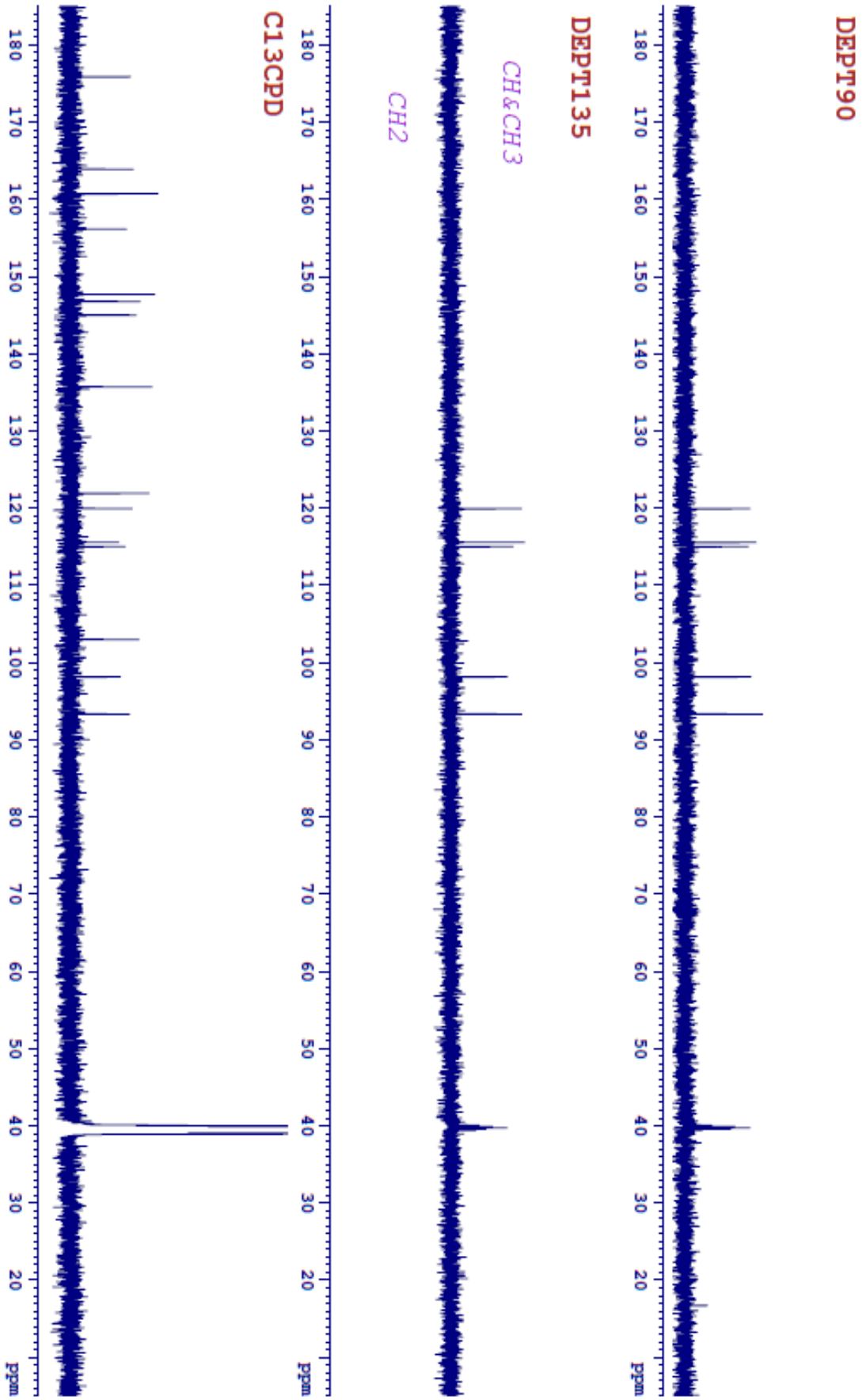
Hình 4.5: Phổ HMBC của 2

PHỤ LỤC 5. Hợp chất quercetin (3)

