

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐINH THỊ HUYỀN TRANG

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC
HÓA HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT TỪ LOÀI DỨA ĐẠI
(*Pandanus tonkinensis* MART.EX B.STONE) BẰNG CÁC
PHƯƠNG PHÁP HÓA LÝ HIỆN ĐẠI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA PHÂN TÍCH

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

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

ĐINH THỊ HUYỀN TRANG

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC
HÓA HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT TỪ LOÀI DỨA ĐẠI
(*Pandanus tonkinensis* MART.EX B.STONE)
BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP HÓA LÝ HIỆN ĐẠI

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA PHÂN TÍCH

Mã số: 9 44 01 18

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ



Nguyễn Thị Trung

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS. Dương Hồng Anh

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

GS.TS. Ngô Quốc Anh

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài Dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Mart.ex B.Stone) bằng các phương pháp hóa lý hiện đại" 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 12 tháng 01 năm 2024

Tác giả luận án



NCS. Đinh Thị Huyền Trang

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới PGS. TS. Dương Hồng Anh và GS. TS. Ngô Quốc Anh đã giao đề tài và trực tiếp hướng dẫn, tận tâm chỉ bảo, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô khoa Hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy, hướng dẫn tôi hoàn thành các học phần và các chuyên đề trong chương trình đào tạo; cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi hoàn thành các thủ tục trong thời gian học tập và thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể phòng Nghiên cứu cấu trúc - Viện Hóa sinh biển đã tạo điều kiện về thời gian, cơ sở vật chất, trang thiết bị hiện đại cho tôi thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban lãnh đạo Trường Đại học Vinh đặc biệt là các thầy cô Khoa Hóa học - Trường sư phạm - Trường Đại học Vinh đã quan tâm giúp đỡ, đóng góp các ý kiến quý báu để tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm cấp Đại học quốc gia “Công nghệ phân tích phục vụ kiểm định môi trường và an toàn thực phẩm” KLATEFOS đặc biệt là GS. TS. Phạm Hùng Việt đã cho phép tôi tham gia đề tài, cũng như đóng góp cho tôi những kiến thức quý báu giúp tôi thực hiện luận án này.

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!

Hà Nội, ngày 12- tháng 01 năm 2024

Tác giả luận án



NCS. Đinh Thị Huyền Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC BẢNG.....	vi
DANH MỤC HÌNH.....	viii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	xi
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Giới thiệu sơ lược về chi <i>Pandanus</i>	3
1.1.1. Đặc điểm hình thái chung của chi <i>Pandanus</i>	3
1.1.2. Chi <i>Pandanus</i> ở Việt Nam và sơ bộ về phân bố các loài	4
1.1.3. Giới thiệu về loài <i>Pandanus tonkinensis</i> Martelli ex B.C. Stone	8
1.1.4. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học của chi <i>Pandanus</i>	8
1.1.5. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của dịch chiết và các chất phân lập từ chi <i>Pandanus</i>	15
1.2. Các phương pháp hóa lý dùng để chiết tách, phân lập, xác định cấu trúc các chất tinh khiết từ dược liệu	16
1.2.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật.....	17
1.2.2. Phương pháp phân lập các chất tinh khiết	17
1.2.3. Các phương pháp phân tích xác định cấu trúc các chất phân lập được.....	18
1.3. Đánh giá hoạt tính sinh học theo định hướng bảo vệ gan	19
1.3.1. Viêm và một số yếu tố quan trọng trong phản ứng viêm	19
1.3.2. Sơ lược về hoạt tính chống oxy hóa	20
1.4. Chất đánh dấu hóa học và phương pháp lựa chọn chất đánh dấu hóa học của dược liệu	21
1.5. Tóm tắt các vấn đề đề tài luận án cần giải quyết	22
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	24
2.1. Đối tượng nghiên cứu	24

2.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu	24
2.2.1. Hóa chất, dụng cụ	24
2.2.2. Thiết bị nghiên cứu	25
2.3. Phương pháp nghiên cứu	26
2.3.1. Xử lí mẫu	26
2.3.2. Chiết xuất dược liệu	26
2.3.3. Phương pháp phân lập các hợp chất	27
2.3.4. Phương pháp xác định cấu trúc	27
2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học	28
2.3.6. Phương pháp lựa chọn, chiết xuất- tinh chế chất đánh dấu, phân tích định lượng chất đánh dấu, xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng chất đánh dấu	29
2.4. Phân lập các hợp chất	31
2.4.1. Phân lập các hợp chất từ quả loài <i>Pandanus tonkinensis</i>	31
2.4.2. Phân lập các hợp chất từ rễ loài <i>Pandanus tonkinensis</i>	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	37
3.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ quả và rễ loài <i>Pandanus tonkinensis</i>	37
3.1.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ quả loài <i>Pandanus tonkinensis</i>	37
3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ rễ loài <i>Pandanus tonkinensis</i>	38
3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được	50
3.2.1. Hoạt tính kháng viêm của các chất đã phân lập thông qua ức chế quá trình sản sinh NO trên tế bào RAW 264,7 được kích thích bởi LPS	50
3.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa của các chất đã phân lập thông qua ức chế quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào	51
3.3. Chất đánh dấu (marker)	52
3.3.1. Lựa chọn chất đánh dấu	52
3.3.2. Chiết xuất, tinh chế chất đánh dấu từ dược liệu	54

3.3.3. Tinh chế chất đánh dấu	57
3.3.4. Tóm tắt qui trình chiết xuất và tinh chế hai chất đánh dấu	59
3.3.5. Xác nhận lại cấu trúc và độ tinh khiết của chất đánh dấu	59
3.4. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và chất vladinol F trong loài dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> ...	73
3.4.1. Xây dựng quy trình phân tích đồng thời hai chất đánh dấu bằng HPLC ..	73
3.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu trước khi phân tích định lượng chất đánh dấu	73
3.4.3. Quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và chất vladinol F trong dược liệu dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	79
3.4.4. Thẩm định quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và chất vladinol F trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	80
3.5. Định lượng pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT20) và vladinol F (PT6) trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> thu thập ở 1 số địa phương.....	92
KẾT LUẬN	94
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	96
KIẾN NGHỊ	97
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	98
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	99

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Tóm tắt các thông tin cơ bản các loài thuộc chi <i>Pandanus</i>	4
ở Việt Nam hiện nay.....	4
<i>Bảng 1.2.</i> Các hợp chất alkaloids phân lập từ loài <i>Pandanus amaryllifolius</i>	9
<i>Bảng 1.3.</i> Các hợp chất carotenoid phân lập từ loài <i>Pandanus tectorius</i>	11
<i>Bảng 1.4.</i> Các hợp chất terpenoid phân lập từ chi <i>Pandanus</i>	11
<i>Bảng 1.5.</i> Các hợp chất dẫn xuất carboxylic acid từ chi <i>Pandanus</i>	12
<i>Bảng 1.6.</i> Lignan và các hợp chất khác từ chi <i>Pandanus</i>	13
<i>Bảng 3.1.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất mới PT10 và chất so sánh (7 <i>R</i>)-2,6-dimethoxyphenyl-7-propanol-1- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	45
<i>Bảng 3.2.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất mới PT25 và chất so sánh <i>cis</i> -cinnamyl alcohol 9- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucopyranoside.....	47
<i>Bảng 3.3.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất mới PT26 và chất so sánh [4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenol β-D-apiofuranosyl(1—6)-β-D-glucopyranoside	500
<i>Bảng 3.4.</i> Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các chất phân lập từ dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	51
<i>Bảng 3.5.</i> Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào của các chất phân lập từ dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	52
<i>Bảng 3.6.</i> Chương trình pha động acid formic 0,1% / acetonitrile.....	53
<i>Bảng 3.7.</i> Chương trình pha động acid formic 0,1% / acetonitrile.....	55
<i>Bảng 3.8.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2B1A và chất so sánh pinoresinol 4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside.....	61
<i>Bảng 3.9.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2D1A và chất so sánh vladinol F. 67	67
<i>Bảng 3.10.</i> Kết quả xác định độ tinh khiết của hợp chất PT20 - pinoresinol 4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	72
<i>Bảng 3.11.</i> Kết quả xác định độ tinh khiết của hợp chất PT6 – vladinol F.....	73
<i>Bảng 3.12.</i> Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong Dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> chiết bằng ethanol 50%	74

<i>Bảng 3.13.</i> Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> chiết bằng methanol 50%	78
<i>Bảng 3.14.</i> Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> chiết bằng ethanol 50% và methanol 50%	78
<i>Bảng 3.15.</i> Chương trình pha động định lượng PT20 và PT6 trong dược liệu dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	79
<i>Bảng 3.16.</i> So sánh thời gian lưu của các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử và mẫu trắng.....	81
<i>Bảng 3.17.</i> Kết quả thời gian lưu và diện tích pic PT20 , PT6 thu được trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) và dung dịch chuẩn hỗn hợp (2)	83
<i>Bảng 3.18.</i> Kết quả khảo sát khoảng đường chuẩn để định lượng PT20 và PT6	85
<i>Bảng 3.19.</i> Kết quả khảo sát độ lặp lại.....	87
<i>Bảng 3.20.</i> Kết quả khảo sát độ tái lập của phương pháp	88
<i>Bảng 3.21.</i> Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp	90
<i>Bảng 3.22.</i> Kết quả định lượng pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT20) và vladinol F (PT6) trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i> lấy tại một số địa phương	93

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Hình ảnh một số loài thuộc chi <i>Pandanus</i>	8
<i>Hình 2.1.</i> Mẫu tiêu bản quả <i>Pandanus tonkinensis</i> Mart. ex B. Stone	24
<i>Hình 2.2.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ quả <i>Pandanus tonkinensis</i>	33
<i>Hình 2.3.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ rễ <i>Pandanus tonkinensis</i>	36
<i>Hình 3.1.</i> Cấu trúc hóa học các hợp chất được phân lập từ quả <i>Pandanus tonkinensis</i>	38
<i>Hình 3.2.</i> Cấu trúc hóa học các hợp chất được phân lập từ rễ <i>Pandanus tonkinensis</i>	42
<i>Hình 3.3.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT10	42
<i>Hình 3.4.</i> Phổ ECD được tính toán lý thuyết của 2 đồng phân lập thể có thể có và CD thử nghiệm cho hợp chất PT10	44
<i>Hình 3.5.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT25	46
<i>Hình 3.6.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT26	48
<i>Hình 3.7.</i> Sắc ký đồ phân tích sơ bộ mẫu dược liệu và mẫu dược liệu thêm chuẩn	54
<i>Hình 3.8.</i> Sắc ký đồ các phân đoạn PT2A-D.....	56
<i>Hình 3.9.</i> So sánh phổ UV của phân đoạn PT2B và chất PT20 , phân đoạn PT2D và chất PT6	57
<i>Hình 3.10.</i> Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn PT2B1	57
<i>Hình 3.11.</i> Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn PT2D1	58
<i>Hình 3.12.</i> Sơ đồ chiết xuất và tinh chế chất đánh dấu.....	59
<i>Hình 3.13.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT2B1A	60
<i>Hình 3.14.</i> Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT2B1A.....	62
<i>Hình 3.15.</i> Phổ ¹ H NMR của hợp chất PT2B1A.....	62
<i>Hình 3.16.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất PT2B1A	63
<i>Hình 3.17.</i> Phổ HSQC của hợp chất PT PT2B1A.....	63
<i>Hình 3.18.</i> Phổ HMBC của hợp chất PT2B1A	64
<i>Hình 3.19.</i> Phổ UV của hợp chất PT2B1A.....	64
<i>Hình 3.20.</i> Phổ IR của hợp chất PT2B1A	65

<i>Hình 3.21.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT2D1A	65
<i>Hình 3.22.</i> Phổ HR-ESI- MS của hợp chất PT2D1A	68
<i>Hình 3.23.</i> Phổ ¹ H- NMR của hợp chất PT2D1A	68
<i>Hình 3.24.</i> Phổ ¹³ C- NMR của hợp chất PT2D1A	69
<i>Hình 3.25.</i> Phổ HSQC của hợp chất PT2D1A	69
<i>Hình 3.26.</i> Phổ HMBC của hợp chất PT2D1A	70
<i>Hình 3.27.</i> Phổ UV của hợp chất PT2D1A.....	70
<i>Hình 3.28.</i> Phổ IR của hợp chất PT2D1A	71
<i>Hình 3.29.</i> Sắc ký đồ phân tích độ tinh khiết của PT20 mẫu bơm lần 1	72
<i>Hình 3.30.</i> Sắc ký đồ phân tích độ tinh khiết của PT6 mẫu bơm lần 1	73
<i>Hình 3.31.</i> Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 1	74
<i>Hình 3.32.</i> Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 2.....	75
<i>Hình 3.33.</i> Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 3.....	76
<i>Hình 3.34.</i> Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp dung dịch thử và mẫu trắng	81
<i>Hình 3.35.</i> Phổ UV của các tín hiệu PT20 , PT6 thu được trong sắc ký đồ mẫu dung dịch chuẩn và mẫu dung dịch thử.....	82
<i>Hình 3.36.</i> Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) lần bơm 2	84
<i>Hình 3.37.</i> Các đường chuẩn định lượng pinoresinol 4'-O-β-D-glucopyranoside (PT20) và vladinol F (PT6).....	85
<i>Hình 3.38.</i> Sắc ký đồ phân tích hỗn hợp chuẩn hai chất đánh dấu tại mức nồng độ 1 và mức nồng độ 5	86
<i>Hình 3.39.</i> Sắc ký đồ phân tích định lượng mức 50%, 100%,150% (bơm lần 1).	89
<i>Hình 3.40.</i> Kết quả xác định giới hạn định lượng của phương pháp.....	92
<i>Hình 3.41.</i> Sắc ký đồ phân tích pinoresinol 4'-O-β-D-glucopyranoside (PT6) và vladinol F (PT20) trong dứa dại <i>Pandanus tonkinensis</i>	93

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
AOAC international	Association of Official Analytical Collaboration International	Hiệp hội các tổ chức hoá học phân tích quốc tế chính thống
c.c	Chromatography column	Sắc ký cột
CD	Circular dichroism Spectroscopy	Phổ lưỡng sắc tròn
^{13}C NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ hai chiều tương quan $^1\text{H} - ^1\text{H}$
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer spectroscopy	Phổ DEPT
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl
EMA	European Medicines Agency	Cơ quan Dược phẩm châu Âu
^1H NMR	Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ gián tiếp qua nhiều liên kết
HPLC	High pressure liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR- ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ trực tiếp qua 1 liên kết

IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
ICH	International Conference on Harmonization	Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người
IL	Interleukin	Interleukin
IR	Infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại
<i>J</i>	Coupling constant	Hằng số ghép
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
m	Mass	Khối lượng
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ tăng cường do hiệu ứng Nuclear Overhauser
OD	Optical density	Mật độ quang
<i>P</i>	<i>Pandanus</i>	<i>Pandanus</i>
RAW 264.7	Mammalian cell line	Dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7
RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
S	Area	Diện tích
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	Tetramethylsilane
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u
t _R	Retention time	Thời gian lưu
USFDA	United States Food and Drug Administration	Cục dược phẩm và thực phẩm Mỹ
USP	United States Pharmacopeia	Dược điển Mỹ
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

MỞ ĐẦU

Là một trong những quốc gia nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, Việt Nam có hệ thực vật đa dạng và phong phú, cây làm thuốc chiếm khoảng 30%. Nhiều công trình nghiên cứu về cây thuốc của hệ thực vật Việt Nam mang lại nhiều đóng góp to lớn cho việc bảo vệ sức khỏe con người. Sử dụng thực vật có tác dụng chữa bệnh cho con người thường để lại ít tác dụng phụ hơn so với thuốc có nguồn gốc tổng hợp. Do đó với tình trạng ngày càng gia tăng về bệnh tật như tim mạch, ung thư, gan...thì việc nghiên cứu về các loài thực vật để làm thuốc có ý nghĩa về khoa học và thời sự [1].

Dứa dại (Pandanaceae) là một họ thực vật có hoa có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, phân bố từ Tây Phi đến Thái Bình Dương. Trong đó *Pandanus* là chi lớn và quan trọng nhất với khoảng 600 loài, có thể dùng làm nguồn thực phẩm và làm thuốc. Ở Việt Nam, họ Dứa dại (Pandanaceae) gồm 23 loài thuộc 2 chi là *Freycinetia* (3 loài) và *Pandanus* (20 loài). Theo các tài liệu y học cổ truyền, có 9 loài thuộc chi *Pandanus* được dùng làm thuốc ở Việt Nam, chủ yếu có tác dụng với các bệnh về thận (lợi tiểu, chữa sỏi thận, sỏi mật, viêm đường tiết niệu,...), các bệnh về gan (viêm gan, xơ gan cổ trướng), thanh nhiệt, hạ sốt, bệnh ngoài da,...[2], [3].

Loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* Mart. ex B. Stone còn gọi là dứa dại Bắc bộ có mặt từ vùng núi trung du Bắc bộ tới miền Trung, Tây Nguyên, Bình Thuận, Long An là một trong 9 loài nói trên mà đọt non, lá, rễ và quả có thể dùng làm thuốc [2]. Trong chương trình Khoa học công nghệ phát triển bền vững vùng Tây bắc, đã công bố kết quả điều tra, nghiên cứu về bài thuốc điều trị bệnh gan mật, trong đó dịch chiết nước của bài thuốc với hai vị Trứng quóc (*Stixis suaveolens*) và Dứa dại (*Pandanus tonkinensis*) đã được chứng minh là có hiệu quả bảo vệ gan tốt, cao hơn so với sylimarin [4]. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* [5]. Để có được những bằng chứng khoa học về thành phần, hoạt tính sinh học cũng như kiểm soát chất lượng dược liệu và các sản phẩm bào chế theo hướng bảo vệ gan, luận án với tên đề tài: “Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài Dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Mart.ex B.Stone) bằng các phương pháp hóa lý hiện đại” đã được đề xuất và thực hiện.

Mục tiêu của luận án:

- Phân tích được thành phần, cấu trúc hóa học và hoạt tính định hướng bảo vệ gan của các hợp chất từ loài *Pandanus tonkinensis*.

- Xác định được chất đánh dấu từ loài *Pandanus tonkinensis* theo hướng bảo vệ gan và xây dựng được quy trình phân tích định lượng các chất đánh dấu trong dược liệu phục vụ việc kiểm soát chất lượng và phát triển chế phẩm từ dược liệu này.

Nội dung luận án bao gồm:

- Sử dụng các kỹ thuật tách chiết, phân lập, các phương pháp hóa lý sinh học hiện đại để phân tích thành phần, cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất được phân lập từ loài *Pandanus tonkinensis*.

- Lựa chọn chất đánh dấu cho loài *Pandanus tonkinensis* theo hướng bảo vệ gan; chiết xuất, tinh chế, phân tích kiểm tra độ tinh khiết của chất đánh dấu từ loài này.

- Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng các chất đánh dấu trong loài *Pandanus tonkinensis*. Áp dụng quy trình, phân tích hàm lượng chất đánh dấu trong loài *Pandanus tonkinensis* thu hái tại một số địa phương.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu sơ lược về chi *Pandanus*

Theo hệ thống phân loại thực vật có hoa APG IV (2018) [6] được phát triển bởi Angiosperm Phylogeny Group, chi *Pandanus* có vị trí phân loại như sau:

Giới (regnum): Plantae

Ngành (divisio): Magnoliophyta

Lớp (class): Liliopsida

Bộ (ordo): Pandanales

Họ (familia): Pandanaceae

Chi (genus): *Pandanus*

1.1.1. Đặc điểm hình thái chung của chi *Pandanus*

Dứa dại (Pandanaceae) là một họ thực vật có hoa có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới của Cổ thế giới, từ Tây Phi đến Thái Bình Dương. Theo các nghiên cứu hiện nay đã thống kê được họ này có 5 chi, 982 loài trong đó *Pandanus* là chi lớn và quan trọng nhất, với khoảng 600 loài, gồm các loài được sử dụng làm nguồn thực phẩm quan trọng như dứa thơm (*Pandanus amaryllifolius*) và dứa julian (*Pandanus julianettii*); và nhiều loài khác được sử dụng làm thuốc. Đây là một họ cổ có niên đại từ đầu đến giữa kỷ Phấn trắng và đây cũng là một họ chưa được nghiên cứu kỹ đầy đủ [7,8,9,10,11].

Họ Pandanaceae bao gồm cây gỗ, cây bụi, bụi trườn, dây leo, cây thảo, sống lâu năm. Thân có thể là thân đơn hoặc phân nhánh thành các bụi lớn và có thể có rễ chống trên không. Thân có các vết sẹo nổi rõ do các lá rụng để lại. Lá đơn mọc cách theo hình xoắn ốc, phiến lá rất dài và hẹp, có bẹ, không cuống, không chia thùy, có các gân song song; mép lá và gân chính giữa thường có gai. Cây thuộc loại đơn tính. Cụm hoa dạng chùm đơn hoặc kép, mọc ở đỉnh thân hoặc nách lá, hoa thường màu trắng hoặc có thể có màu sắc rực rỡ. Hoa nhỏ và không có bao hoa. Hoa đực chứa nhiều nhị hoa với các chỉ nhị rời hoặc hợp nhất. Hoa cái có một hoa, không có vòi nhụy, thường gồm nhiều lá noãn xếp thành vòng, nhưng có thể giảm thành một hàng lá noãn hoặc một lá noãn. Quả mọng hoặc quả hạch, thường gồm nhiều quả xếp sát với nhau [7,8,9].

Trên thế giới, họ Pandanaceae bao gồm năm chi: *Benstonea*, *Freycinetia*, *Martellidendron*, *Pandanus* và *Sararanga*. *Benstonea* (như chi phụ "*Acrostigma*") và *Martellidendron* trước đây được coi là chi phụ của *Pandanus*, nhưng được công nhận là các chi riêng biệt dựa trên giải trình tự DNA [7,8,9].

1.1.2. Chi *Pandanus* ở Việt Nam và sơ bộ về phân bố các loài

Ở Việt Nam, họ Dứa dại (Pandanaceae) gồm 23 loài thuộc 2 chi là *Freycinetia* (3 loài) và *Pandanus* (20 loài) [10,11,12]. Có 2 loài thuộc chi *Pandanus* ở Việt Nam được nhập trồng làm cảnh là *Pandanus utilis* và *Pandanus furcatus*; 18 loài là cây mọc tự nhiên, trong đó có tới 8 loài là đặc hữu ở Việt Nam như Dứa chót chẻ - *P. bipollicaris* (mới thấy ở núi Bạch Mã - Thừa Thiên Huế); Dứa nha trang - *P. ceratostigma* (Nha Trang - Khánh Hòa); Dứa sừng - *P. cornifer* (Phú Yên, Khánh Hòa); Dứa nhãn - *P. laevis* (Nam Bộ); Dứa đơn - *P. monodon* (Đà Nẵng); Dứa nhiều chân - *P. multirupaceus* (Lâm Đồng và Đồng Nai); Dứa gỗ - *P. tectorius* (ven biển nhiều tỉnh ở Việt Nam) và Dứa Bắc bộ - *P. tonkinensis* (mọc rải rác ở các tỉnh miền núi phía Bắc tới Khánh Hòa. Bảng 1.1 trình bày về phân bố và đặc điểm sinh thái của chi *Pandanus* ở Việt Nam hiện nay.

Bảng 1.1. Tóm tắt các thông tin cơ bản các loài thuộc chi *Pandanus* ở Việt Nam hiện nay

TT	Tên Việt Nam / Tên khoa học	Phân bố	Đặc điểm sinh thái
1	Dứa cam - <i>P. affinis</i> Kurz (<i>P. aurantiacus</i> Ridl.)	Ở miền Trung, còn có ở Malaysia, Indonesia và Philippin	Mọc thành bụi ở vùng trung du, đồng bằng, trong đầm lầy, trảng cỏ
2	Dứa thơm - <i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb. (<i>P. odoratus</i> Ridl.)	Được trồng nhiều nơi ở Việt Nam để lấy lá làm hương liệu, còn có ở Xri Lanca, Thái Lan, Malaysia, Indonesia và Philippin	Mọc thành bụi ở vùng núi, trung du và đồng bằng
3	Dứa chót chẻ - <i>P. bipollicaris</i> St. John	Thừa Thiên Huế (Bạch Mã)	Mọc thành bụi ở vùng núi, trung du, trong rừng, ven suối, ở độ cao 1.200 - 1.400 m
4	Dứa nhiễm - <i>P. capusii</i> Mart.	Bình Dương (Thủ Dầu Một, Thị Tín, Lái Thiêu), Tây Ninh, thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Nai (Biên	Mọc thành bụi ở vùng núi, trung du, trong rừng, trảng cỏ,

		Hòa), còn có ở Thái Lan, Campuchia	ven bờ sông suối. Có quả tháng 5-6.
5	Dứa Nha Trang - <i>P.</i> <i>ceratostigma</i> Mart.	Loài đặc hữu của Việt Nam, gặp ở Khánh Hòa (Nha Trang)	Mọc thành bụi ở trung du, đồng bằng và ven biển, trong trảng cỏ, đầm lầy
6	Dứa sừng - <i>P.</i> <i>cornifer</i> St. John	Phú Yên, Khánh Hòa (Nha Trang, Hòn Tre)	Mọc thành bụi ở vùng núi, trong rừng, trảng cỏ
7	Dứa nước - <i>P.</i> <i>fibrosus</i> Gagnep.	Phú Yên, Khánh Hòa (Nha Trang, Phú Hữu), còn có ở Thái Lan, Trung Quốc, Lào	Mọc thành bụi ở vùng trung du, đồng bằng và ven biển
8	Dứa dạng nĩa - <i>P. furcatus</i> Roxb.	Tp Hồ Chí Minh còn có ở Ấn Độ	Cây bụi, mọc thành bụi rải rác
9	Dứa nuốm ngang - <i>P.</i> <i>horizontalis</i> St. John	Kiên Giang (Phú Quốc, Hòn Thơm), còn có ở Malaysia.	Mọc thành bụi ở vùng đồng bằng, ven biển, trong rừng, trảng cỏ
10	Dứa núi - <i>P.</i> <i>humilis</i> Lour.	Hà Nam, Ninh Bình, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam (Hội Mít), Khánh Hòa (Nha Trang, Phước Thành), Lâm Đồng (Bảo Lộc), Tây Ninh, Đồng Nai (Biên Hòa, Bảo Chánh, Trảng Bom), Bà Rịa Vũng Tàu (Bà Rịa). Còn có ở Lào, Thái Lan, Campuchia và Malaysia	Mọc thành bụi ở vùng núi đá, trong rừng, ở độ cao 1.000 - 1.500 m
11	Dứa kaida - <i>P.</i> <i>kaida</i> Kurz	Tp Hồ Chí Minh, Hà Nội (Bát Bạt), Hà Nam (Kim Bảng, Kiện Khê). Còn có ở Campuchia và Hải Nam (Trung Quốc)	Mọc thành bụi ở vùng núi, trung du, trong rừng, trảng cỏ
12	Dứa nhãn - <i>P.</i>	Nam bộ Việt Nam	Mọc thành bụi ở

	<i>laevis</i> Rumph. ex Lour.		miền núi, trong rừng.
13	Dứa đơn - <i>P. monodon</i> (Gaudich.) Balf.f.	Đà Nẵng	Mọc thành bụi ở miền núi, trong rừng
14	Dứa nhiều chân - <i>P. multirupaceus</i> St. John	Lâm Đồng (Đà Lạt), Đồng Nai (Long Thành)	Mọc thành bụi ở vùng núi, trung du, trong rừng, trắng cỏ, ven sông suối, ở độ cao 1.000 - 1.500 m
15	Dứa bụi nhỏ - <i>P. nanofrutex</i> B. Stone	Hà Nội (Ba Vì: Làng Cốc), còn có ở Campuchia.	Mọc thành bụi ở vùng núi, trong rừng, trắng cỏ, ở độ cao tới 1.000 m
16	Dứa dại - <i>P. odoratissimus</i> L.f.	Quảng Ninh (Uông Bí), Hà Nam (Kim Bảng, Kiện Khê, Vĩ Xá), Ninh Bình, Quảng Trị, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Khánh Hòa (Nha Trang, Cam Ranh, Hòn Miếu), Bình Thuận (Phan Thiết: Mũi Né), Đồng Nai (Biên Hòa), Bà Rịa – Vũng Tàu (Phước Tuy), Kiên Giang (Phước Quốc). Còn có ở Ấn Độ, Mianma, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Lào, Campuchia, Thái Lan, Xri Lanca, Malaixia và Philippin	Mọc thành bụi, ở đồng bằng, ven biển, vùng nước mặn, đất cát
17	Dứa gỗ - <i>P. tectorius</i> Parkins	Mọc nhiều ở các vùng ven biển Việt Nam	Mọc thành bụi ở vùng đồng bằng, ven biển. Ra hoa tháng 6 - 9, hoa đục rất thơm
18	Dứa Bắc bộ - <i>P. tonkinensis</i> Mart.	Hà Nội (Ba Vì), Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Đắc Lắc, Khánh	Mọc thành bụi ở vùng núi, trong rừng, ở độ cao 600 - 1.200

		Hòa (Nha Trang, Hòn Hèo)	m. Mùa hoa quả tháng 2 - 5
19	Dứa đuôi - <i>P. urophyllus</i> Hance	Hà Nam (Kim Bảng, Kiện Khê), Nghệ An (Cô Ba), Hà Tĩnh, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Kon Tum (Đắc Glei), Đồng Nai (Chứa Chan), Bà Rịa Vũng Tàu (Phước Tuy), Tp Hồ Chí Minh. Còn có ở Trung Quốc và Lào	Bụi cao 1 – 2 m, mọc thành bụi ở vùng núi, trong rừng, ven sông suối, ở độ cao tới 1.200 m
20	Dứa dại - <i>P. utilis</i> Bory	Trồng ở Tp Hồ Chí Minh. Nguồn gốc có lẽ từ Madagascar.	Bụi thấp

Dứa cam - *P. affinis* KurzDứa thom – *P. amaryllifolius* RoxbDứa nhiễm- *P. capussi* MartDứa dại - *P. odoratissimus* L.fDứa gai- *P. kaida* KurzDứa gỗ - *P. tectorius* Parkins



Dừa Bắc Bộ - *P. tonkinensis* Mart

Hình 1.1. Hình ảnh một số loài thuộc chi *Pandanus* [12]

1.1.3. Giới thiệu về loài *Pandanus tonkinensis* Martelli ex B.C. Stone

Tên khoa học: *Pandanus tonkinensis* Martelli ex B.C. Stone

Tên thông thường: Dừa Bắc bộ, dừa gai, dừa gổ.

Chi: *Pandanus*

Họ: Pandanaceae

Mô tả về thực vật [11]: Loài *P. tonkinensis* có một số tên tiếng Việt là Dừa Bắc bộ, dừa gai, dừa gổ. Cây nhỏ, cao khoảng từ 1 - 2 m. Thân gổ nhiều ngấn ngang, phân nhánh. Lá cứng hình dải, mọc nhiều ở ngọn thân, dài 0,7 – 0,8 m, rộng 4 cm, đầu có mũi nhọn sắc mép, gốc thành bẹ to và gân giữa có gai cứng, mặt trên màu lục sẫm nóng, mặt dưới nhạt.

Ở ngọn thân hay kẽ lá cụm hoa mọc gồm hoa đực và hoa cái hợp thành bông bao bọc trong mo dạng lá ngấn, sớm rụng, bao hoa có mùi thơm, hoa cái có một số lá noãn, hoa đực có nhiều nhị

Quả phức to 55 x 50 cm hoặc hơn, cuống mập khi chín màu vàng. Quả hạch hình trứng ngược, 17 x 10 – 11 mm ở gốc và 25 – 27 x 10 mm ở đỉnh; nhụy ở giữa, thẳng đến xiên hoặc cong, màu nâu đỏ, dẹt hoặc gàn hình trụ, dài 4 – 5 mm, đơn hoặc hơi chẻ đôi 1 chút ở đầu.

Sinh thái : Mọc thành bụi ở vùng núi, trong rừng, ở độ cao 600 – 1200 m.

Công dụng trong y học cổ truyền: Chữa bệnh đái rắt, đái ra sỏi., lợi tiểu. Giã đắp chữa gãy xương, lòi dom khi dùng bên ngoài. Dùng đọt non để chữa sỏi thận và kinh phong ở trẻ em, chữa các bệnh về gan.

Phân bố : Ở các tỉnh miền núi hoặc trung du phía Bắc vào đến Khánh Hòa.

1.1.4. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Pandanus*

Đã có nhiều công trình trong và ngoài nước của các nhà khoa học nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Pandanus*. Các nghiên cứu đã chỉ ra sự

có mặt của các dẫn xuất carboxyl acid, carotene, lignan, alkaloids, terpenoid. Tuy nhiên với loài *Pandanus tonkinensis* chưa có công bố nào về thành phần hóa học.

1.1.4.1. Các hợp chất alkaloids

Những hợp chất có chứa dị vòng nitrogen, có tính base, thường gặp trong nhiều loại thực vật, đôi khi còn tìm thấy trong một vài động vật được gọi là alkaloids. Có một số ít alkaloids ngoài hợp chất dị vòng có nguyên tử nitrogen nằm ở ngoài vòng (như hordenin, colchixin, ...). Đối với cơ thể người và động vật, nhất là đối với hệ thần kinh thì alkaloids có tính chất hoạt động sinh lý cao. Là loại thuốc đặc hiệu nếu là lượng nhỏ, phù hợp nhưng nó là chất độc gây chết người nếu là một lượng lớn. Từ lá, rễ, cây loài *Pandanus amaryllifolius* [13-21] đã tìm thấy các hợp chất alkaloids như liệt kê trong bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các hợp chất alkaloids phân lập từ loài *Pandanus amaryllifolius*

TT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
1	Pandanamine	Lá	[13]
2	Pandamarilactone-1	Lá	[13]
3	Norpandamarilactonine-A	Lá	[14]
4	Norpandamarilactonine- B	Lá	[14]
5	Pandamarilactone-32	Lá	[15]
6	Pandamarilactone-31	Lá	[15]
7	(6E)-pandanamine	Lá	[15]
8	(6Z)-pandanamine	Lá	[15]
9	(6Z)-pandamarilactonine A	Lá	[15]
10	(6E)-pandamarilactonine C	Lá	[15]
11	(6Z)-pandamarilactonine B	Lá	[15]
12	(6E) pandamarilactonine D	Lá	[15]
13	Pandamarilactam-3x	Lá	[15]
14	Pandamarilactam-3y	Lá	[15]
15	2-acetyl-1-pyrrolin	Lá	[16]
16	Pandamarilactonine E	Rễ	[17]
17	Pandamarilactonine F	Rễ	[17]
18	Pandamarilactonine F-Noxide	Rễ	[17]
19	Pandamarilactonine G	Rễ	[17]
20	Pandamarilactonine H	Rễ	[17]

21	<i>Epi</i> -pandamarilactonine H	Rễ	[17]
22	Dubiusamines A	Cây	[18]
23	Dubiusamine B	Cây	[18]
24	Dubiusamine C	Cây	[18]
25	Pandanusine A	Rễ	[19]
26	Pandanusine B	Rễ	[19]
27	Pandalizin C	Rễ	[19]
28	Pandalizin D	Rễ	[19]
29	Pandalizin E	Rễ	[19]
30	Norpandamarilactonine C	Rễ	[19]
31	Norpandamarilactonine D	Rễ	[19]
32	Pandalisines A	Lá	[20]
33	Pandalisines B	Lá	[20]
34	N-acetylnorpandamarilactonine A	Cây	[21]
35	N-acetylnorpandamarilactonine B	Cây	[21]
36	Pandalizin A	Cây	[21]
37	Pandalizin B	Cây	[21]
38	Pandanmenyamine	Cây	[21]
39	Pandamarilactones 2	Cây	[21]
40	Pandamarilactones 3	Cây	[21]
41	5(<i>E</i>)- pandamarilactonine-32	Cây	[21]
42	Pandalactonine	Cây	[21]

1.1.4.2. Các hợp chất carotenoid

Những chất màu vàng, đỏ, da cam...có nhiều trong động thực vật là các hợp chất carotenoid. Vì chúng tan trong dầu béo nên còn được gọi chất màu liporomic (màu trong chất lipid). Trong cơ thể động vật, carotenoid được hóa hợp với protein ở pha nước hoặc hòa tan trong máu. Trong một số hoa màu vàng, da cam, đỏ của nhiều loại vi sinh vật thì chúng là những chất màu chính. Từ quả loài *Pandanus tectorius*, nhóm tác giả Lois Englberger [22] đã tìm thấy các hợp chất carotenoid như trong bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các hợp chất carotenoid phân lập từ loài *Pandanus tectorius*

TT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
43	α -caroten	Quả	[22]
44	β -caroten	Quả	[22]
45	β -cryptoxanthin	Quả	[22]
46	Lutein	Quả	[22]
47	Zeaxanthin	Quả	[22]

1.1.4.3. Các hợp chất terpenoid

Những hợp chất hữu cơ tồn tại trong thiên nhiên có chứa C, H và O mà có bộ khung carbon gồm nhiều mắt xích giống với khung carbon của isopren, tức là có thể biểu diễn bởi công thức $(C_5H_8)_n$ với $(n \geq 2)$. Hầu hết là các cấu trúc đa vòng với các nhóm chức có chứa oxygen. Khoảng 60% các sản phẩm tự nhiên được biết đến là terpenoid. Dưới đây là một số hợp chất terpenoid đã được phân lập từ loài *Pandanus tectorius* [23,24], *Pandanus boninensis* [25] và *Pandanus simplex* [26].

Bảng 1.4. Các hợp chất terpenoid phân lập từ chi *Pandanus*

TT	Tên chất	Bộ phận	Loài	TLTK
48	25- dine-3-one	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[23]
49	Squalene	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[23]
50	Geraniol	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
51	Linalool	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
52	Linalyl acetate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
53	Limonen	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
54	(+)-Linalool	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
55	Citral	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
56	(24S)-24-methyl-25,32-cyclo-5 α -lactosta-9(11)-en-3 β -ol	Lá	<i>Pandanus boninensis</i>	[25]
57	(24S)-24-methyl-25,32-cyclo-cycloartane-3 β -ol	Lá	<i>Pandanus boninensis</i>	[25]
58	Loliolide	Cây	<i>Pandanus simplex</i>	[26]
59	(+)-Dehydrovomifoliol	Cây	<i>Pandanus simplex</i>	[26]
60	Vomifoliol	Cây	<i>Pandanus simplex</i>	[26]

1.1.4.4. Các hợp chất dẫn xuất carboxylic acid

Khi thay thế nhóm - OH của acid carboxylic bằng những nhóm thế khác nhau thu được các dẫn xuất ở nhóm chức của acid carboxylic. Bảng 1.5 liệt kê các dẫn xuất của acid carboxylic đã tìm được từ các loài *Pandanus tectorius* [22,24], *Pandanus amaryllifolius* [27,31,32], *Pandanus odoratissimus* [28], *Pandanus kaida* Kurz [29].

Bảng 1.5. Các hợp chất dẫn xuất carboxylic acid từ chi *Pandanus*

TT	Tên chất	Bộ phận	Loài	TLTK
61	Benzyl benzoate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
62	Benzyl salicylate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
63	Benzyl acetate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
64	Isopentenyl acetate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
65	Dimethylallyl acetate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
66	Ethyl cinnamate	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
67	Vitamin C	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[22]
68	4-hydroxybenzoic acid	Rễ	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[27]
69	4-hydroxy-3-(2',3'-dihydroxy-3'-methylbutyl)-benzoic acid methyl ester	Rễ	<i>Pandanus odoratissimus</i>	[28]
70	3-hydroxy-2isopropenyl dihydrobenzofuran-5-carboxylic acid methyl ester	Rễ	<i>Pandanus odoratissimus</i>	[28]
71	Acid vanillic	Quả	<i>Pandanus kaida</i> Kurz	[29]
72	Methyl caffeate	Quả	<i>Pandanus kaida</i> Kurz	[29]
73	Acid galic	Cây	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[30]
74	Acid cinnamic	Cây	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[30]
75	Acid ferulic	Cây	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[30]
76	3,4 Dihydroxybenzoic acid	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[31]
77	Acid p coumaric	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[32]
78	P-Coumaroyl dimethyl Malate	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[32]
79	P-coumaroyl malate	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[32]

1.1.4.5. Các hợp chất khác

Ngoài alkaloids và terpenoid, từ các loài thuộc chi *Pandanus* người ta đã tách được một số hợp chất lignan/neolignan, vitamin, sterol và các hợp chất khác [16, 23, 24, 26-29, 31, 33-36] như liệt kê trong bảng 1.6.

Bảng 1.6. Lignan và các hợp chất khác từ chi *Pandanus*

TT	Tên chất	Bộ phận	Loài	TL TK
80	Benzyl ancol	Hoa	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
81	Bromostyrene	Hoa	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
82	Phenylethyl alcol	Hoa	<i>Pandanus tectorius</i>	[24]
83	Stigmasterol	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[23]
84	β -sitosterol	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[23]
85	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[16]
86	Phytol	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[16]
87	Pinoresinol	Rễ	<i>Pandanus odoratissimus</i>	[28]
88	3,4-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)tetrahydrofuran	Rễ	<i>Pandanus odoratissimus</i>	[28]
89	Algin	Cây	<i>Pandanus simplex</i>	[26]
90	Pantolactone	Cây	<i>Pandanus simplex</i>	[26]
91	(\pm)-Divanillyltetrahydrofuran	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[27]
92	<i>Epi</i> - pinoresinol	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[29]
93	(+)-Syringaresinol	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[29]
94	(+)-Medioresinol	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[29]
95	(+)-Isolariciresinol	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[29]
96	(-) Secoisolariciresinol	Quả	<i>Pandanus kaida Kurz</i>	[29]
97	Epicatechin	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[31]
98	Catechin	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[31]
99	Kaempferol	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[31]
100	Blumenol A	Lá	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	[31]
101	Pandanusin A	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
102	Bergapten	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
103	6-(6'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',7'-dienyl)-7-hydroxycoumarin)	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
104	6-(6',7'-dihydroxy-3',7'-dimethyloct-2'-enyl)-7-hydroxycoumarin)	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
105	Balan ophonin	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]

106	Luteolin	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
107	(S)-2,3- dihydroluteolin	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
108	2,3-bis-(4-hydroxy-3-metoxyphenyl)-3-metoxypropanol	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
109	tachioside	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
110	P-hydroxycinamalde Hyde	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
111	1-O-(28-hydroxyoctacosanoyl) glycerol	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
112	Methyl-d-fructopyranoside	Quả	<i>Pandanus tectorius</i>	[33]
113	2-methoxy-4-methylphenyl 1-O-rutinoside	Rễ	<i>Pandanus tectorius</i>	[34]
114	2-methoxy-4-hydroxymethylphenyl-1-O-rutinoside	Rễ	<i>Pandanus tectorius</i>	[34]
115	3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl-1-O-rutinoside	Rễ	<i>Pandanus tectorius</i>	[34]
116	Cuneataside D	Rễ	<i>Pandanus tectorius</i>	[34]
117	(S)-2-hydroxy-2-phenylethyl 1-O-rutinoside	Rễ	<i>Pandanus tectorius</i>	[34]
118	Tumerone	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
119	Ar-tumerone	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
120	Curlone	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
121	γ -Elemene	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
122	α - Caryophyllene	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
123	Benzene,1-(1,5dimethyl-4 hexenyl)-4-methyl	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
124	Pentacosane	Lá	<i>Pandanus tectorius</i>	[35]
125	Enpipinoresinol 4-O – β - D glucopyranosid	Thân	<i>Pandanus tectorius</i>	[36]
126	Enpipinoresinol 4-O – β - D glucopyranosid	Thân	<i>Pandanus tectorius</i>	[36]
127	Vomifoliol	Thân	<i>Pandanus tectorius</i>	[36]
128	Roseosid	Thân	<i>Pandanus tectorius</i>	[36]

1.1.5. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của dịch chiết và các chất phân lập từ chi *Pandanus*

Các công trình nghiên cứu về những hợp chất phân lập từ chi *Pandanus* đã chỉ ra các hợp chất có khả năng kháng khuẩn, chống ung thư, chống oxy hóa và chống viêm. Cụ thể như sau:

1.1.5.1. Khả năng kháng khuẩn

Năm 2008 từ lá *Pandanus tectorius* Soland Mario A. Tan và cộng sự đã công bố kết quả phân lập được các hợp chất: hỗn hợp stigmasterol, β -sitosterol, 24,24-dimethyl-5 β -tirucall-9, squalene, 25-dien-3-one. Qua thí nghiệm 24,24-dimethyl-5 β -tirucall-9, 25-dien-3-one có tác dụng ức chế sinh trưởng *Mycobacterium tuberculosis* – vi khuẩn lao H37Rv với MIC 64 $\mu\text{g/ml}$; trong khi squalene và stigmasterol, β -sitosterol có MIC lần lượt 100 và 128 $\mu\text{g/ml}$ [21]. Cao chiết methanol của rễ non và lá loài *Pandanus tectorius* thể hiện hoạt tính ức chế tốt với sự phát triển của chủng vi sinh vật Gram (+) *Bacillus subtilis* và *Staphylococcus aureus* với giá trị IC_{50} lần lượt là 40,73 $\mu\text{g/ml}$ và 88,47 $\mu\text{g/ml}$, đối với rễ non 26,0 $\mu\text{g/ml}$ và 80,0 $\mu\text{g/ml}$ đối với lá [35].