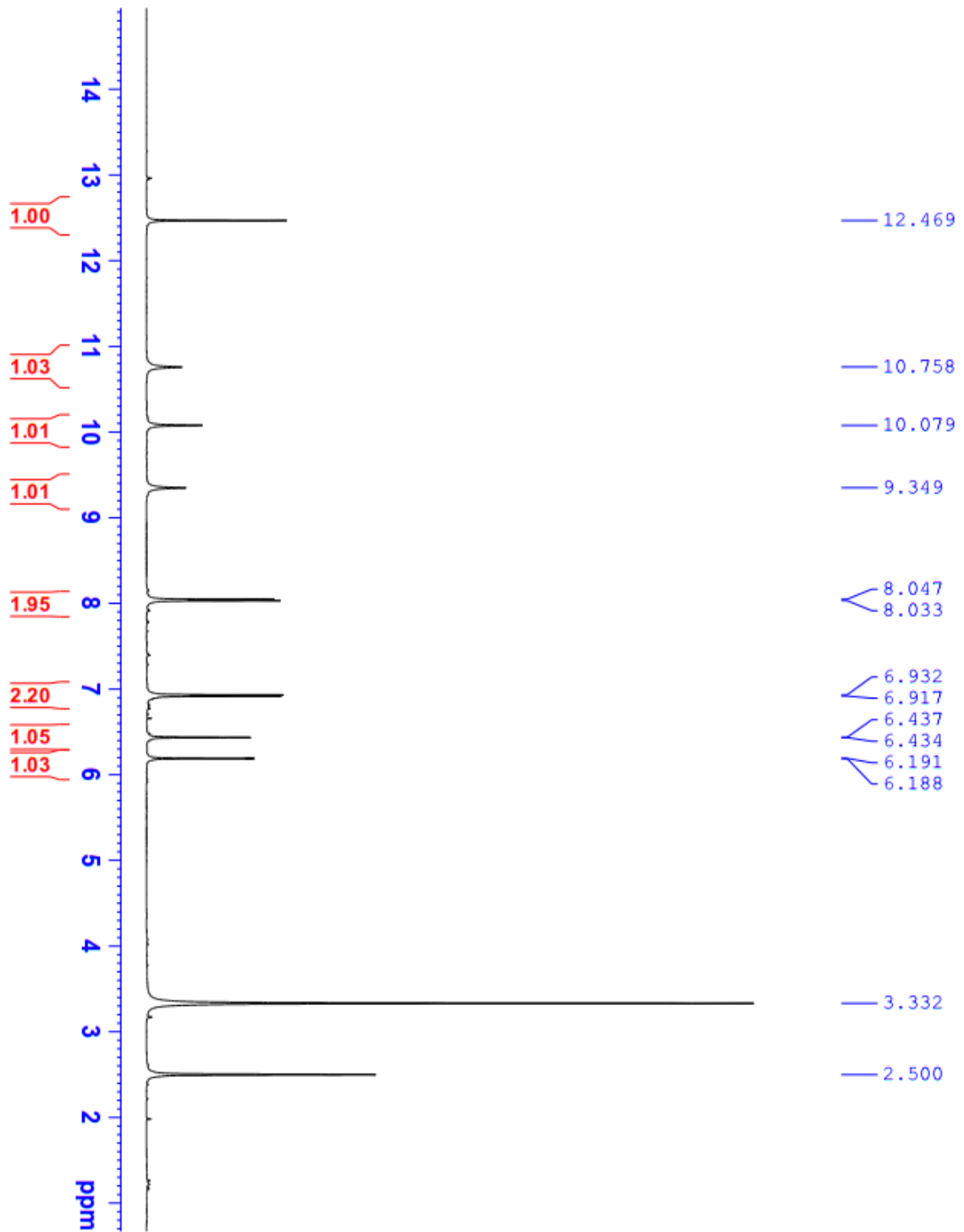
Hình 5.1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 3



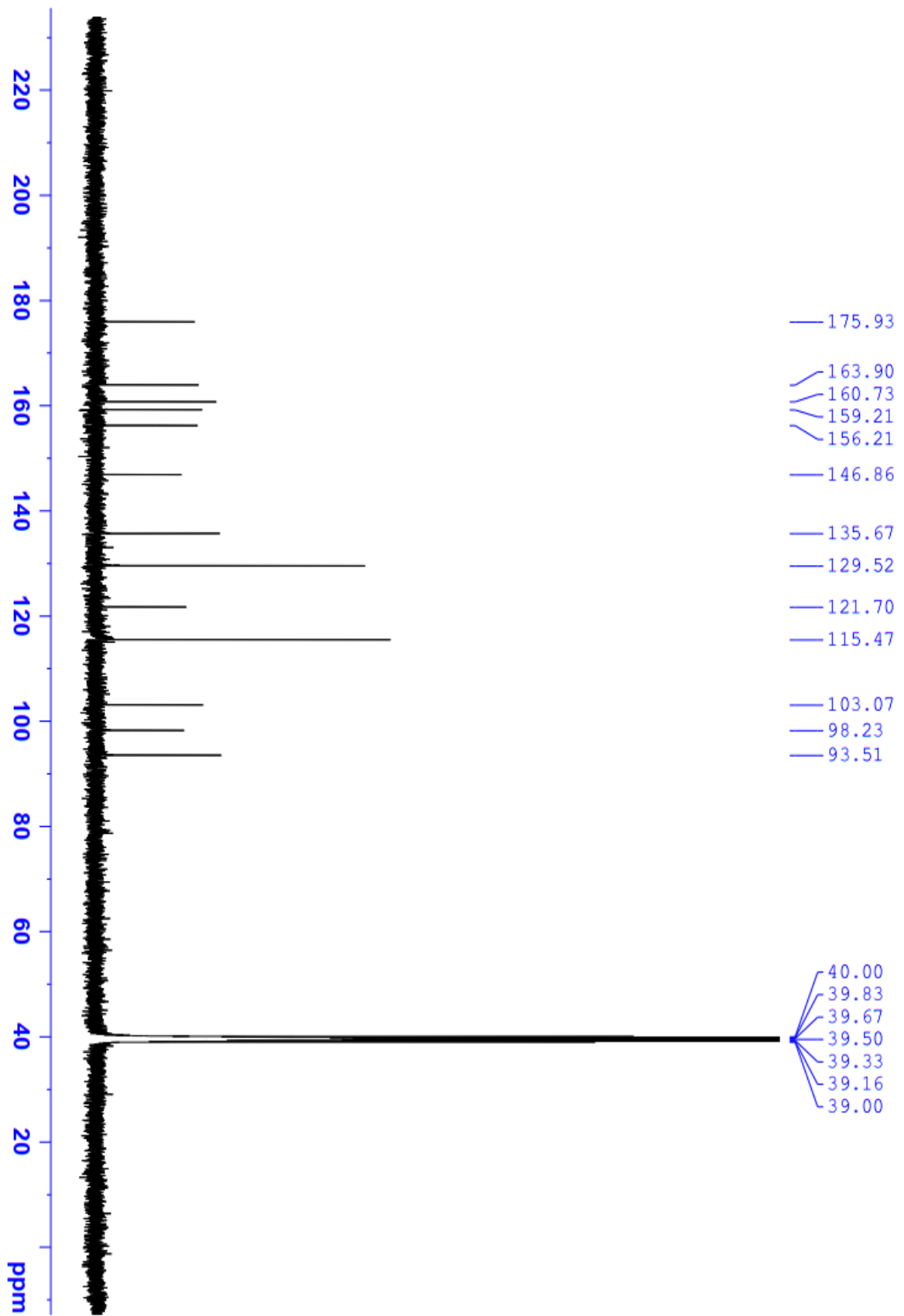
Hình 5.2: Phổ ^{13}C -NMR của 3



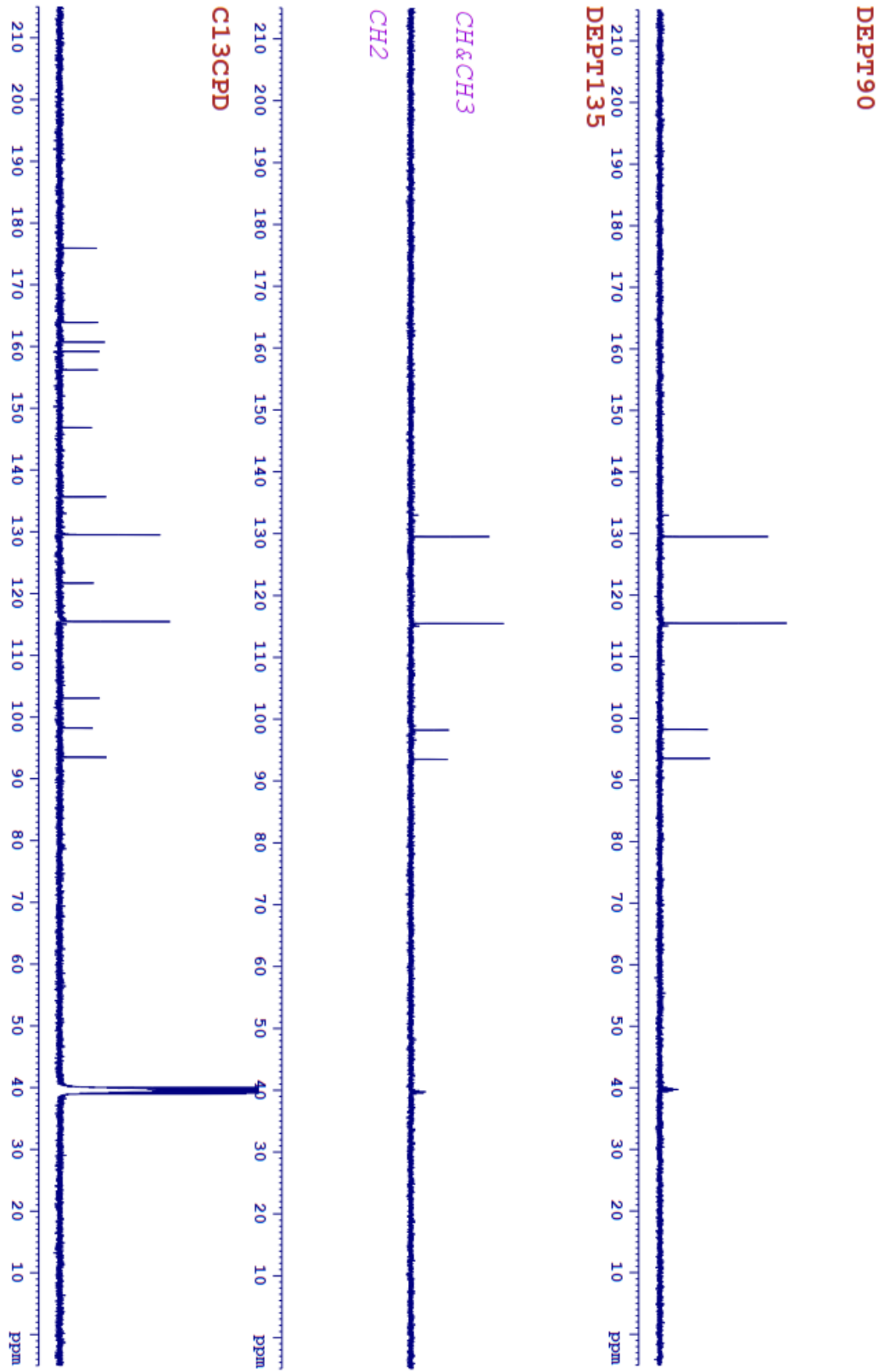