1.1.5.2. Tác dụng hạ đường huyết

Từ cao ethanol của lá cây dứa *Pandanus amaryfollius*, Sasidharan S. công bố có sự có mặt của flavonoid, saponin, alkaloid và tannin; cao có hiệu quả hạ đường huyết khi thử nghiệm mô hình chuột bị tiểu đường do streptozotocin [37]. Từ dịch chiết ethyl acetate của quả *Pandanus tectorius* Parkinson ex Du Roi tại Việt Nam, các tác giả đã phân lập được 16 hợp chất thuộc các nhóm furanocoumarin, lignan/neolignan, flavonoids, phenolics, monoglyceride và monosaccharide. 14/16 chất phân lập được thể hiện hoạt tính ức chế alpha-glucosidase tốt hơn chất chuẩn tham chiếu acarbose [33].

1.1.5.3. Khả năng chống ung thư

Gunti Gowtham Raj đã tiến hành nghiên cứu hoạt tính chống ung thư của dịch chiết nước từ rễ và lá của loài *Pandanus Odoratissimus* f. *ferreus* (Y. Kimura) sử dụng mô hình *in vitro* cytotoxic và sàng lọc antimitotic. Các kết quả cho thấy dịch chiết nước của rễ và lá *Pandanus odoratissimus* thể hiện hoạt tính cytotoxic và antimitotic hơn so với chuẩn so sánh podophyllotoxin, cyclophosphamide [40].

1.1.5.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Từ rễ của *Pandanus odoratissimus*, Ting Ting Jong đã phân lập được pinoresinol có hoạt tính chống oxy hóa trung bình, 3,4-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-tetrahydrofuran có hoạt tính chống oxy hóa mạnh tương đương BHA [28].

Theo các nghiên cứu của Việt Nam, một số hợp chất lignan như secoisolariciresinol, (+)-pinoresinol và (+)-medioresinol được tách từ phân đoạn chiết bằng cloroform từ quả dừa kaida (*Pandanus kaida*) và dừa gổ (*Pandanus odoratissimus*) là những chất có hoạt tính chống oxy hóa [29].

1.1.5.5. Hoạt tính kháng viêm

Năm 2015 Ramesh Londonkar đã công bố kết quả nghiên cứu hoạt tính chống viêm của dịch chiết methanol lá loài *Pandanus odoratissimus*. Dịch chiết methanol của lá *Pandanus odoratissimus* liều 100 μ g/kg thể hiện tác dụng chống viêm đáng kể, đạt đỉnh sau 3 giờ, giảm mức độ phù bàn chân chuột là 64,2% trong mô hình gây viêm mạn bằng formalin, 68% trong mô hình gây viêm cấp bằng carageenan [39].

1.1.5.6. Tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo*

Garima Mishra và các cộng sự tiến hành nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết ethanol của rễ loài *Pandanus odoratissimus* trên mô hình chuột gây tổn thương gan bằng paracetamol ở liều 200 và 400 mg/kg làm giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) SGOT, SGPT, ALP, bilirubin và triglycerides [38]. Các tác giả đã công bố cao toàn phần và phân đoạn ethylacetate của quả loài *Pandanus odoratissimus* (ở liều 7,2 mg/kg và 14,4 mg/kg) có tác dụng bảo vệ gan và phục hồi thương tổn gan (tương đương với silymarin 70 mg/kg) trên mô hình động vật gây thương tổn gan bằng paracetamol [41].

Nghiên cứu của các tác giả tại Đại học quốc gia Hà Nội và Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH &CN VN [4] về dịch chiết nước bài thuốc dân gian gồm 2 vị *Stixis suaveolens* và *Pandanus tonkinensis* trên mô hình *in vitro* cũng như *in vivo* đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết này. Liều uống cao nhất của dịch chiết nước tương đương 29,6 g/kg không gây độc cấp. Nghiên cứu mô bệnh học cho thấy sử dụng dịch chiết nước có tác dụng bảo vệ gan khỏi tác hại do CCl₄ gây ra ở chuột. Dịch chiết nước làm giảm đáng kể nồng độ men ALT và AST, nồng độ MDA, TNF- α và IFN- γ ở chuột bị gây độc bởi CCl₄ so với nhóm bệnh đối chứng.

1.2. Các phương pháp hóa lý dùng để chiết tách, phân lập, xác định cấu trúc các chất tinh khiết từ dược liệu

Để xác định cấu trúc các hợp chất tinh khiết từ dược liệu trước hết cần tách chiết mẫu. Tiếp theo phân lập tách riêng các hợp chất tinh khiết ra khỏi hỗn hợp bằng các phương pháp sắc ký.

1.2.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật

Chiết bằng dung môi là một kỹ thuật đáng tin cậy đã được ghi nhận từ lâu đời. Nó được sử dụng như một kỹ thuật chuẩn bị mẫu trong đó các chất tan được lấy ra khỏi các mô thực vật bằng dung môi.

Trong nghiên cứu này sẽ sử dụng phương pháp chiết với sự hỗ trợ của siêu âm để chiết được liệu và dung môi sử dụng là methanol.

1.2.2. Phương pháp phân lập các chất tinh khiết

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng (TLC) là một kỹ thuật tách các chất được thực hiện trên một tấm TLC được tạo thành từ chất rắn không phản ứng được phủ một lớp vật liệu hấp phụ mỏng (pha tĩnh). Mẫu được đặt trên tấm TLC, được rửa giải bằng dung môi hoặc hỗn hợp dung môi (pha động). Dung môi này sau đó di chuyển lên tấm TLC thông qua hoạt động mao dẫn. Các hợp chất khác nhau di chuyển lên tấm TLC với tốc độ khác nhau và bị tách ra. TLC nhanh chóng, đơn giản và có độ nhạy cao với chi phí tương đối thấp.

Phương pháp sắc ký cột (CC)

Kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi vì nhiều chất hấp phụ khác nhau (pha thường, pha đảo hoặc các chất khác) có thể được sử dụng với nhiều loại dung môi. Sắc ký cột là chi phí tương đối thấp và ngăn ngừa ô nhiễm chéo và suy thoái pha tĩnh do tái chế. Sắc ký cột có thể được thực hiện bằng cách sử dụng trọng lực để di chuyển dung môi hoặc sử dụng khí nén để đẩy dung môi qua cột.

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một kỹ thuật trong hóa học phân tích được dùng để tách, xác định và định lượng các thành phần cụ thể trong hỗn hợp. Các hỗn hợp này có thể có nguồn gốc từ thực phẩm, hóa chất, dược phẩm, sinh học, môi trường và nông nghiệp, v.v., đã được hòa tan thành dung dịch lỏng. Nó dựa vào máy bơm áp suất cao, cung cấp hỗn hợp các dung môi khác nhau, được gọi là pha động, chảy qua hệ thống, thu thập hỗn hợp mẫu trên đường đi, đưa nó vào một hình trụ, gọi là cột, chứa đầy các hạt rắn, được làm bằng chất hấp phụ gọi là pha tĩnh. Đầu ra của máy dò là một biểu đồ, được gọi là sắc ký đồ, hiển thị các đỉnh, mỗi đỉnh đại diện cho một thành phần của mẫu, xuất hiện theo thời gian tương ứng, được gọi là thời gian lưu giữ, có diện tích tỷ lệ với hàm lượng của nó.

So với phương pháp sắc ký cột, sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế có khả năng phân tách, tinh chế chất tốt hơn.

1.2.3. Các phương pháp phân tích xác định cấu trúc các chất phân lập được

1.2.3.1. Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối là biểu đồ biểu diễn cường độ so với tỷ lệ khối lượng trên điện tích (m/z) trong mẫu hóa học, thường thu được bằng cách sử dụng một dụng cụ gọi là máy quang phổ khối. Không phải tất cả khối phổ của một chất nhất định đều giống nhau; ví dụ, một số máy quang phổ khối phá vỡ các phân tử phân tích thành các mảnh; những người khác quan sát khối lượng phân tử nguyên vẹn với ít sự phân mảnh. Phổ khối có thể biểu thị nhiều loại thông tin khác nhau dựa trên loại máy đo khối phổ và thí nghiệm cụ thể được áp dụng.

1.2.3.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ proton $^1\text{H-NMR}$: Số lượng các hấp thụ khác nhau cho biết có bao nhiêu loại proton trong phân tử. Độ chuyển dịch hóa học của proton trong khoảng 0-14 ppm. Độ chuyển dịch của proton cho biết proton gắn vào nguyên tử nào (C, O, H...). Sự tách mũi tín hiệu cho biết có bao nhiêu proton hiện diện kề bên proton khảo sát. Hằng số ghép được tính bằng khoảng cách giữa các pic doublet, triplet và quartet rồi nhân với tần số máy theo công thức 1.2. $J_{(\text{Hz})} = (\delta_1 - \delta_2) \cdot \nu_{\text{máy}}$

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$: Cung cấp thông tin trực tiếp bộ khung carbon của phân tử, số nguyên tử carbon, nhóm chức trong phân tử. Độ chuyển dịch của carbon trong khoảng 1- 220ppm. Chiều cao của pic tỷ lệ thuận với số nguyên tử carbon tương đương

Phổ DEPT: Xác định bậc của nguyên tử carbon. Phổ DEPT-90 cho các pic hướng lên của CH, phổ DEPT-135 cho thấy các pic hướng lên của CH và CH_3 , đồng thời các pic hướng xuống của CH_2

Phổ HSQC: Các tương tác trực tiếp ^1H và ^{13}C giúp ta gán được độ dịch chuyển hóa học của carbon với proton tương ứng.

Phổ HMBC: Sự tương quan thông qua sự kết nối độ dịch chuyển hóa học ^1H và ^{13}C - NMR qua hai, ba liên kết giúp xác định gián tiếp tương quan carbon-carbon và các tương quan giữa carbon bậc 4 với proton xung quanh.

Phổ COSY: Các nguyên tử H ghép cặp với nhau dựa trên kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ giúp xác định các nguyên tử H ghép cặp này của một carbon hay các H ghép cặp này của hai carbon ở gần nhau.

Phổ NOESY: Cho thấy các tương tác không gian bên trong phân tử.

1.2.3.3. Phổ lưỡng sắc tròn

Lưỡng sắc tròn (CD) là lưỡng sắc liên quan đến ánh sáng phân cực tròn, tức là sự hấp thụ vi sai của ánh sáng thuận tay trái và tay phải. Ánh sáng phân cực tròn bên trái (LHC) và ánh sáng phân cực tròn bên phải (RHC) biểu thị hai trạng thái động lượng góc quay có thể có của một photon, và do đó lưỡng sắc tròn còn được gọi là lưỡng sắc cho xung lượng góc quay.

1.3. Đánh giá hoạt tính sinh học theo định hướng bảo vệ gan

Là một trong những cơ quan lớn nhất của cơ thể gan đảm nhận những chức năng quan trọng như: sản xuất ra nhiều chất cần thiết, biến đổi thức ăn thành những chất quan trọng cho sự sống và phát triển; giải độc và bài tiết các chất độc trong cơ thể. Rối loạn chức năng gan, tăng men gan, viêm gan, áp xe gan, xơ gan và ung thư gan là những bệnh lý thường gặp về gan. Ở Việt Nam người mắc bệnh gan có xu hướng ngày càng tăng vượt ngưỡng cho phép của Tổ chức Y tế Thế Giới.

Mô hình thử nghiệm *in vitro* được sử dụng để sàng lọc tác dụng bảo vệ gan của loài *Pandanus tonkinensis*. Trong luận án này, hoạt tính kháng viêm và hoạt tính chống oxy hóa là hai hoạt tính sinh học được sử dụng để sàng lọc các chất theo định hướng bảo vệ gan [42-44].

1.3.1. Viêm và một số yếu tố quan trọng trong phản ứng viêm

Tình trạng viêm thường xảy ra khi các vi sinh vật truyền nhiễm như vi khuẩn, vi rút hoặc nấm xâm nhập cơ thể, cư trú trong các mô cụ thể và/ hoặc lưu thông trong máu [45 – 47]. Để đáp ứng quá trình tổn thương thì tình trạng viêm cũng có thể xảy ra [45, 47 – 52]. Chất chống viêm và chất trung gian gây viêm là hai loại chính gây viêm. Chất interleukin (IL)-12 là chất trung gian vừa có đặc tính gây viêm và chống viêm [54]. Trong số các chất trung gian gây viêm và con đường tế bào đã được nghiên cứu rộng rãi liên quan đến tình trạng bệnh lý ở người là các cytokine, chemokine, eicosanoids, κB.

Yếu tố hoại tử khối u (TNF)-α là một cytokine tiền viêm quan trọng được tiết ra từ các tế bào khác nhau và gây ra nhiều tác dụng cho tế bào [55,56]. TNF-α có liên quan đến nhiều tình trạng bệnh tật ở người, bao gồm các bệnh miễn dịch và viêm nhiễm, ung thư, rối loạn tâm thần, trong số những bệnh khác. Một cytokine khác chủ yếu thực hiện hoạt động gây viêm là IL-1α [57,58]. Nó kích thích sự tiết ra các cytokine tiền viêm như IL-1β và TNF-α [57,58]. Tuy nhiên, IL-1α cũng có liên quan đến hoạt động chống viêm. Tương tự như IL-1α, IL-6 thường hoạt động như một cytokine gây viêm nhưng nó cũng có một số tác dụng chống viêm. Họ cytokine IL-12 (bao gồm IL-12, IL-23, IL-27 và IL-35) có cả chức năng gây viêm và kháng

viêm [54,59,60]. Mặt khác, IL-10 là một cytokine chống viêm mạnh, hoạt động của nó cản trở hoạt động của nhiều chất trung gian gây viêm [61–63]. Bằng cách làm suy yếu và kiểm soát phản ứng viêm, IL-10 giúp duy trì cân bằng nội môi mô và làm giảm tổn thương có thể xảy ra do phản ứng viêm quá mức [61–63].

Prostaglandin (PG) E2 là PG được nghiên cứu nhiều nhất liên quan đến tình trạng sinh lý và bệnh lý của con người [64]. Nó có nhiều vai trò sinh lý khác nhau bao gồm điều chỉnh nhiệt độ cơ thể bình thường, tính toàn vẹn của niêm mạc dạ dày, lưu lượng máu đến thận và chức năng của hệ thống sinh sản nữ. Mặt khác, những thay đổi trong hoạt động PGE2 có liên quan đến các tình trạng bệnh lý như bệnh viêm nhiễm, thay đổi nhiệt độ cơ thể bất thường, ung thư đại trực tràng, trong số những bệnh khác. Con đường tổng hợp PG bắt đầu bằng việc tạo ra axit arachidonic từ phospholipid màng tế bào bởi phospholipase A2(PLA2). Sau đó, axit arachidonic được chuyển đổi thành PG nhờ enzyme cyclooxygenase (COX) [64]. Trong số ba đồng dạng COX đã biết (COX-1, COX-2 và COX-3), enzyme cảm ứng COX-2 được công nhận là hoạt động mạnh nhất trong quá trình viêm. Leukotrienes (LTs) như LTB4 cũng có liên quan đến tình trạng bệnh tật ở người bao gồm viêm nhiễm, hen suyễn và trầm cảm [65–67]. LTs được sản xuất bởi enzyme 5-lipoxygenase (5-LOX) [68]. Một loại enzyme khác có liên quan nhiều đến tình trạng viêm nhiễm là nitric oxide synthase (NOS) tạo ra oxit nitric (NO) [68]. Tương tự như COX-2, NOS cảm ứng (iNOS) là đồng dạng NOS gây viêm nhiều nhất. Yếu tố hạt nhân của yếu tố phiên mã κ B (NF κ B) là yếu tố điều chỉnh nổi bật các phản ứng miễn dịch và viêm và có liên quan nhiều đến sinh lý bệnh ung thư [69–71]. Ở động vật có vú, bộ máy NF κ B bao gồm một số thành viên (ví dụ: p50 và p65) điều chỉnh cả quá trình sinh lý và bệnh lý [69,70]. Ở điều kiện không hoạt động (không bị kích thích), NF κ B cư trú trong tế bào chất [70]. Sau khi được kích hoạt bởi các kích thích truyền nhiễm/viêm/giảm thiểu khác nhau, các protein NF κ B chuyển vị trí vào nhân và tạo ra sự phiên mã của các gen liên quan đến viêm [70,71].

Một số thử nghiệm *invitro* dưới đây thường sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng viêm:

- Khả năng tác động đến biểu hiện của các cytokine TNF- α , IL-10, IL-6
- Khả năng ức chế sản sinh NO
- Khả năng ức chế biểu hiện gen iNOS, COX-2

1.3.2. Sơ lược về hoạt tính chống oxy hóa

Việc nghiên cứu các chất chống oxy hóa đang được cộng đồng khoa học quan tâm do vai trò bảo vệ của chúng trong thực phẩm và dược phẩm chống lại sự

suy giảm oxy hóa và trong cơ thể cũng như chống lại các quá trình bệnh lý do stress oxy hóa gây ra.

Vai trò của các chất chống oxy hóa là vô hiệu hóa các gốc tự do trong tế bào sinh học, các gốc tự do có tác động xấu đến cơ thể sống. Một vai trò đặc biệt trong việc vô hiệu hóa các tác động của stress oxy hóa liên quan đến sự hiện diện của các gốc tự do được thực hiện bởi enzyme gọi là superoxyde dismutase (SOD). Nó là một metalloenzyme với tổ chức cấu trúc tiểu đơn vị, là chất điều hòa chính của quá trình oxi hóa trong tế bào sinh học. Enzyme này xúc tác phản ứng tái hợp của các gốc oxy. Áp dụng liệu pháp chống oxy hóa bằng cách sử dụng SOD có hiệu quả trong việc điều trị các trạng thái bệnh lý khác nhau của cơ thể con người, cũng như ngăn ngừa sự xuất hiện của chúng (ngăn chặn sự hình thành hydro peroxyde và oxy bộ ba).

Stress oxy hóa là một khái niệm tương đối mới, được sử dụng rộng rãi trong khoa học y tế trong ba thập kỷ qua. Nó tham gia tích cực vào sinh lý học của các bệnh rất phổ biến, như tiểu đường, huyết áp cao, tiền sản giật, xơ vữa động mạch, suy thận cấp, Alzheimer và Parkinson. Các tế bào, thông qua quá trình chuyển hóa oxy, tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS), có khả năng gây hại. Trong những trường hợp bình thường, tốc độ và biên độ hình thành chất oxy hóa được cân bằng bởi tốc độ loại bỏ chúng. Tuy nhiên, mất cân bằng giữa pro-oxy hóa và chất chống oxy hóa dẫn đến stress oxy hóa. Hàm lượng ROS cao trong các tế bào sinh học có tác động lớn đến hoạt động của chúng, dẫn đến hoạt động của tế bào bị thiếu hụt, lão hóa hoặc bệnh tật [72].

Một số phương pháp thử nghiệm *invitro* dưới đây thường được sử dụng để khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

- Phương pháp ức chế gốc tự do DPPH
- Phương pháp đánh giá khả năng bắt gốc superoxide O_2^{\cdot}
- Phương pháp xác định hàm lượng MDA
- Phương pháp đánh giá khả năng kết hợp với ion sắt II

1.4. Chất đánh dấu hóa học và phương pháp lựa chọn chất đánh dấu hóa học của dược liệu

Với sự gia tăng liên tục trong việc sử dụng thuốc thảo dược trên toàn thế giới và sự mở rộng nhanh chóng của thị trường toàn cầu đối với chúng. Các cơ quan y tế, ngành công nghiệp dược phẩm có mối quan tâm là sự an toàn và chất lượng của nguyên liệu thảo dược và thành phẩm thảo dược. Sự an toàn và hiệu quả của thuốc thảo dược chủ yếu phụ thuộc vào chất lượng của chúng [73]. Để kiểm soát dược

liệu về chất lượng bên cạnh phương pháp định danh thực vật về hình thái, soi bột, xác định các thông số cảm quan, độ ẩm, độ tro, hàm lượng kim loại nặng, vi sinh... rất cần thêm các thông số định tính, định lượng về mặt hóa học. Muốn vậy, cần phải nghiên cứu xác định được các thành phần chính đặc trưng cho dược liệu và/ hoặc quyết định tác dụng của dược liệu. Các thành phần chính này được gọi là các chất đánh dấu (marker) của dược liệu. Theo Tổ chức Y tế thế giới, chất đánh dấu của dược liệu được xác định là thành phần về mặt hóa học của dược liệu ấy, có thể đóng góp hoặc không đóng góp cho dược liệu về mặt điều trị [73]. Tuy nhiên đối với nhiều chất, bằng chứng về hiệu quả điều trị lâm sàng không phải lúc nào cũng sẵn có cho dù chất ấy góp phần vào tác dụng điều trị của dược liệu nói chung.

Từ các đặc trưng và vai trò của chất đánh dấu, các tiêu chí để lựa chọn chất đánh dấu cho một dược liệu sẽ bao gồm [73,74]: (i) Là thành phần có hàm lượng đủ lớn trong dược liệu, có khả năng xác định định tính, định lượng bằng các phương pháp thông thường như TLC, HPTLC, HPLC, hoặc GC; (ii) Nếu là chất đánh dấu định lượng thì phải có tác dụng đặc trưng cho hướng điều trị của dược liệu; Nếu là chất đánh dấu định tính dược liệu thì phải đặc trưng cho dược liệu đó hoặc loài của dược liệu đó.

Số lượng dược liệu hiện nay rất lớn, nhưng những dược liệu đã được tìm ra chất đánh dấu và có chất đánh dấu được sử dụng để kiểm soát chất lượng là chưa nhiều [2, 3, 9,10]. Một số chất đánh dấu điển hình đang được sử dụng trong các dược điển [74 – 76], như: artemisinin dùng định tính và định lượng Thanh hao hoa vàng; acid ganoderic A dùng định tính và định lượng Nấm linh chi; silymarin dùng định tính và định lượng cao khế sữa; curcumin dùng định tính và định lượng Nghệ; notoginsenosid R₁, ginsenosid Rg₁, ginsenosid Rb₁ dùng định tính và định lượng Tam thất; ginsenosid Re, ginsenosid Rb₁ và ginsenosid Rg₁ dùng kiểm tra chất lượng dược liệu nhân sâm;....

Chất đánh dấu thường là thành phần hóa học chính và đại diện cho tác dụng sinh học chính của dược liệu nên nếu có phương pháp định tính, định lượng thích hợp, chất đánh dấu của dược liệu mang đến nhiều giá trị thực tiễn trong ứng dụng phát triển và kiểm soát chất lượng dược liệu cũng như sản xuất chế phẩm từ dược liệu, phát triển thuốc mới [77].

1.5. Tóm tắt các vấn đề đề tài luận án cần giải quyết

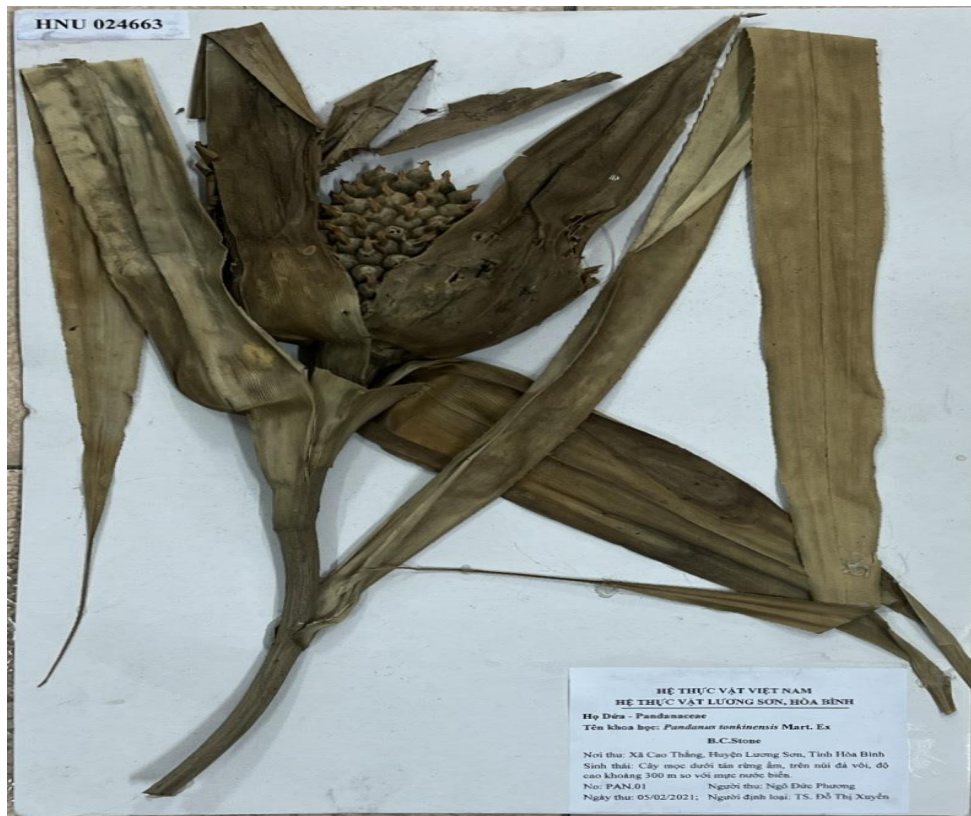
Theo nhóm tác giả thuộc chương trình Khoa học công nghệ phát triển bền vững vùng Tây bắc [4] thì dựa đại *Pandanus tonkinensis* Mart.ex B.Stone là vị thuốc chữa các chứng bệnh về gan như viêm gan, xơ gan tại một số tỉnh miền núi

phía Bắc với kết quả tốt về số ca chữa và có “hiệu quả”. Đã có nhiều công trình trong và ngoài nước nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng dược lí của một số loài thuộc chi *Pandanus*. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính của loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* để có minh chứng về tác dụng chữa gan như kinh nghiệm dân gian đang sử dụng; đồng thời nghiên cứu sâu về thành phần hóa học để xác định và định lượng chất đánh dấu nhằm kiểm soát dược liệu, sản phẩm bào chế. Đề tài sử dụng các phương pháp phân tích hóa lý sinh hiện đại để xác định cấu trúc các chất phân lập được từ quả và rễ loài *Pandanus tonkinensis*; sàng lọc hoạt tính sinh học các chất phân lập được bằng thử nghiệm *in vitro* đánh giá tính kháng viêm và chống oxy hóa; lựa chọn, tách chiết và tinh chế chất đánh dấu cho dược liệu, xây dựng quy trình phân tích định lượng các chất đánh dấu này.

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quả và rễ loài *Pandanus tonkinensis* được thu vào tháng 02 năm 2021 tại huyện Lương Sơn – Hòa Bình, Mường Lát – Thanh Hóa, Định Hóa – Thái Nguyên, Cẩm Thủy – Thanh Hóa. Tên khoa học được giám định bởi tiến sĩ Đỗ Thị Xuyên, bộ môn Thực vật, khoa Sinh học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên so sánh với mẫu tiêu bản (HNU 024663) được lưu giữ tại Bảo tàng sinh học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.



Hình 2.1. Mẫu tiêu bản quả *Pandanus tonkinensis* Mart. ex B. Stone

2.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, dụng cụ

Hóa chất

- Nước tinh khiết cho HPLC
- Silica gel 60 Merck cỡ hạt 0,040 – 0,063 mm.
- Nước cất
- Sulfuric acid (H_2SO_4)

- Các loại dung môi acetone (CH_3COCH_3), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyl acetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), *n*-hexane (Merck)
- Bản mỏng silica gel trắng sẵn TLC Silica gel Merck 60G F₂₅₄, RP₁₈ F_{254s}
- Silica gel pha đảo YMC (150 μm , FujiSilica Chemical Ltd.)
- Nhựa trao đổi ion loại Diaion HP-20 (Misubishi Chemical Industries Co., Ltd)
- Vật liệu nhồi LiChroprep RP₁₈ kích thước 40-63 μm (Merck, Đức)
- Trolox (Sigma Aldrich)
- Đệm phosphat hoặc đệm KCl, tricloacetic acid (TCA, Fisher)
- Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma Aldrich), FeSO_4 , H_2O_2
- Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (Eppendorf)
- Lipopolysaccharides (LPS) (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
 - Fetal bovine serum (FBS) (Gaithersburg, MD, USA)
 - Sodium nitrite
 - Sulfanilamide
 - N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride
 - Dimethyl sulphoxide (DMSO) của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Tế bào: RAW 264,7 (Đại học quốc gia Yang-Ming)

Dụng cụ

- Bình tam giác (các loại)
- Bình cầu (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)
- Ống nghiệm, ống mao quản
- Phễu chiết 5 lít
- Cột sắc ký thủy tinh dài 1m (Schott, Đức)
- Các loại pipet, ống hút chia độ, quả bóp
- Bình định mức (5 ml, 10 ml, 20 ml)
- Bình đựng dung môi (các loại)
- Bình chạy sắc ký bản mỏng
- Cột sắc ký (các loại)

2.2.2. Thiết bị nghiên cứu

- Cân phân tích Toledo Mettler (Thụy Sĩ)
- Tủ sấy chân không VO49 Memmert (Đức)

- Máy cô quay chân không Buchi Rotavapor R – 220 (Thụy sỹ)
- Máy cô quay chân không Eyela N –1200AV – WD (Nhật)
- Máy hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm.
- Máy sắc ký lỏng HPLC Agilent 1100HP ghép nối bộ dò mảng diode quang DAD (Mỹ)
- Máy sắc ký lỏng điều chế Pure C-850 (Buchi, Thụy sỹ)
- Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi fourier Impact 410 NICOLET
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD, 20 AB, Shimadzu, Nhật Bản
- Máy siêu âm Elma Elmasonic S 300H 28 lít (Đức)
- Máy hứng phân đoạn Fraction collector Eyela DC – 1500C (Nhật Bản)
- Máy đo khối phổ phân giải cao: SCIEX X500 Q – TOF LC/MS, Mỹ
- Máy đo sắc ký lỏng ghép nối khối phổ phân giải cao: HPLC 1290 infinity - 6530 Accurate mass QTOF LC/MS, Mỹ
- Máy đo sắc ký khí khối phổ ba tứ cực: QPMS – TQ8050NX Shimadzu, Nhật
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Bruker Avance NEO 600 MHz Spectrometer, Mỹ
- Máy đo phổ lưỡng sắc tròn: Chirascan CD spectrometer, Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK
- Máy đo phổ quay cực: JASCO P – 2000 polarimeter, Nhật Bản
- Máy đo phổ tử ngoại khả kiến UV – Vis, Shimadzu, Nhật Bản
- Máy đo máy đọc ELISA 96 giếng (Biotek)
- Phổ hồng ngoại FT – IR, Perkin Elmer, Mỹ

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Từ các mục tiêu đặt ra của luận án đã lựa chọn các phương pháp nghiên cứu sau:

2.3.1. Xử lý mẫu

Mẫu loài *Pandanus tonkinensis* (Mart. ex B. Stone) sau khi thu hái được chia thành hai bộ phận riêng biệt là quả và rễ. Thái lát, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 40 - 45⁰C, sau đó nghiền nhỏ thu bột dược liệu.

2.3.2. Chiết xuất dược liệu [78]

Sử dụng methanol làm dung môi để chiết dược liệu bột quả và bột rễ *Pandanus tonkinensis*. Sử dụng máy siêu âm để chiết dược liệu với tỷ lệ dược liệu -

dung môi là 1 : 3, không bật chế độ gia nhiệt. Chiết lặp lại 03 lần, gom dung dịch sau siêu âm để cô quay loại dung môi để thu được cao chiết methanol.

Cao chiết methanol được lần lượt chiết với hỗn hợp các dung môi như n-hexane - nước, dichloromethane - nước và ethyl acetate - nước và nước. Chiết 3 lần ở mỗi pha với tỉ lệ pha nước và pha dung môi hữu cơ là 1 : 1.

2.3.3. Phương pháp phân lập các hợp chất [78]

Cao chiết được ở các phân đoạn được phân lập và tinh chế trên các hệ sắc ký kết hợp pha thuận và pha đảo (gồm cả sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế). Các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

2.3.3.1. Sắc ký bản mỏng

Sử dụng bản mỏng Alufolien 60 F254 (0,25 mm, Merck), RP-18 F254s (0,25 mm, Merck) để thực hiện sắc ký bản mỏng (TLC). Để phát hiện chất bắt UV dùng đèn tử ngoại (bước sóng 254 nm và 365 nm). Để phát hiện vết dùng dung dịch sulfuric acid 10% làm thuốc thử phun đều lên bản mỏng rồi hơi nóng từ từ.

2.3.3.2. Sắc ký cột

Để tiến hành sắc ký cột (c.c) sử dụng các hạt silica gel có cỡ hạt là 0,040 - 0,063 mm (230 - 400 mesh) làm chất hấp phụ pha thuận, pha đảo sử dụng loại RP - 18 (30 - 50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.), Diaion HP-20 (Misubishi Chemical Industries Co., Ltd.).

Pha động cho hệ sắc ký pha thuận là hỗn hợp của các dung môi n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, acetone và nước ở các tỷ lệ thích hợp. Hệ sắc ký lỏng pha đảo dùng hệ dung môi là hỗn hợp nước với acetone hoặc methanol. Sử dụng máy hứng phân đoạn tự động DC-1500C EYELA (Tokyo Rikakikai, Nhật Bản) để gom các phân đoạn. Vết các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng TCL hoặc bằng thiết bị HPLC Shimadzu LC20 A detector PDA (Shimadzu, Nhật Bản) với điều kiện thử thích hợp.

2.3.3.3. Sắc ký lỏng điều chế

Sắc ký lỏng điều chế được thực hiện trên máy HPLC với cột sắc ký điều chế J'sphere ODS-H80 150 mm x 20 mm

2.3.4. Phương pháp xác định cấu trúc [79,80]

Trên cơ sở sử dụng các phương pháp đo phổ, các thông số vật lý đồng thời dựa vào sự phân tích và tra cứu tài liệu tham khảo để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất. Các phương pháp đo được sử dụng gồm có:

2.3.4.1. Phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao (HR-ESI-MS)

Sử dụng máy phân tích phổ khối phân giải cao QTOF LC/MS xác định ion phân tử ở chế độ ion hóa dương hoặc âm.

2.3.4.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

Sử dụng máy đo cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AM500 FT-NMR với chất nội chuẩn là Tetramethyl Silan. Các kỹ thuật đo phổ cộng hưởng từ sử dụng thực hiện luận án 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, COSY và NOESY
- Dung môi CD_3OD được dùng để hòa tan mẫu thử khi đo phổ.

2.3.4.3. Các phương pháp đo khác

Để hỗ trợ cho việc xác định cấu trúc các chất đã phân lập, một số tính chất khác của mẫu nghiên cứu được xác định bao gồm: Phổ lưỡng sắc tròn (CD), độ quay cực ($[\alpha]_D$), phổ hồng ngoại và phổ tử ngoại.

2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Các thực nghiệm được thực hiện tại Phòng Thử nghiệm sinh học – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

2.3.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid thông qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyde (MDA) là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào là MDA. Sử dụng acid thiobarbituric phản ứng với MDA để tạo thành phức có màu hồng ở bước sóng $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$.

Thực nghiệm được thực hiện theo các tài liệu [81,82] có thay đổi nhỏ cho phù hợp với phòng thí nghiệm. Quy trình cụ thể được trình bày tại phần phụ lục mục 29.

2.3.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm

a. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264,7

Gốc tự do nitric oxide được sản sinh ở nhiều loại tế bào khác nhau. Dạng NO sản sinh ở các tế bào như đại thực bào, nguyên bào sợi hay tế bào gan thường được sản sinh với lượng lớn khi xuất hiện các đáp ứng viêm. Vì vậy, việc xác định khả năng kháng viêm được đánh giá thông qua phương pháp xác định hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxit (NO) trên tế bào RAW264.7. Trong thực nghiệm này N^G -Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Thực nghiệm được thực hiện theo các tài liệu [83,84] có thay đổi nhỏ cho phù hợp với phòng thí nghiệm. Quy trình cụ thể được trình bày tại phần phụ lục mục 30.

b. Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT

Thực nghiệm được thực hiện theo các tài liệu [83,84] có thay đổi nhỏ cho phù hợp với phòng thí nghiệm. Quy trình cụ thể được trình bày tại phần phụ lục mục 31.

2.3.6. Phương pháp lựa chọn, chiết xuất- tinh chế chất đánh dấu, phân tích định lượng chất đánh dấu, xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng chất đánh dấu

2.3.6.1. Phương pháp lựa chọn chất đánh dấu [73,74]

Vì tiêu chí đầu tiên của các chất đánh dấu là có thể phân tích định lượng hàm lượng trong dược liệu/sản phẩm bào chế bằng các phương pháp thông thường như đo quang, sắc ký lỏng, sắc ký do vậy cần ưu tiên lựa chọn các chất có khối lượng tách cao. Dược liệu trước hết được chiết bằng dung môi methanol. Tiến hành phân tích sắc ký lỏng (HPLC-DAD) trong cùng điều kiện đối với dịch chiết dược liệu, các chất tinh khiết phân lập được từ dược liệu (chỉ lựa chọn một số chất có khối lượng tách cao). So sánh thời gian lưu của các pic thu được khi phân tích dược liệu và tín hiệu của các đơn chất, so sánh hình dạng phổ UV của các pic trong sắc ký đồ dược liệu và phổ UV của các đơn chất có thời gian lưu gần tương đương. Lựa chọn chất đánh dấu cho dược liệu dựa vào các kết quả trên, có thể sử dụng thêm kết quả hoạt tính sinh học của các đơn chất đã phân lập.

2.3.6.2. Phương pháp chiết xuất và tinh chế chất đánh dấu [78-80]

Tùy thuộc vào tính chất của chất đánh dấu đã lựa chọn, trước hết lựa chọn được dung môi thích hợp để chiết mẫu sau đó dùng thêm các dung môi/hệ dung môi với độ phân cực thay đổi để tách thành một số phân đoạn cao thô. Sơ bộ sử dụng phương pháp HPLC để phân tích thành phần các phân đoạn cao thô, so sánh định tính với sắc ký đồ phân tích chất chuẩn (của chất đánh dấu) để tìm phân đoạn cao thô chứa nhiều chất đánh dấu cho bước tách tiếp theo.

Tiếp tục sử dụng các kỹ thuật sắc ký cột, sắc ký lỏng điều chế để phân lập và tinh chế chất đánh dấu. Trong các bước này sử dụng phương pháp HPLC phân tích để kiểm tra độ tinh khiết của phân đoạn đã tách được. Phần dịch tinh chế cuối từ máy sắc ký lỏng điều chế được cô quay chân không loại dung môi, sấy cần trong tủ sấy chân không có P₂O₅ để thu được chất tinh khiết.

2.3.6.3. Phương pháp xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất đánh dấu

Sau khi đã chiết xuất, tinh chế chất đánh dấu đã lựa chọn, cần xác định một số dữ liệu đặc trưng cho cấu trúc của chúng bao gồm: Phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ hấp thụ UV, phổ hồng ngoại. Bộ dữ liệu này là cơ sở để nhận dạng, khẳng định cấu trúc chất đánh dấu đã được chiết tách.

2.3.6.4. Phương pháp phân tích định lượng chất đánh dấu trong dược liệu [80]

Phương pháp sắc ký khí: Trong phương pháp sắc ký khí, mẫu được tiêm vào cổng bơm của thiết bị sắc kí, được làm bay hơi tại cổng bơm, sau đó được dòng khí mang (có thể là He, Ni, không khí...) dẫn qua cột tách, tại đây do tương tác khác nhau của các chất trong pha động với pha tĩnh tẩm cột, các chất khác nhau trong mẫu sẽ được rửa giải ra khỏi cột tại các thời gian lưu khác nhau và được nhận biết định lượng bằng các detector. Các detector sử dụng cho sắc ký khí là detector dẫn nhiệt, detector ion hoá ngọn lửa, detector cộng kết điện tử, detector ion hoá nhiệt, detector quang hoá ngọn lửa và detector khối phổ. Trong đó detector khối phổ hoạt động trên nguyên lý xác định cấu trúc của các chất cần phân tích và nhận biết các chất dựa vào các mảnh ion đặc trưng là detector cho giới hạn phát hiện thấp nhất. Với sắc ký khí khối phổ, bên cạnh thông tin về thời gian lưu để phân biệt các chất, các mảnh ion đặc trưng chính là thông tin để xác nhận về cấu trúc của chất cần phân tích khi so sánh với thư viện phổ [79, 80]. Trong các thảo dược tồn tại nhiều thành phần, trong đó có thành phần rất dễ bay hơi – ví dụ các tinh dầu. Sự có mặt và tỷ lệ hàm lượng của các thành phần rất dễ bay hơi này có thể đặc trưng cho các loài thảo dược, và đó chính là cơ sở để xây dựng sắc ký vân tay với các thảo dược khi sử dụng phương pháp phân tích sắc ký khí [78].

Phương pháp sắc ký lỏng: Khác với sắc ký khí, sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao có thể phân tích hầu hết các hợp chất thiên nhiên trong thảo dược mà không bị hạn chế bởi khả năng bay hơi của chất phân tích. Tùy theo tính chất các chất cần phân tích có thể sử dụng detector quang UV-Vis, detector huỳnh quang hoặc detector tán xạ ánh sáng. Hiện nay, các kỹ thuật ghép nối sắc ký lỏng đã được phát triển với các detector khác nhau như DAD, UV-MS/MS, NMR nhằm nâng cao hiệu quả tách và phân tích định tính, định lượng và cả cấu trúc. Để tiến hành phân tích, mẫu được chiết bằng dung môi hữu cơ, làm sạch bằng và làm giàu, sau đó dịch chiết cuối được chuyển hòa tan trong dịch pha động tiêm vào hệ thống sắc ký lỏng để tách và định tính, định lượng. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao là một

công cụ phân tích được sử dụng phổ biến nhất trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu về các hợp chất thiên nhiên hiện nay [78].

2.3.6.5. Phương pháp xác định độ tinh khiết của chất đánh dấu đã chiết tách được [78]

Nếu có chất chuẩn thương mại cho chất đánh dấu có thể xác định độ tinh khiết của chất đánh dấu đã chiết tách được thông qua việc phân tích và so sánh với chất chuẩn thương mại.

Trong trường hợp không có sẵn chất chuẩn thương mại, có thể dùng phương pháp sắc ký lỏng phân tích chất đánh dấu đã chiết tách, độ tinh khiết được xác định bằng phần trăm diện tích tín hiệu chính (được coi là của chất đánh dấu) với tổng diện tích các tín hiệu xuất hiện trên sắc ký đồ (được coi là của chất đánh dấu và các tạp chất).

2.3.6.6. Phương pháp xây dựng và thẩm định quy trình HPLC phân tích định lượng chất đánh dấu

Trên cơ sở các khảo sát sơ bộ từ bước tách chiết, tinh chế chất đánh dấu, phổ hấp thụ tử ngoại của hai chất này có thể lựa chọn điều kiện sắc ký để phân tích sắc ký, bước xử lý mẫu trước khi phân tích cần khảo sát thành phần dung môi chiết và số lần chiết thích hợp. Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của Cục dược phẩm và thực phẩm Mỹ (USFDA), Hiệp hội các tổ chức hoá học phân tích chính thống (AOAC) [85], Dược điển Mỹ (USP) và Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH) [86] bao gồm: tính đặc hiệu, độ phù hợp hệ thống, đường chuẩn, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

2.3.7. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft-Excel với công cụ Data Analysis để phân tích thống kê các số liệu: tính toán các đại lượng thống kê mô tả (trung bình số học, độ lệch chuẩn, biên giới tin cậy 95%); phân tích hồi quy tuyến tính... Các kết quả phân tích lập được trình bày dạng Trung bình (TB) \pm sai số (SE). Các thuật toán thống kê Student's *t*-test, F'test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA) được sử dụng để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa, với $P < 0.05$ được coi là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê sinh học.

2.4. Phân lập các hợp chất

2.4.1. Phân lập các hợp chất từ quả loài Pandanus tonkinensis

Thái lát quả dứa dại *Pandanus tonkinensis* đem phơi khô rồi nghiền mịn thu được bột khô. Lấy 9,6 kg bột khô ngâm chiết siêu âm với methanol (3 lần X 30 l,

mỗi lần 3h). Gom các dịch chiết lại, lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được 250,0 mg cao methanol (PT). Hòa tan cao bằng 2 lít nước cất sau đó tiến hành chiết lần lượt với các dung môi dichloromethane và ethyl acetate, loại bỏ dung môi bằng máy cô quay dưới áp suất giảm thu được các phân đoạn dichloromethane (PTD, 210 g), ethyl acetate (PTE, 5,0 g) và cao chiết nước (PTW, 25,0 g). Gộp hai phân đoạn PTD và PTE được PTS. Cao chiết PTS (215,0 g) được hòa tan với một lượng tối thiểu dichloromethane sau đó tẩm với 430,0 gam silica gel, chưng cất cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách hỗn hợp này bằng cột silica gel thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi với độ phân cực tăng dần (hexane/acetone: 100/0, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, v/v), (dichloromethane/methanol: 100/0, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 100/0, v/v) thu được 10 phân đoạn PTS1 - PTS10. Qua kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng nhận thấy hai phân đoạn PTS6 và PTS7 có chứa các chất chính giống nhau nên gộp hai phân đoạn PTS6 và PTS7 (12,462 g) để tiếp tục tách. Phân đoạn PTS6 - S7 được phân tách bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi acetone/ nước (1/1,5, v/v) thu được 6 phân đoạn PT2A - PT2F. Phân đoạn PT2A được tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải (dichloromethane/ methanol: 50/1, 35/1, 15/1, 10/1, v/v) thu được sáu phân đoạn PT3A - PT3G.

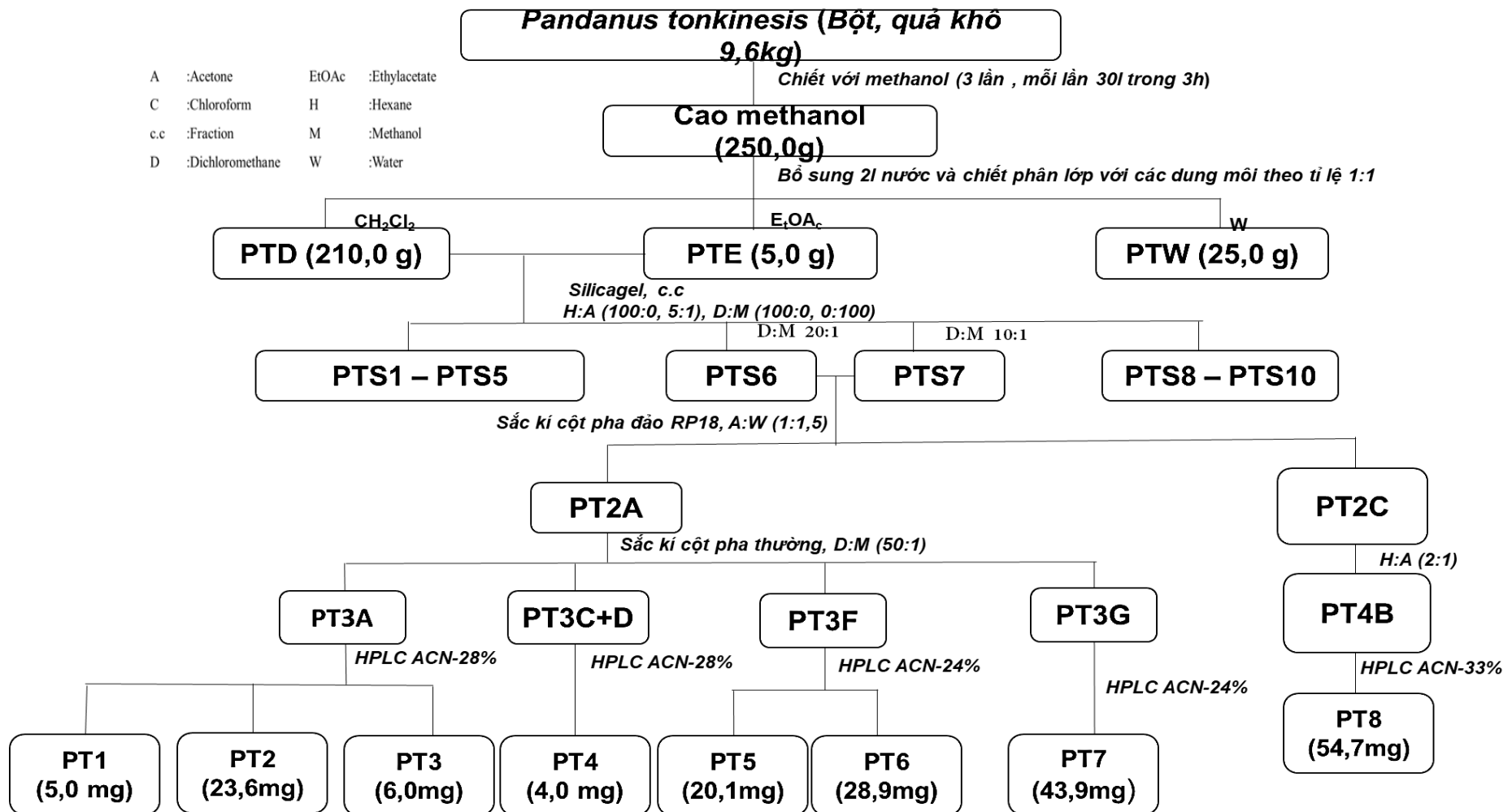
Phân đoạn PT3A (87,4 mg) tiến hành tách bằng sắc ký lỏng điều chế với cột j-sphere H-80 (150 x 20 mm), điều kiện dung môi là 28% acetonitrile, tốc độ dòng 2,5 mL / phút lần lượt thu được các hợp chất **PT1** (5,0 mg, $t_R = 51$ phút); **PT2** (23,6 mg, 57 phút); **PT3** (6,0 mg, 63 phút).

Gộp 2 phân đoạn PT3C và PT3D (57,5mg) sử dụng hệ thống HPLC với cột j-sphere H-80 (150 x 20 mm), điều kiện dung môi là 28% acetonitrile, tốc độ dòng 2,5 mL / phút thu được hợp chất **PT4** (4,8 mg, $t_R = 58,7$ phút).

Phân đoạn PT3F tiến hành tách bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột j-sphere H-80 (150 x 20 mm), điều kiện dung môi là 24% acetonitrile, tốc độ dòng 2,5 mL / phút, lần lượt thu được các hợp chất **PT5** (20,1 mg, $t_R = 50,8$ phút) và **PT6** (28,9 mg, $t_R = 64,166$ phút).

Tách phân đoạn PT3G (125,8 mg) sử dụng hệ thống HPLC với cột j-sphere H-80 (150 x 20 mm), điều kiện dung môi là 24% acetonitrile, tốc độ dòng 2,5 mL / phút thu được hợp chất **PT7** (43,9 mg, $t_R = 53,166$ phút).

Phân đoạn PT2C được tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải hexane/ acetone 2:1 thu được 3 phân đoạn PT4A; PT4B; PT4C. Phân đoạn PT4B tách bằng sắc ký lỏng điều chế với cột j-sphere H-80 (150 x 20 mm), điều kiện dung môi là 33% acetonitrile thu được hợp chất **PT8** (54,7 mg, $t_R = 48,9$ phút).



Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ quả *Pandanus tonkinensis*

2.4.2. Phân lập các hợp chất từ rễ loài *Pandanus tonkinensis*

Thái nhỏ rễ *Pandanus tonkinensis* đem phơi khô rồi nghiền mịn thu được bột khô. Lấy 14 kg bột ngâm chiết với methanol (3 lần x 30 L) (mỗi lần 3 giờ). Gom các dịch chiết, lọc bằng giấy lọc sau đó chưng cất thu hồi dung môi thu được 40,0 g cao chiết methanol. Hòa tan cao chiết vào 2 lít nước cất và tiến hành chiết lần lượt với các dung môi n-hexane, dichloromethane và ethyl acetate, cô quay dưới áp suất giảm thu được các phân đoạn n-hexane (PTH, 2,5 g), dichloromethane (PTD, 3,7 g), ethyl acetate (PTE, 5,3 g) và cao chiết nước (PTW, 27 g). PTW này cho chạy qua cột Diaion (LH-20) rửa giải bằng nước để loại bỏ đường, sau đó với nồng độ tăng dần của methanol trong nước (25; 50 và 100%) thu được 3 phân đoạn PT4A (2,4 g), PT4B (2,6 g), PT4C (29 g).

Tiến hành phân tách PT4C bằng cột silica gel thường, rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol với độ phân cực tăng dần (dichloromethane/methanol 1:0 tới 0:1 v/v) thu được 5 phân đoạn PT4C1 (11,0 g), PT4C2 (3,0 g), PT4C3 (8,5 g), PT4C4 (4,5 g), PT4C5 (1,5g). Gộp hai phân đoạn PT4C1 và PT4C2 được phân đoạn PT4C6 (14,0 g). Phân đoạn PT4C6 tiến hành sắc ký pha đảo rửa giải bằng (axeton/ nước, 1/3, v/v) thu được 7 phân đoạn PT5A - PT5G. Phân đoạn PT5C (1,405 g) được phân tách trên cột silica gel thường với dung môi rửa giải là dichloromethane/methanol (7/1, v/v) thu được 6 phân đoạn từ PT6A - PT6F. Phân đoạn PT6A (83mg) sử dụng sắc ký lỏng điều chế với cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi acetonitrile 15% tốc độ dòng 2,5 mL / phút) thu được các hợp chất **PT9** (7,5 mg, $t_R = 23,364$ phút), **PT10** (2,7 mg, $t_R = 30,689$ phút), **PT11** (20,2 mg, $t_R = 35,024$ phút). Hợp chất **PT12** (5,9 mg, $t_R = 46,912$ phút) thu được từ phân PT6C (72 mg) trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 13% acetonitrile. Tách phân đoạn PT6D (172,6 mg) sử dụng HPLC với cột J - sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi acetonitrile 13% tốc độ dòng 2,5 mL / phút) thu được các hợp chất **PT13** (17,1 mg, $t_R = 33,4$ phút), **PT14** (36 mg, $t_R = 37,5$ phút), **PT15** (12,3 mg, $t_R = 48,2$ phút), **PT16** (5,3 mg, $t_R = 56,6$ phút), **PT17** (11,4 mg, $t_R = 58,4$ phút). Hợp chất **PT18** (16,4 mg, $t_R = 40,158$ phút) thu được từ phân PT6E (151,3 mg) trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 15% acetonitrile.

Phân đoạn PT5F (1,423 g) được phân tách trên cột silica gel thường với dung môi rửa giải là dichloromethane/methanol (10/1, v/v) thu được 7 phân đoạn từ PT7A- PT7G. Phân đoạn PT7A (93,9 mg) sử dụng HPLC với cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi acetonitrile 20% tốc độ dòng 2,5 mL / phút) thu

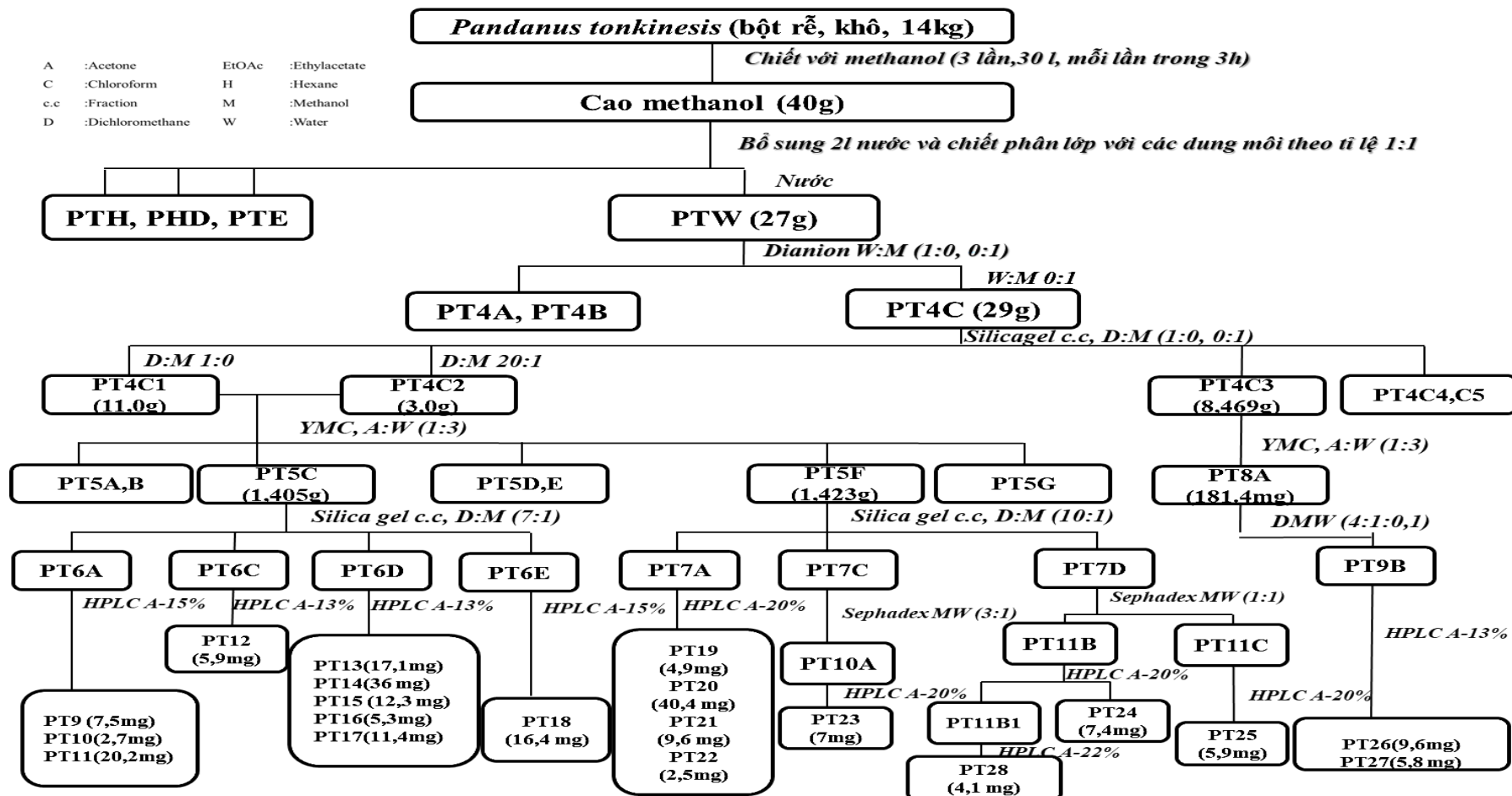
được các hợp chất **PT19** (4,9 mg, $t_R = 48,319$ phút), **PT20** (40,4 mg, $t_R = 50,933$ phút), **PT21** (9,6 mg, $t_R = 53,606$ phút), **PT22** (2,5 mg, $t_R = 57,438$ phút)

Phân đoạn PT7C (134,5 mg) chạy sephadex với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (3/1, v/v) thu được phân đoạn PT10A. Hợp chất **PT23** (7,0 mg, $t_R = 42,854$ phút) thu được từ phần PT10A (44,7 mg) trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 20% acetonitrile.

Phân đoạn PT7D (88 mg) chạy sephadex với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1, v/v) thu được 3 phân đoạn PT11A - PT11C. Phân đoạn PT11B1 và hợp chất **PT24** (7,4 mg, $t_R = 36,155$ phút) thu được từ phần PT11B (123 mg) trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 20% acetonitrile. Hợp chất **PT28** (4,1 mg, $t_R = 24,6$ phút) thu được từ phần PT11B1B trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 22% acetonitrile.

Hợp chất **PT25** (5,9 mg, $t_R = 42,958$ phút) thu được từ phần PT11C (60,2 mg) trên cột J - sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 20% acetonitrile.

Phân đoạn PT4C3 (8,469 g) được chạy YMC rửa giải bằng (axeton/ nước, 1/3, v/v) thu được 7 phân đoạn PT8A- PT8G. Phân đoạn PT8A được phân tách trên cột silica gel thường với dung môi rửa giải là dichloromethane/methanol/nước (4/1/0,1, v/v/v) thu được 2 phân đoạn PT9A và PT9B. Các hợp chất **PT26** (9,6 mg, $t_R = 27,0$ phút) và **PT27** (5,8 mg, $t_R = 33,2$ phút) thu được từ phần PT9B (57,6 mg) trên cột J-sphere H-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi là 20% acetonitrile.



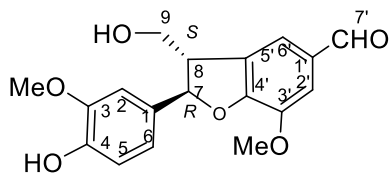
Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ rễ *Pandanus tonkinensis*

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

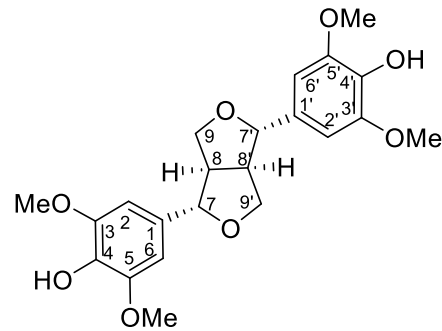
3.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ quả và rễ loài *Pandanus tonkinensis*

3.1.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ quả loài *Pandanus tonkinensis*

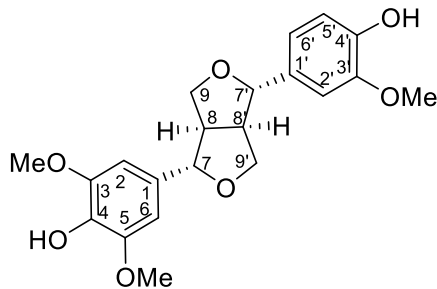
Từ quả *Pandanus tonkinensis* đã phân lập được 8 hợp chất tinh khiết. Dựa vào các thông số vật lý, dữ liệu phổ và tài liệu tham khảo [87– 94] biện giải cấu trúc xác định được 8 hợp chất phân lập được từ quả gồm: ficusal (**PT1**), syringaresinol (**PT2**), medioresinol (**PT3**), lariciresinol (**PT4**), secoisolariciresinol (**PT5**), vladinol F (**PT6**), luteoliflavan (**PT7**), isorhapontigenin (**PT8**). Các hợp chất phân lập được gồm 4 hợp chất lignan, 2 hợp chất thuộc nhóm neo - lignan, 1 hợp chất thuộc nhóm flavan và 1 hợp chất polyphenol. Biện luận cấu trúc, bảng số liệu và phổ các hợp chất **PT1 - PT8** được trình bày ở phần phụ lục hợp chất **PT1 -** phụ lục hợp chất **PT8**.



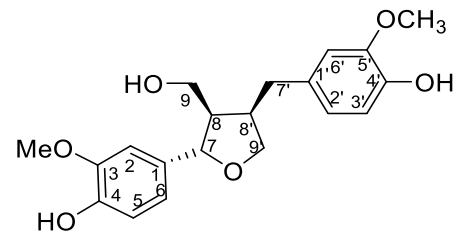
PT1 - ficusal



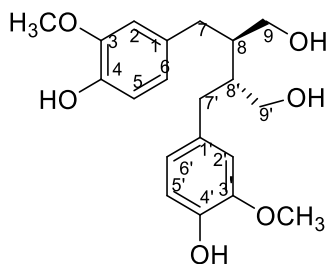
PT2 - syringaresinol



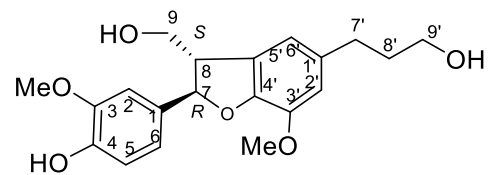
PT3 - medioresinol



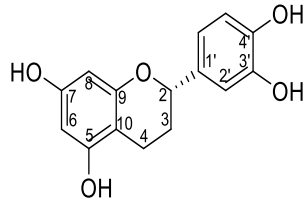
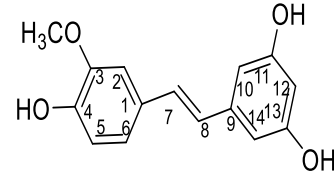
PT4 - lariciresinol



PT5 - secoisolariciresinol



PT6 - vladinol F

**PT7** - luteoliflavan**PT8** - isorhapontigenin

Hình 3.1. Cấu trúc hóa học các hợp chất được phân lập từ quả *Pandanus tonkinensis*

3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ rễ loài *Pandanus tonkinensis*

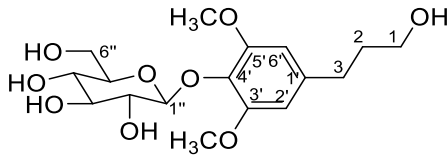
Từ rễ *Pandanus tonkinensis* đã phân lập được 20 hợp chất. Dựa vào các thông số vật lý, dữ liệu phổ và tài liệu tham khảo [95 – 114] biện giải cấu trúc xác định được 20 hợp chất phân lập từ rễ, trong đó có 3 hợp chất mới và 17 hợp chất đã biết.

3 hợp chất mới gồm: (7*S*)-2,6-dimethoxyphenyl-7-propanol-1-*O*- β -D-glucopyranoside (**PT10**), *trans*-cinnamyl alcohol 9-*O*-(6'-*O*- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucopyranoside (**PT25**), 4-(3-hydroxypropyl)-2,6-dimethoxyphenol- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**PT26**).

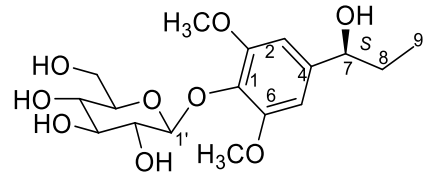
17 hợp chất đã biết bao gồm: dihydrosyringin (**PT9**), (6*S*,9*S*)-roseoside (**PT11**), 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-2-{2,6-dimethoxy-4-[1-(*E*)-propen-3-ol]phenoxy}propan-3-ol (**PT12**), 1-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2-methoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol (**PT13**), benzyl *O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**PT14**), 1-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol (**PT15**), (7*R*,8*R*)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-*O*-4'-neolignan-4-*O*- β -D-glucopyranoside (**PT16**), (7*S*,8*S*)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-*O*-4'-neolignan-4-*O*- β -D-glucopyranoside (**PT17**), pinoresinol-4,4'-di-*O*- β -D-glucoside (**PT18**), isoeucommin A (**PT19**), pinoresinol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**PT20**), acanthoside B (**PT21**), eucommin A (**PT22**), rourinoside (**PT23**), (7*S*,8*R*)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (**PT24**), kelampayoside A (**PT27**), urolignoside (**PT28**).

Các chất phân lập được chủ yếu thuộc dạng hợp chất phenylpropanoic glycoside (10 chất). Ngoài ra còn có 5 hợp chất neo - lignan, 2 hợp chất neo - lignan glycoside, 1 hợp chất megastigmane glycoside, 1 hợp chất phenolic glycoside, 1 hợp chất benzyl- β -D-glucorapyranoside. Biện luận cấu trúc, bảng số liệu và phổ các hợp chất đã biết bao gồm **PT9**, **PT11** - **PT24**, **PT27**, **PT28** được trình bày ở phần phụ lục hợp chất **PT9**, **PT11** - **PT24**, **PT27**, **PT28** còn đối với các hợp chất mới

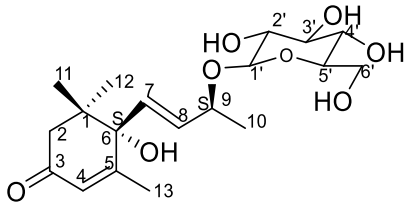
PT10, **PT25** và **PT26** được trình bày ở mục 3.1.4.1 - 3.1.4.3 dưới đây.



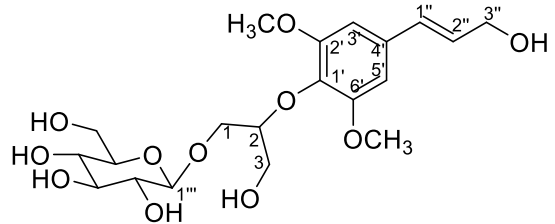
PT9 - dihydrosyringin



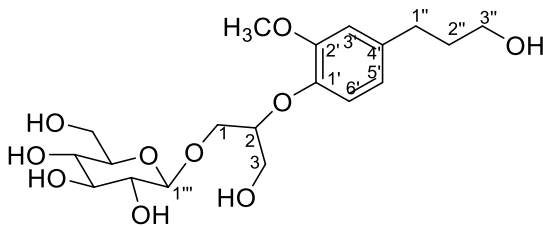
PT10 - (7*S*)-2,6-dimethoxyphenyl-7-propanol-1-*O*- β -D-glucopyranoside



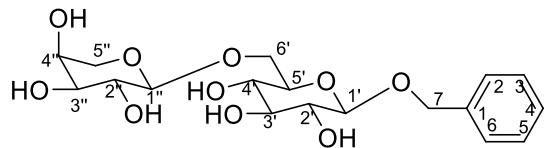
PT11 - (6*S*,9*S*)-roseoside



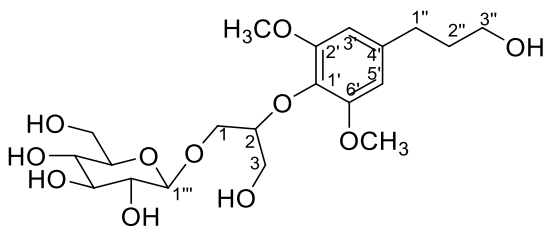
PT12 - 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-2-{2,6-dimethoxy-4-[1-(*E*)-propen-3-ol]phenoxy}propan-3-ol



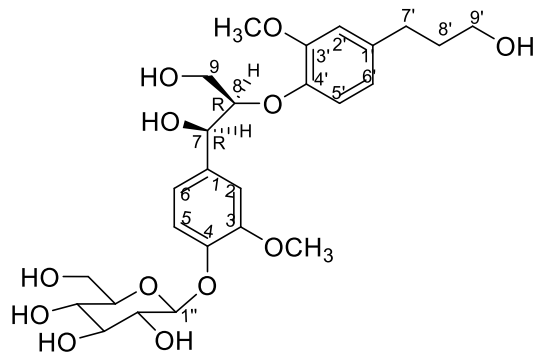
PT13 - 1-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2-methoxy-4-(ω -hydroxypropyl)phenoxy]-propan-3-ol



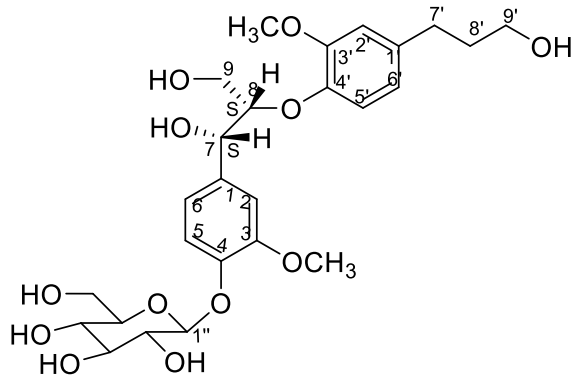
PT14 - benzyl *O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside



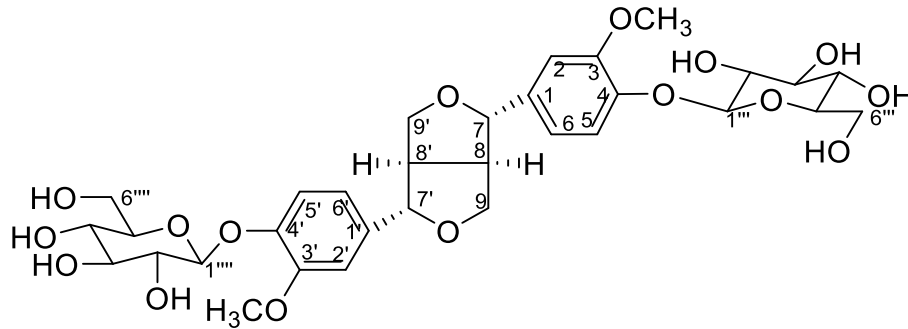
PT15 - 1-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)phenoxy]-propan-3-ol



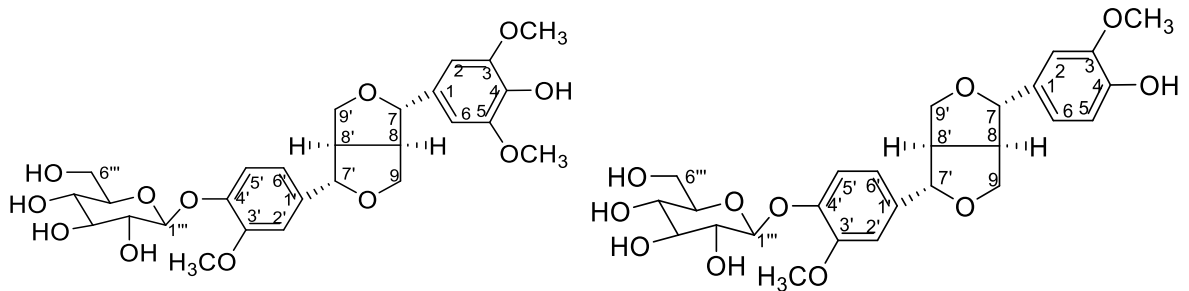
PT16 - (7*R*,8*R*)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-*O*-4'-neolignan-4-*O*- β -D-glucopyranoside



PT17 - (7*S*,8*S*)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside

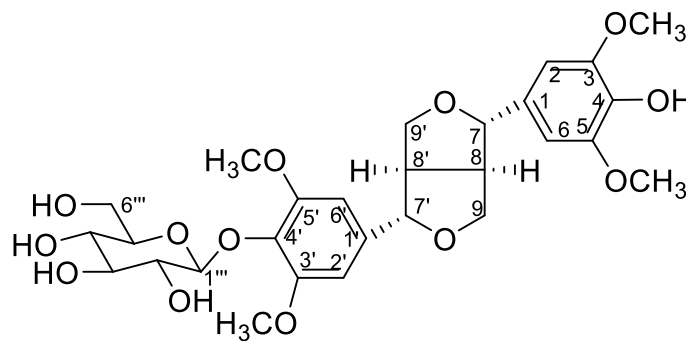


PT18 - pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucoside

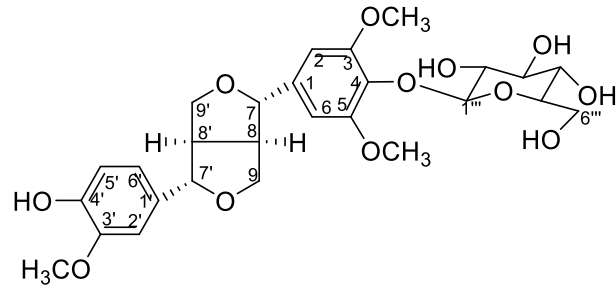


PT19 - isoeucommin A

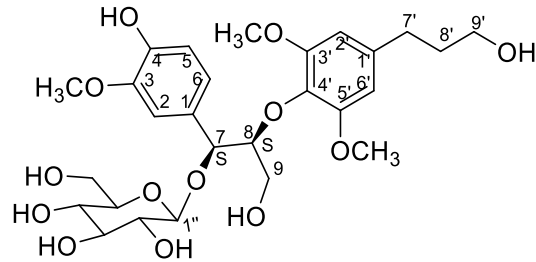
PT20 - pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside



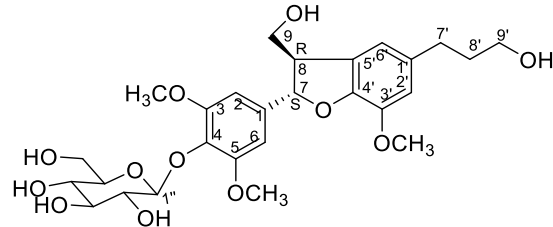
PT21 - acanthoside B



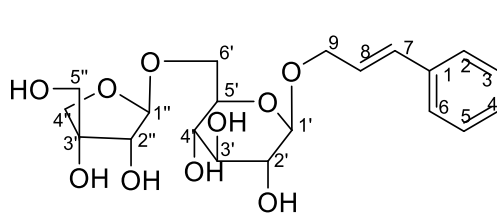
PT22 - eucommin A



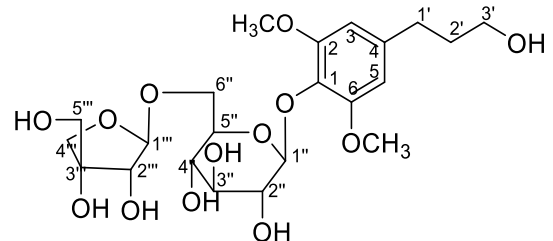
PT23 - rourinoside



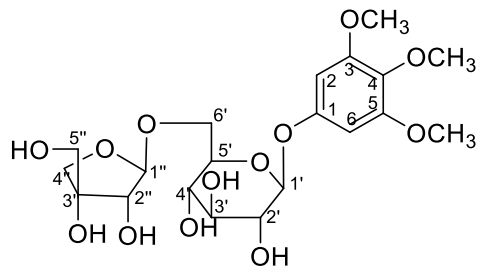
PT24 - (7*S*,8*R*)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4- β -D-glucopyranoside



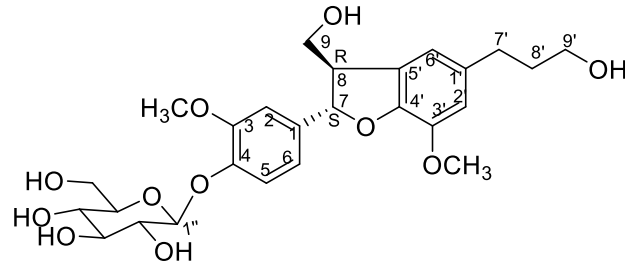
PT25 - *trans*-cinnamyl alcohol 9-O-(6'-O- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucopyranoside



PT26 - 4-(3-hydroxypropyl)-2,6-dimethoxyphenol- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside



PT27 - kelampayoside A



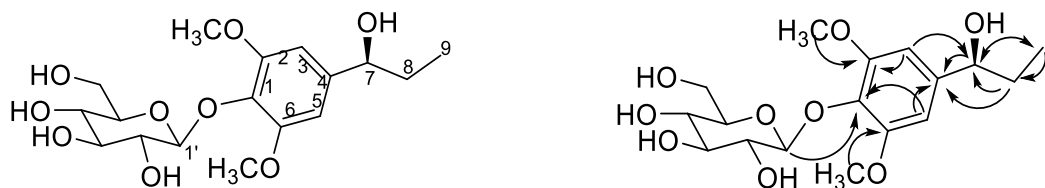
PT28 - urolignoside

Hình 3.2. Cấu trúc hóa học các hợp chất được phân lập từ rễ *Pandanus tonkinensis*

3.1.2.1. Hợp chất **PT10**

* *Tính chất và thông số phổ*

- Bột vô định hình không màu
- Công thức phân tử $C_{17}H_{26}O_9$ ($M = 374$)
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +9,0^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} : 3428, 2935, 1650, 1078 cm^{-1}
- Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PT10** xuất hiện pic ion m/z 397,1470 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{26}O_9Na = 397,1469$, $\Delta = +0,2$ ppm; và pic m/z 392,1910 $[M+NH_4]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{26}O_9NH_4 = 392,1915$, $\Delta = -1,2$ ppm.
- Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 3.1
- Phổ CD: $\Delta = -210$ nm
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H -NMR và ^{13}C -NMR, HMBC, HSQC, CD: Xem phụ lục 10.1 – 10.6



Hình 3.3. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT10**

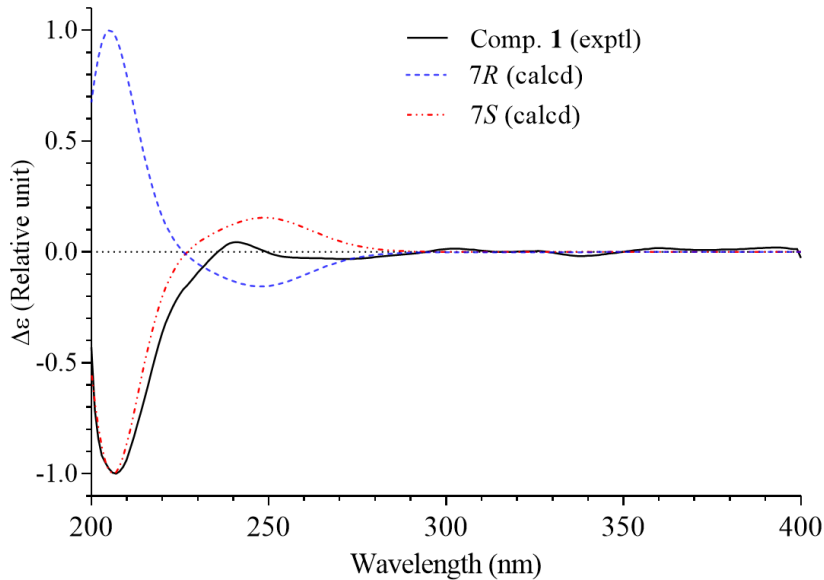
* *Biện giải cấu trúc*

Hợp chất **PT10** được phân lập ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Hợp chất **PT10** có công thức phân tử là $C_{17}H_{26}O_9$ được xác định dựa vào phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 397,1470 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{17}H_{26}O_9Na = 397,1469$, $\Delta = +0,2$ ppm) và pic m/z 392,1910 $[M+NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{17}H_{26}O_9NH_4 = 392,1915$, $\Delta = -1,2$ ppm).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **PT10** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_{H} 6,71 có cường độ tích phân tương ứng với 2 proton cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế 2,6 đối xứng. Cộng thêm tín hiệu singlet của hai nhóm methoxy đối xứng được nhận biết tại δ_{H} 3,89 (6H) có thể gợi ý là hai nhóm methoxy này trực tiếp gắn vào vòng thơm để tạo ra tính đối xứng trục bậc 2 của vòng thơm. Ngoài ra, phổ $^1\text{H-NMR}$ còn xuất hiện tín hiệu của một nhóm methyl doublet tại δ_{H} 0,94 (3H, d, $J = 7,2$ Hz) chứng tỏ bên cạnh nhóm methyl này phải là một nhóm CH_2 . Nhóm CH_2 này cũng được nhận biết tại δ_{H} 1,76 (2H, m), cùng với tín hiệu doublet của một proton oximethine tại δ_{H} 4,51 (1H, t, $J = 7,2$ Hz). Kết quả phân tích chi tiết các tương tác của các proton nêu trên bao gồm độ dịch chuyển hóa học, dạng pic, hằng số tương tác J cho thấy sự có mặt của một nhánh $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$. Tín hiệu tại δ_{H} 4,85 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) của một proton anome gợi ý sự có mặt của một phân tử đường glucose. Điều này hoàn toàn phù hợp với sự có mặt của một nhóm 6 proton trong vùng cộng hưởng δ_{H} 3,22-3,79. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ và HSQC của hợp chất **PT10** cho thấy tín hiệu của 17 nguyên tử carbon, bao gồm 4 nguyên tử không proton, 8 methines, 2 methylenes và 3 methyls. 4 tín hiệu C của vòng thơm được nhận ra tại δ_{C} 154,1; 143,4; 135,3; 105,0 trong đó hai tín hiệu tại δ_{C} 154,1 và δ_{C} 105,0 có cường độ cao gấp đôi bình thường do vòng thơm có tính đối xứng, hai nhóm methoxy tại δ_{C} 57,0; 6 tín hiệu của đường glucose tại δ_{C} 105,6; 75,8; 77,8; 71,4; 78,3; 62,6 nhánh propan gồm 3 carbon tại δ_{C} 76,6; 30,0 và 10,6 trong đó carbon CH tại δ_{C} 76,6 được khẳng định đã nối với nguyên tử oxy và tín hiệu ở vùng trường mạnh δ_{C} 10,6 thuộc về nhóm methyl. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton gắn với C trực tiếp được xác định bằng phổ HSQC.

Vị trí của các nhóm thế gắn vào vòng thơm được khẳng định bằng phổ HMBC. Trên phổ HMBC, tương tác của proton anome (H-1', δ_{H} 4.85) tương quan đến C-4 (δ_{C} 135,3), hai nhóm methoxy được gắn vào C-3 và C-5 do các proton methoxy có tương tác HMBC rất mạnh với C-3/C-5. Cuối cùng, nhánh $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$ được chứng minh là nối vào C-1 của vòng thơm do có tương tác HMBC giữa H2-8 (δ_{H} 1,76) với C-1 và giữa H-7 (δ_{H} 4,51) với C-1 và C-2/C-6 và glucozo gắn với C-4. Hơn nữa, hằng số ghép nối của proton anomeric, $J_{\text{H-1}' / \text{H-2}'}$ = 7,8 Hz, chỉ ra liên kết $\beta\text{-D-glucopyranosyl}$. Sau đó, sự hiện diện của D-glucose được xác định bằng cách thủy phân bằng axit, xử lý bằng cysteine methyl ester và O-tolyl isothiocyanate và tiếp theo là phân tích HPLC để so sánh các giá trị t_{R} với giá trị của D / L-glucose. Các giá trị phổ NMR của hợp chất này hoàn toàn phù hợp với các dữ kiện đã công bố cho hợp chất (7R)-2,6-dimethoxyphenyl-7- propanol-1-O- $\beta\text{-D-glucopyranoside}$ [96].

Tuy nhiên, độ quay cực riêng của hợp chất (7*R*)-2,6-dimethoxyphenyl-7-propanol-1-*O*- β -D-glucopyranoside là $[\alpha_D]^{23} = -10,0^\circ$, trong khi độ quay cực riêng của hợp chất **PT10** là $[\alpha_D]^{23} = +9,0^\circ$. Điều này gợi ý cấu hình **PT10** sẽ là 7*S*.



Hình 3.4. Phổ ECD được tính toán lý thuyết của 2 đồng phân lập thể có thể có và CD thử nghiệm cho hợp chất **PT10**

Dự đoán này đã được chứng minh bằng phổ CD lý thuyết và tính toán. Hai cấu hình có thể có 7*S*/7*R* của **PT10** đã được tính toán phổ ECD lý thuyết của chúng và so sánh với kết quả thực nghiệm. Phân tích CD thử nghiệm của **PT10** phù hợp với cấu hình 7*S*. Kết quả nêu trên đã khẳng định hợp chất **PT10** là (7*S*)-2,6-dimethoxyphenyl-7-propanol-1-*O*- β -D-glucopyranoside, đây là một hợp chất mới.