Hình 5.3: Phổ DEPT của 3

PHỤ LỤC 6. Hợp chất kaempferol (4)

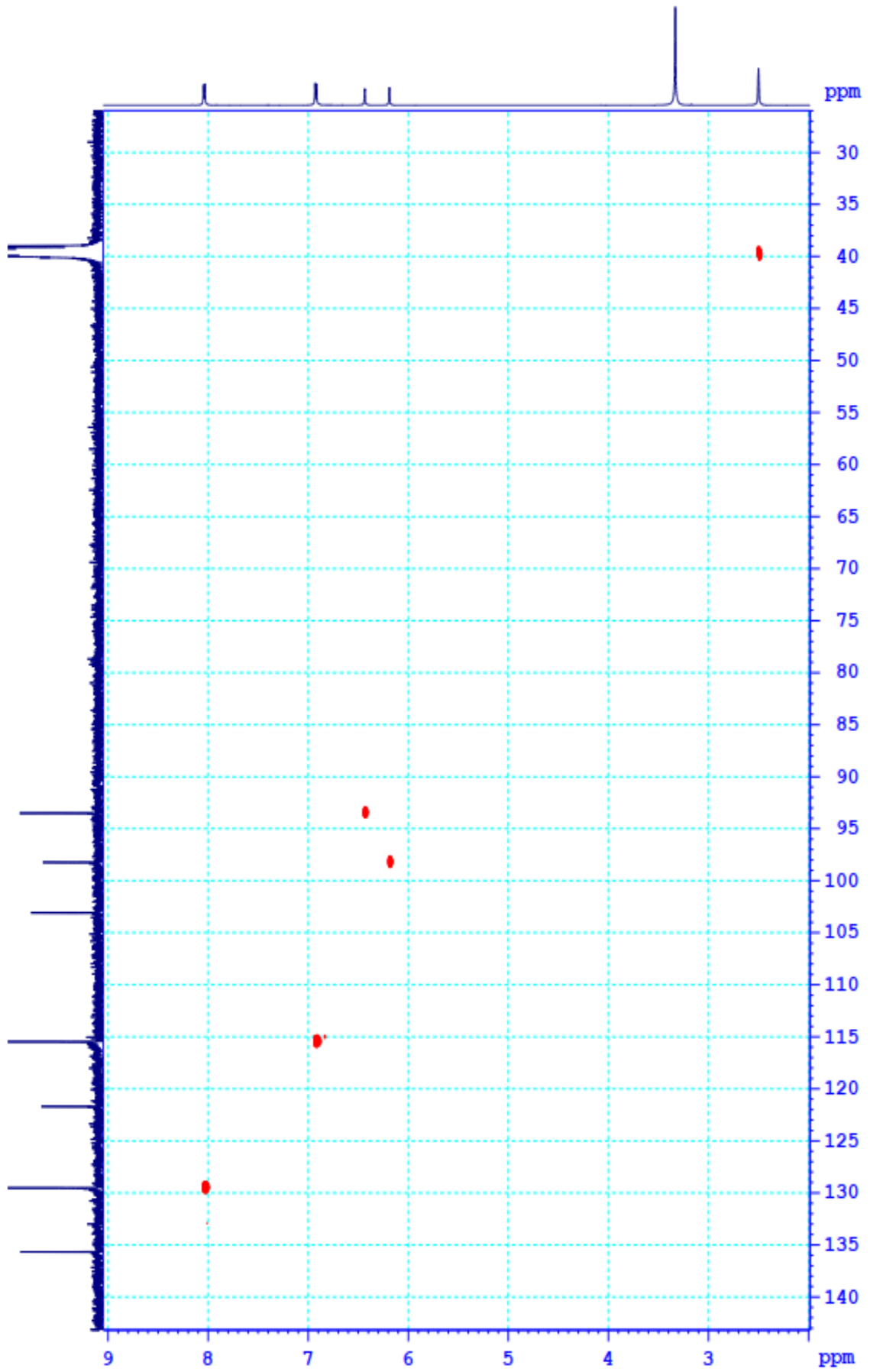