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất mới **PT10** và chất so sánh (7*R*)-2,6-dimethoxyphenyl-7- propanol-1-O- β -D-glucopyranoside

C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	143,46(+5,9)	143,4	-
2	104,80	105,0	6,71 (1H, s)
3	153,61(+4,6)	154,1	-
4	134,90 (-1,6)	135,3	-
5	153,61(+4,6)	154,1	-
6	104,80	105,0	6,71 (1H, s)
7	75,08	76,6	4,51 (1H, t, 7,2)
8	33,18	30,0	1,76 (2H, m)
9	10,81	10,6	0,94 (3H, d, 7,2)
1'	105,25	105,6	4,85 (1H, d, 7,8)
2'	76,10	75,8	3,50 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'	78,37	77,8	3,43 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'	71,58	71,4	3,44 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'	78,67	78,3	3,22 (1H, m)
6'	62,61	62,6	3,68 (1H, dd, 12,0, 5,0) 3,79 (1H, dd, 12,0, 5,0)
2 x OCH ₃	56,57	57,0	3,89 (6H, s)

^{a)}CD₃OD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz; # δ_C của (7*R*)-2,6-dimethoxyphenyl-7- propanol-1-O- β -D-glucopyranoside [96].

3.1.2.2. Hợp chất **PT25**

* Tính chất và thông số phổ

- Bột vô định hình không màu

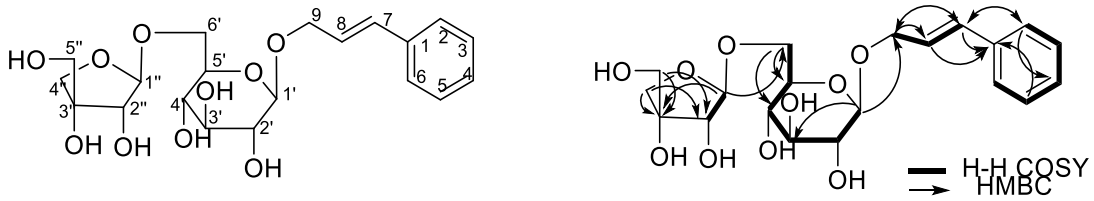
- Công thức phân tử C₂₀H₂₈O₁₀ (M = 428)

- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +5,8^0$ (c = 0,1, MeOH); UV(MeOH) λ_{max} 230, 250 nm; IR(KBr): ν_{max} 3287, 2926, 1556, 1061 cm⁻¹

- Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PT25** với sự xuất hiện các pic ion m/z 446,2030 [M+NH₄]⁺, [C₂₀H₂₈O₁₀NH₄]⁺ 446,2021, $\Delta = +2,0$ ppm; m/z 451,1576 [M+Na]⁺, [C₂₀H₂₈O₁₀Na]⁺ 451,1575, $\Delta = +0,2$ ppm.

- Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR: Xem Bảng 3.2

- Các phổ HR-ESI-MS, ¹H-NMR và ¹³C-NMR, HMBC, HSQC, COSY, NOESY: Xem phụ lục 25.1 – 25.6.



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT25**

* *Biện giải cấu trúc*

Hợp chất **PT25** thu được ở dạng chất bột, vô định hình không màu. Hợp chất **PT25** có công thức phân tử $C_{20}H_{28}O_{10}$, $M = 428$ được xác định thông qua phổ khối lượng phân giải cao HR - ESI - MS, với sự xuất hiện các pic ion m/z 446,2030 $[M+NH_4]^+$, $[C_{20}H_{28}O_{10}NH_4]^+$ 446,2021, $\Delta = + 2,0$ ppm; m/z 451,1576 $[M+Na]^+$, $[C_{20}H_{28}O_{10}Na]^+$ 451,1575, $\Delta = + 0,2$ ppm.

Phổ 1H NMR xuất hiện tín hiệu của 5 proton thơm, cùng với phổ ^{13}C NMR xuất hiện 4 pic carbon tương đương với 6C, cho thấy sự có mặt của một vòng phenyl thế mono. Một nối đôi ngoài vòng được xác định tại δ_H 6,71 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)/ δ_C 133,9, δ_H 6,38 (1H, dt, $J = 16,0, 7,0$ Hz)/ δ_C 126,7. Nối đôi này có cấu hình *trans* do có hằng số J khá lớn (16,0 Hz). Nhóm oxymethylen tại δ_C 70,9/ δ_H 4,53 (ddd, $J = 12,6, 7,0, 1,2$ Hz) và 4,34 (ddd, $J = 12,6, 7,0, 1,2$ Hz) được khẳng định là nối trực tiếp với nối đôi nêu trên do các proton của nhóm oxymethylen này có tương tác với cả hai carbon của nối đôi, đồng thời các proton của nối đôi cũng có tương tác HMBC với carbon tại δ_C 70,9. Mặt khác hai proton của nối đôi lại có tương tác với các carbon của vòng thơm. Do đó có thể khẳng định đây là một hợp chất có phần cấu trúc aglycon là phenylpropenol. Hợp chất **PT25** có hai cấu tử đường bao gồm một đường glucose và một đường apiose. Phân tử đường glucose được nhận biết bởi tín hiệu carbon anome và proton anome tương ứng tại 103,4 và δ_H 4,38 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), cùng với bộ các tín hiệu carbon δ_C 75,1, 78,1, 71,8, 77,0 (4xCH), δ_C 68,7 (CH₂). Đơn vị đường apiose dễ dàng nhận biết bởi tín hiệu carbon anome tại δ_C 111,0 và proton anome tương ứng tại δ_H 5,06 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), cũng như tín hiệu carbon không nối với bất kỳ nguyên tử H nào tại δ_C 80,6, đồng thời với hai tín hiệu carbon CH₂ đều có nối với nguyên tử oxy tại δ_C 75,0 và δ_C 65,7. Đường apiose nối với đường glucose tại C-6 glc được khẳng định nhờ sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton anome của đường apiose (δ_H 5,06) với C-6 glc (δ_C 68,7), mặt khác đường glucose được khẳng định nối với C-7 do có tương tác HMBC rõ nét giữa proton anome của glucose (δ_H 4,38) với C-7 (δ_C 70,9). Cấu trúc của các mảnh phân tử được kiểm chứng thêm bằng phổ H-H COSY và NOESY. Kết quả phân tích các phổ nêu trên được trình bày trên hình vẽ. Các liên kết β -glycoside được khẳng định

nhờ phân tích giá trị hằng số tương tác của các proton anome phù hợp hoàn toàn với các tài liệu đã công bố [110]. Việc xác định cấu hình của hai đơn vị đường của hợp chất **PT25** cũng được xác định tương tự như hợp chất **PT26**, đó là thủy phân để thu lấy các đường mono glucose và apiose, sau đó đo độ quay cực riêng của chúng. Kết quả thu được cả hai đường này đều cho độ quay cực dương $\{[\alpha]_{D^{22}} +48,5^\circ (c = 0,1, \text{MeOH}) \text{ và } +9,0^\circ (c = 0,1, \text{MeOH})\}$, so sánh với giá trị đo được của các đường chuẩn *D*-glucose ($[\alpha]_{D^{22}} +54^\circ$) và *D*-apiose ($[\alpha]_{D^{22}} +10^\circ$) cho thấy chúng đều là có cấu hình *D*, tức là *D*-apiose và *D*-glucose. Vì vậy, hợp chất **PT25** được khẳng định là *trans*-cinnamyl alcohol 9-*O*-(6'-*O*- β -*D*-apiofuranosyl)- β -*D*-glucopyranoside. Đây là một hợp chất mới.

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất mới PT25 và chất so sánh *cis*-cinnamyl alcohol 9-*O*-(6'-*O*- α -*L*-arabinofuranosyl)- β -*D*-glucopyranoside

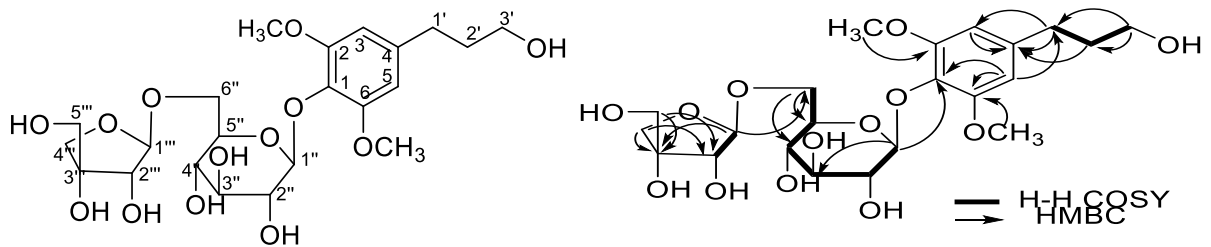
C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> = Hz)
1	137,9	138,3	-
2	129,9	127,6	7,45 (1H, d, 8,0)
3	129,4	129,6	7,32 (1H, t, 8,0)
4	128,3	128,7	7,25 (1H, t, 8,0)
5	129,4	129,6	7,32 (1H, t, 8,0)
6	129,9	127,6	7,45 (1H, d, 8,0)
7	132,8	133,9	6,71 (1H, br d, 16,0)
8	129,4	126,7	6,38 (1H, dt, 16,0, 7,0)
9	67,4	70,9	4,53 (1H, ddd, 12,6, 7,0, 1,2) 4,34 (1H, ddd, 12,6, 7,0, 1,2)
1'	103,9	103,4	4,38 (1H, d, 7,8)
2'	75,1	75,1	3,25 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'	78,0	78,1	3,37 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'	71,9	71,8	3,30 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'	76,7	77,0	3,43 (1H, m)
6'	68,0	68,7	3,64 (1H, dd, 12,0, 5,0) 4,02 (1H, dd, 12,0, 1,2)
1''	109,9	111,0	5,06 (1H, d, 3,0)
2''	83,1	78,1	3,94 (1H, d, 3,0)
3''	78,9	80,6	-
4''	85,9	75,0	4,00 (1H, d, 9,6) 3,79 (1H, d, 9,6)
5''	63,1	65,6	3,60 (2H, s)

^{a)}CD₃OD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz; [#] δ_C của *cis*-cinnamyl alcohol 9-*O*-(6'-*O*- α -*L*-arabinofuranosyl)- β -*D*-glucopyranoside[110]

3.1.2.3. Hợp chất **PT26**

* *Tính chất và thông số phổ:*

- Bột vô định hình không màu
- Công thức phân tử $C_{22}H_{34}O_{13}$ ($M = 506$)
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +5,5^0$ (c 0,1, MeOH); λ_{max} UV(MeOH) 230, 250 nm; IR(KBr): ν_{max} 3428, 2935, 1650, 1162, 1079 cm^{-1}
- Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PT26** với xuất hiện pic ion m/z 507,2076 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{35}O_{13}$ 507,2072, $\Delta = + 0,8$ ppm), pic ion m/z 529,1900 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{34}O_{13}Na = 529,1892$, $\Delta = +1,5$ ppm) và pic ion m/z 524,2345 $[M+NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{38}O_{13}N = 524,2338$, $\Delta = +1,34$ ppm).
- Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 3.3
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H -NMR và ^{13}C -NMR, HMBC, HSQC, COSY, NOESY: Xem phụ lục 26.1 – 26.6



Hình 3.6. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT26**

* *Biện giải cấu trúc*

Hợp chất **PT26** có công thức phân tử là $C_{22}H_{34}O_{13}$ được xác định dựa vào phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 507,2076 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{35}O_{13}$ 507,2072, $\Delta = + 0,8$ ppm), pic ion m/z 529,1900 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{34}O_{13}Na = 529,1892$, $\Delta = + 1,5$ ppm) và pic ion m/z 524,2345 $[M+NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết $C_{22}H_{38}O_{13}N = 524,2338$, $\Delta = + 1,34$ ppm).

Phổ NMR của hợp chất **PT26** cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế 1,2,4,6 đối xứng [δ_H 6,56 (2H, s)/ δ_C 107,4 x 2, δ_C 154,2 x 2 (C), δ_C 134,4, 140,5], hai nhóm methoxy [δ_H 3,85 (6H, s)/ δ_C 57,0 x 2], một nhánh propanol $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$ với các cặp giá trị (δ_C / δ_H) tương ứng là 33,4/2,66 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 35,3/1,86 (2H, m), 62,2/3,59 (2H, t, $J = 6,6$ Hz). Ngoài ra, hai phân tử đường bao gồm một đường glucose [δ_C 105,6, 75,6, 77,8, 71,7, 77,4 (5 x CH), 68,4 (CH₂) và một đường apiofuranose [δ_C 110,8, 78,0 (2 x CH), 80,5 (C), 74,9, 65,7 (2 x CH₂)]

cũng được xác định [111]. Các proton anome của hai phân tử đường này xuất hiện tại δ_H 4,75 (d, $J = 7,8$ Hz) và δ_H 4,96 (d, $J = 2,4$ Hz) cùng với tín hiệu C-6 glc (δ_C 68,4) đã dịch chuyển khá mạnh về phía trường thấp hơn gợi ý liên kết giữa đường apiose với đường glucose thông qua liên kết ete api (1 \rightarrow 6) glc tại thành nhánh đường β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside. Liên kết api (1 \rightarrow 6) glc còn được chứng minh rõ ràng hơn bằng tương tác HMBC giữa H-1''' api (δ_H 4,96) với C-6'' glc (δ_C 68,4) và giữa H-6'' glc (δ_H 3,62/3,92) với C-1''' api (δ_C 110,8). Mặt khác, tương tác HMBC giữa H-1'' glc (δ_H 4,75) với C-1 của vòng thơm (δ_C 134,4) khẳng định rằng nhánh đường đã được nối với C-1 của vòng thơm. Trong khi hai nhóm methoxy phải gắn vào C-2/C-6 để tạo ra vòng thơm đối xứng đã được chứng minh thêm bằng tương tác giữa các proton methoxy (δ_H 3,85) với C-2/C-6 (δ_C 154,2). Các tương tác HMBC giữa H-3' (δ_H 3,59) với C-1' (δ_C 33,4)/C-2' (δ_C 35,3), giữa H-2' (1,86) với C-4 (δ_C 140,5)/C-1' (δ_C 33,4), và giữa H-1' (δ_H 2,66) với C-4 (140,5)/C-3,C-5 (δ_C 107,4) hoàn toàn khẳng định cấu trúc nhánh propanol -CH₂-CH₂-OH cũng như vị trí C-4 của vòng thơm mà nhánh này nối vào. Các đường glucose và apiose đều được xác định là *D*-glucose và *D*-apiose nhờ kết quả thủy phân hợp chất **PT26** trong môi trường acid, sau đó phân lập các đường đơn glucose và apiose sau đó đo độ quay cực của các đường đơn này và nhận được các giá trị độ quay cực riêng tương ứng là $[\alpha]_D^{22} +48^\circ$ và $+9,5^\circ$, so sánh với giá trị đo được của các đường chuẩn *D*-glucose và *D*-apiose tương ứng là $+54^\circ$ và $+10^\circ$. Kết quả so sánh nêu trên khẳng định các đường thu được của hợp chất **PT26** đều có cấu hình *D*. Vì vậy, hợp chất này được khẳng định cấu trúc là 4-(3-hydroxypropyl)-2,6-dimethoxyphenol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, đây là một hợp chất mới.

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất mới **PT26** và chất so sánh [4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J = Hz)
1	146,2	134,4	-
2	150,8	154,2	-
3	114,2	107,4	6,56 (1H, s)
4	138,7	140,5	-
5	122,2	107,4	6,56 (1H, s)
6	118,5	154,2	-
1'	32,8	33,4	2,66 (2H, t, 7,2)
2'	35,6	35,3	1,86 (2H, m)
3'	62,3	62,2	3,59 (2H, t, 6,6)
1''	103,3	105,6	4,75 (1H, d, 7,8)
2''	75,06	75,6	3,49 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	77,9	77,8	3,42 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	71,8	71,7	3,34 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	77,2	77,4	3,35 (1H, m)
6''	68,8	68,4	3,62 (1H, dd, 12,0, 5,0) 3,92 (1H, dd, 12,0, 1,2)
1'''	111,1	110,8	4,96 (1H, d, 2,4)
2'''	78,2	78,0	3,82 (1H, d, 2,4)
3'''	80,6	80,5	-
4'''	75,12	74,9	3,84 (1H, d, 9,6) 3,71 (1H, d, 9,6)
5'''	65,7	65,7	3,54 (2H, s)
2 x OCH ₃	56,8	57,0	3,85 (3H, s)

^a)CD₃OD, ^b)125 MHz, ^c)500 MHz; $\delta_C^{\#}$ [4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside[111].

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

3.2.1. Hoạt tính kháng viêm của các chất đã phân lập thông qua ức chế quá trình sản sinh NO trên tế bào RAW 264,7 được kích thích bởi LPS

Sau khi đã phân lập được 28 hợp chất từ quả và rễ của loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* tiến hành thử hoạt tính kháng viêm của 28 hợp chất thông qua thử nghiệm ức chế sản sinh NO kết quả trình bày trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các chất phân lập từ dứa dại *Pandanus tonkinensis*

Chất	IC ₅₀ (μM)	Chất	IC ₅₀ (μM)	Chất	IC ₅₀ (μM)
PT1	17,4 ± 1,94	PT11	28,5 ± 1,76	PT21	-
PT2	126 ± 7,65	PT12	-	PT22	32,2 ± 3,47
PT3	39,3 ± 3,30	PT13	44,4 ± 6,24	PT23	1,93 ± 0,23
PT4	5,25 ± 0,39	PT14	-	PT24	54,0 ± 2,03
PT5	23,0 ± 1,35	PT15	1,78 ± 0,13	PT25	83,3 ± 4,67
PT6	21,4 ± 2,08	PT16	34,4 ± 1,81	PT26	20,1 ± 2,07
PT7	7,08 ± 0,44	PT17	80,3 ± 7,26	PT27	5,84 ± 0,44
PT8	48,3 ± 5,11	PT18	-	PT28	-
PT9	37,0 ± 4,04	PT19	-	L-NMMA	37,8 ± 3,2
PT10	94,0 ± 10,3	PT20	24,7 ± 1,08		

Kết quả thử nghiệm trên cho thấy 6 chất **PT12**, **PT14**, **PT18**, **PT19**, **PT21**, **PT28** có IC₅₀ không xác định (NA) do ở nồng độ thử mẫu cao nhất không ức chế được trên 50% NO sinh ra và % tế bào sống nhỏ hơn 80% ở mức nồng độ này. Mẫu đối chứng dương L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm với kết quả IC₅₀ 37,8 ± 3,2 μM. 22 chất còn lại **PT1** - **PT9**, **PT10**, **PT11**, **PT13**, **PT15** - **PT17**, **PT20**, **PT22** - **PT27** đã thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO với giá trị IC₅₀ từ 1,78 tới 126 μM, trong đó 14 chất **PT1**, **PT4** - **PT7**, **PT9**, **PT11**, **PT15**, **PT16**, **PT20**, **PT22**, **PT23**, **PT26**, **PT27** cho khả năng kháng viêm thông qua kết quả IC₅₀ tốt hơn so với đối chứng dương.

3.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa của các chất đã phân lập thông qua ức chế quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào

Sau khi đã phân lập được 28 hợp chất từ quả và rễ của loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* tiến hành thử hoạt tính chống oxy hóa của 28 hợp chất thông qua ức chế quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA) kết quả được trình bày ở bảng 3.5

Bảng 3.5. Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào của các chất phân lập từ dứa dại *Pandanus tonkinensis*

Chất	IC ₅₀ (μM)	Chất	IC ₅₀ (μM)	Chất	IC ₅₀ (μM)
PT1	-	PT11	-	PT21	27,5 ± 2,76
PT2	126 ± 5,57	PT12	-	PT22	54,2 ± 3,54
PT3	-	PT13	-	PT23	-
PT4	32,2 ± 1,42	PT14	-	PT24	-
PT5	20,2 ± 1,71	PT15	-	PT25	-
PT6	84,8 ± 6,69	PT16	-	PT26	-
PT7	26,3 ± 3,57	PT17	-	PT27	-
PT8	23,3 ± 1,67	PT18	-	PT28	-
PT9	-	PT19	57,5 ± 5,53	Trolox	31,4 ± 2,20
PT10	-	PT20	10,4 ± 0,71		

Trong thử nghiệm này, chất đối chứng dương trolox hoạt động ổn định cho giá trị IC₅₀ là 31,4 ± 2,2 μM. Kết quả cho thấy trong số 28 chất đã phân lập có 10 hợp chất số **PT2, PT4 - PT7, PT8, PT19, PT20 - PT22** thể hiện hoạt tính ức chế quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào với giá trị IC₅₀ từ 10,4 đến 126 μM. Như vậy 10 hợp chất này có thể hiện khả năng chống oxy hóa trong đó 5 chất **PT5, PT7, PT8, PT20, PT21** khả năng chống oxy hóa tốt hơn so với đối chứng dương trolox.

3.3. Chất đánh dấu (marker)

3.3.1. Lựa chọn chất đánh dấu

Tiêu chuẩn đầu tiên để lựa chọn chất đánh dấu là chất được tách từ dược liệu, có hàm lượng trong dược liệu đủ lớn để có thể định lượng bằng phương pháp phân tích thông dụng như sắc ký lỏng hiệu năng cao. Từ quả *P. tonkinensis* đã phân lập được 8 hợp chất tinh khiết, từ rễ *P. tonkinensis* đã phân lập được 20 hợp chất tinh khiết, trong đó có 8 hợp chất có mức khối lượng trong khoảng 20,1 – 54,7 mg, 20 hợp chất có khối lượng trong khoảng 2,5 – 17,1 mg. Do vậy trong bước lựa chọn, dược liệu được chiết bằng methanol 50%. Dịch chiết được phân tích sơ bộ bằng

HPLC detector DAD sử dụng bước sóng hấp thụ 210 nm. 03 hợp chất tinh khiết có lượng tách ra ở mức cao nhất trong quả và 03 hợp chất tinh khiết có lượng tách ra ở mức cao nhất trong rễ bao gồm: hợp chất số **PT8**, **PT7**, **PT6** và **PT20**, **PT15**, **PT11** được hòa tan trong dung môi methanol 50% và bơm vào thiết bị HPLC sử dụng cùng điều kiện phân tích với dịch chiết dược liệu.

Các điều kiện phân tích sắc ký cụ thể như sau:

- + Cột: C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột: 40°C
- + Thẻ tích tiêm mẫu: 10 μ l
- + Detector: PDA đặt ở bước sóng 210 nm.
- + Chương trình pha động:

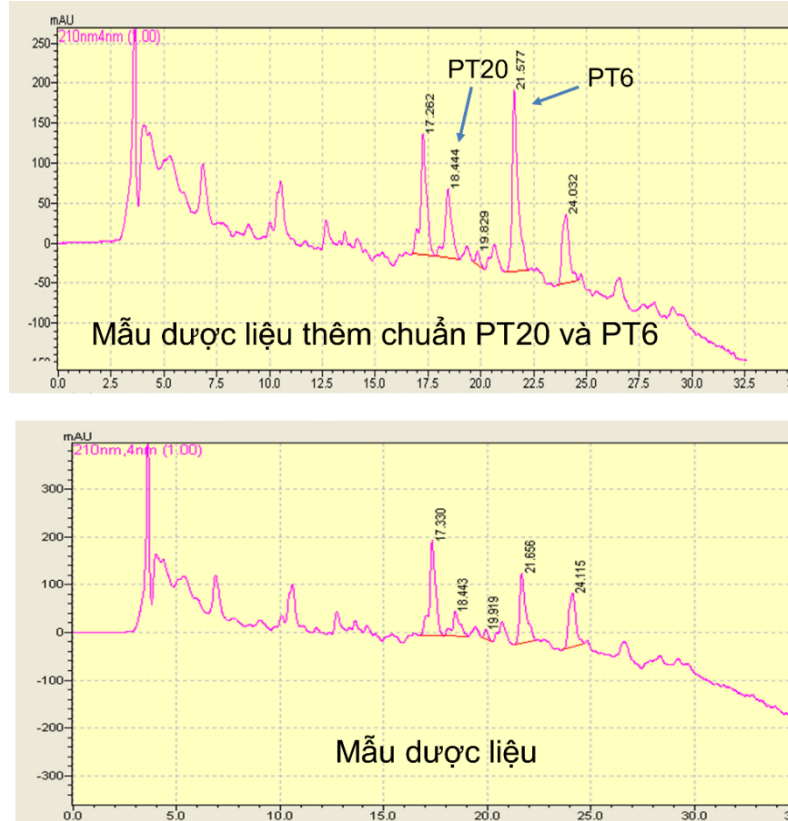
Bảng 3.6. Chương trình pha động acid formic 0,1% / acetonitrile

Thời gian (phút)	Acid formic 0,1 %	Acetonitrile
0	95 %	5 %
40	50 %	50 %
60	50 %	50 %
61-65	95 %	5 %
65	95 %	5 %

So sánh thời gian lưu của các tín hiệu phát hiện trong sắc ký đồ phân tích sơ bộ dược liệu và thời gian lưu của 6 hợp chất nói trên, cũng như phổ UV của chúng. Kết quả cho thấy hai tín hiệu có thời gian lưu gần trùng với thời gian lưu của hợp chất số **PT20** và **PT6**.

Tên chất	Khối lượng (mg)	Thời gian lưu (phút)
PT6	28,9	22,880
PT7	43,9	18,618
PT8	54,7	29,400
PT11	20,2	13,067
PT15	12,3	20,403
PT20	40,4	19,089

Thực hiện việc thêm chuẩn **PT20** và **PT6** vào nền dịch chiết mẫu dược liệu khẳng định sự có mặt của **PT20** và **PT6** trong dịch chiết mẫu dược liệu như trong hình 3.27.



Hình 3.7. Sắc ký đồ phân tích sơ bộ mẫu dược liệu và mẫu dược liệu thêm chuẩn

Trong bước xác định thành phần dược liệu, hợp chất **PT20** là pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside và **PT6** là vladinol F được phân lập từ dược liệu với khối lượng là 40,4 mg cao nhất trong phân đoạn nước của rễ và 28,9 mg cao thứ ba trong phân đoạn dung môi của quả; cả hai hợp chất này đều có hoạt tính kháng viêm và chống oxy hóa theo thử nghiệm sàng lọc. Dựa vào kết quả phân tích sơ bộ mẫu dược liệu và các chất đơn, hai hợp chất số **PT20** và **PT6** được định hướng lựa chọn là 2 chất đánh dấu cho dược liệu *Pandanus tonkinensis*.

3.3.2. Chiết xuất, tinh chế chất đánh dấu từ dược liệu

Chiết cao từ dược liệu

Bước 1: Lấy 10 kg dược liệu khô được nghiền thành bột mịn, chiết siêu âm 3 lần với methanol 50%, tỉ lệ (1kg dược liệu / 5 lít MeOH), mỗi lần siêu âm 30 phút, nghỉ 30 phút, lặp lại hai lần. Gộp dịch chiết, cô quay thu hồi dung môi, lấy cao chiết (PTM-150 g).

Bước 2: Cao PTM được siêu âm nhiều lần với dung môi ethyl acetate, loại cặn không tan trong ethyl acetate. Lọc dịch ethyl acetate qua bông, cô quay chân không thu hồi ethyl acetate, lấy cao chiết (PTE-64 g). Cao chiết ethyl acetate sẽ được tiếp tục để tinh chế lấy chất đánh dấu.

* *Lựa chọn phân đoạn cao để chiết xuất và tính chế chất đánh dấu*

Cao PTE được phân tán ướt với hạt silica gel G60 với tỉ lệ 1 : 3, làm khô để cao PTE phân tán toàn bộ trên bề mặt hạt silica gel. Đưa lên cột sắc ký thủy tinh. Lần lượt rửa với hỗn hợp dichloromethane và methanol tỉ lệ 20:1, 10:1, 5:1, 3:1. Thử tích mỗi lần rửa gấp 5 lần thử tích hạt nhỏ để thu được 4 phân đoạn thô PT2A (31,3g), PT2B (10,3g), PT2C (8,4g) và PT2D (5,1g). Các phân đoạn PT2A, PT2B, PT2C, PT2D được kiểm tra bằng HPLC với các điều kiện như sau:

+ Cột: C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột: 40°C

+ Chương trình pha động:

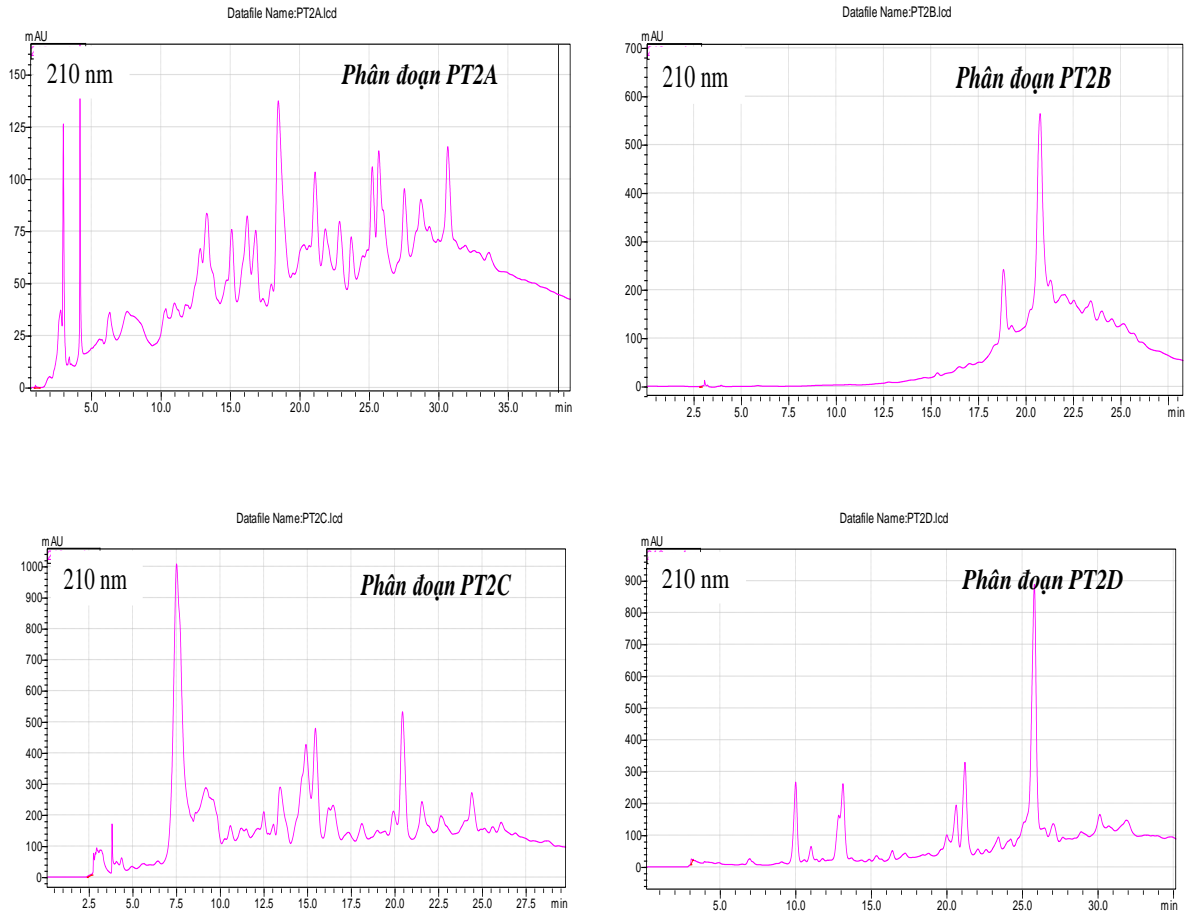
Bảng 3.7. Chương trình pha động acid formic 0,1% / acetonitrile

Thời gian (phút)	Acid formic 0,1 %	Acetonitrile
0	95 %	5 %
40	50 %	50 %
60	50 %	50 %
61 - 65	95 %	5 %
65	95 %	5 %

+ Thử tích tiêm mẫu: 10 μ l

+ Detector: PDA đặt ở bước sóng 210 nm

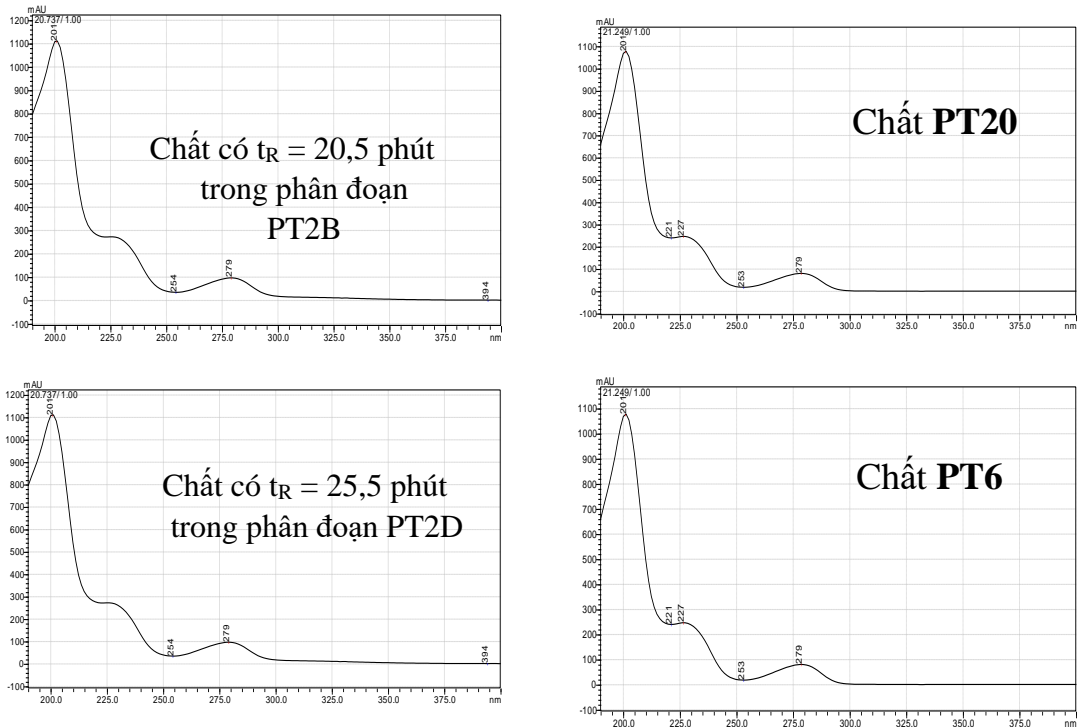
Kết quả phân tích các phân đoạn như sau:



Hình 3.8. Sắc ký đồ các phân đoạn PT2A-D

So sánh sắc ký đồ phân tích phân đoạn PT2B và PT2D với sắc ký đồ phân tích hai đơn chất **PT20** và **PT6** nhận thấy, chất **PT20** có thời gian lưu trùng với pic lớn nhất của phân đoạn PT2B ở khoảng 20,5 phút; chất **PT6** có thời gian lưu trùng với pic lớn nhất của phân đoạn PT2D ở khoảng 25,5 phút. So sánh phổ UV(200 - 400 nm) của chất **PT20** và chất cho tín hiệu tại 20,5 phút trong sắc ký đồ phân đoạn PT2B thấy tương đồng nhau. So sánh phổ UV-VIS của **PT6** và chất cho tín hiệu tại 25,5 phút trong sắc ký đồ phân đoạn PT2D thấy tương đồng.

Phân đoạn PT2A rất nhiều tạp chất, không ưu tiên tinh chế. Phân đoạn PT2C có pic trùng với **PT20** nhưng tạp chất cũng nhiều và lượng phân đoạn này không lớn. Do đó, phân đoạn PT2B và PT2D được lựa chọn để tinh chế các chất đánh dấu bằng sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế.

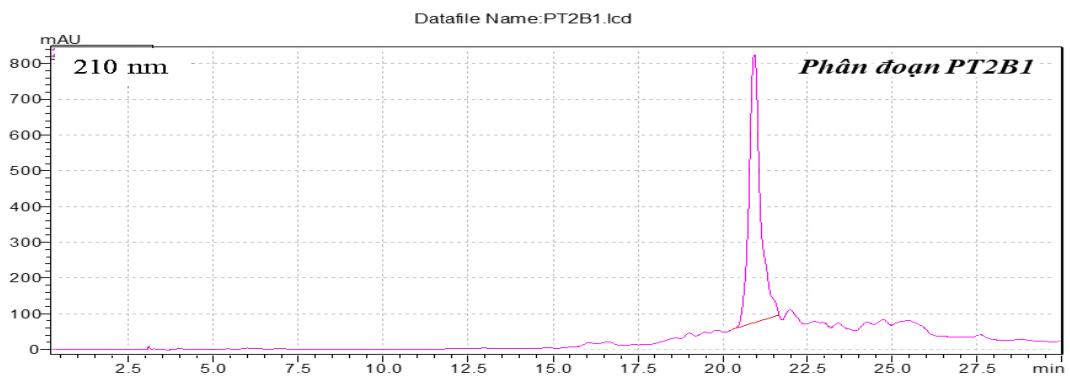


Hình 3.9. So sánh phổ UV của phân đoạn PT2B và chất **PT20**, phân đoạn PT2D và chất **PT6**

3.3.3. Tinh chế chất đánh dấu

*Tinh chế phân đoạn 2B

Phân đoạn PT2B sau khi được nhồi lên cột silica gel, rửa giải bằng hệ pha động dichloromethane - methanol tỉ lệ 12 : 1, thu được phân đoạn PT2B1 (1,21 g). Kiểm tra độ tinh khiết của phân đoạn với chương trình khảo sát như mục 3.3.2.



Hình 3.10. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn PT2B1

Phân đoạn PT2B1 ta thấy vẫn còn tạp chất xung quanh pic chính. Do đó tiếp tục hòa tan PT2B1 với methanol đến khi tan hết, lọc qua màng 0,45 μm và tiếp tục tinh chế phân đoạn này trên máy sắc ký lỏng điều chế. Chương trình sắc ký như sau:

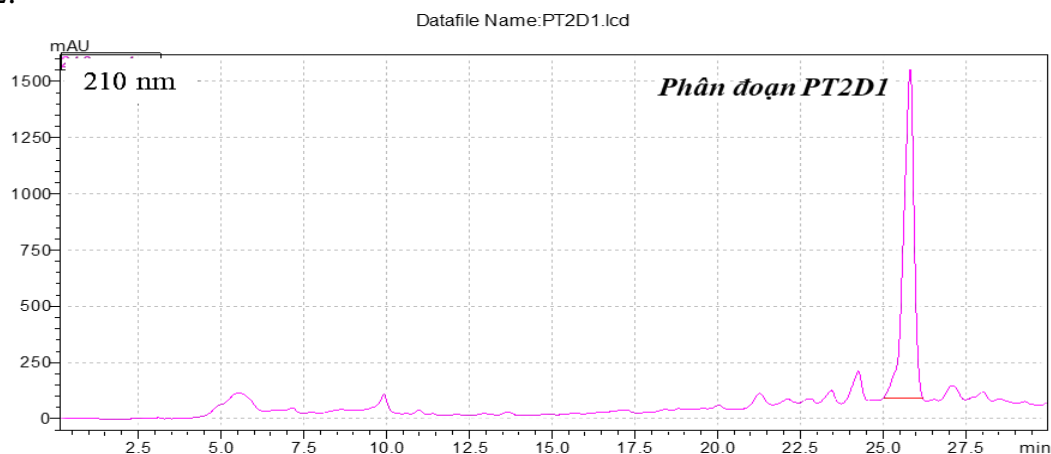
- + Cột: C18 (250 x 22 mm; 5 μm), nhiệt độ cột 40°C

- + Pha động: nước – methanol tỷ lệ 75 : 25
- + Thể tích tiêm mẫu: 200 μ l
- + Detector: PDA đặt ở bước sóng 210 nm

Gom dịch được hứng từ máy sắc ký lỏng điều chế tại thời gian 20,5 – 21,5 phút, sau đó cô quay chân không loại dung môi. Tiếp đến sấy cao trong tủ sấy chân không ở 50°C trong 1 ngày có P₂O₅ thu được chất tinh khiết PT2B1A dự kiến là hợp chất **PT20** - pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside với khối lượng 254 mg.

**Tinh chế phân đoạn 2D*

Phân đoạn PT2D được nhồi lên cột silica gel, rửa giải bằng hệ pha động dichloromethane – methanol tỉ lệ 8 : 1. Sau tinh chế, thu được phân đoạn PT2D1 (0,87 g). Kiểm tra độ tinh khiết của phân đoạn với chương trình khảo sát như mục 3.3.2.



Hình 3.11. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn PT2D1

Phân đoạn PT2D1 sau khi chạy cột pha thuận vẫn còn tạp chất xung quanh pic chính. Hòa tan PT2D1 với methanol đến khi tan hết, lọc qua màng 0,45 μ m và tiếp tục tinh chế phân đoạn này trên máy sắc ký lỏng điều chế.

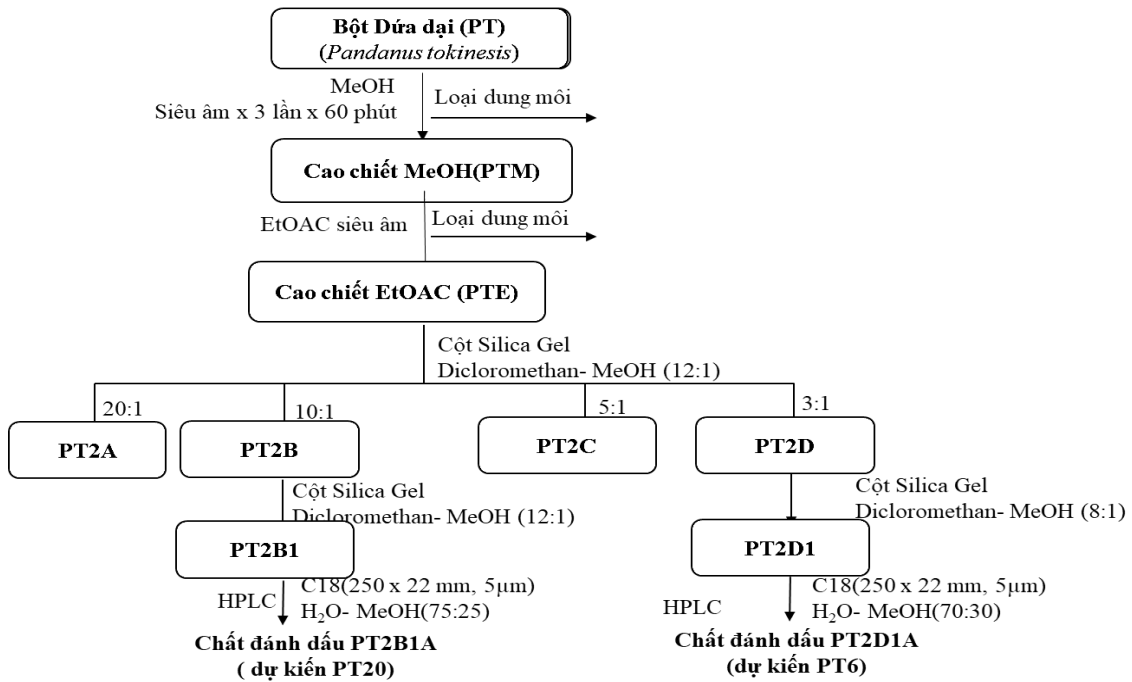
Chương trình sắc ký như sau:

- + Cột: C18 (250 x 22 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột 40°C
- + Pha động: nước – methanol tỷ lệ 70 : 30
- + Thể tích tiêm mẫu: 300 μ l

Gom dịch được hứng từ máy sắc ký lỏng điều chế tại thời gian 25,0 – 26,0 phút, sau đó cô quay chân không loại dung môi. Tiếp đến sấy cao trong tủ sấy chân không ở 50°C trong 1 ngày có P₂O₅ thu được chất tinh khiết PT2D1A dự kiến là hợp chất **PT6** – vladinol F với khối lượng 125 mg.

3.3.4. Tóm tắt qui trình chiết xuất và tinh chế hai chất đánh dấu

Qui trình chiết xuất và tinh chế hai chất đánh dấu được tóm tắt như sơ đồ sau:



Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất và tinh chế chất đánh dấu

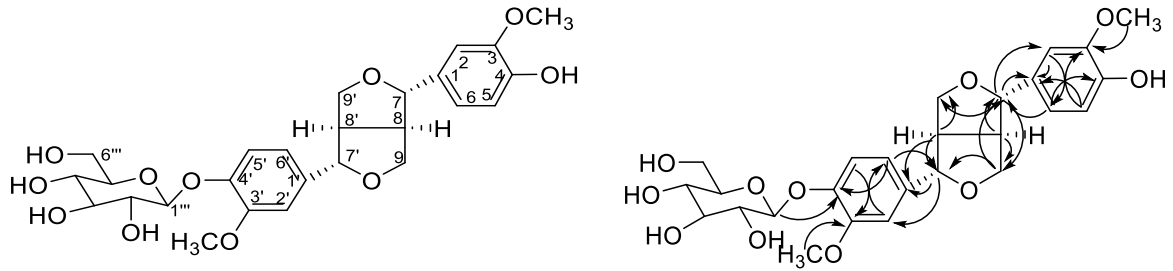
3.3.5. Xác nhận lại cấu trúc và độ tinh khiết của chất đánh dấu

3.3.5.1. Xác nhận lại cấu trúc 2 chất đánh dấu

Hợp chất **PT2B1A (PT20)**

* *Tính chất và thông số phổ:*

- Chất bột vô định hình
- Công thức phân tử $C_{26}H_{32}O_{11}$ ($M = 520$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 543,1823, tính toán lý thuyết cho
- Công thức $[C_{26}H_{32}O_{11}Na]^+ = 543,18368$; $\Delta = - 2,6$ ppm
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +21,3^\circ$ ($c = 0,01$, MeOH)
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm: 201, 227, 279
- Phổ IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3393, 2936, 2855, 1602, 1514, 1391, 1277
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 3.8
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, UV, IR: Xem hình 3.13 – hình 3.19



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT2B1A

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất PT2B1A thu được dưới dạng chất bột vô định hình, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 543,1823, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{26}H_{32}O_{11}Na]^+ = 543,1837$, $\Delta = -2,58$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{26}H_{32}O_{11}$, $M = 520$ g/mol. Phổ 1H -NMR của hợp chất này xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai vòng thơm thế 3,4 với hệ tương tác proton ABX tại δ_H 7,03 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 7,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,92 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz) và δ_H 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,81 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz), 6,93 (1H, d, $J = 1,8$ Hz); các tín hiệu nêu trên có xuất hiện các tương tác HMBC tương ứng với các tín hiệu carbon lần lượt tại δ_C 111,7, 118,0, 119,8, 111,0, 116,1, 120,0. Các tín hiệu gần như cặp đôi tại δ_C 87,7/ δ_H 4,74 (CH, d, $J = 4,8$ Hz)/ δ_C 87,4/ δ_H 4,71 (CH, d, $J = 4,8$ Hz); δ_C 55,5 x 2/ δ_H -3,12 (2 x CH, m); δ_C 72,7 và 72,8 (2 x CH)/ δ_H 4,5-4,30 (2H) và 3,86-3,90 (2H) hoàn toàn tương ứng với phần cấu trúc tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan, một dạng cấu trúc phổ biến của các hợp chất lignan tương tự như hợp chất pinoresinol. Ngoài ra trên phổ NMR còn xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_C 56,5 và 56,9 và tín hiệu carbon anome của một phân tử đường glucose tại δ_C 102,8. Xem xét kỹ các tín hiệu của hai vòng thơm cho thấy chúng có sự khác biệt nhỏ. Điều này cho thấy hai vòng thơm này không tương đương nhau về cấu trúc trong phân tử. Từ kết quả phổ khối lượng phân giải cao thu được cho thấy hợp chất PT2B1A chỉ có một phân tử đường.

Bằng việc phân tích các tương tác trên phổ HMBC cho thấy hai nhóm methoxy đã được nối vào C-3 và C-3', trong khi đó một nhóm OH nối vào C-4 và nhóm đường glucose được nối vào C-4'. Chính vì hai vị trí C-4 và C-4' có hai nhóm thế khác nhau này đã làm cho phân tử không có tính đối xứng nữa và các tín hiệu không bị chập đôi mà tách ra theo từng cặp tín hiệu khá gần nhau.

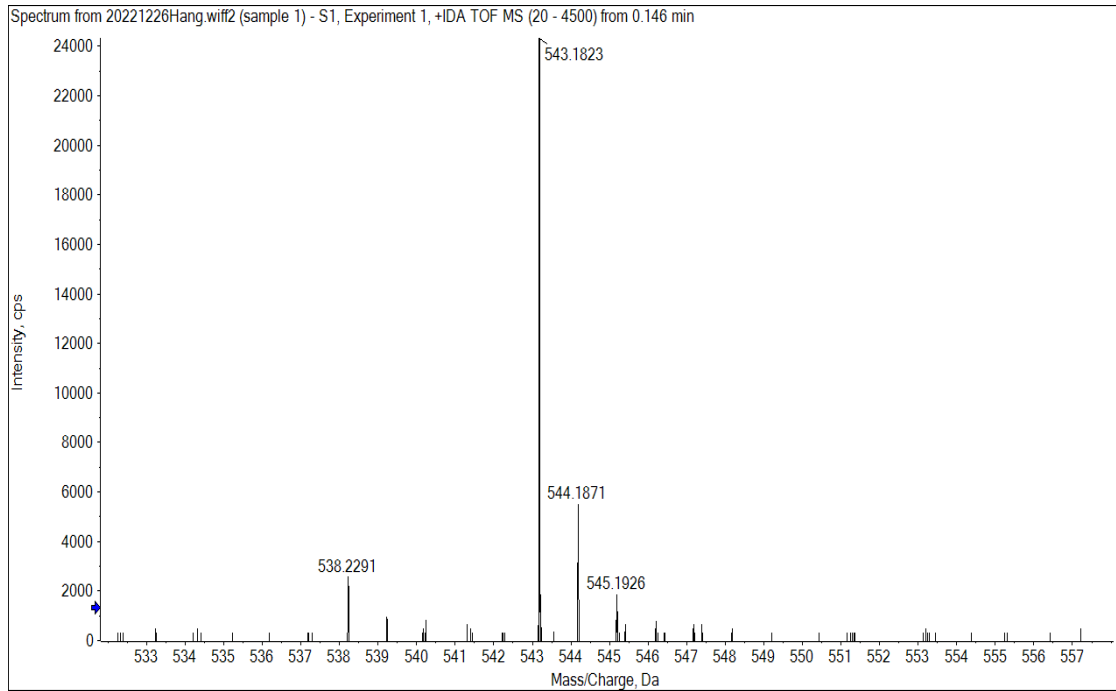
Các dữ kiện phổ NMR của hợp chất PT2B1A cũng như giá trị độ quay cực riêng của nó được so sánh với hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glycoside cho thấy sự phù hợp hoàn toàn [105]. Giá trị hằng số tương tác J của proton anome của phân tử

đường glucose khá cao ($J = 7,8$ Hz) chứng tỏ liên kết β -glycoside. Từ những phân tích nêu trên, hợp chất PT2B1A được khẳng định là pinoresinol 4'-O- β -D-glycoside.

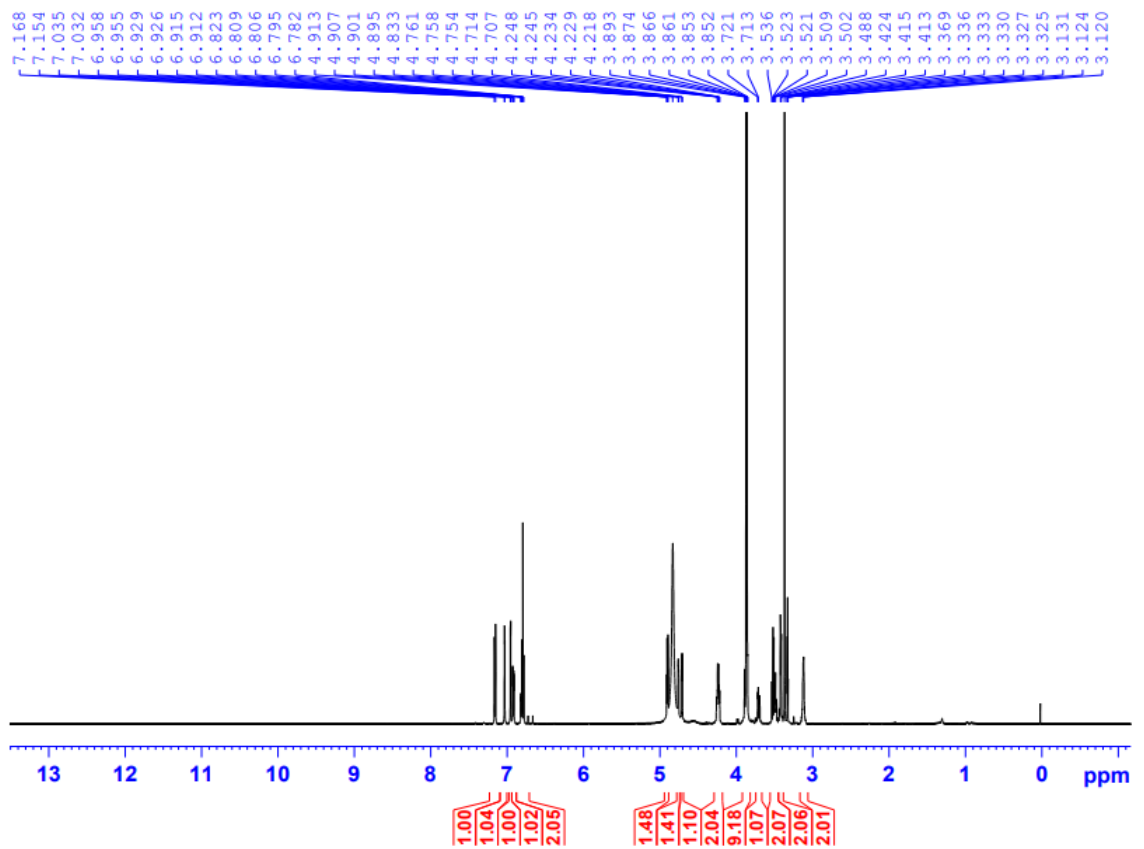
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2B1A và chất so sánh pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside

C	$\# \delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c} \delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	137,6	137,5	-
2	111,8	111,7	7,03 (1H, d, 1,8)
3	147,4	147,3	-
4	151,1	150,9	-
5	118,2	118,0	7,16 (1H, d, 8,0)
6	119,9	119,8	6,92 (1H, dd, 8,0, 1,8)
7	87,2	87,7	4,74 (1H, d, 4,8)
8	55,6	55,5	3,15 (1H, m)
9	72,8	72,8	4,30 (1H, m) 3,90 (1H, m)
1'	133,9	133,8	-
2'	111,2	111,0	6,93 (1H, d, 1,8)
3'	147,6	147,6	-
4'	149,3	149,1	-
5'	116,2	116,1	6,79 (1H, d, 8,0)
6'	120,2	120,0	6,81 (1H, dd, 8,0, 1,8)
7'	87,6	87,4	4,71 (1H, d, 4,8)
8'	55,6	55,5	3,12 (1H, m)
9'	72,8	72,7	4,25 (1H, m)/3,86 (1H, m)
3'-OCH ₃	56,9	56,9	3,87 (3H, s)
3''-OCH ₃	56,6	56,5	3,86 (3H, s)
Glc			
1'''	102,9	102,8	4,90 (1H, d, 7,8)
2'''	75,1	74,9	3,51 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'''	78,0	77,8	3,42 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	71,4	71,3	3,41 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	78,3	78,1	3,49 (1H, m)
6'''	62,6	62,5	3,71 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,87 (1H, dd, 12,0, 2,0)

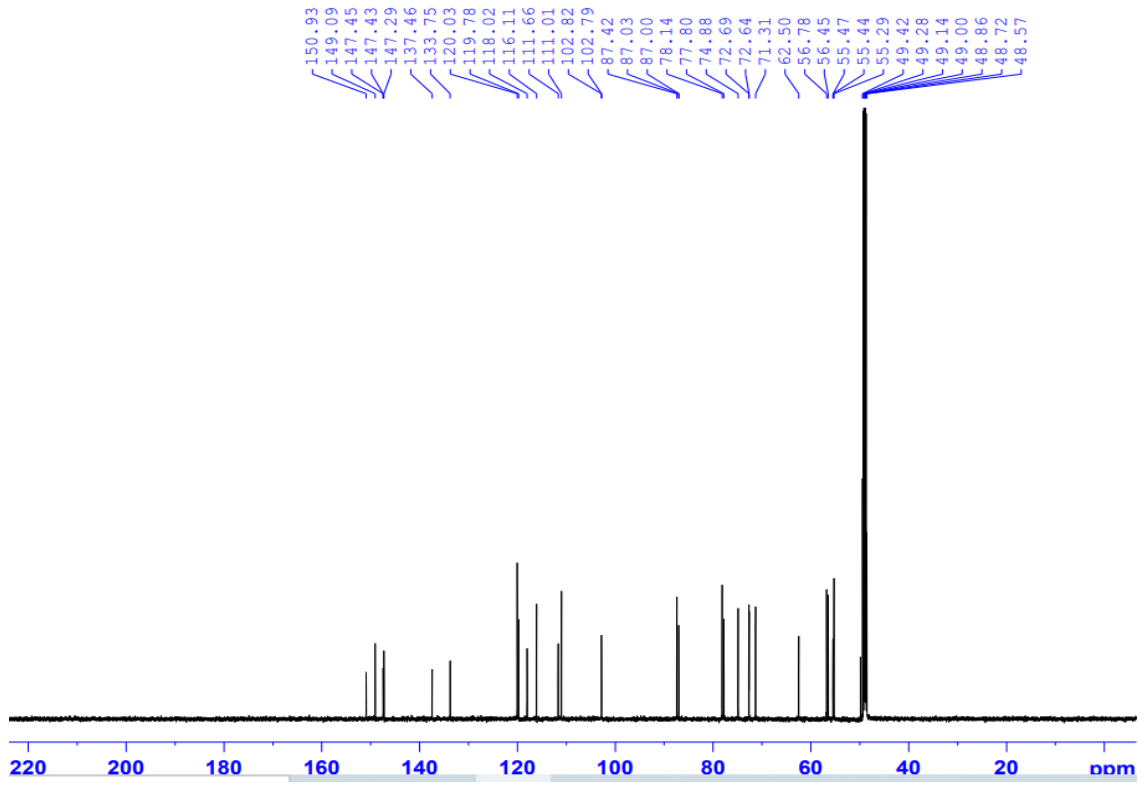
^{a)}CD₃OD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz; $\# \delta_C$ của pinoresinol 4'-O- β -D-glycoside [105]



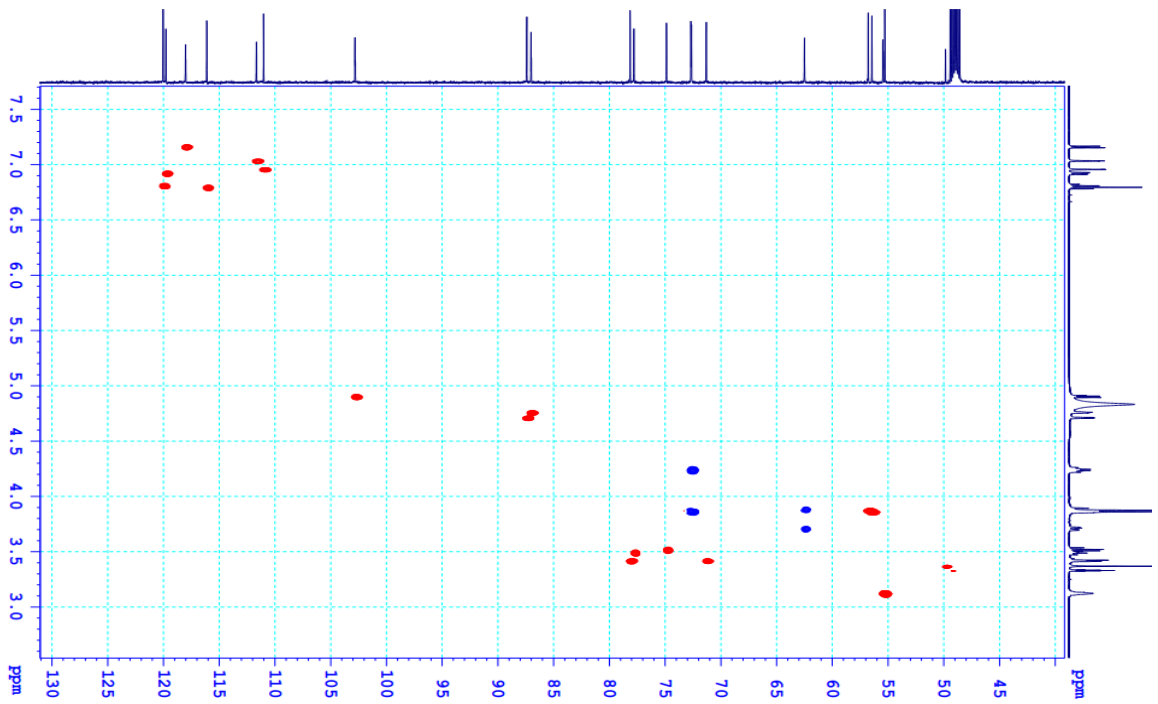
Hình 3.14. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT2B1A



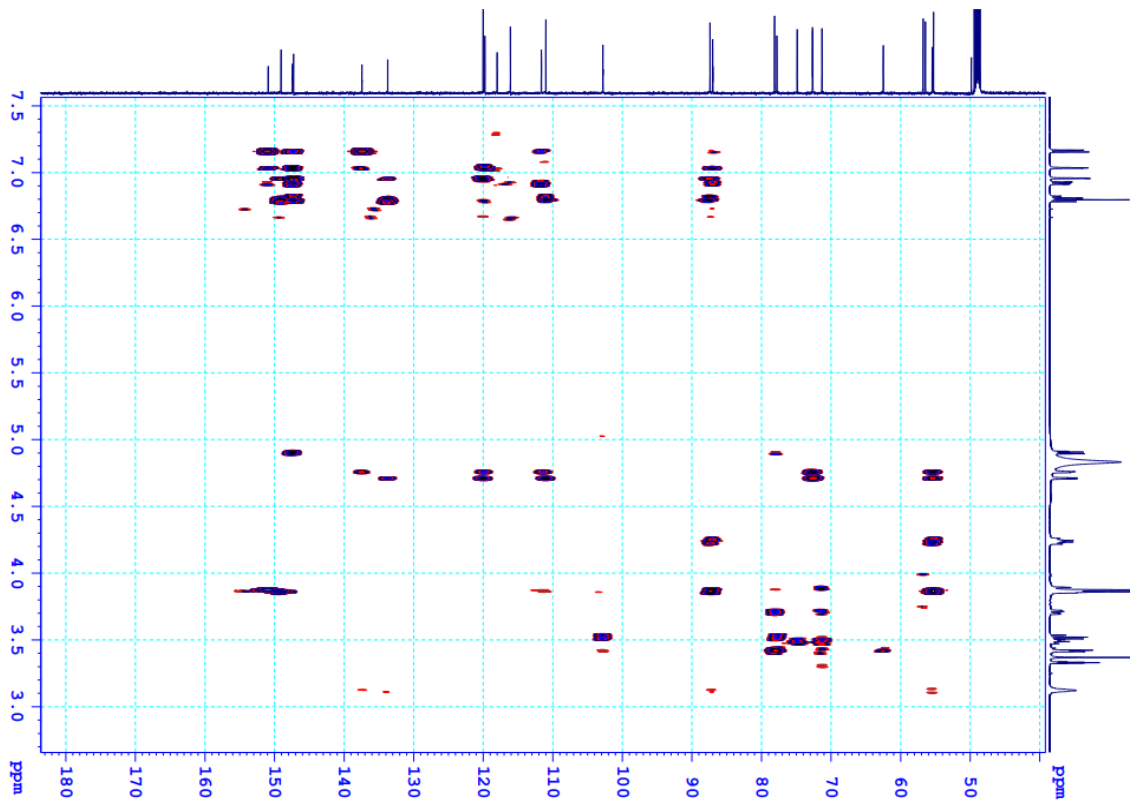
Hình 3.15. Phổ ^1H NMR của hợp chất PT2B1A



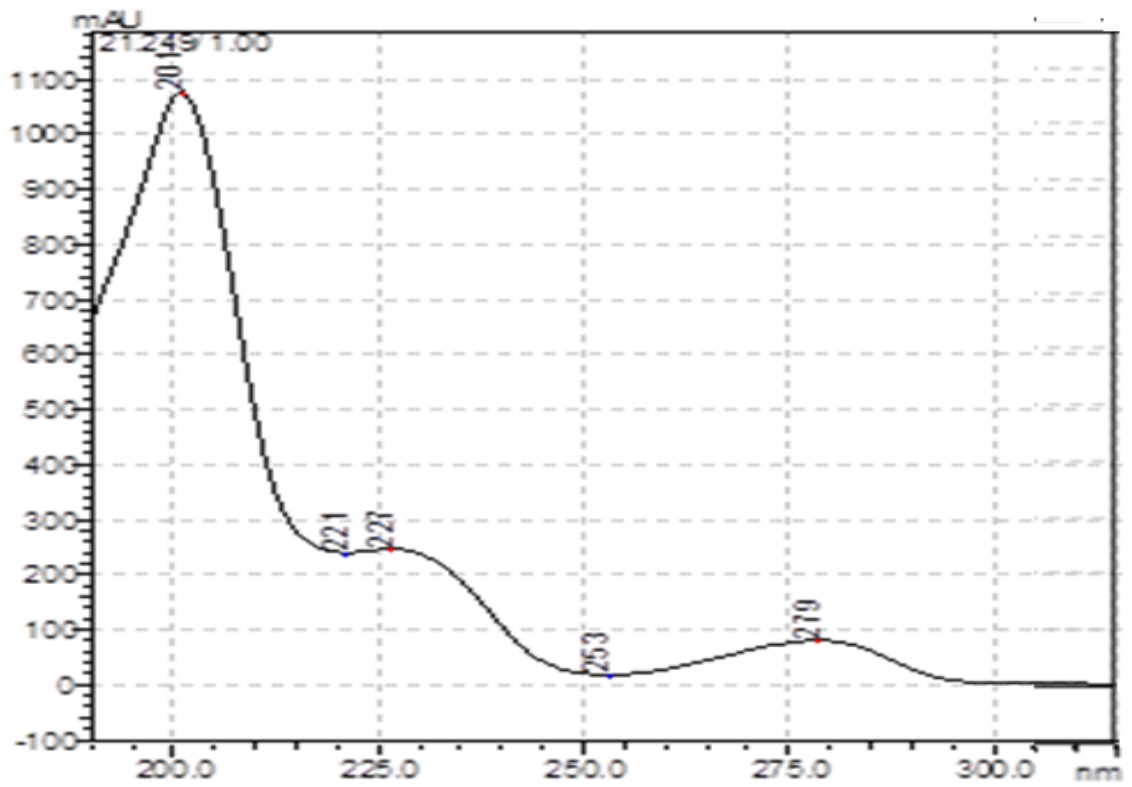
Hình 3.16. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT2B1A



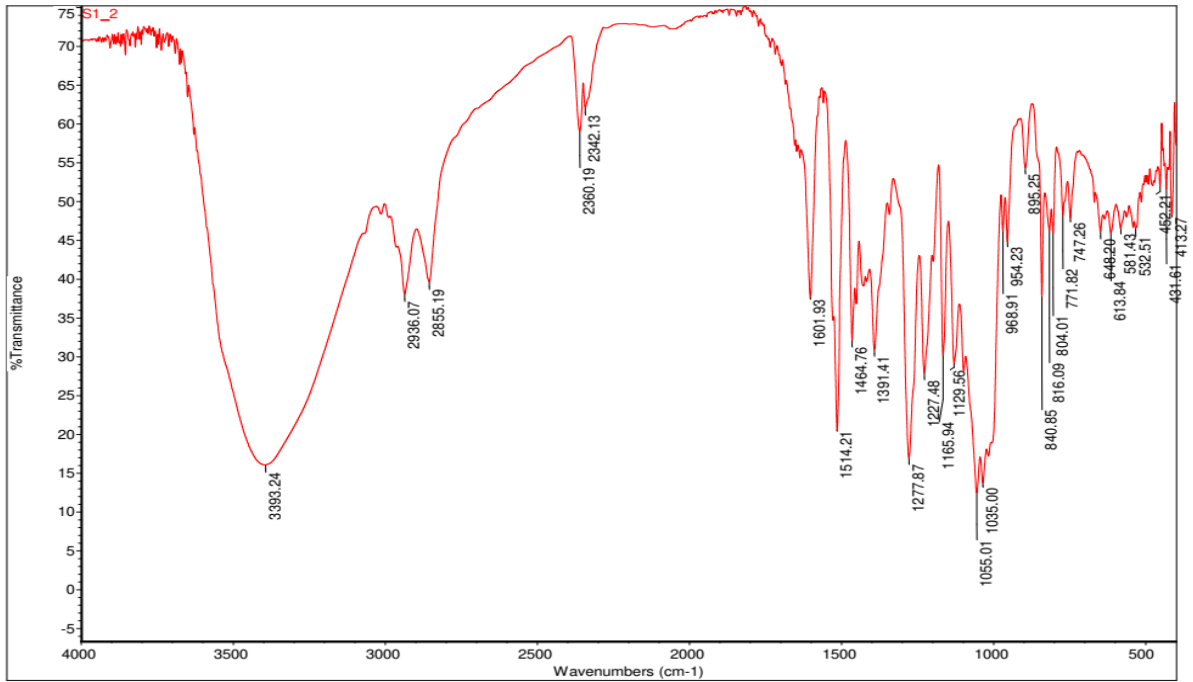
Hình 3.17. Phổ HSQC của hợp chất PT2B1A



Hình 3.18. Phổ HMBC của hợp chất PT2B1A



Hình 3.19. Phổ UV của hợp chất PT2B1A

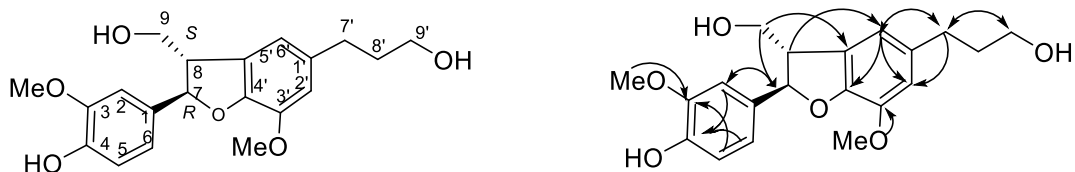


Hình 3.20. Phổ IR của hợp chất PT2B1A

Hợp chất PT2D1A (PT6)

* *Tính chất và thông số phổ:*

- Chất dầu, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{20}H_{24}O_6$ ($M = 360$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 383,1457 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{20}H_{24}O_6Na]^+ = 383,1465$, $\Delta = -2,1$ ppm
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -6,1^\circ$ ($c = 0,99$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem bảng 3.9
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm 282, 231, 203
- Phổ IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3413, 2937, 1606, 1518, 1499, 1277, 1212, 1141
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, UV, IR: Xem hình 3.21 – hình 3.27



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT2D1A

**Biện giải xác định cấu trúc:*

Hợp chất PT2D1A phân lập được ở dạng chất dầu, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 383,1457, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{20}H_{24}O_6Na]^+$ = 383,1465, Δ = - 2,09 ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{20}H_{24}O_6$, M = 360 g/mol.

Phổ 1H -NMR của hợp chất PT2D1A xuất hiện các tín hiệu của hai vòng benzen tại δ_H 6,74 (1H, s, H-2'), 6,74 (1H, s, H-6'), và δ_H 6,97 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-2), 6,78 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-5), 6,84 (1H, dd, J = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H-6). Tín hiệu của proton của hai nhóm methine xuất hiện tại δ_H 5,51 (d, J = 6,5 Hz, H-7), 3,49 (1H, dd, J = 9,0 Hz, 6,5 Hz, H-8), trong đó, sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp hơn của tín hiệu tại δ_H 5,51 được lý giải là do nhóm methine này phải được gắn với một nguyên tử oxy. Bốn tín hiệu nhóm CH_2 xuất hiện tại δ_H 2,64 (t, J = 7,5 Hz, H-7') và δ_H 1,84 (m, H-8'), δ_H 3,59 (t, J = 7,5 Hz, H-9') δ_H 3,75 và 3,85 và cùng với hai nhóm methoxy cũng được nhận ra bởi tín hiệu tại δ_H 3,82 (3H, s) và 3,86 (3H, s).

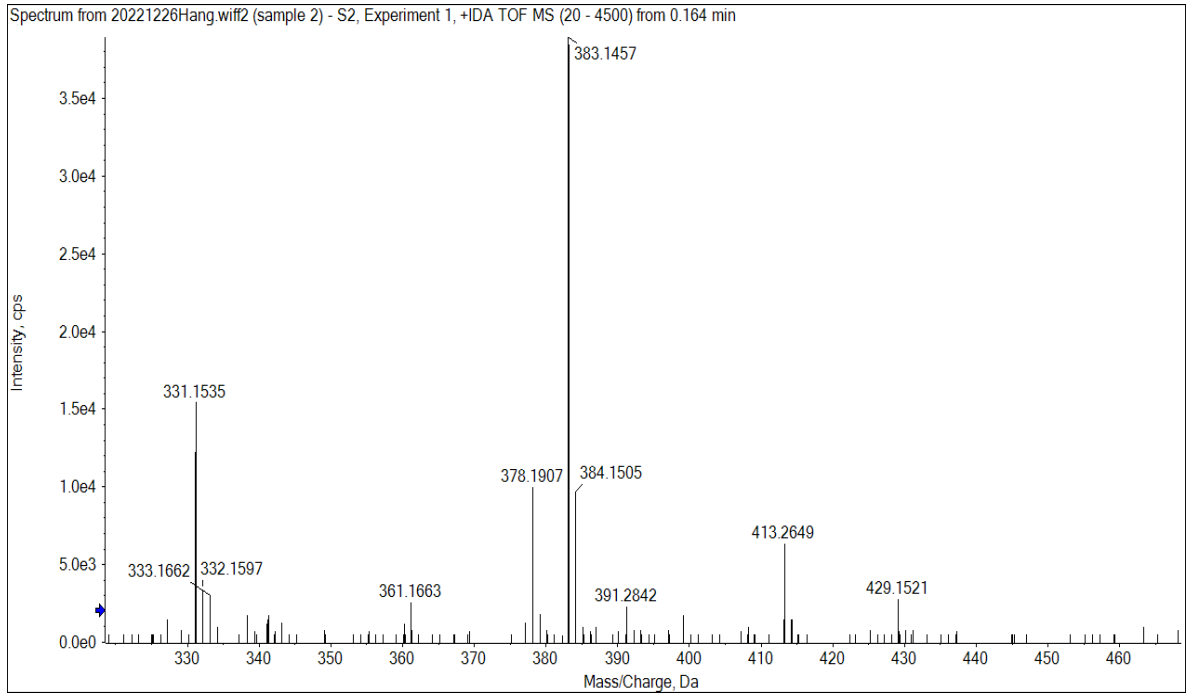
Từ phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra rằng PT2D1A có 20 tín hiệu đặc trưng cho 20 nguyên tử carbon tương tự như 1 ngoại trừ việc thay thế nhóm aldehyde bằng 3-hydroxypropyl tại C-1. Vị trí của nhóm 3-hydroxypropyl tại C-1' cũng được xác nhận bởi phổ HMBC cho thấy tương quan giữa H-7' (δ_H 2,64) với C-2' (δ_C 114,1/C-6' (δ_C 117,9).

Ngoài ra, hai carbon CH_2 có nối với nguyên tử oxy được nhận biết tại δ_C 65,0 và 62,2, một tín hiệu carbon methine nối với oxy tại δ_C 89,0, một carbon CH khác tại δ_C 55,4, hai carbon CH_2 tại δ_C 32,9, 35,8 cùng với hai nhóm methoxy tại δ_C 56,4 và 56,8. Những kết quả phổ NMR thu được nêu trên cho thấy hợp chất PT2D1A thuộc vào lớp chất neolignan có hai nhóm methoxy gắn vào hai vòng thơm. So sánh trực tiếp các dữ liệu phổ NMR của PT2D1A và vladinol F [93] cho thấy sự trùng khớp. Từ những phân tích và kết quả nêu trên, hợp chất PT2D1A được xác định là vladinol F.

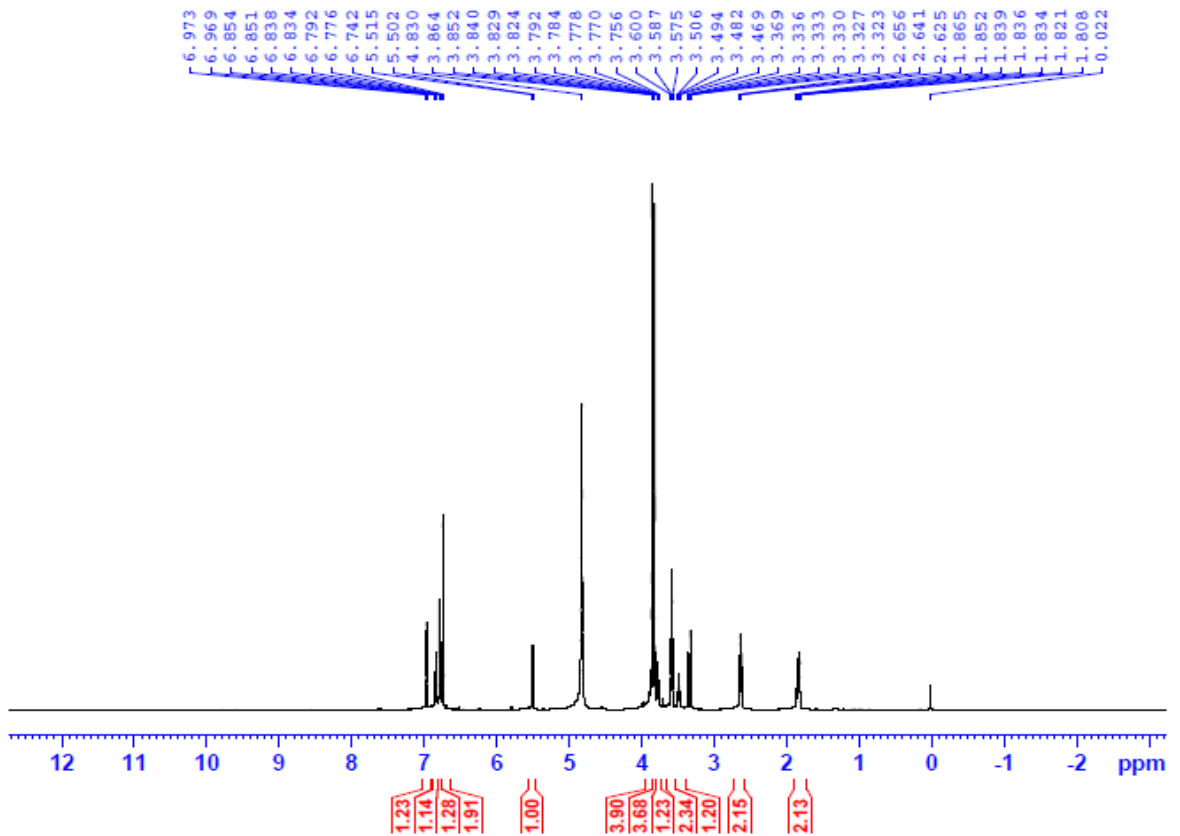
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2D1A và chất so sánh vladinol F

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,b}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	134,8	134,8	
2	110,5	110,0	6,97 (d, 2,0)
3	149,1	149,1	-
4	147,5	147,5	-
5	116,1	116,1	6,78 (d, 8,0)
6	119,7	119,7	6,84 (dd, 8,0 2,0)
7	89,0	89,0	5,51 (d, 6,5)
8	55,4	55,4	3,49 (dd, 9, 6,5)
9	65,0	65,0	3,75 và 3,85
1'	136,9	136,9	-
2'	115,8	114,1	6,74 (s)
3'	145,2	145,2	-
4'	147,5	147,5	-
5'	129,9	129,9	-
6'	117,9	117,9	6,74 (s)
7'	32,9	32,9	2,64 (t, 7,5)
8'	35,8	35,8	1,84 (m)
9'	62,2	62,2	3,59 (t, 7,5)
3-OMe	56,4	56,4	3,82 (s)
3'-OMe	56,8	56,8	3,86 (s)

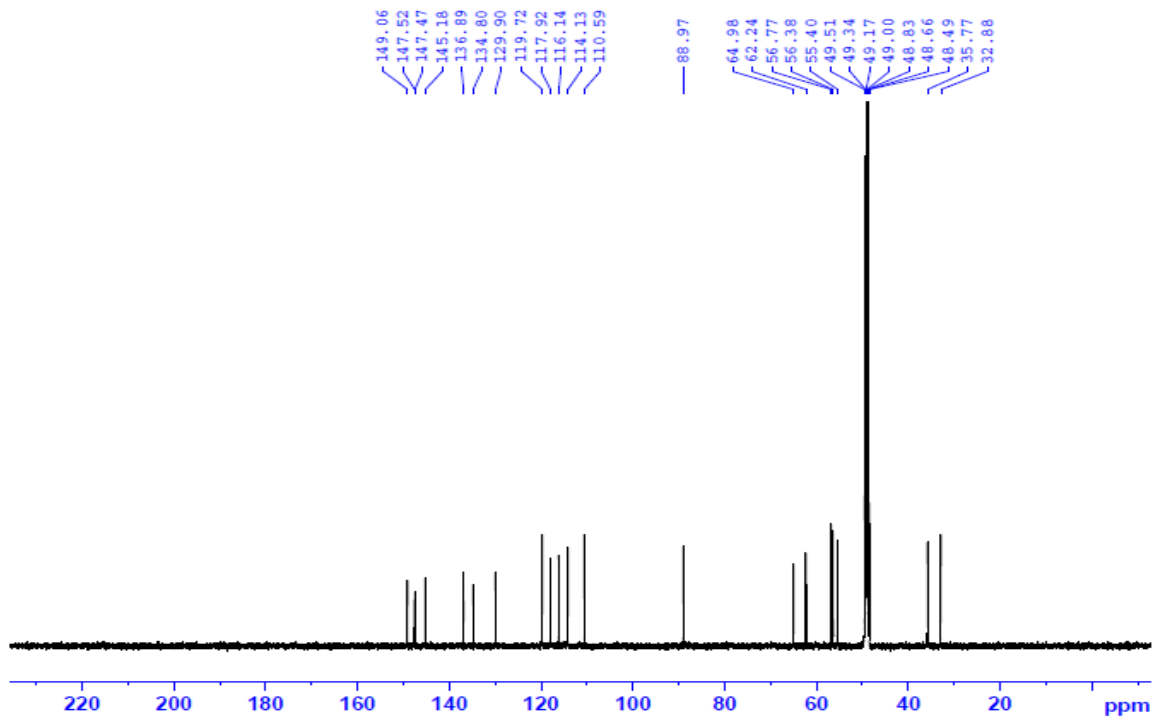
a) CD_3OD b) 125 MHz c) 500 MHz; # δ của vladinol F (CD_3OD) [93]



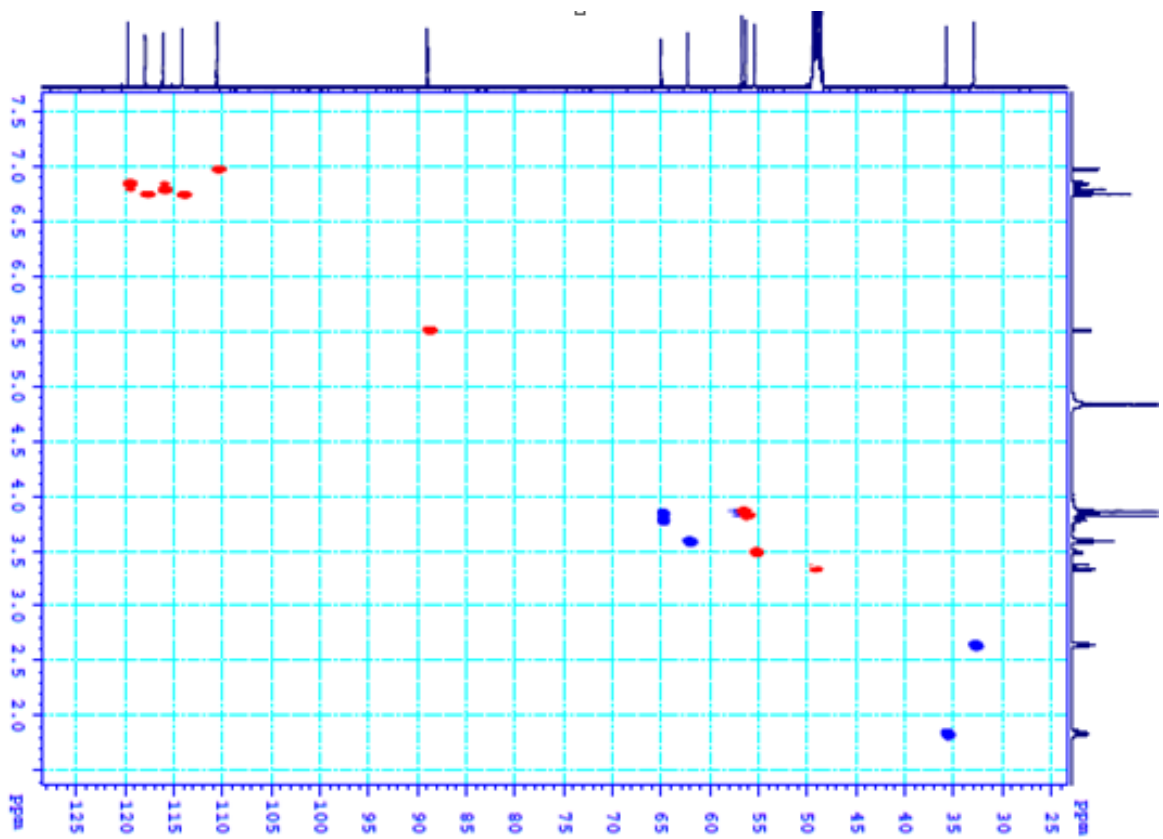
Hình 3.22. Phổ HR-ESI- MS của hợp chất PT2D1A



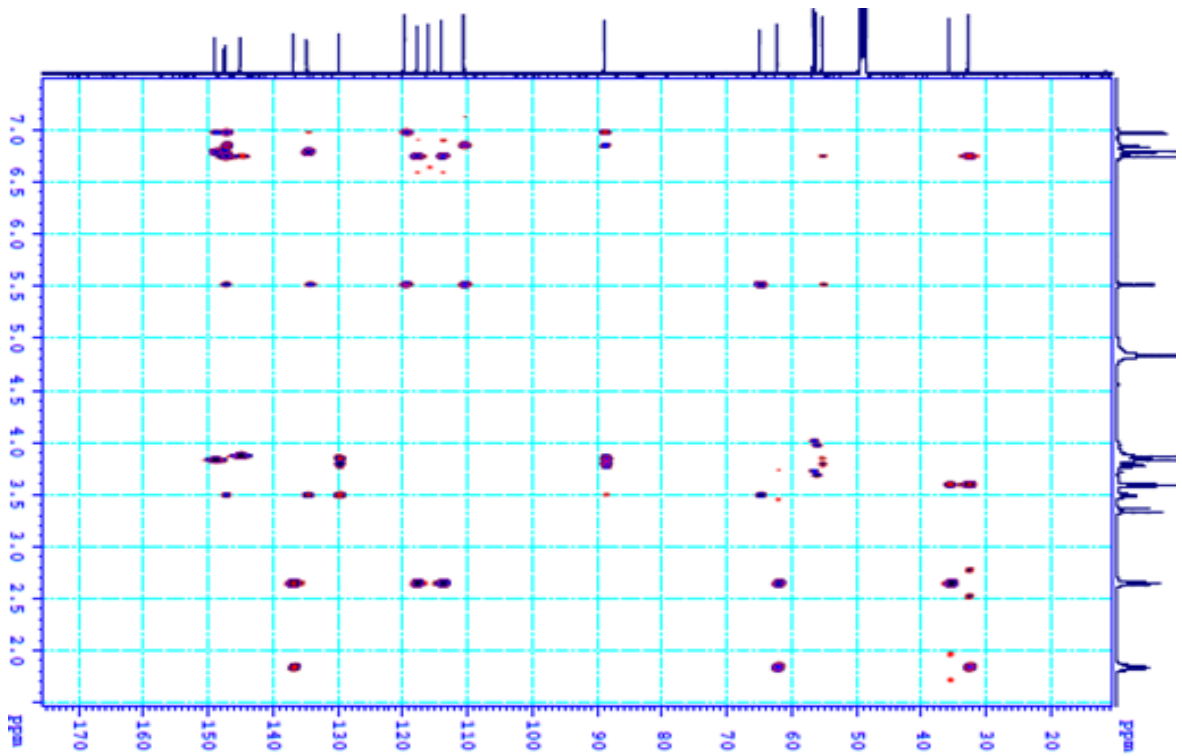
Hình 3.23. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT2D1A