Hình 6.1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 4



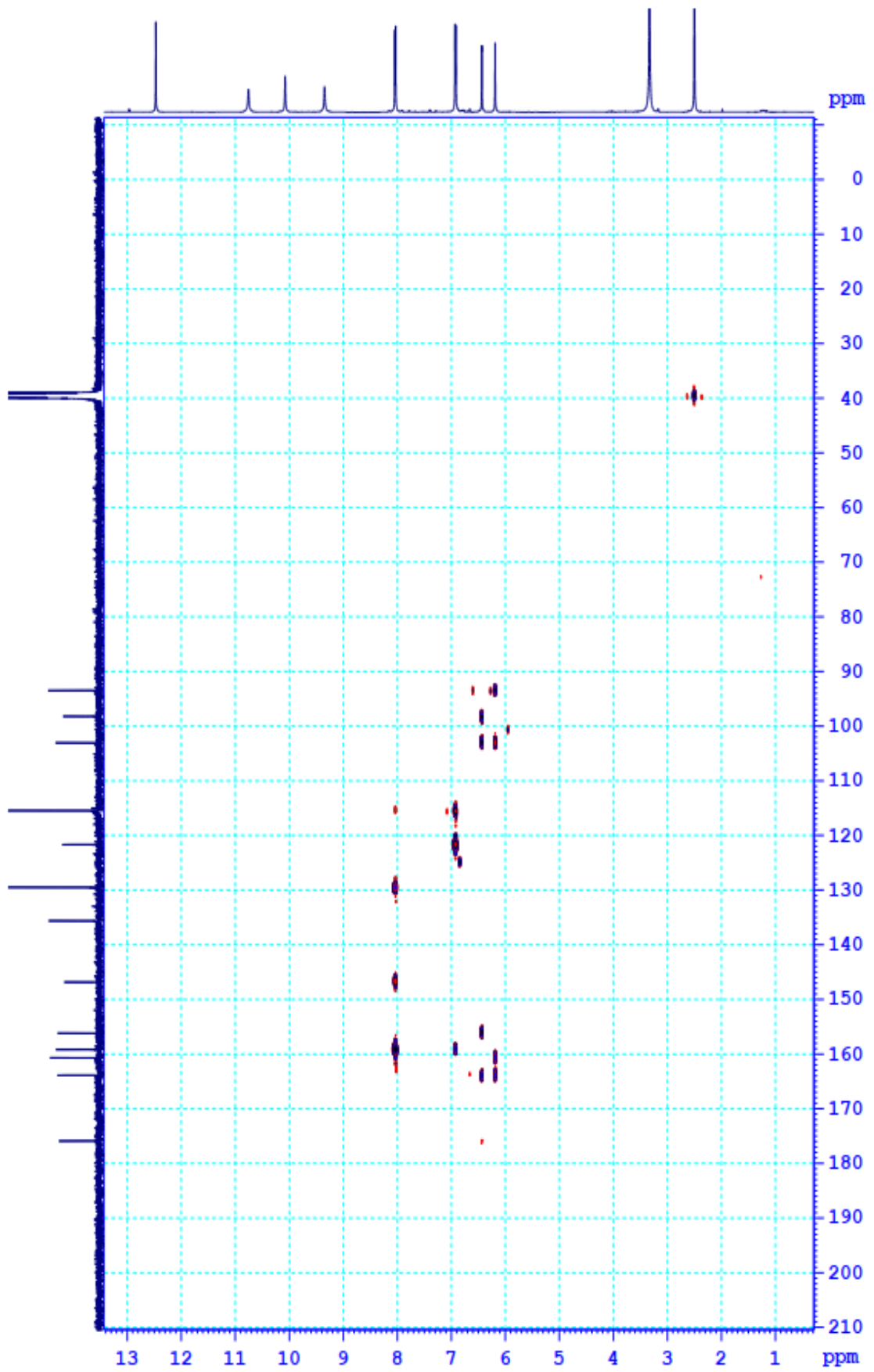
Hình 6.2: Phổ ^{13}C -NMR của 4



Hình 6.3: Phổ DEPT của 4



Hình 6.4: Phổ HSQC của 4



Hình 6.5: Phổ HMBC của 4