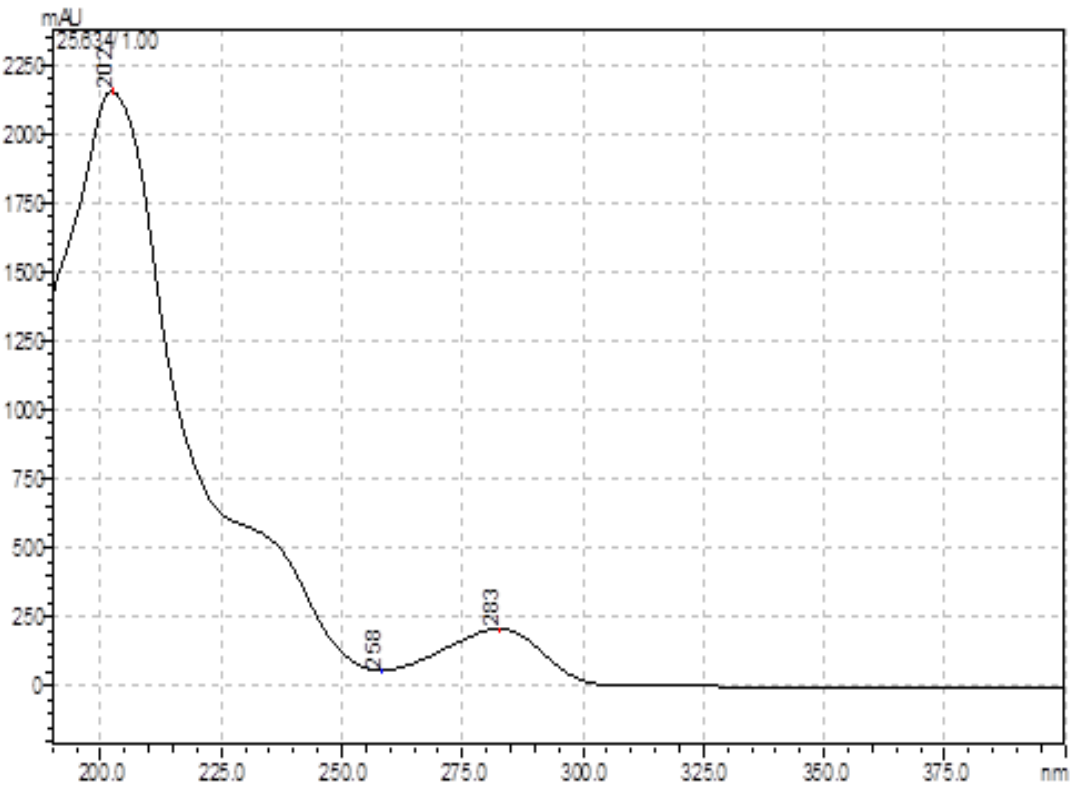
Hình 3.24. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PT2D1A



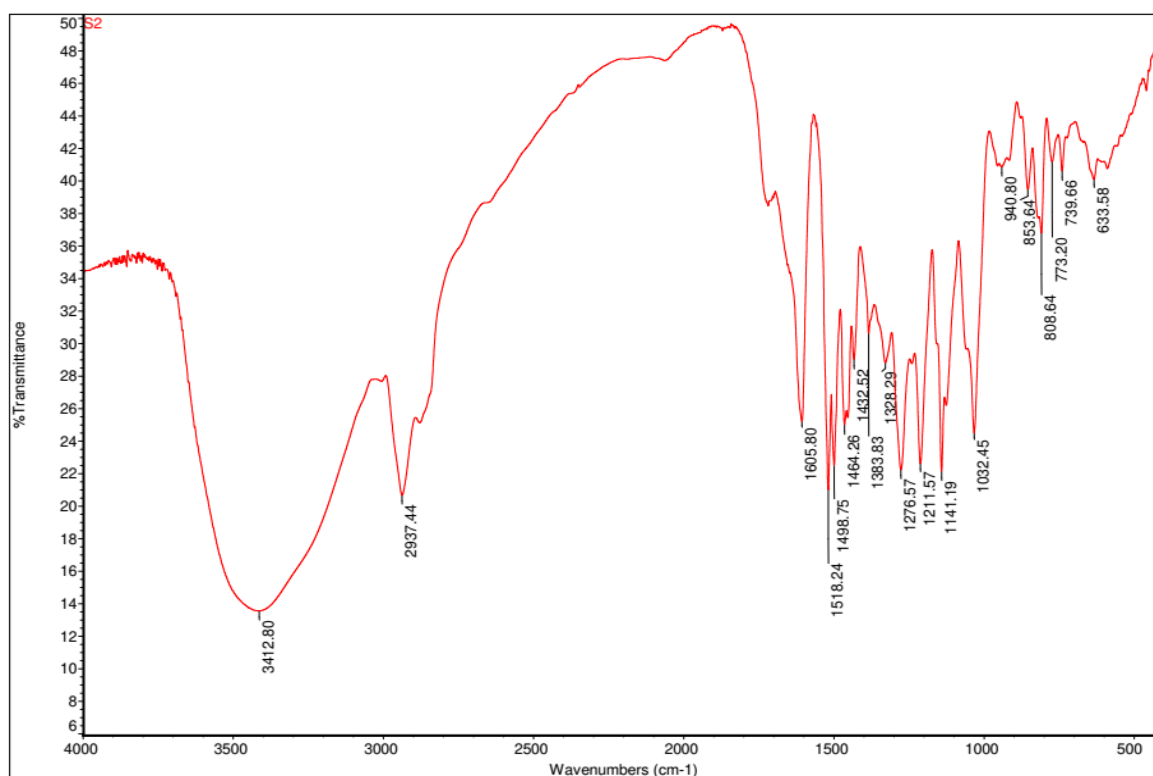
Hình 3.25. Phổ HSQC của hợp chất PT2D1A



Hình 3.26. Phổ HMBC của hợp chất PT2D1A



Hình 3.27. Phổ UV của hợp chất PT2D1A



Hình 3.28. Phổ IR của hợp chất PT2D1A

Sau khi đã chiết xuất, tinh chế 2 chất PT2B1A và PT2D1A đo một số dữ liệu đặc trưng cho cấu trúc của chúng bao gồm: Phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ UV- Vis, phổ hồng ngoại; so sánh với tài liệu tham khảo [105,93] đã xác nhận lại cấu trúc PT2B1A hay **PT20** là pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và PT2D1A là vladinol F(**PT6**).

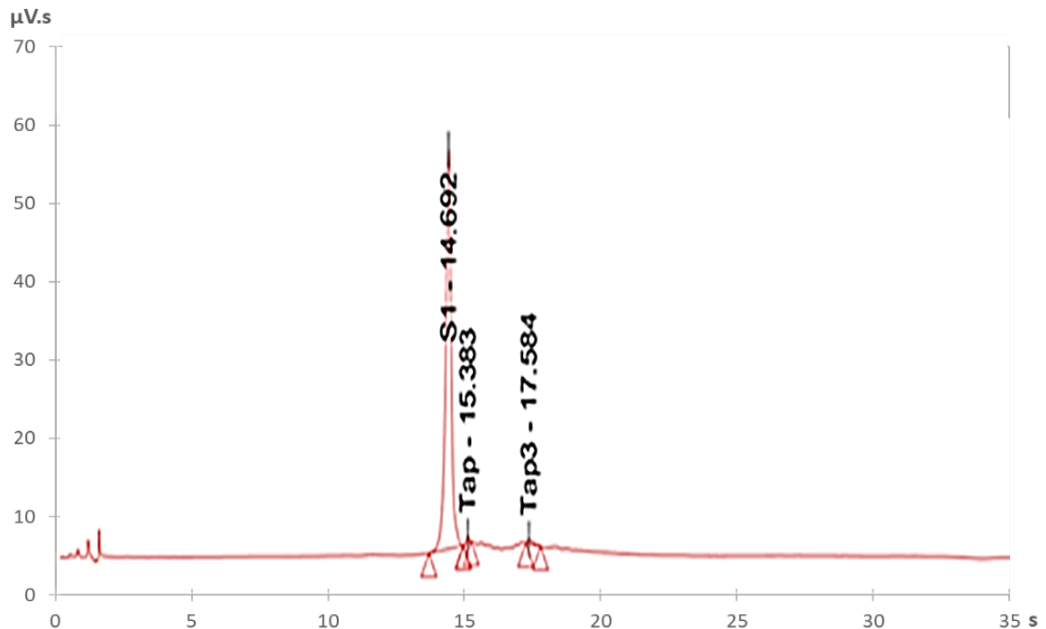
3.3.5.2. Xác định độ tinh khiết của 2 chất đánh dấu

Độ tinh khiết của 2 chất đã tách chiết được xác định qua phân tích HPLC trên cơ sở diện tích tín hiệu chất phân tích so với tổng diện tích các tín hiệu cho kết quả tương ứng là 98,0% đối với pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và 98,7% đối với vladinol F (phân tích xác định độ tinh khiết được thực hiện tại Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh).

Phân tích **PT20** sử dụng sắc ký lỏng, phát hiện chất ở bước sóng 230 nm, thể tích bơm mẫu 10 μ l, tổng thời gian phân tích một mẫu là 35 phút. Sắc ký đồ cho pic chính **PT20** ở khoảng 14,7 phút và hai pic phụ Tap, Tap 3 tại thời gian lưu khoảng 15,4 và 17,6 phút. Kết quả tính % diện tích tín hiệu chính (bơm 6 mẫu) so với tổng diện tích ba tín hiệu xuất hiện trên sắc ký đồ được trình bày trong bảng 3.10. Độ tinh khiết của chất đánh dấu **PT20** được xác định là $98,0 \pm 0,1$ %.

Bảng 3.10. Kết quả xác định độ tinh khiết của hợp chất **PT20** - pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside

Mẫu bơm	Diện tích pic PT20 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Diện tích Tap ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Diện tích Tap 3 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Diện tích PT20
1	4843191	37372	64957	97,93
2	4836603	44143	64957	97,89
3	4843191	37372	57157	97,93
4	4865724	43346	44360	98,04
5	4908907	42333	60910	98,26
6	4846672	39520	52886	97,97
			TB \pm SD	98,0 \pm 0,1

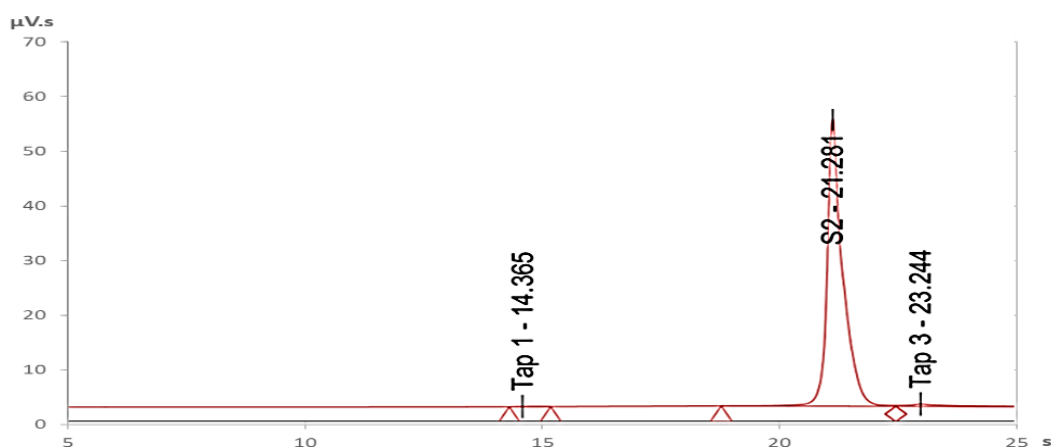


Hình 3.29. Sắc ký đồ phân tích độ tinh khiết của **PT20** mẫu bơm lần 1

Phân tích **PT6** sử dụng sắc ký lỏng, phát hiện chất ở bước sóng 220 nm, thể tích bơm mẫu 10 μl , tổng thời gian phân tích một mẫu là 30 phút. Sắc ký đồ cho một pic chính **PT6** ở khoảng 21,3 phút và hai pic phụ Tap 1, Tap 3 tại thời gian lưu khoảng 14,4 và 23,2 phút. Kết quả tính % diện tích tín hiệu chính (bơm 6 mẫu) so với tổng diện tích ba tín hiệu xuất hiện trên sắc ký đồ được trình bày trong bảng 3.11. Độ tinh khiết của chất đánh dấu **PT6** được xác định là $98,7 \pm 0,6$ %.

Bảng 3.11. Kết quả xác định độ tinh khiết của hợp chất **PT6** – vladinol F

Mẫu bơm	Diện tích pic PT6 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Diện tích Tap 1 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Diện tích Tap 3 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% diện tích PT6
1	53911341	21254	494647	99,07
2	54801468	18924	1149754	97,85
3	53770456	20229	503153	99,29
4	55854596	22648	1182424	97,95
5	54000122	21570	483194	99,06
6	54991158	20732	365422	99,06
			TB \pm SD	98,7 \pm 0,6

Hình 3.30. Sắc ký đồ phân tích độ tinh khiết của **PT6** mẫu bơm lần 1

Qua thực nghiệm đã xây dựng được quy trình chiết xuất hai chất chính từ dược liệu dứa dại *Pandanus tonkinensis*, chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (**PT20**) có khối lượng 254 mg và chất vladinol F (**PT6**) có khối lượng 125 mg với độ tinh khiết lớn hơn 98%. Hai chất này có hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa sẽ được lựa chọn làm chất đánh dấu của dược liệu nghiên cứu.

3.4. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và chất vladinol F trong loài dứa dại *Pandanus tonkinensis*

3.4.1. Xây dựng quy trình phân tích đồng thời hai chất đánh dấu bằng HPLC

3.4.1.1. Lựa chọn cột sắc ký và bước sóng phát hiện

Qua nghiên cứu các đặc điểm về tính chất lý hóa và công thức cấu tạo cùng với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn cột phân tích là cột sắc ký mao quản Agilent C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm).

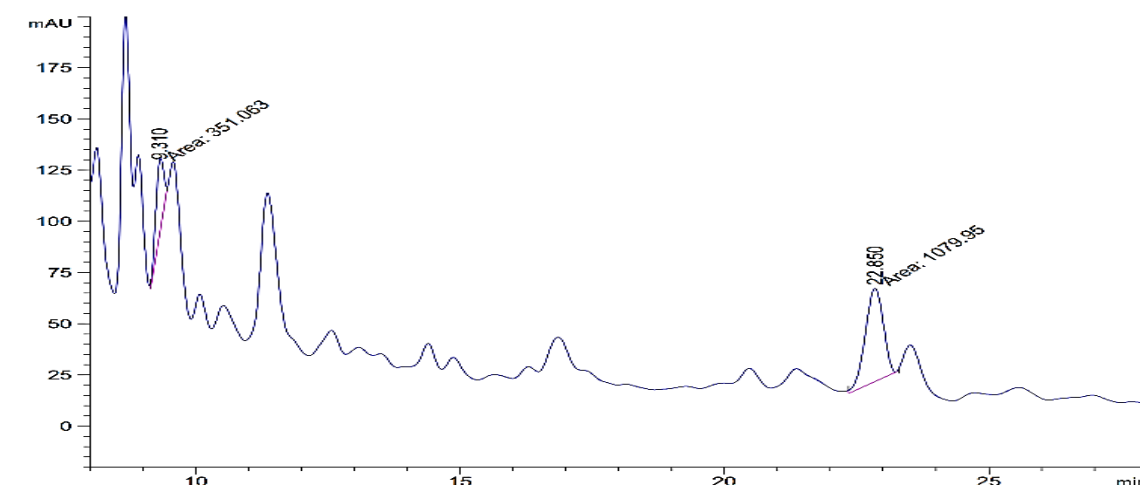
Thực hiện quét phổ UV mẫu chuẩn đơn của hai chất đánh dấu ở dải bước sóng 200 - 400nm. Kết quả cho thấy **PT20** có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 228 nm và 280 nm, **PT6** có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 280nm.

Tiến hành tiêm sắc ký mẫu thử (chiết bằng nước và methanol) ở cả tại hai bước sóng 228 nm và 280 nm, nhận thấy tại bước sóng 228 nm cả 2 chất đánh dấu **PT20** và **PT6** đều có đáp ứng cao hơn. Do đó bước sóng 228 nm được lựa chọn để phân tích đồng thời hai chất trên, tránh các sai số ảnh hưởng do bước sóng.

3.4.1.2. Lựa chọn pha động, tỷ lệ pha động và tốc độ dòng

Qua các đặc điểm về tính chất lý hóa và công thức cấu tạo, kết hợp với sự có sẵn của hóa chất, dung môi hiện có của phòng thí nghiệm, pha động gồm acetonitril và acid acetic 0,1% được lựa chọn để khảo sát.

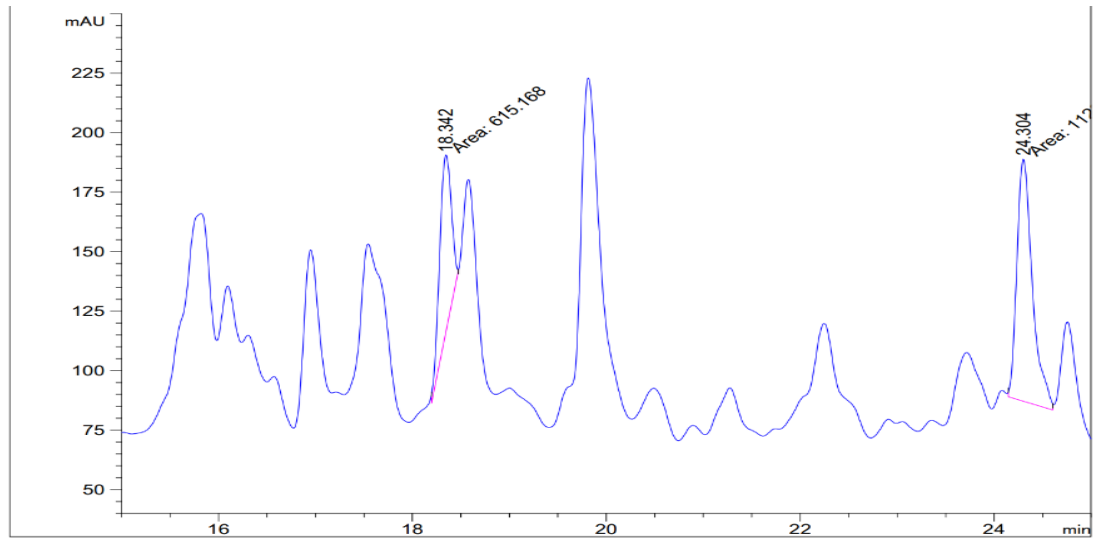
Tiến hành khảo sát chương trình đẳng dòng với pha động gồm acetonil và acid acetic 0,1% với tỷ lệ 20: 80 (hệ pha động 1), tốc độ dòng 1 ml/phút trên dung dịch thử. Kết quả thu được như hình 3.30



Hình 3.31. Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 1: đẳng dòng acetonil và acid acetic 0,1% , tỷ lệ 20: 80

Từ hình ảnh sắc ký đồ thu được sau khi khảo sát, thấy rằng tại hệ pha động này có xuất hiện pic của hai chất phân tích với thời gian lưu hợp lý. Tuy nhiên, pic **PT20** và pic chất lạ bên cạnh chưa tách tốt. Để khắc phục những hạn chế ở trên, chương trình đẳng dòng được chuyển sang chương trình gradient dung môi (hệ pha động 2), tốc độ dòng 1 ml/phút như sau:

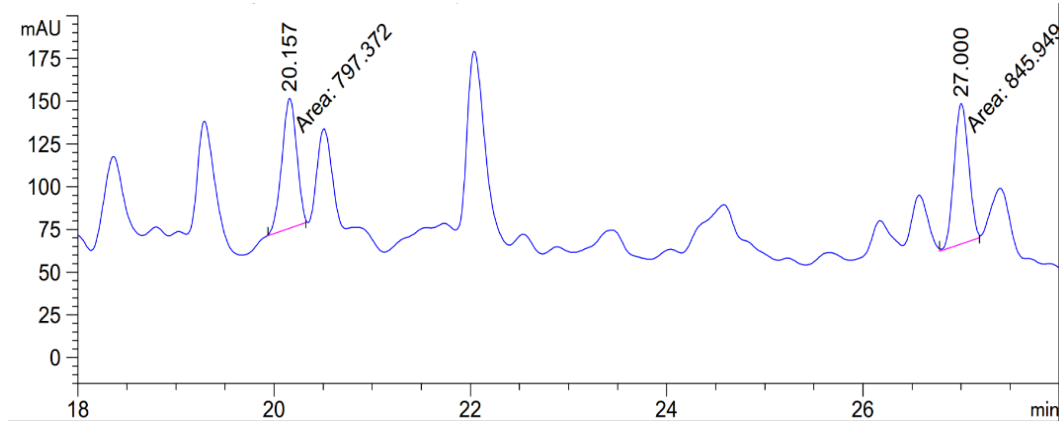
Thời gian (phút)	Pha A: Acetonitril (% tt/tt)	Pha B: Acid acetic 0,1% (% tt/tt)
0	10	90
25	30	70
40	90	10
40 – 50	10	90



Hình 3.32. Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 2: gradient dung môi acetonil và acid acetic 0,1%

Kết quả phân tích sử dụng chương trình gradient dung môi (hệ pha động 2) như hình 3.31. Từ hình ảnh sắc ký đồ thu được sau khi khảo sát, thấy rằng tại hệ pha động 2 có xuất hiện pic của hai chất phân tích với thời gian lưu hợp lý. Tuy nhiên, pic **PT20** và pic chất lạ bên cạnh đã tách tốt hơn so với hệ pha động 1, tuy nhiên vẫn chưa tách hẳn ra khỏi nhau. Để khắc phục những hạn chế ở trên, chương trình gradient dung môi được thay đổi theo hệ pha động 3 như sau:

Thời gian (phút)	Pha A: Acetonitril (% tt/tt)	Pha B: Acid acetic 0,1% (% tt/tt)
0	10	90
30	30	70
40	90	10
40-50	10	90



Hình 3.33. Sắc ký đồ dung dịch thử sử dụng hệ pha động 3: gradient dung môi acetoni và acid acetic 0,1%

Từ kết quả trong sắc ký đồ hình 3.32 nhận thấy, với chương trình gradient theo hệ dung môi 3, các pic gọn không còn hiện tượng bị kéo đuôi, tách hoàn toàn, thời gian lưu hợp lý.

Như vậy, qua quá trình khảo sát thực nghiệm, các điều kiện sắc ký được lựa chọn như sau:

- Cột Agilent C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μ m) hoặc cột tương đương
- Detector: UV 228 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm: 10 μ l
- Pha động: A: Acetonitril – B: Dung dịch acid acetic 0,1%

Thời gian (phút)	Pha A – acetonitril (% tt/tt)	Pha B – Dung dịch acid acetic 0,1% (% tt/tt)
0	10	90
30	30	70
40	90	10
41- 50	10	90

3.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu trước khi phân tích định lượng chất đánh dấu

* Khảo sát dung môi chiết mẫu

Hai loại dung môi chiết mẫu được sử dụng để khảo sát là dung môi methanol

50% và ethanol 50%.

Chiết chất phân tích ra khỏi dược liệu *Pandanus tonkinensis* với tỷ lệ 10,0g dược liệu /100 ml dung môi, với mỗi loại dung môi thực hiện chiết 3 lần có hỗ trợ siêu âm mỗi lần 30 phút, gộp dịch chiết, cô quay và hòa tan lại cao trong 5 ml dung môi thu dịch chiết cuối lần 1. Lặp lại quá trình chiết nói trên thu dịch chiết cuối lần 2. Phân tích các dịch chiết cuối lần 1, lần 2 của từng dung môi bằng HPLC, so sánh các kết quả để lựa chọn dung môi, số lần chiết để có khả năng tách chiết các chất phân tích hiệu quả nhất.

+ *Khảo sát dung môi chiết ethanol 50%*

Sau khi sử dụng dung môi ethanol 50 % để chiết 10,0 gam dứa dại *Pandanus tonkinensis* hiệu suất 2 chất **PT20** và **PT6** thu được qua 2 lần chiết được trình bày trong bảng 3.12. So sánh lượng **PT20** và **PT6** chiết được trong dịch chiết cuối lần 1 và lần 2 bằng ethanol 50% thấy diện tích chất đánh dấu **PT20**, **PT6** trong dịch chiết lần 1 chiếm lần lượt 92,5 và 88,9 % diện tích chất đánh dấu **PT20**, **PT6** có trong dược liệu dứa dại, như vậy không cần thêm dịch chiết lần 2.

*Bảng 3.12. Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong Dứa dại *Pandanus tonkinensis* chiết bằng ethanol 50%*

STT	Dịch chiết lần 1		Dịch chiết lần 2		Hiệu suất chiết lần 1 (%)	
	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)	PT20	PT6
1	781,062	676,150	63,319	82,735	92,50	89,10
2	783,450	678,912	63,990	83,523	92,45	89,05
3	782,104	662,330	62,760	83,967	92,57	88,75
TB	782	672	63,4	83,4	92,5	88,9
RSD(%)	0,15	1,32	0,97	0,75	0,07	0,21

+ *Khảo sát dung môi chiết methanol 50%*

Sau khi sử dụng dung môi methanol 50% để chiết 10,0 gam loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* hiệu suất 2 chất **PT20** và **PT6** thu được qua 2 lần chiết được biểu diễn trong bảng 3.13. So sánh lượng **PT20** và **PT6** chiết được trong dịch chiết cuối lần 1 và lần 2 bằng methanol 50% thì hàm lượng chất đánh dấu **PT20**, **PT6** trong dịch chiết lần 1 chiếm lần lượt 99,67 và 99,48 % hàm lượng chất đánh dấu

PT20, PT6 có trong dược liệu dứa dại, như vậy không cần thêm dịch chiết lần 2.

Bảng 3.13. Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong dứa dại Pandanus tonkinensis chiết bằng methanol 50%

STT	Dịch chiết lần 1		Dịch chiết lần 2		Hiệu suất chiết lần 1 (%)	
	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)	PT20	PT6
1	674,069	616,184	43,624	64,171	93,92	90,57
2	658,801	620,893	44,025	65,123	93,74	90,51
3	674,363	635,466	44,990	66,008	93,75	90,59
TB	669	624	44,2	65,1	93,8	90,6
RSD(%)	1,33	1,61	1,59	1,41	0,11	0,05

Để so sánh kết quả chiết các chất đánh dấu bằng ethanol 50% và methanol 50%, diện tích pic **PT20** và **PT6** trong dịch chiết lần 1 của 10,0 gam dược liệu dứa dại bằng dung môi ethanol 50% và methanol 50% được trình bày ở bảng 3.14. Diện tích chất đánh dấu **PT20, PT6** chiết từ loài dứa dại *Pandanus tonkinensis* bằng methanol 50% cao hơn so với chiết bằng ethanol 50% do đó lựa chọn methanol 50% là dung môi chiết mẫu.

Bảng 3.14. Kết quả diện tích pic các chất đánh dấu trong dứa dại Pandanus tonkinensis chiết bằng ethanol 50% và methanol 50%

STT	Chiết lần ethanol 50%		Chiết lần methanol 50%	
	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)	Diện tích pic PT20 (mAu.s)	Diện tích pic PT6 (mAu.s)
1	781,062	676,150	674,069	616,184
2	783,450	678,912	658,801	620,893
3	782,104	662,330	674,363	635,466
TB	782	672	669	624
RSD(%)	0,15	1,32	1,33	1,61

3.4.3. Quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và chất vladinol F trong dược liệu dứa dại *Pandanus tonkinensis*

- ❖ Qua khảo sát sơ bộ, các điều kiện sau được sử dụng cho phân tích HPLC sử dụng detector mảng diod (DAD):
 - Cột Agilent C18 (250 mm \times 4,6 mm; 5 μ m) hoặc cột tương đương
 - Detector: UV 228 nm
 - Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
 - Thể tích tiêm: 10 μ l
 - Pha động: A: Acetonitril – B: Dung dịch acid acetic 0,1%

Bảng 3.15. Chương trình pha động định lượng **PT20** và **PT6** trong dược liệu dứa dại *Pandanus tonkinensis*

Thời gian (phút)	Pha A – acetonitril (% tt/tt)	Pha B – Dung dịch acid acetic 0,1% (% tt/tt)
0	10	90
30	30	70
40	90	10
41- 50	10	90

- ❖ Các dung dịch cho thực nghiệm được chuẩn bị như sau:
 - *Dung dịch chuẩn gốc pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT20)*: Cân chính xác khoảng 5,0 mg chuẩn **PT20** vào bình định mức 5,0 ml, thêm khoảng 3,0 ml methanol 50%, lắc siêu âm để hòa tan rồi định mức vừa đủ, trộn đều.
 - *Dung dịch chuẩn gốc vladinol F (PT6)*: Cân chính xác khoảng 5,0 mg chuẩn **PT6** vào bình định mức 5,0 ml, thêm khoảng 3,0 ml methanol 50%, lắc siêu âm để hòa tan rồi định mức vừa đủ, trộn đều.
 - *Dung dịch chuẩn PT20*: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc **PT20** vào bình định mức 20,0 ml, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch, lắc đều.
 - *Dung dịch chuẩn PT6*: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc **PT6** vào bình định mức 20 ml, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch, lắc đều.
 - *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Hút chính xác lần lượt 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc **PT20** và 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc **PT6** vào bình định mức 20 ml, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch, lắc đều

- *Dung dịch thử - dịch chiết dược liệu*: Cân chính xác 5,0 g bột dược liệu vào bình nón 100 ml. Thêm chính xác 50,0 ml methanol 50%, lắc siêu âm 30 phút (chiết 3 lần). Gộp dịch chiết thu được, cô quay đến cao. Hòa tan cao trong 5,0 ml methanol 50% thu được dung dịch thử (mỗi mẫu làm 3 thử).

❖ **Đánh giá kết quả:**

- Xác định vị trí các chất chuẩn: Tiêm các dung dịch chuẩn **PT20** và dung dịch chuẩn hỗn hợp để xác định vị trí các pic của **PT20** và **PT6**

- Kiểm tra độ thích hợp hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp (tiêm 6 lần). Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic **PT20** và **PT6** không được lớn hơn 2%

- Tiến hành sắc ký với dung dịch thử để tính hàm lượng **PT20**, **PT6** có trong mỗi mẫu dược liệu.

Hàm lượng **PT20**, **PT6** trong dược liệu được tính theo công thức 3.1 sau:

$$C_{PT20, PT6 \text{ trong dược liệu (mg/g)}} = \frac{C_{PT20, PT6 \text{ trong dịch tiêm}} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 5 \text{ (ml)}}{m_{\text{dược liệu (g)}} \times (1 - \text{độ ẩm dược liệu})} \quad (3.1)$$

3.4.4. Thẩm định quy trình định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O-β-D-glucopyranoside và chất vladinol F trong dứa dại *Pandanus tonkinensis*

Theo các quy định của USFDA, AOAC, USP và ICH đối với phương pháp định lượng hợp chất pinoresinol 4'-O-β-D-glucopyranoside và chất vladinol F các thông số thẩm định bao gồm: tính đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian), giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng.

3.4.4.1. Tính đặc hiệu

Thực nghiệm: Tiến hành phân tích sắc ký các dung dịch: mẫu trắng, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử theo điều kiện phân tích đã lựa chọn.

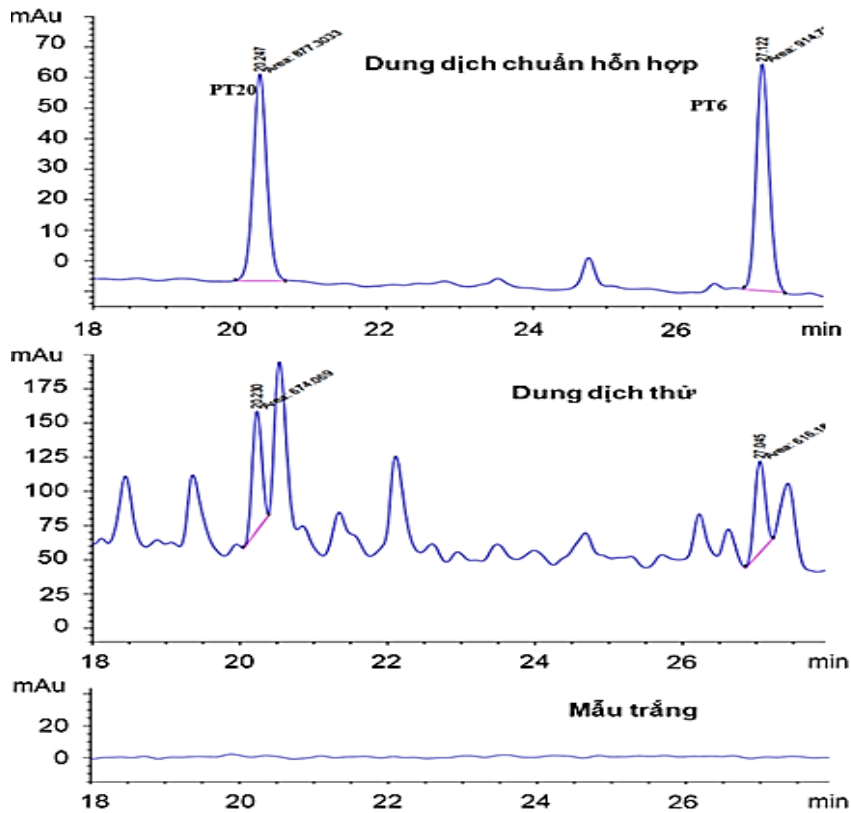
Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải xuất hiện các pic có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV pic của các chất đánh dấu trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp (khác nhau không quá 2,0%), sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng với các chất đánh dấu.

Sau khi chạy sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử và dung môi methanol (mẫu trắng) kết quả thời gian lưu (t_R) của các pic **PT20** và **PT6** thu được trong bảng 3.16.

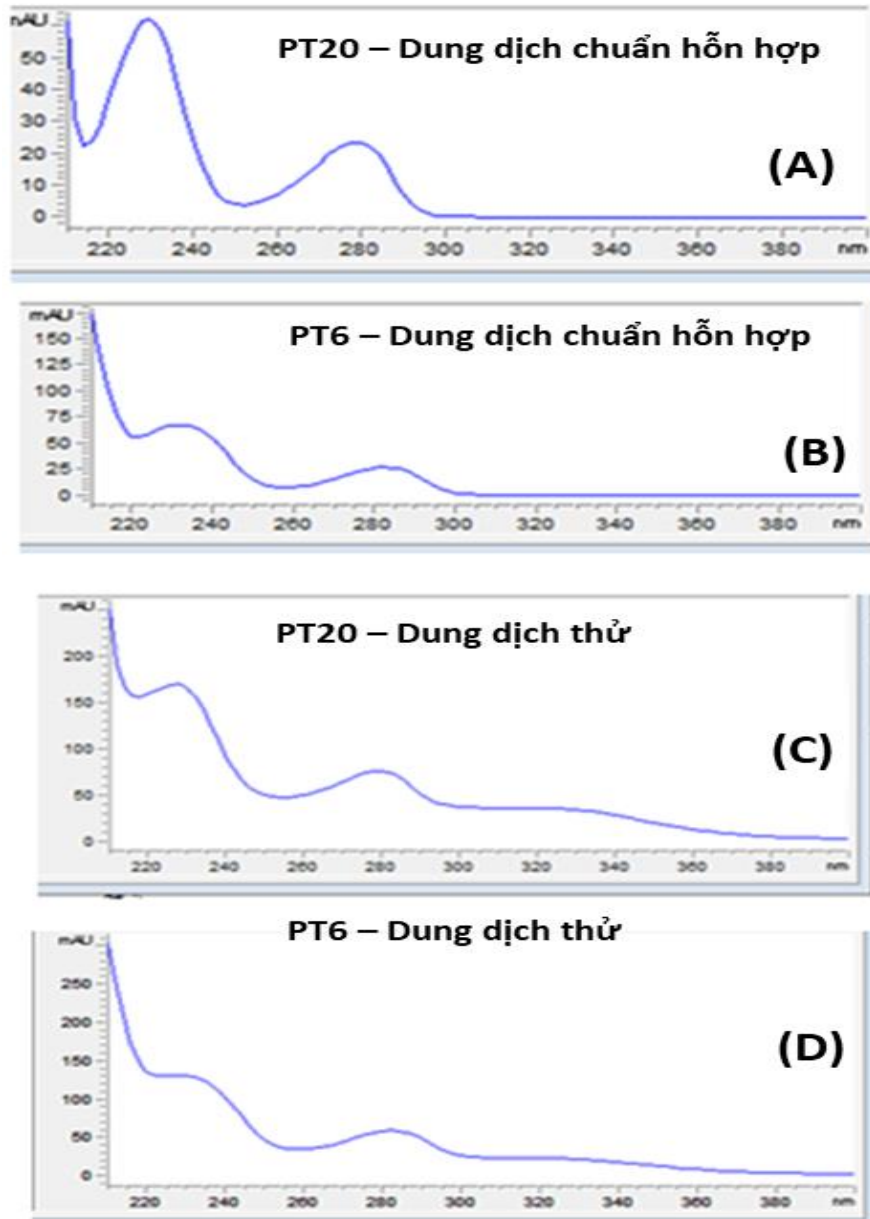
Bảng 3.16. So sánh thời gian lưu của các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử và mẫu trắng

Sắc ký đồ	t_R của pic PT20 (phút)	t_R của pic PT6 (phút)	Ảnh hưởng của mẫu trắng
Chuẩn hỗn hợp	20,247	27,122	
Dung dịch thử	20,230	27,045	
Mẫu trắng	Không có	Không có	Không ảnh hưởng

Thực nghiệm cho thấy trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện các pic có thời gian lưu 20,230 phút và 27,045 phút tương ứng với pic **PT20** (20,247 phút) và pic **PT6** (27,122 phút) trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp. Phổ UV của pic **PT20** thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử tương ứng với phổ UV của pic **PT20** thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp với $\lambda_{\max} = 228,2$ nm và 280,0 nm. Phổ UV của pic **PT6** thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử tương ứng với phổ UV của pic **PT6** thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp với $\lambda_{\max} = 280,0$ nm. Mẫu trắng không ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Các kết quả này cho thấy quy trình phân tích đạt yêu cầu về tính đặc hiệu



Hình 3.34. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử và mẫu trắng



Hình 3.35. Phổ UV của các tín hiệu **PT20**, **PT6** thu được trong sắc ký đồ mẫu dung dịch chuẩn và mẫu dung dịch thử

3.4.4.2. Độ thích hợp hệ thống

Thực nghiệm: Pha 2 dung dịch chuẩn gốc **PT20**, 2 dung dịch chuẩn gốc **PT6** bằng các lần cân khác nhau. Từ các dung dịch chuẩn gốc trên pha dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) và dung dịch chuẩn hỗn hợp (2) như hướng dẫn phần 3.4.2. Phân tích sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) lặp lại 6 lần, phân tích sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp (2) lặp lại 3 lần. Ghi nhận các thông số về thời gian lưu và diện tích tín hiệu các chất đánh dấu trong các lần phân tích. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD)

theo thời gian lưu và diện tích pic chất đánh dấu khi phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp (1), tính hệ số tương đồng (RF) của từng chất khi so sánh tỷ lệ diện tích pic so với tỷ lệ nồng độ của hợp chuẩn (1) và (2)

Yêu cầu: RSD thời gian lưu $\leq 1,0\%$, RSD của diện tích pic $\leq 2,0\%$, hệ số tương đồng: $0,98 \leq RF \leq 1,02$. Hệ số tương đồng được xác định theo biểu thức 3.2:

$$RF = \frac{S_{C2}}{S_{C1}} \times \frac{m_{C1}}{m_{C2}} \quad (3.2)$$

Trong đó:

S_{C1} : Diện tích pic **PT20/PT6** trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp (1)

S_{C2} : Diện tích pic **PT20/PT6** trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp (2)

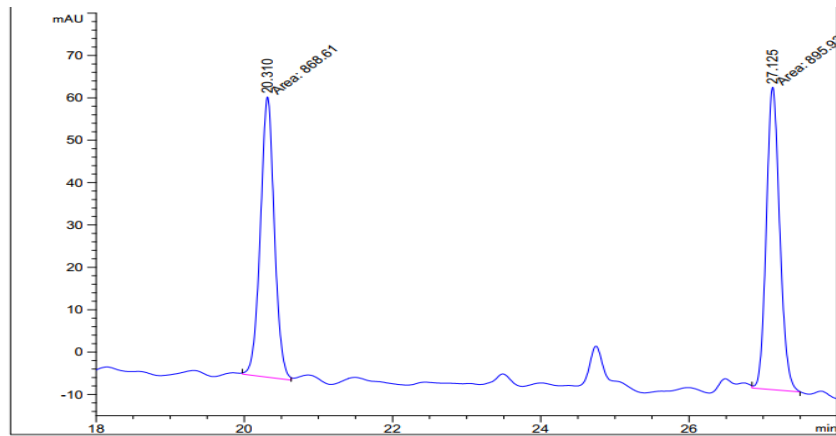
m_{C1} : Lượng **PT20/PT6** dùng để pha dung dịch chuẩn gốc (1) tương ứng (mg)

m_{C2} : Lượng **PT20/PT6** dùng để pha dung dịch chuẩn gốc (2) tương ứng (mg)

Kết quả so sánh về thời gian lưu và diện tích pic **PT20, PT6** của từng lần phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) và hỗn hợp (2) được trình bày như trong bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả thời gian lưu và diện tích pic **PT20, PT6** thu được trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) và dung dịch chuẩn hỗn hợp (2)

STT (lần bom)	Dung dịch chuẩn hỗn hợp (1)		Dung dịch chuẩn hỗn hợp (2)	Dung dịch chuẩn hỗn hợp (1)		Dung dịch chuẩn hỗn hợp (2)
	t_R PT20 (phút)	S_{pic} PT20 (mAU.s)	S_{pic} PT20 (mAU.s)	t_R PT6 (phút)	S_{pic} PT6 (mAU.s)	S_{pic} PT6 (mAU.s)
1	20,274	877,33270	842,11656	27,122	914,72601	875,25109
2	20,310	868,60956	843,05712	27,125	895,92957	876,00235
3	20,301	862,74652	843,99453	27,128	898,45697	876,21226
4	20,299	891,30774		27,133	885,65656	
5	20,255	883,30621		27,082	889,45502	
6	20,321	889,92517		27,101	913,48248	
TB	20,293	879	843	27,115	900	876
RSD (%)	0,12	1,31	0,11	0,07	1,35	0,06
	Hệ số tương đồng RF = 1,01			Hệ số tương đồng RF = 1,00		



Hình 3.36. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp (1) lần bơm 2

Giá trị độ lệch chuẩn tương đối về thời gian lưu của pic **PT20**, **PT6** lần lượt là 0,12% và 0,07% đạt yêu cầu $\leq 1,0\%$, giá trị độ lệch chuẩn tương đối về diện tích pic của pic **PT20**, **PT6** lần lượt là 1,31% và 1,35% đạt yêu cầu $\leq 2,0\%$, hệ số tương đồng của **PT20** và **PT6** giữa hai mức nồng độ có giá trị $RF = 1,01$ và $RF = 1,00$. Như vậy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn cho kết quả lặp lại về thời gian lưu và diện tích pic **PT20**, **PT6**, hệ thống thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao đã sử dụng là phù hợp đảm bảo độ ổn định của phép phân tích.

3.4.4.3. Khoảng đường chuẩn

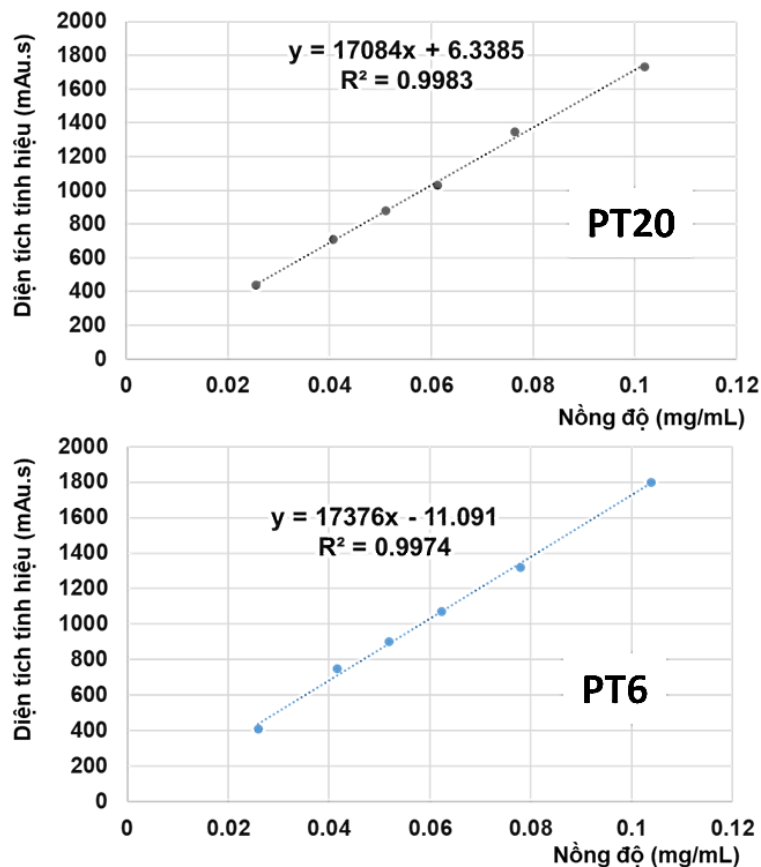
Thực nghiệm: Pha dãy 6 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ bằng 50%, 80%, 100%, 120%, 150% và 200% so với nồng độ dung dịch chuẩn hỗn hợp ở phần chuẩn bị dung dịch. Căn cứ vào lượng cân chính xác **PT20** và **PT6** khi pha dung dịch chuẩn gốc tính được nồng độ của **PT20** và **PT6** trong 6 dung dịch chuẩn hỗn hợp là: 25,5 và 26,0 $\mu\text{g/ml}$, 40,8 và 41,6 $\mu\text{g/ml}$, 51,0 và 51,9 $\mu\text{g/ml}$, 61,2 và 62,3 $\mu\text{g/ml}$, 76,4 và 77,9 $\mu\text{g/ml}$, 101,9 và 103,9 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành sắc ký, ghi lại diện tích tín hiệu pic **PT20**, **PT6** xác định phương trình hồi qui tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa diện tích pic **PT20**, **PT6** và nồng độ **PT20**, **PT6** của các dung dịch chuẩn.

Yêu cầu: Hệ số tương quan tuyến tính $0,99 \leq R^2 \leq 1$, % hệ số chặn (so với diện tích pic tại nồng độ 100%) $\leq 2,0\%$.

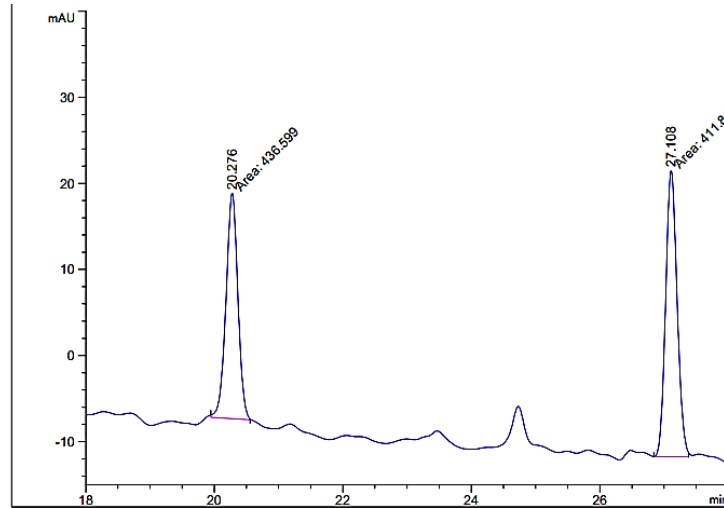
Kết quả khảo sát khoảng đường chuẩn được trình bày trong bảng 3.18 và hình 3.36.

Bảng 3.18. Kết quả khảo sát khoảng đường chuẩn để định lượng **PT20** và **PT6**

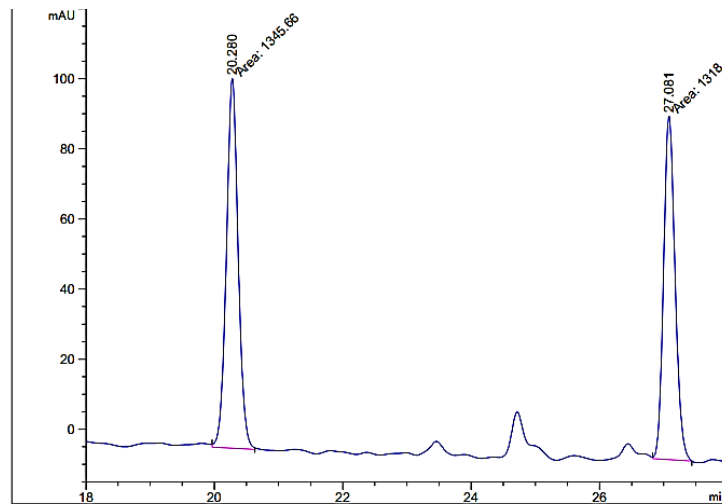
Chất đánh dấu	PT20		PT6	
	Nồng độ (mg/mL)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (mg/mL)	Diện tích pic (mAU.s)
Khoảng đường chuẩn	$25,5 \times 10^{-3}$	436,59933	$26,0 \times 10^{-3}$	411,81412
	$40,8 \times 10^{-3}$	708,55096	$41,6 \times 10^{-3}$	749,87158
	$51,0 \times 10^{-3}$	878,87132	$51,9 \times 10^{-3}$	899,61777
	$61,2 \times 10^{-3}$	1028,60651	$62,3 \times 10^{-3}$	1071,64014
	$76,4 \times 10^{-3}$	1345,65894	$77,9 \times 10^{-3}$	1318,18884
	$101,9 \times 10^{-3}$	1733,94653	$103,9 \times 10^{-3}$	1799,81677
	Phương trình hồi qui	$y = 17084x + 6,3385$		$y = 17376x - 11,091$
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9983 > 0,99$		$R^2 = 0,9974 > 0,99$	
% Y	0,72% (< 2,0%)		1,23% (< 2,0%)	

Hình 3.37. Các đường chuẩn định lượng pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside (**PT20**) và vladinol F (**PT6**)

(A)



(B)



Hình 3.38. Sắc ký đồ phân tích hỗn hợp chuẩn hai chất đánh dấu tại (A) mức nồng độ 1: 25,5 $\mu\text{g/ml}$ PT20 và 26,0 $\mu\text{g/ml}$ PT6, (B) mức nồng độ 5: 76,4 $\mu\text{g/ml}$ PT20 và 77,9 $\mu\text{g/ml}$ PT6

Trong khoảng nồng độ từ $25,5 \times 10^{-3}$ tới $101,9 \times 10^{-3}$ mg/ml đối với **PT20** có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ **PT20** với hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9983$. Trong khoảng nồng độ từ $26,0 \times 10^{-3}$ tới $103,9 \times 10^{-3}$ mg/ml đối với **PT6** có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ **PT6** với hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9974$. Như vậy các đường chuẩn có tính tuyến tính tốt để phân tích định lượng **PT20** và **PT6**.

3.4.4.4. Độ chụm

* Độ lặp lại

Thực nghiệm: Tiến hành định lượng mẫu thử 6 lần độc lập với kiểm nghiệm viên 1. Xác định giá trị trung bình và RSD (%) của kết quả xác định hàm lượng các chất đánh dấu trong các mẫu thử. Tính RSD kết quả định lượng của kiểm nghiệm viên 1 (n = 6).

Yêu cầu: So sánh RSD (n = 6) với ngưỡng quy định theo hướng dẫn của AOAC ở khoảng nồng độ tương ứng.

Hàm lượng **PT20**, **PT6** trong mẫu thử là 40,9 µg/g và 36,7 µg/g tính theo được liệu khan. Kết quả đánh giá độ lặp lại được trình bày trong bảng 3.19. Phương pháp đã xây dựng có độ lặp lại RSD (n = 6) đối với **PT20** và **PT6** đều nhỏ hơn 5,3% đáp ứng các yêu cầu qui định theo hướng dẫn của AOAC với mẫu thử có hàm lượng từ 0,001 % đến 0,01 %.

Bảng 3.19. Kết quả khảo sát độ lặp lại

Mẫu thử	Lượng cân (g)	S _{pic} PT20 (mAU.s)	S _{pic} PT6 (mAU.s)	Hàm lượng PT20 (mg/g)	Hàm lượng PT6 (mg/g)
1	5,10042	674,06952	616,18457	0,0404	0,0367
2	5,32086	704,51483	643,13428	0,0404	0,0368
3	5,52441	724,00456	665,42011	0,0400	0,0366
4	5,31051	706,41534	628,91473	0,0406	0,0360
5	5,20041	700,22448	632,86042	0,0411	0,0370
6	5,18079	699,01453	631,08778	0,0412	0,0371
TB				0,0405	0,0366
RSD (%)				1,13	1,02

* Độ tái lặp

Thực nghiệm: Kiểm nghiệm viên 1: Lấy kết quả ở mục độ lặp lại.

Kiểm nghiệm viên 2: Tiến hành thực nghiệm độ lặp lại như kiểm nghiệm viên 1, nhưng khác ngày. Xác định giá trị trung bình và RSD (%) của kết quả xác định hàm lượng chất đánh dấu trong các mẫu thử do mỗi kiểm nghiệm viên thử nghiệm và giữa hai kiểm nghiệm viên.

Yêu cầu: So sánh RSD (n = 6), RSD (n = 12) với các ngưỡng quy định theo hướng dẫn của AOAC ở khoảng nồng độ tương ứng.

Kết quả thu được khi phân tích mẫu thử 6 lần độc lập trong 2 ngày khác nhau, với 2 kiểm nghiệm viên khác nhau, được sử dụng để đánh giá độ chính xác (độ lặp lại và độ tái lập). Kết quả đánh giá độ tái lập được trình bày trong bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả khảo sát độ tái lập của phương pháp

	Ngày 1- kiểm nghiệm viên 1 (n = 6)	Ngày 2- kiểm nghiệm viên 2 (n = 6)	Hai ngày (n = 12)
Hàm lượng PT20 trung bình ($\mu\text{g/g}$)	40,5	41,2	40,9
RSD (%)	1,13	1,43	1,54
Hàm lượng PT6 trung bình ($\mu\text{g/g}$)	36,6	36,7	36,7
RSD (%)	1,02	1,67	1,32

Phương pháp đã xây dựng có độ tái lập RSD (n = 6) đối với **PT20** và **PT6** đều nhỏ hơn 5,3% và RSD (n = 12) đối với **PT20** và **PT6** đều nhỏ hơn 8% đáp ứng các yêu cầu qui định theo hướng dẫn của AOAC với mẫu thử có hàm lượng từ 0,001 % đến 0,01 %.

3.4.4.5. Độ đúng và khoảng làm việc

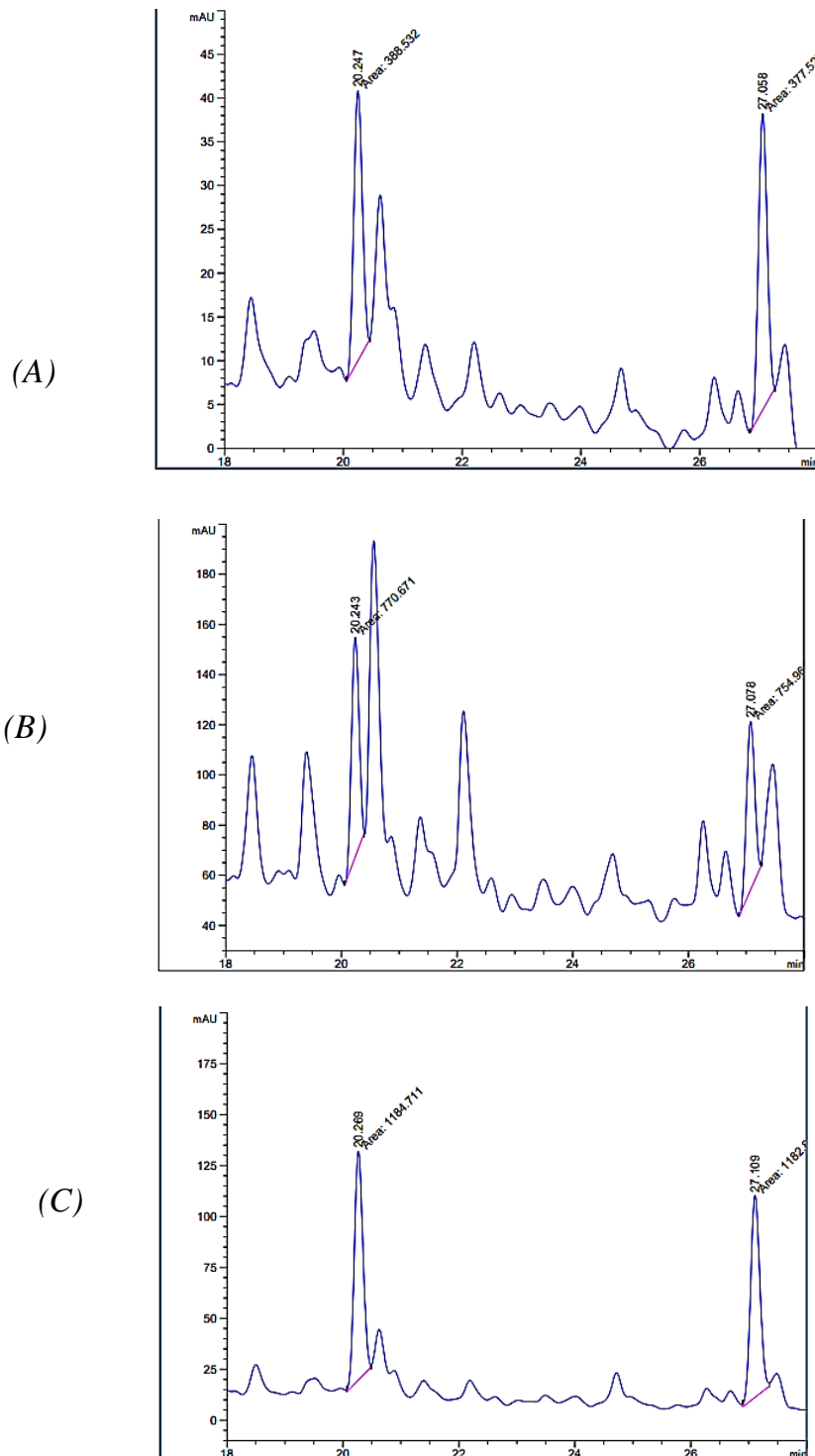
Thực nghiệm: Thêm vào nền mẫu thử một lượng đã biết chất đánh dấu để có tương ứng khoảng 50%, 100% và 150% của nồng độ chất phân tích có trong mẫu thử (các mẫu thêm có tên gọi: dung dịch định lượng mức 50%, 100% và 150%). Tiến hành định lượng 3 nồng độ, mỗi nồng độ thực hiện trên 3 mẫu. Độ đúng là tỷ lệ phục hồi % giữa nồng độ chất đánh dấu tìm thấy so với lượng chất đánh dấu thêm vào.

Yêu cầu: So sánh RSD (n = 3) ở từng mức thêm chuẩn với các ngưỡng quy định theo hướng dẫn của AOAC ở khoảng nồng độ tương ứng

Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu thử tại các mức nồng độ thử khoảng 50 %, 100 % và 150 % của nồng độ chuẩn làm việc. Thực hiện như sau:

- Dung dịch định lượng mức 50%: Cân chính xác khoảng 1,25 g dược liệu vào bình nón 100 ml, thêm 62,5 μL dung dịch chuẩn gốc **PT20** và 62,5 μl dung dịch chuẩn gốc **PT6**, thêm methanol 50% và xử lý như dung dịch thử.
- Dung dịch định lượng mức 100%: Cân chính xác khoảng 2,5 g dược liệu vào bình nón 100 ml, thêm 125 μl (hoặc 250 μl) dung dịch chuẩn gốc **PT20** và **PT6**, thêm methanol 50% và xử lý như dung dịch thử.

- Dung dịch định lượng mức 150%: Cân chính xác khoảng 2,5 g dược liệu vào bình nón 100 ml, thêm 250 μ l dung dịch chuẩn gốc **PT20** và **PT6**, thêm methanol 50% và xử lý như dung dịch thử.



Hình 3.39. Sắc ký đồ phân tích định lượng mức 50% (bơm lần 1), 100% (bơm lần 1) và 150% (bơm lần 1)

Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp được trình bày trong bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Mức nồng độ định lượng (% so với mẫu thử)	Lượng chuẩn thêm vào trung bình (μg)	Lượng chuẩn thêm tìm lại trung bình (μg)	Hiệu suất thu hồi trung bình (%)	RSD (%) (n = 3)
PT20: 50%	6,29	6,38	101	0,06
100%	12,58	12,66	101	0,82
150%	25,17	25,03	99	1,41
PT6: 50%	6,41	6,44	101	0,96
100%	12,82	13,01	101	0,55
150%	25,64	25,76	100	1,31

Giá trị trung bình của hiệu suất thu hồi **PT20** ở cả 3 mức thêm có giá trị từ 99% đến 101% với độ lệch chuẩn tương đối từ 0,06% đến 1,41%; với **PT6** trung bình hiệu suất thu hồi ở 3 mức nồng độ có giá trị từ 101% đến 102% và độ lệch chuẩn tương đối từ 0,55% đến 1,31%. Theo yêu cầu của AOAC với mẫu có hàm lượng từ 0,001 % đến 0,01 %, độ thu hồi mẫu trung bình phải đạt từ 90% đến 107%, như vậy phương pháp phân tích đảm bảo về độ đúng để định lượng **PT20** và **PT6**.

Từ kết quả thẩm định độ tuyến tính và độ đúng suy ra khoảng xác định của **PT20** và **PT6** đều từ 50% đến 150% nồng độ dung dịch trong phần định lượng (**PT20**) từ 0,0255 mg/ml đến 0,0764 mg/ml; **PT6** từ 0,0260 mg/ml đến 0,0779 mg/ml).

3.4.4.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Thực nghiệm:

Giá trị giới hạn phát hiện của thiết bị đối với chất đánh dấu trong dịch chiết (IDL) được xác định qua việc phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp, cách tiến hành cụ thể như sau: Pha loãng dần dung dịch chuẩn hỗn hợp và phân tích tới lúc diện tích pic chất đánh dấu gấp 3 lần tín hiệu nhiễu nền. Pha loãng gấp đôi dung dịch trên, tiêm vào hệ thống sắc ký, hầu như không xuất hiện đáp ứng pic trên sắc ký đồ.

Giới hạn định lượng của thiết bị đối với chất đánh dấu (IQL) được tính bằng 3,3 lần giới hạn phát hiện, được xác định qua việc phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp và cả dung dịch chuẩn hỗn hợp thêm vào nền dịch chiết được liệu.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp (MDL, MQL) quy theo hàm lượng chất đánh dấu trong dược liệu được tính theo giá trị giới hạn

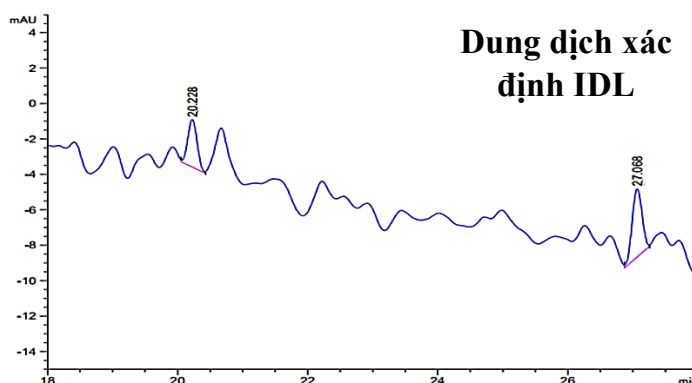
phát hiện, giới hạn định lượng chất đánh dấu khi phân tích bằng quy trình HPLC (IDL, IQL) nêu trên và hệ số quy đổi của quy trình xử lý mẫu (5 g dược liệu thu 5 ml dung dịch thử).

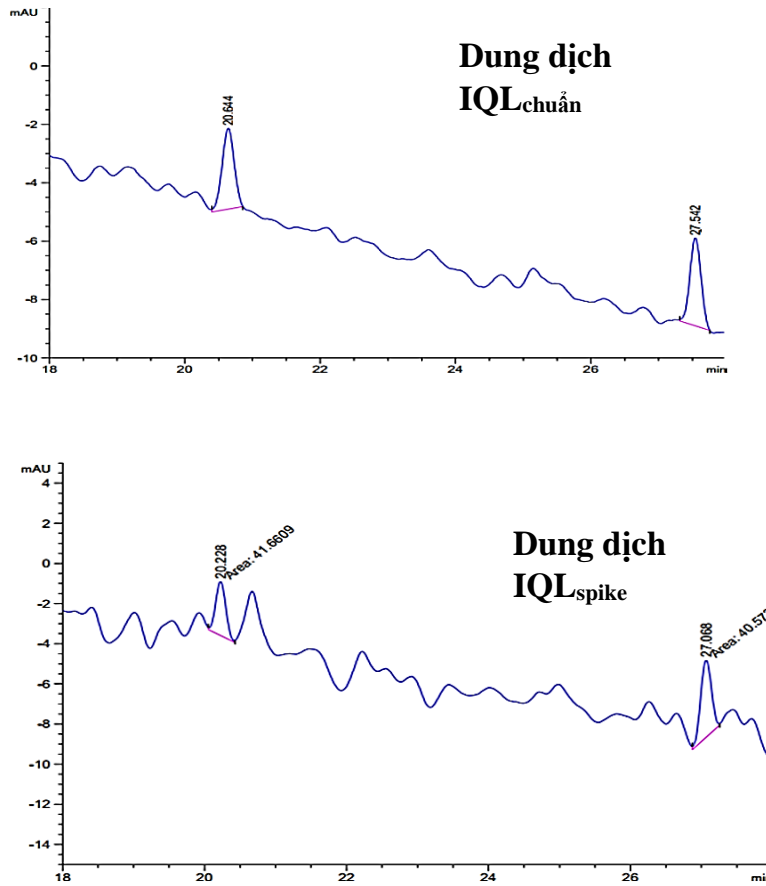
Kết quả:

Pha loãng dần dung dịch chuẩn hỗn hợp và tiêm vào máy sắc ký đến nồng độ **PT20** khoảng 0,76 µg/ml và **PT6** khoảng 0,78 µg/ml thì thu được pic **PT20** và **PT6** có đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền. Pha loãng gấp đôi dung dịch trên, tiêm vào hệ thống sắc ký, hầu như không xuất hiện đáp ứng pic trên sắc ký đồ. Như vậy, giới hạn phát hiện (IDL) với dung dịch chuẩn ở khoảng 0,76 µg/ml **PT20** và 0,78 µg/ml **PT6**. Theo tính toán giới hạn định lượng (IQL) của dung dịch chuẩn sẽ ở khoảng gấp 3,3 lần giới hạn phát hiện, tương ứng với nồng độ 2,55 µg/ml **PT20** và 2,60 µg/ml **PT6**.

Pha các dung dịch chuẩn hỗn hợp (dung dịch IQL_{chuẩn}) và dung dịch chuẩn hỗn hợp thêm vào nền dịch chiết dược liệu (dung dịch IQL_{spike}) có nồng độ **PT20**, **PT6** tương ứng 2,55 µg/ml và 2,60 µg/ml. Phân tích sắc ký mỗi dung dịch lặp lại 6 lần. Trên sắc ký đồ của dung dịch IQL_{chuẩn} và dung dịch IQL_{spike} các pic **PT20**, **PT6** xuất hiện rõ ràng, RSD (n = 6) diện tích pic **PT20**, **PT6** khi phân tích dung dịch LOQ_{spike} là 2,87% và 2,31% nhỏ hơn 7,3 % theo yêu cầu của AOAC. Như vậy, có thể khẳng định giới hạn định lượng đối với **PT20** và **PT6** lần lượt là 2,55 µg/ml và 2,60 µg/ml thu dung dịch thử.

Sử dụng hệ số quy đổi của quy trình xử lý mẫu: 5 g dược liệu chuyển vào 5 ml dung dịch thử tính được giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 0,76 µg/g **PT20** và 0,78 µg/g **PT6** dược liệu khô; giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) là 2,55 µg /g **PT20** dược liệu khô và 2,60 µg/g **PT6** dược liệu khô.





Hình 3.40. Kết quả xác định giới hạn định lượng

Như vậy kết quả thẩm định trong mục 3.4.3 cho thấy qui trình phân tích đồng thời **PT20** và **PT6** trong dược liệu dứa dại bằng phương pháp HPLC đáp ứng yêu cầu về tính đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), phù hợp để áp dụng kiểm tra định tính, định lượng đồng thời **PT20** và **PT6** trong dược liệu.

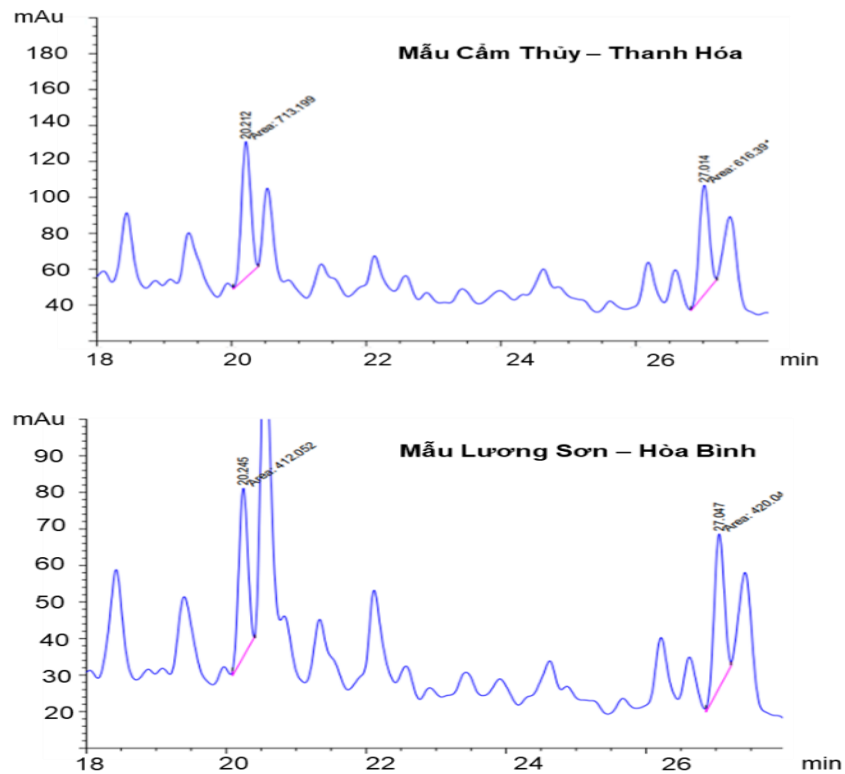
3.5. Định lượng pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (**PT20**) và vladinol F (**PT6**) trong dứa dại *Pandanus tonkinensis* thu thập ở 1 số địa phương

Sử dụng quy trình phân tích đã thẩm định ở trên đã xác định được hàm lượng trung bình của hai chất đánh dấu trong dứa dại *Pandanus tonkinensis* lấy tại Thanh Hóa, Hòa Bình và Thái Nguyên. Kết quả hàm lượng của các hợp chất **PT20** và **PT6** trong dược liệu thu thập ở các địa phương được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả định lượng pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT20) và vladinol F (PT6) trong dứa dại *Pandanus tonkinensis* lấy tại một số địa phương

	Mường Lát – Thanh Hóa	Cẩm Thủy - Thanh Hóa	Lương Sơn - Hòa Bình	Định Hóa - Thái Nguyên
PT20:				
Hàm lượng ($\mu\text{g/g}$)	40,9	43,5	25,0	38,6
RSD % (n=3)	1,54	0,9	1,62	0,37
PT6:				
Hàm lượng ($\mu\text{g/g}$)	36,7	37,1	24,3	30,7
RSD % (n=3)	1,32	1,44	1,97	1,96

Hàm lượng trung bình của hai chất đánh dấu trong dứa dại *Pandanus tonkinensis* lấy tại Cẩm Thủy - Thanh Hóa, Mường Lát – Thanh Hóa, Lương Sơn - Hòa Bình, Định Hóa – Thái Nguyên trong khoảng $25,0 \pm 0,4$ tới $43,5 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ dược liệu khô với pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside và $24,3 \pm 0,5$ tới $37,1 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ dược liệu khô với vladinol F.



Hình 3.41. Sắc ký đồ phân tích pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT6) và vladinol F (PT20) trong dứa dại *Pandanus tonkinensis*

KẾT LUẬN

Sau quá trình thực hiện, luận án đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và đạt được các mục tiêu đề ra ban đầu. Các kết quả nghiên cứu đạt được như sau:

1. Nghiên cứu về thành phần hóa học

Sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ hiện đại đã phân lập và xác định cấu trúc 28 hợp chất từ quả và rễ của loài *Pandanus tonkinensis*. Trong đó có 3 hợp chất mới. Cụ thể:

- Từ quả loài *P.tonkinensis* phân lập được 8 hợp chất đã biết gồm: ficusal (PT1), syringaresinol (PT2), medioresinol (PT3), lariciresinol (PT4), secoisolariciresinol (PT5), vladinol F (PT6), luteoliflavan (PT7), isorhapontigenin (PT8).

- Từ rễ loài *P.tonkinensis* phân lập được 20 hợp chất. Trong đó có 3 hợp chất mới: (7S)-2,6-dimethoxyphenyl-7,9-propanediol-1-O- β -D-glucopyranoside (PT10), *trans*-cinnamyl alcohol 9-O-(6'-O- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucopyranoside (PT25), 4-(3-hydroxypropyl)-2,6 dimethoxyphenol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (PT26) và 17 hợp chất đã biết: dihydrosyringin (PT9), (6S,9S)-roseoside (PT11), 1-O- β -D-glucopyranosyl-2-{2,6-dimethoxy-4-[1-(*E*)-propen-3-ol]phenoxy}propan-3-ol (PT12), 1-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2-methoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol (PT13), benzyl O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (PT14), 1-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol (PT15), (7R,8R)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside (PT16), (7S,8S)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside (PT17), pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucoside (PT18); isoeucommin A (PT19), pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (PT20); acanthoside B (PT21), eucommin A (PT22), rourinoside (PT23), (7S,8R)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside (PT24); kelampayoside A (PT27) và urolignoside (PT28).

2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm và chống oxy hóa của các chất đã phân lập bằng thử nghiệm ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264,7, cảm ứng bằng LPS và thử nghiệm ức chế quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào của 28 hợp chất phân lập được từ quả và rễ của loài *P.tonkinensis*. Kết quả cho thấy:

- 22 hợp chất PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6, PT7, PT8, PT9, PT10, PT11, PT13, PT15, PT16, PT17, PT20, PT22, PT23, PT24, PT25, PT26, PT27 thể hiện khả năng kháng viêm trong đó 14 hợp chất PT1, PT4, PT5, PT6, PT7, PT9, PT11,

PT15, PT16, PT20, PT22, PT23, PT26, PT27 có giá trị IC_{50} từ 1,78 – 37,03 μm có khả năng kháng viêm tốt hơn so với đối chứng dương L-NMMA (IC_{50} 37,8 μm).

- 10 hợp chất số **PT2, PT5, PT6, PT4, PT7, PT8, PT19, PT20, PT21, PT22** thể hiện khả năng chống oxy hóa trong đó 5 chất **PT5, PT7, PT8, PT20, PT21** có giá trị IC_{50} từ 10,36 – 27,45 μm có khả năng chống oxy hóa tốt hơn so với đối chứng dương trolox (IC_{50} 31,4 μm).

3. Nghiên cứu về chất đánh dấu

Sau khi lựa chọn 02 hợp chất làm chất đánh dấu cho loài *Pandanus tonkinensis* là pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và vladinol F, đã chiết xuất và tinh chế được chúng ở mức độ tinh khiết 98% với trọng lượng 100 - 200 mg để làm chất chuẩn cho kiểm nghiệm. Phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao để phân tích định lượng hai chất đánh dấu trong loài *Pandanus tonkinensis* đã được phát triển và thẩm định. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có tính đặc hiệu, có khoảng đường chuẩn tuyến tính từ 25,5 tới 101,9 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,9983$) và từ 26,0 tới 103,9 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0,9974$) cho hai chất đánh dấu, có độ chính xác tốt ($RSD < 2\%$), độ đúng cao (hiệu suất thu hồi trong khoảng 99,4 tới 101,5%), giới hạn định lượng với pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và vladinol F lần lượt là 2,55 $\mu\text{g/g}$ và 2,60 $\mu\text{g/g}$ được liệu khô.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Sử dụng kỹ thuật tách chiết và các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại lần đầu tiên đã phân lập và xác định được cấu trúc của 28 hợp chất từ quả và rễ của loài *P.tonkinensis*.

2. Xác định được 3 hợp chất mới từ loài *Pandanus tonkinensis* gồm: (7S) - 2,6-dimethoxyphenyl-7,9-propanediol-1-O- β -D-glucopyranoside (**PT10**); *trans*-cinnamyl alcohol 9-O-(6'-O- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucopyranoside (**PT25**) và 4-(3-hydroxypropyl)-2,6 dimethoxyphenol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**PT26**).

3. Lần đầu tiên lựa chọn 02 hợp chất làm chất đánh dấu cho loài *Pandanus tonkinensis* theo định hướng bảo vệ gan là pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và vladinol F và xây dựng được phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao phù hợp để định lượng hai chất đánh dấu trong loài *Pandanus tonkinensis*.

KIẾN NGHỊ

Có thể sử dụng hai hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside và vladinol F đã chiết xuất tinh chế được làm chất chuẩn và quy trình phân tích định lượng đã thẩm định để kiểm soát chất lượng dược liệu và nghiên cứu quá trình sản xuất các chế phẩm bảo vệ gan từ loài *Pandanus tonkinensis*

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Dinh Thi Huyen Trang**, Pham Hung Viet, Duong Hong Anh, Bui Huu Tai, Ngo Quoc Anh, Nguyen Xuan Nhiem and Phan Van Kiem, 2022, Lignans and Other Compounds from the Roots of *Pandanus tonkinensis* with Their Lipid Peroxidation Inhibitory Activity, *Natural Product Communications*, 17(4), pp 1-5. Doi: [10.1177/1934578X221088372](https://doi.org/10.1177/1934578X221088372)
2. **Dinh Thi Huyen Trang**, Duong Hong Anh, Quoc Anh Ngo, Pham Hung Viet, Bui Huu Tai, Nguyen Xuan Nhiem & Phan Van Kiem, 2023, Pandatonkinosides A and B: two new phenolic glycosides from the roots of *Pandanus tonkinensis* and their nitric oxide production inhibitory activities, *Natural Product Research*, 37(19), pp 3253- 3260. Doi: [10.1080/14786419.2022.2066662](https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2066662)
3. **Dinh Thi Huyen Trang**, Pham Thu Trang, Do Minh Phuong, Duong Hong Anh, Ngo Quoc Anh, Phan Van Kiem, and Pham Hung Viet, 2023, The chemical composition from the fruits of *Pandanus tonkinensis* and their inhibitory NO production and lipid peroxidative inhibitory activities, *Vietnam Journal of Chemistry*, 61(special issue), pp 1-7. Doi: [10.1002/vjch.202200205](https://doi.org/10.1002/vjch.202200205)
4. **Dinh Thị Huyền Trang**, Bùi Văn Trung, Ngô Quốc Anh, Dương Hồng Anh và Phạm Hùng Việt, 2023, Định lượng các chất đánh dấu pinoresinol 4-O-beta-D glucopyranoside và vladinol F trong dược liệu quả dứa dại Bắc bộ (*Pandanus tonkinensis*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Khoa học ĐHQG Hà Nội*, 39(2), tr. 1-9. Doi: [10.25073/2588-1132/vnumps.4512](https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4512)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Huy Huỳnh, Hồ Thanh Hải và cộng sự, 2011, *Báo cáo quốc gia về đa dạng sinh học*, Bộ tài nguyên và môi trường, chương 1, tr. 2-12.
2. Võ Văn Chi, 2012, *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 833-841.
3. Viện Dược liệu Quốc gia, 2004, *Những cây và con làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr. 700-701.
4. Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thanh Hải, Bùi Văn Trung, Dương Hồng Anh, Dương Thị Duyên, Hoàng Thị Thúy, Hồ Thị Hằng, Đồng Thị Nhâm, Phạm Hùng Việt, 2018, Đánh giá tác dụng bảo vệ gan và lợi mật của bài thuốc dân gian “Trứng quốc - Dứa dại” thuộc tỉnh Hà Giang, *Tạp chí y dược cổ truyền Việt Nam*, số 01.
5. Scifinder truy cập 10/2020.
6. Byng J.W., Smets E.F., van Vugt.R et al., 2018, The phylogeny of angiosperms poster: a visual summary of APG IV family relationships and floral diversity, *The Global Flora*, 1.
7. In C Y.Wu., P H.Raven & D Y.Hong (eds.), 2010, Flora of China, *Flora of China Editorial Committee*, Vol 23, 127–130.
8. Harold St.John., 1961, *Pandanus* of the Maldive Islands and the Seychelles Islands, *Revision of the Genus Pandanus Stickman*, Part 5, Indian Ocean, Pacific science, Vol. 15, 328 – 346.
9. Harold St. John., 1963, Malayan Species Described by H.N.Ridley, *Revision of the Genus Pandanus Stickman*, Part15, Pacific science, Vol 17, 329 - 360.
10. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kinh Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, 2004, *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, Tập I, tr. 700 - 701.
11. Viện Dược liệu, 2016, *Danh lục cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
12. Phạm Hoàng Hộ, 1999, *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản trẻ, TP. Hồ Chí Minh.
13. Hiromitsu T., Tomotake I., Mariko K., Maribel G.N., and Norio A., 2001, A new alkaloid, pandanamine; finding of an anticipated biogenetic intermediate in *Pandanus amaryllifolius Roxb*, *Tetrahedron Letters*, 42.
14. Hiromitsu T., Tomotake I., Mariko K., Maribel G.N., and Norio A., 2001, Isolation and characterization of two new alkaloids, norpandamarilactonine A and norpandamarilactonine B, from *Pandanus amaryllifolius* by spectroscopic and synthetic methods, *Journal of Natural Products*, 64, 1224-1225.

15. Anglela A.S., Mary J.G., and David J.C., 2004, New alkaloids from *Pandanus amaryllifolius*, *Journal of Natural Products*, 67, 54-57.
16. Mohamed R., Fatimahtun Z., 2012, Extraction of volatile compounds from pandan leaves (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) using pressurised liquid extraction (PLE), dissertation of pharmacist, *Universiti Teknologi Mara (UiTM)*.
17. Mario A.T., Mariko K., Noriyuki K., Maribel G.N., Hiromitsu T., 2010, Isolation of pandamarilactonine H from the roots of *Pandanus amaryllifolius* and synthesis of epi - pandamarilactonine H, *Journal of Natural Products*, 73, 1453-1455.
18. Mario A. T., Mariko K., Noriyuki K., Maribel G.N., Hiromitsu T., 2010, Isolation and total syntheses of two new alkaloids, dubiusamines A, and dubiusamines B, from *Pandanus dubius*, *Tetrahedron Letters*, 66, 3353-3359.
19. Yuan B.Ch., Hao Ch.Hu., Yu Ch.T., Shu L.Ch., Mohamed E.Sh., Maribel G. N., Yang Ch.W., Fang R.Ch., 2017, Isolation and absolute configuration determination of alkaloids from *Pandanus amaryllifolius*, *Tetrahedron*, 73(25), 3423-3429.
20. Yuan B.Ch., Yi H.T., I W. L., Chen Ch.H., Yu Ch.T., Ludger B., Mohamed E.Sh, Ming F.H., Shyng Sh.Y., Chin Ch.W., Fang R.Ch., Yang Ch.W., 2015, Pandalisines A and B, novel indolizidine alkaloids from the leaves of *Pandanus utilis*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4333-4336.
21. Yu Ch.T., Meng L.Y., Mohamed E.Sh., Ludger B., Yuan B.Ch., Lei Ch. Ch., Tsong L.H., Hui F.Ch, Yu M.Ch., Ming F.H., Yang Ch.W., and Fang R.Ch., 2015, Alkaloids from *Pandanus amaryllifolius*: Isolation and Their Plausible Biosynthetic Formation, *Natural products*, 78(10), 2346-54.
22. Lois E et al., 2009, Carotenoid and vitamin content of Micronesian atoll foods: Pandanus (*Pandanus tectorius*) and garlic pear (*Crataeva speciosa*) fruit, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(1), 1-8.
23. Mario A.T., Hiromitsu T., Norio A., Mariko K., Scott G.F., Maribel G.N., 2008, Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. var. *laevis*, *Journal of Natural Medicine*, 62(2), 232-5.
24. Vahirua L., C. Menut, B. Roig, J. Bessiere and G. Lamaty, 1996, Institut Malardd, Tahiti, Polyndsie franqaise; University de Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France, Isoprene related esters, significant components of *Pandanus tectorius*, *Phytochemistry*, 43 (6), 1277-1279.

25. Akira I., Yasuyuki I., Hiroko M., Yuka I., Tsutomu N., Kinkini B., Tanusree K., Gabriele B., Andrea C., 2005, Unusual cyclolanostanes from leaves of *Pandanus boninensis*, *Phytochemistry*, 66 (23) :2729- 33.
26. Mario A.T., Maribel G.N., Noriyuki K., Mariko K., Hiromitsu T., 2012, Secondary metabolites from *Pandanus simplex*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 40, 4–5.
27. P Peungvicha1., Y Wongkrajang., B Kongsaktrakoon., R Temsiririrkul and H Watanabe., 2014, *Pandanus amaryllifolius* Root Extract Prolongs Sleeping Time and Reduces Locomotor Activity in Mice, *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (3), 6-12.
28. Ting T.J., Shang W.Ch., 1998, Antioxidative activities of constituents isolated from *Pandanus odoratissimus*, *Phytochemistry*, 49 (7), 2145-2148.
29. Lê Thị Ngọc Chúc, Đặng Hoàng Phú, Nguyễn Hữu Trọng, Nguyễn Trung Nhân, 2013, Khảo sát thành phần hóa học cao chloroform của quả Dứa dại (*Pandanus kaida* Kurz) họ Dứa dại (*Pandanaceae*), *Tạp chí phân tích Lý Hóa và Sinh học Việt Nam*, 18(4), tr. 154-158.
30. Hanna M C.L., Atsushi N., Maribel G.N., Thomas E.C., Mario A.T., 2015, Antimicrobial alkaloids from the leaves of *Pandanus amaryllifolius*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (10), 151-15.
31. Vũ Thị Hoài, *Nghiên cứu đặc điểm thực vật và thành phần hóa học cây dứa thom (Pandanus amaryllifolius Roxb.)*, Khóa luận tốt nghiệp đại học ngành dược, Trường Đại học Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 2021.
32. Ryuichiro S., Shu K., Yoshiaki S., and Yoshiaki S., 2017, p-Coumaroyl Malate Derivatives of the *Pandanus amaryllifolius* Leaf and Their Isomerization, *Chem. Pharm. Bull*, 65, 1191–1194.
33. Tan Phat Nguyen, Tien Dung Le, Phan Nhat Minh, Bui Trong Dat, Nguyen Kim Tuyen Pham, Thi My Lien Do, Dinh Tuyen Nguyen & Tri Dinh Mai, 2016, A new dihydrofurocoumarin from the fruits of *Pandanus tectorius Parkinson ex Du Roi*, *Natural Product Research*. 30 (21), 2389-95.
34. Poolsak S., Nitirat Ch., Wassapol Th., Somsak R., Tripetch K., 2020, Aromatic rutinoides from the aerial roots of *Pandanus tectorius*, *Phytochemistry Letters*, 37, 47-50.
35. Phùng Thị Ái Hữu, Bùi Ngọc Phương Châu, Đào Hùng Cường, 2016, Nghiên cứu chiết tách và xác định thành phần hóa học trong một số dịch chiết của lá và rễ non cây dứa dại ở Hội An, *Tạp chí Khoa học Xã hội, Nhân văn & Giáo dục*, 6 (1), 5-9.

36. Trương Thị Liên, Đỗ Hoàng Giang, Nguyễn Tiên Đạt, Nguyễn Thị Luyên, 2021, Một số hợp chất lignin và megastigman phân lập từ thân cây dứa dại, *Tạp chí dược liệu*, (06).
37. S Sasidharan., Y Chen¹., D Saravanan., K M.Sundram., L Y.Latha¹., 2011, extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8(1), 1-10.
38. Garima M., R L.Khosa., Pradeep S., and K K.Jha., 2015, Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Pandanus odoratissimus* root against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 7(1), 45-48.
39. Ramesh L., Abhaykumar K., V Ch.Reddy., 2015, Anti-Inflammatory Activity of *Pandanus odoratissimus* Extract, *International Journal of Pharmacology*, 6, 311-314.
40. Raj GG., Varghese HS., Kotagiri S., Vrushabendra S.BM., Swamy A., Pathan RK., 2014, Anticancer Studies of Aqueous Extract of Roots and Leaves of *Pandanus Odoratissimus* f. *ferreus* (Y. Kimura) *Hatus*: An In Vitro Approach, *Journal of traditional and complementary medicine*, 4 (4), 279-284.
41. Báo cáo đề tài KHCN cấp Đại học Thái Nguyên, Mã số ĐH 2015-TN0502, 2015, *Đánh giá tác động bảo vệ và phục hồi thương tổn gan của quả dứa dại Pandanus Odoratissimus L.*
42. Romyana S., Magdalena KB., Vessela V, and Mitka M., 2014, Some in vitro/in vivo chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats, *BioMed Research International*, Article ID 706302, 6 pages.
43. Dimitrios T., 2017, Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges, *Analytical Biochemistry*, 524, 13-30.
44. Jianrong L., Timothy R.B., Nitric Oxide^{IV}. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver, *Department of Surgery*, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania 1526.
45. Artis D., Spits H., 2015, The biology of innate lymphoid cells, *Nature*, 517, 293–301.
46. Isailovic N., Daigo K., Mantovani A., Selmi C., 2015, Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation, *J. Autoimmun*, 60, 1–11.
47. Pedraza Alva., G Pérez.Martínez., L Valdez.Hernández., L Meza.Sosa., Ando.Kuri., 2015, Negative regulation of the inflammasome: Keeping inflammation under control, *Immunol. Rev*, 265, 231–257.

48. Lucas S.M., Rothwell N.J., Gibson R.M., 2006, The role of inflammation in CNS injury and disease, *Br. J. Pharmacol*, 2006, 147, S232–S240.
49. Rock K.L., Lai J.J., Kono H., 2011, Innate and adaptive immune responses to cell death, *Immunol. Rev*, 243, 191–205.
50. Fernandes J.V., Cobucci R.N., Jatobá C.A., Fernandes T.A., de Azevedo J.W., de Araújo J.M., 2015, The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol. Oncol. Res*, 21, 527–534.
51. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B., 2015, Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurosci*, 16, 358–372.
52. Loane D.J., Kumar A., 2016, Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated, *Exp. Neurol*, 275, 316–327.
53. Waisman A., Liblau R.S., Becher B., 2015, Innate and adaptive immune responses in the CNS, *Lancet Neurol*, 14, 945–955.
54. Vignali D.A., Kuchroo V.K., 2012, IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immun*, 13, 722–728.
55. Montgomery S.L., Bowers W.J., 2012, Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune. Pharmacol*, 7, 42–59.
56. Zelová H., Hošek J., 2013, TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res*, 62, 641–651.
57. Fenton M.J., 1992 Review: Transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression, *Int. J. Immunopharmacol*, 401–411.
58. Rider P., Carmi Y., Voronov E., Apte R.N., 2013, Interleukin-1 α , *Semin. Immunol*, 25, 430–438.
59. Langrish C.L., McKenzie B.S., Wilson N.J., de Waal Malefyt R., Kastelein R.A., Cua D.J., 2004, IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev*, 202, 96–105.
60. Duvallet E., Semerano L., Assier E., Falgarone G., Boissier M.C., 2011, Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases, *Ann. Med*, 43, 503–511.
61. Sabat R., IL-10 family of cytokines, 2010, *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 315–324.
62. Ng T.H., Britton G.J., Hill E.V., Verhagen J., Burton B.R., Wraith D.C., 2013, Regulation of adaptive immunity, The role of interleukin-10. *Front. Immunol*, 31, 129.

63. Kwilasz A.J., Grace P.M., Serbedzija P., Maier S.F., Watkins L.R., 2015, The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*, 96, 55–69.
64. Goetzl E.J., An S., Smith W.L., 1995, Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases, *FASEB J.*, 9, 1051–1058.
65. Leff J.A., Busse W.W., Pearlman D., Bronsky E.A., Kemp J., Hendeles L., Dockhorn R., Kundu S., Zhang J., Seidenberg B.C., et al, 1998, Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction, *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, 147–152.
66. Peters Golden.M., Henderson W.R., 2007, Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* 357, 1841–1854.
67. Zhao J., Quyyumi A.A., Patel R., Zafari A.M., Veledar E., Onufrak S., Shallenberger L.H., Jones L., Vaccarino V., 2009, Sex-specific association of depression and a haplotype in leukotriene A4 hydrolase gene. *Psychosom. Med.*, 71, 691–696.
68. Moncada S., Bolanos J.P., 2006, Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration, *J. Neurochem.*, 97, 1676–1689.
69. Rayet B., G elinas C., 1999, Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18, 6938–6947.
70. Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S., 2011, Crosstalk in NF- B signaling pathways. *Nat. Immunol.*, 12, 695–708.
71. Ling J., Kumar R., 2012, Crosstalk between NFkB and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy, *Cancer Lett.*, 2012, 322, 119–126.
72. Rodrigo R., 2009, Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Diseases; Nova: New York, NY, USA, pp. 9–10.
73. World Health Organization, 2017, *WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines*. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/trs1003-annex1-marker-substances-herbal-medicine-quality-control.pdf?sfvrsn=f4ac0cca_0
74. Agency EM, Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products, 2008. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific->

[guideline/reflection-paper-markers-used-quantitative-qualitative-analysis-herbal-medicinal-products_en.pdf](#)

75. Hội đồng Dược điển Việt Nam - Bộ Y tế, 2017, *Dược điển Việt Nam V*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.

76. Organization WH, 2011, *Quality control methods for herbal materials* Geneva, Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44479/9789241500739_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

77. S Li., et al., 2008, Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview, *Chinese medicine*, 3, 7, 10.1186/1749-8546-3-7.

78. Bộ Y tế - Bộ Giáo dục và Đào tạo – Viện Dược liệu, 2006, *Nghiên cứu thuốc từ thảo dược* - Giáo trình Sau đại học, Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ.

79. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung, 2007, *Các phương pháp phân tích công cụ*, Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ, phần 2.

80. Douglas A Skoog, James Holler F., Stanley R. C., 2006, *Principles of Instrumental Analysis* (6th Edition), Brooks Cole Publishing.

81. Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A.J., & Trakatellis A.G., 1994, Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931–1937.

82. Jelili A.Badmus., Temitope O.A., John O.F., Victor A.A., Oluwatosin A.A., and Oyeronke A.O., 2011, Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68(1), 23-29.

83. P J.Tsai., T H.Tsai., C H.Yu., and S C.Ho., 2007, Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chem.*, 103, 181-187.

84. Cheenpracha S., Park EJ., Rostama B., Pezzuto J.M., Chang L.C, 2010, Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesquiterpene peroxide, epimuquibilin A. *Marine drugs*, 8(3), 429-437.

85. AOAC, 2016, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, AOAC International, Rockville, MD, USA, https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.

86. ICH, 2005, *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
87. Y C.Li., Y H.Kuo., 2000, Four New Compounds, Ficusal, Ficulesquilignan A, B, and Ficusolide Diacetate from the Heartwood of *Ficus microcarpa*, *Chem. Pharm. Bull.*, *48*, 1862-1865.
88. S H.Wu., X D.Luo., Y B.Ma., X J.Hao., J Zhou., D G.Wu., 2001, Two New Germacranolides from *Magnolia Grandiflora*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, *3*, 95-102.
89. B Das., B Venkataiah., A Kashinatham., 1999, (+)-Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*, *Fitoterapia*, *70*, 101-102.
90. A Tulake., Y Jiang. Y., P F.Tu., 2012, Nine lignans from *Artemisia absinthium* L, *J Chin Pharm Sci*, *21*, 360-364.
91. F Abe., T Yamauchi., 1988, 9 α - Hydroxypinoresinol, 9 α - Hydroxymedioresinol and related lignans from *Allamanda Neriifolia*, *Phytochem*, *27*, 575-577.
92. L H Xie., T Akao., K Hamasaki., T Deyama., M Hattori., 2003, Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol, *Chem. Pharm. Bull.*, *51* 508-515.
93. Ngo Quoc Anh Tran Thi Yen, Nguyen Thuy Hang, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, Nguyen Huy Hoang, Vu Van Doan, Phan Van Kiem, 2019, Lignan compounds from *Stixis suaveolens*, *Vietnam J. Chem.*, *57*(3), 311-317.
94. F Hanawa., M Shiro., Y. Hayashi., 1997, Heartwood constituents of *Betula maximowicziana*, *Phytochem*, *45*, 589-595
95. S Roemmelt., N Zimmermann., W Rademacher., D Treutter., 2003, Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca, *Phytochem*, *64*, 709-716.
96. Maria Isabel Fernandez.Marin., Raul F.Guerrero., Maria Carmen Garcia.Parrilla., Belén Puertas., Tristan Richard., Miriam Adriana Rodriguez Werner., Peter Winterhalter., Jean-Pierre.Monti., 2012, Emma Cantos.Villar., Isorhapontigenin: A novel bioactive stilbene from wine grapes, *Food Chemistry*, *135*, 1353-1359.

97. Ngo Quoc Anh Tran Thi Yen, Nguyen Thuy Hang, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, Nguyen Huy Hoang, Vu Van Doan, Phan Van Kiem, 2019, Phenolic and lignan compounds from *Stixis suaveolen*, *Vietnam J. Chem*, 57(3), 311-317.
98. Toru ishikawa, Kyoko kondo, and Junichi Kitajima, 2003, Water-Soluble Constituents of Coriander, *Chem. Pharm. Bull*, 51(1) 32—39
99. Yumiko yamano and Masayoshi ito, 2005, Synthesis of Optically Active Vomifoliol and Roseoside Stereoisomers, *Chem. Pharm. Bull*, 53(5) 541—546.
100. David Chassagne., Jean crouzet., claude L.Bayonove., t Jean Marc.brillouet.,Raymond L.Baumes., 1996, 6-O- α -L-arabinopyranosyl- β -D-Glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit, *Phytochemistry*, Apr;41(6):1497-500.
101. Yong Zhou., Ling Yu.Li., Heng Chun.Ren., Ri Dong.Qin., Qin Li., Peng Fei Tu., Gui Fang.Dou., Qing Ying. Zhang., Hong Liang., 2017, Chemical constituents from the whole plants of *Pilea cavaleriei* Levl subsp, *Cavaleriei*, 119, 100-107.
102. Changhong Huo., Hong Liang., Yuying Zhao., Bin Wang., Qingying Zhang, 2008, Neolignan glycosides from *Symplocos caudata*, *Phytochemistry*, Feb;69(3):788-95.
103. Eiji Kawahara., Mikio fujii., Keisuke kato., Yoshiteru ida., and Hiroyuki akita., 2005, Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring Benzyl 6-O-Glycosylb-D glucopyranosides, *Chem. Pharm. Bull*, 53(8) 1058—1061.
104. Huo C.H., Liang H., Zhao Y.Y., Wang B., Zhang Q.Y., 2008, Neolignan glycosides from *Symplocos caudata*, *Phytochemistry*, 69, 788–795.
105. Britta Schumacher, Silke Scholle, Josef Holzl, Nasser Khudeir, Sonja Hess, and Christa E.Muller, 2002, Lignans isolated from Valerian: Identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at a1 adenosine receptors, *J. Nat. Prod*, 65, 1479-1485.
106. Zhen Dan He, Cui Ying.Ma, Ghee Teng Tan, Kongmany Sydara, Pamela Tamez, Bounhoong Southavong, Somsanith Bouamanivong, D Doel Soejarto, John M.Pezzuto, Harry H S.Fong., Hong Jie Zhang, 2006, Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochemistry*, 67(13):1378-84.
107. Hai xue.Kuang, Yong gang.Xia, Bing you.Yang, Qiu-hong Wang, and Shao wa.Lü, 2009, Lignan Constituents from *Chloranthus japonicus* Sieb, *Arch Pharm Res*, 32(3), 329-334.
108. Tripetch Kanchanapoom, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki, 2002, Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda corei*, *Phytochemistry*, 59, 551–55.

109. Ya Ching Shen., Pei wen Hsieht., Yaci Haur KuoS, 1998, Neolignan glucosides from *Jasminum urophyllum*. *Phytochemistry*, 48(4), 719-723.
110. Masataka Sugiyama., Masao Kikuchi., 1991, Studies on the constituents of *Osmanthus* species. VII. Structures of lignan glycosides from the leaves of *Osmanthus asiaticus* Nakai, *Chem Pharm Bull*, 39(2), 483-485.
111. Joon M.Ch., Dong H.K., Tae H.L., Lalita S., Sun Y. K., and Kang R.L., 2018, Phytochemical Constituents of *Capsella bursa-pastoris* and Their Anti-inflammatory Activity, *Natural Product Sciences* 24(2) : 132-138.
112. Hiromi K., Hiroko K., Toshio M., and Seigo F., 1985, Studies on the constituents of *cistanchis herba*. V. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanosides E and F, *Chem Pharm Bull*. 33(4) 1452-1457.
113. Takeshi D., Takako I., Sansei N.. 1985, The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. II. Isolation and structures of three new lignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull*. 33(9) 3651-3657.

PHỤ LỤC LUẬN ÁN

**“NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC
HÓA HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT TỪ LOÀI DỨA ĐẠI
(*PANDANUS TONKINESIS* MART.EX B.STONE) BẰNG
CÁC PHƯƠNG PHÁP HÓA LÝ HIỆN ĐẠI”**

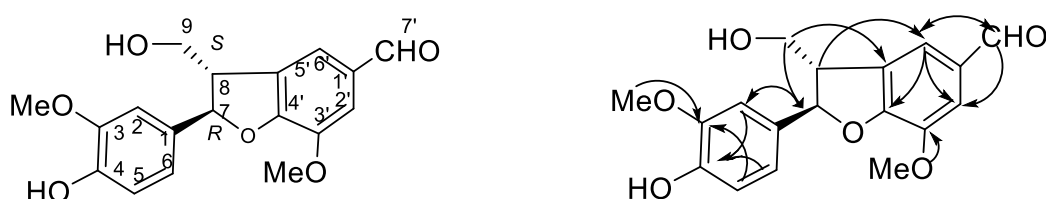
MỤC LỤC PHỤ LỤC

1. Phụ lục hợp chất PT1	1
2. Phụ lục hợp chất PT2	4
3. Phụ lục hợp chất PT3	7
4. Phụ lục hợp chất PT4	10
5. Phụ lục hợp chất PT5	14
6. Phụ lục hợp chất PT6	16
7. Phụ lục hợp chất PT7	16
8. Phụ lục hợp chất PT8	20
9. Phụ lục hợp chất PT9	22
10. Phụ lục hợp chất PT10	26
11. Phụ lục hợp chất PT11	28
12. Phụ lục hợp chất PT12	32
13. Phụ lục hợp chất PT13	36
14. Phụ lục hợp chất PT14	40
16. Phụ lục hợp chất PT16	47
17. Phụ lục hợp chất PT17	50
18. Phụ lục hợp chất PT18	53
19. Phụ lục hợp chất PT19	57
20. Phụ lục hợp chất PT20	61
21. Phụ lục hợp chất PT21	61
22. Phụ lục hợp chất PT22	64
23. Phụ lục hợp chất PT23	61
24. Phụ lục hợp chất PT24	81
25. Phụ lục phổ hợp chất PT25	75
26. Phụ lục phổ hợp chất PT26	77
27. Phụ lục phổ hợp chất PT27	79
28. Phụ lục hợp chất PT28	61
29. Quy trình thử nghiệm <i>invitro</i> xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid.....	88
30. Quy trình thử nghiệm <i>invitro</i> xác định khả năng ức chế sản sinh NO.....	89
31. Quy trình thử nghiệm <i>invitro</i> xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT.....	89

1. Phụ lục hợp chất PT1

- Bột vô định hình, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{18}H_{18}O_6$ ($M = 330$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ 331,1179, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{18}H_{19}O_6]^+ = 331,1176 \Delta = - 0,9$ ppm
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +10,5^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 1.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HMBC, HSQC: Xem mục 1.2- mục 1.6

1.1. Hợp chất PT1



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT1**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT1** được phân lập dưới dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS cho pic ion m/z 331,1179 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{18}H_{19}O_6]^+ = 331,1176$, $\Delta = + 0,9$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{18}H_{18}O_6$, $M = 330$ g/mol.

Phổ 1H -NMR cho thấy tín hiệu cộng hưởng của proton nhóm aldehyde tại δ_H 9,81 (d, $J = 4,5$ Hz, H-7'), ba tín hiệu đặc trưng của proton vòng thơm kiểu ABX tại δ_H 6,81 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,85 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz) và 6,97 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), hai proton vòng thơm tại δ_H 7,48 (1H, d, $J = 4,0$ Hz) và 7,54 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), proton của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,95 (3H, s) và δ_H 3,84 (3H, s). Phân tích kết hợp phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy **PT1** có tất cả 18 nguyên tử carbon, bao gồm 1 nhóm aldehyde (δ_C 192,7, C-7'), 7 nguyên tử carbon bậc bốn (δ_C 131,2, 132,8, 133,7, 146,3, 148,0, 149,0 và 155,0), 7 methine (δ_C 54,3, 90,6, 110,7, 114,0, 116,3, 119,9 và 122,3), 1 methylene (δ_C 64,5), 2 nguyên tử carbon nhóm methoxy tại δ_C 56,7 và 56,4 ppm. Phân tích phổ 1D -NMR và 2D -NMR của **PT1** cho gợi ý đây là một neolignan. Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 6,97)/H-6 (δ_H 6,85) với C-4 (δ_C 148,0) và H-5 (δ_H 6,81)/ methoxy (δ_H 3,84) với C-3 cho thấy vị trí của nhóm hydroxyl và methoxy tương ứng tại C-3 và C-4. Tương tác HMBC giữa H-7' (δ_H 9,81) và C-1' (δ_C 132,8)/C-2' (δ_C 122,3)/ C-6' (δ_C 114,0), giữa methoxy (δ_C 3,95) và C-3' (δ_C 131,2) chứng tỏ nhóm aldehyde và methoxy tại các vị trí C-1' và C-3'. Từ

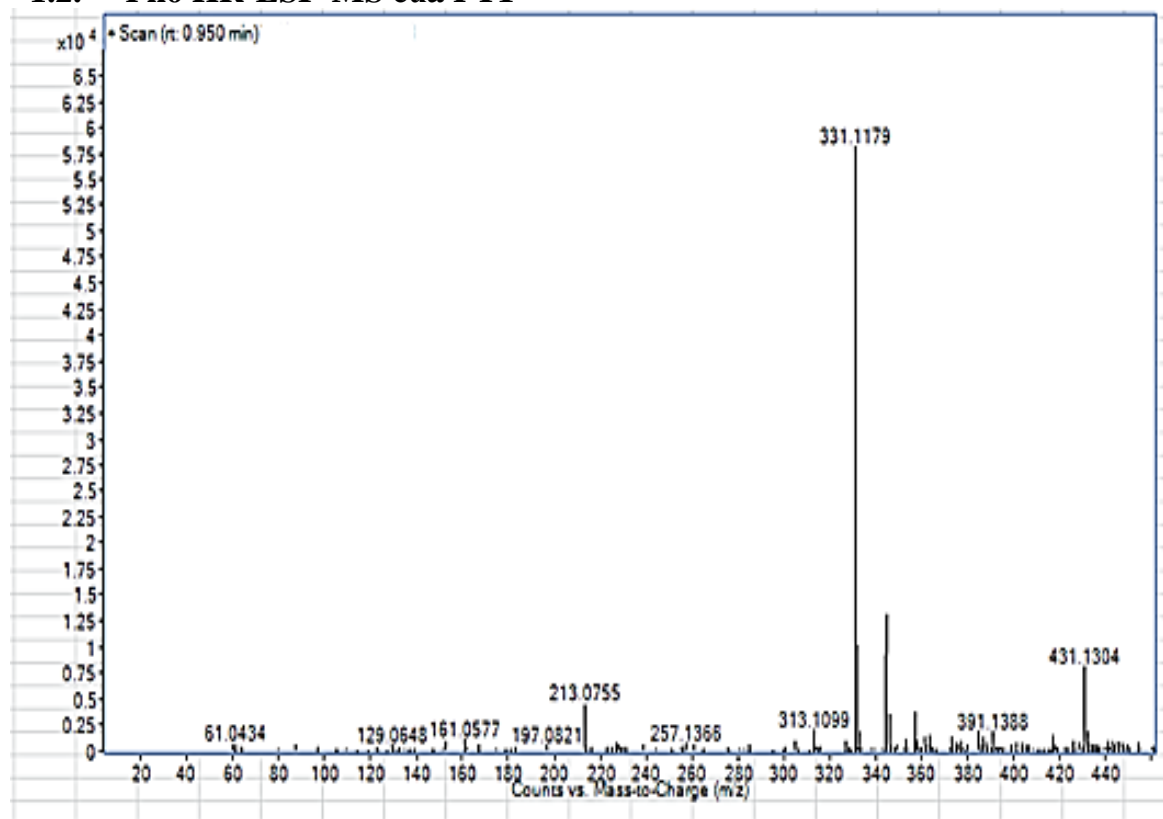
việc phân tích dữ liệu phổ và so sánh dữ liệu phổ của **PT1** với tài liệu tham khảo [87] có thể kết luận **PT1** là ficusal.

Bảng 1.1. Phổ NMR của hợp chất **PT1** và chất so sánh ficusal

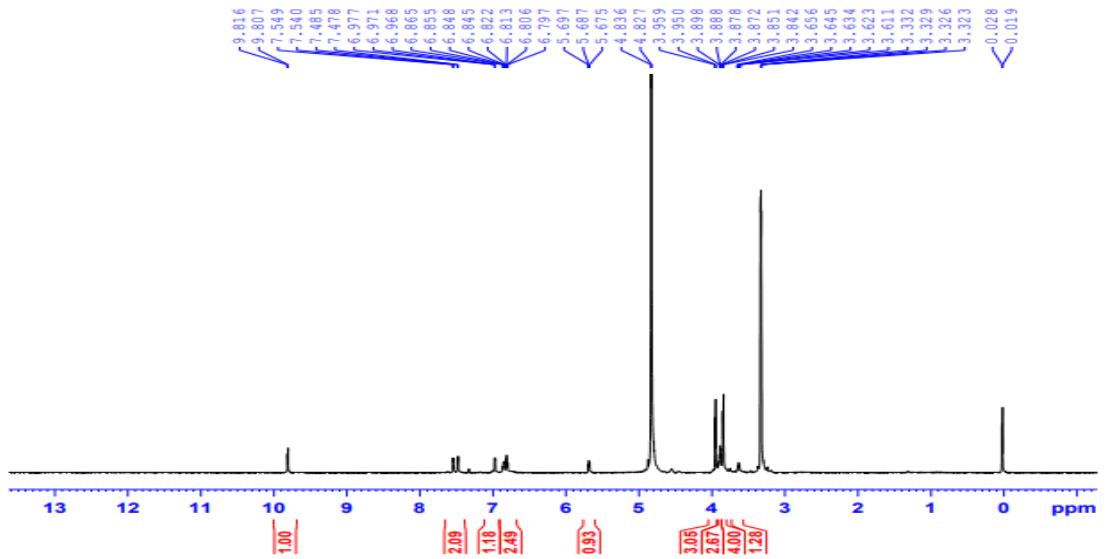
C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	133,3	133,7	-
2	110,6	110,7	6,97 (d, 2,0)
3	147,6	149,0	-
4	148,4	148,0	-
5	115,7	116,3	6,81 (d, 8,0)
6	119,8	119,9	6,85 (dd, 8,0, 2,0)
7	89,8	90,6	5,68 (d, 6,0)
8	53,8	54,3	3,64 (m)
9	64,1	64,5	3,88 (m)
1'	132,3	132,8	-
2'	121,4	122,3	7,54 (d, 4,0)
3'	131,1	131,2	-
4'	154,8	155,0	-
5'	145,8	146,3	-
6'	113,3	114,0	7,48 (d, 4,0)
7'	190,9	192,7	9,81 (d, 4,0)
3-OMe	56,3	56,4	3,84 (s)
3'-OMe	56,2	56,7	3,95 (s)

a) CD_3OD b) 125 MHz, c) 500 MHz; # δ_C của ficusal (axeton, d_6) [87]

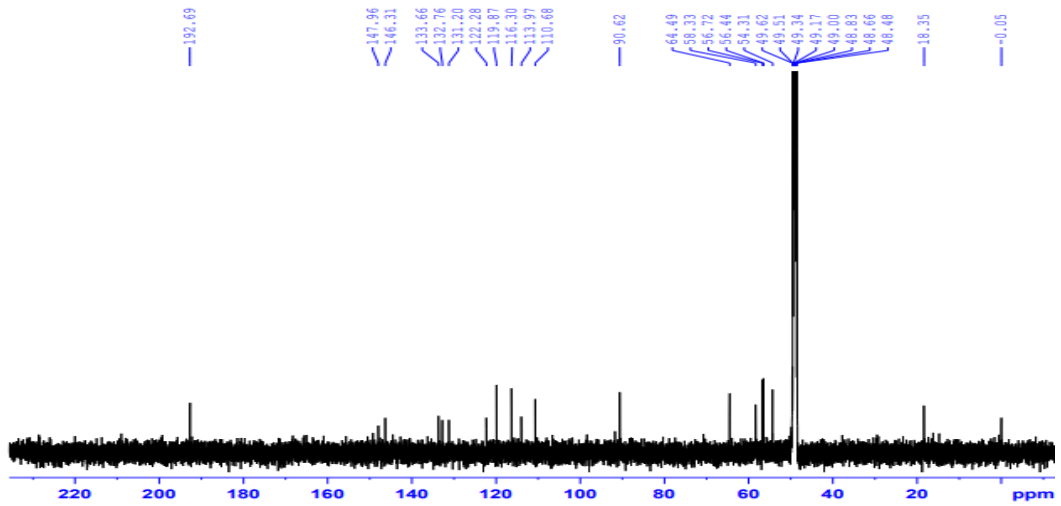
1.2. Phổ HR-ESI- MS của PT1



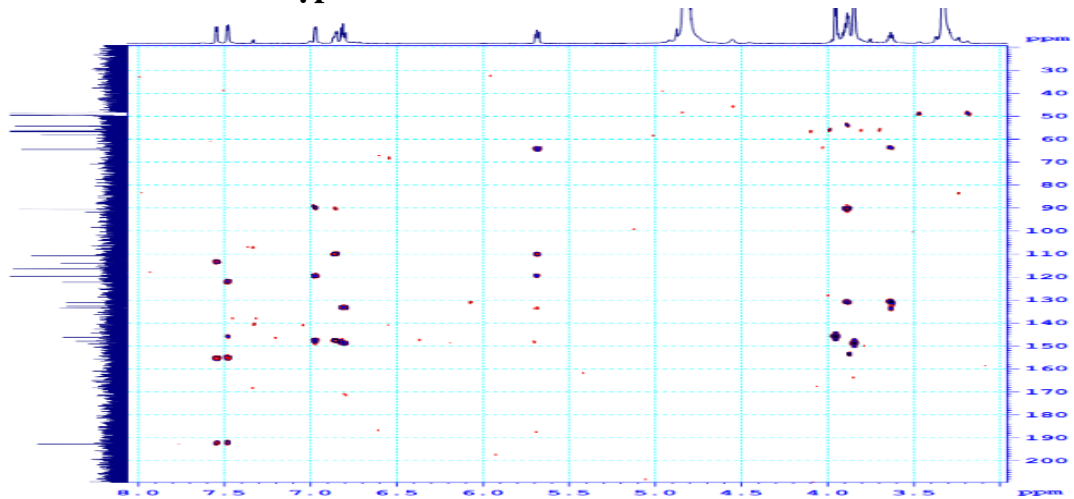
1.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PT1



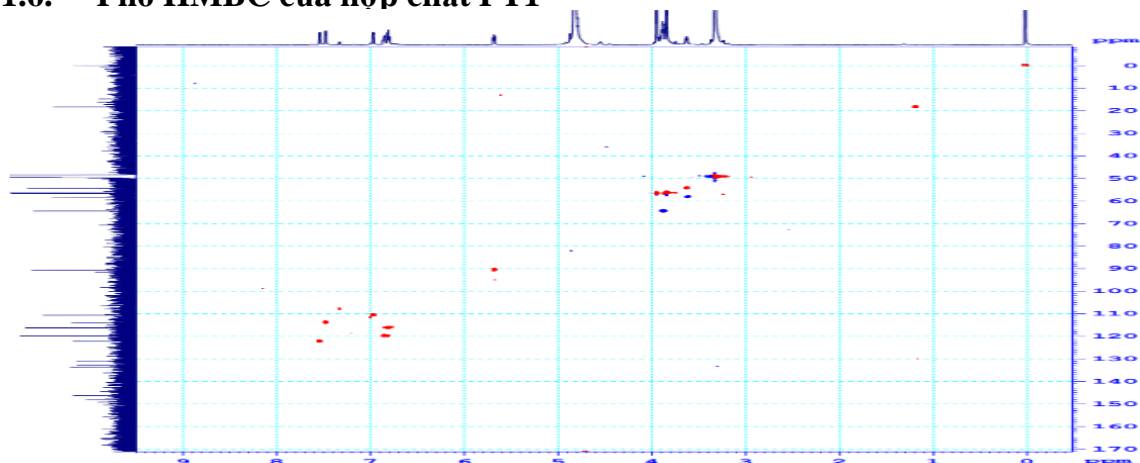
1.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PT1



1.5. Phổ HMBC của hợp chất PT1



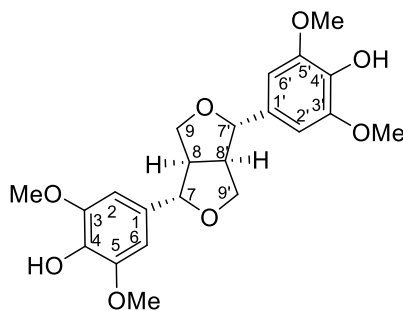
1.6. Phổ HMBC của hợp chất PT1



2. Phụ lục hợp chất PT2

- Bột vô định hình, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{22}H_{26}O_8$ ($M = 418$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Cl]^-$ 453,1313, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{26}O_8Cl]^- = 453,1322$ $\Delta = - 1,9$ ppm
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 2.2
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm: 232, 271
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, UV: Xem mục 2.2 – mục 2.7

2.1. Hợp chất PT2



Hình 2.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PT2**

Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT2** phân lập được ở dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Cl]^-$ 453,1313, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{26}O_8Cl]^- = 453$, $\Delta = - 1,9$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{22}H_{26}O_8$, $M = 418$ g/mol.

Phổ 1H -NMR (MeOD, 500 MHz): δ 6,67 (4H, s, H-2, H-2', H-6, H-6'), 4,73 (2H, d, $J = 4,5$ Hz, H-7, H-7'), 3,14 (2H, m, H-8, H-8'); 4,27 (2H, $J = 9,0, 6,5$ Hz, H-9 α , H-9' α); 3,89 (2H, $J = 9,0, 3,5$ Hz, H-9 β , H-9' β), 3,86 (12H, s, OCH₃). Phổ 1H -NMR cho thấy proton thơm, chúng là 4H- singlet có $\delta = 6,67$, 12H nhóm

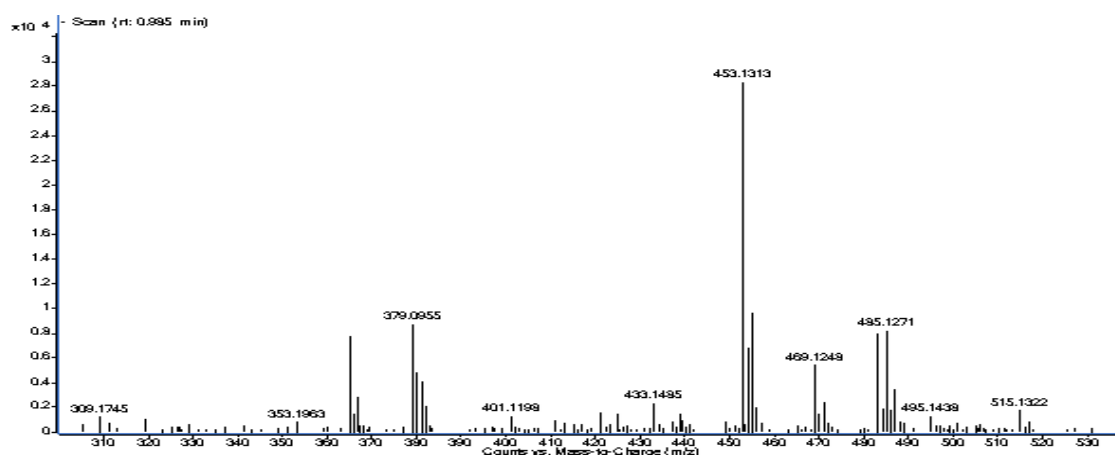
methoxyl gợi ý về cấu trúc của furofuran lignan. Số liệu phổ ^{13}C -NMR cho thấy tính đối xứng của hợp chất. Trên phổ HSQC, các tương tác H-C trực tiếp được xác định cùng với tương tác xa của H-C trên phổ HMBC giúp xác định vị trí những nguyên tử H. Thêm vào đó, so sánh dữ liệu phổ hợp chất **PT2** với hợp chất syringaresinol theo tài liệu [83] thấy hoàn toàn trùng khớp. Từ đó, kết luận hợp chất là syringaresinol - chất đã được phân lập theo các tài liệu (B. DasU và cộng sự, 1999) [88] và (Tulake A và cộng sự, 2012) [89].

Bảng 2.1. Phổ NMR của hợp chất **PT2** và chất so sánh syringaresinol

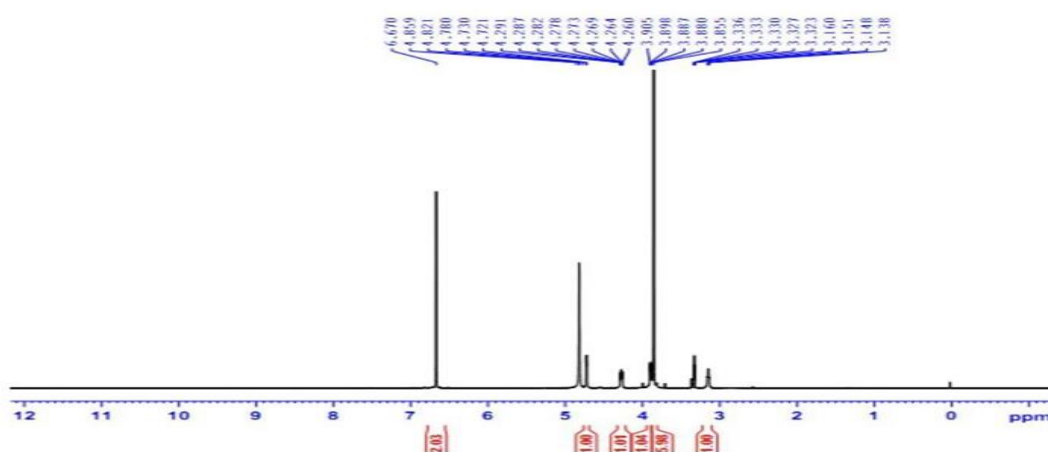
C	# δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1,1'	131,7	132,1	-
2,2',6,6'	102,5	102,7	6,67 (s)
3,3',5,5'	146,7	147,1	-
4,4'	134,1	134,3	-
7,7'	85,7	86,0	4,73 (d, 4,5)
8,8'	56,0	54,3	3,15 (m)
9,9'	71,4	72,8	4,27 (dd, 9,0, 6,5) 3,89 (dd, 9,0, 3,5)
OCH ₃	53,7	53,7	3,86 (s)

a) $^{\text{a}}$ CD₃OD b) $^{\text{b}}$ 125 MHz, c) $^{\text{c}}$ 500 MHz; # δ_{C} của syringaresinol (CDCl₃) [89]

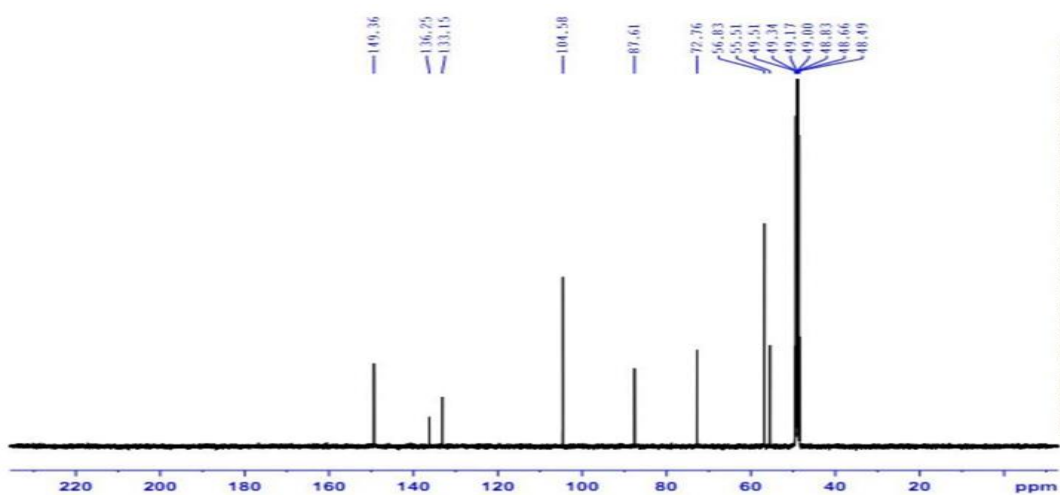
2.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT2



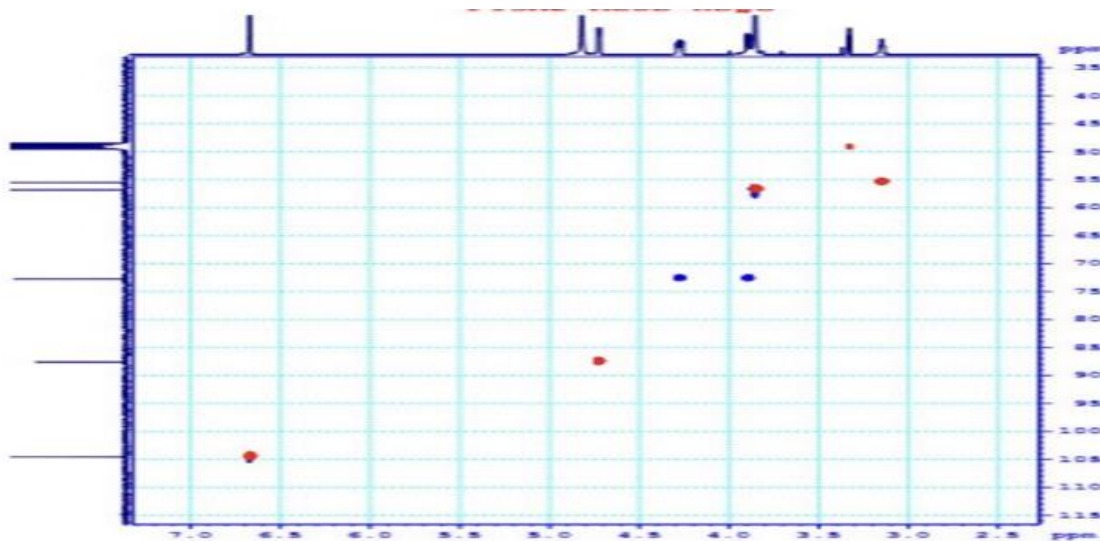
2.3. Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT2



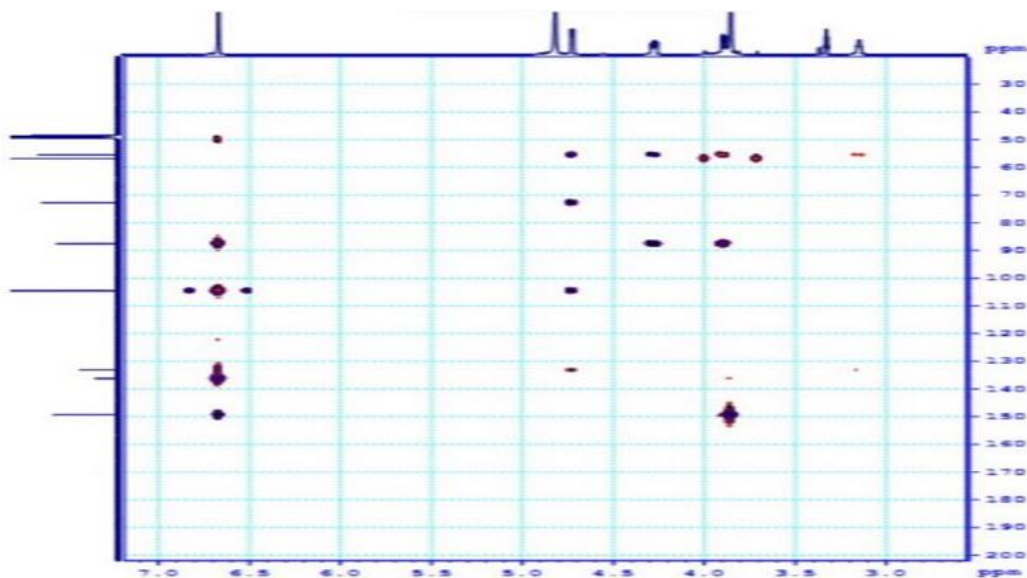
2.4. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT2



2.5. Phổ HSQC của hợp chất PT2



2.6. Phổ HMBC của hợp chất PT2



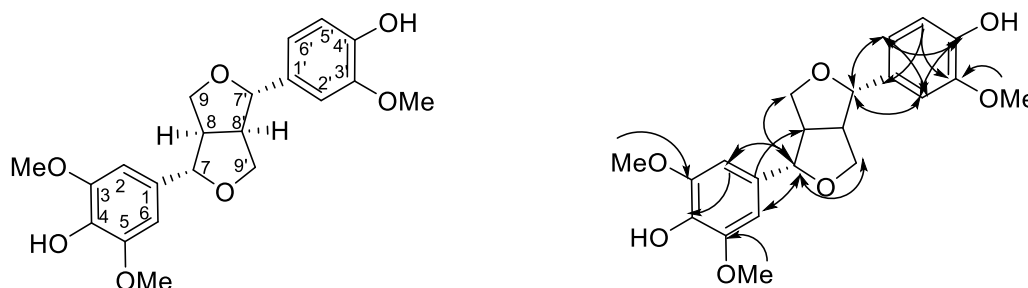
2.7. Phổ UV của hợp chất PT2



3. Phụ lục hợp chất PT3

- Bột vô định hình, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{21}H_{24}O_7$ ($M = 388$)
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +17,8^\circ$ ($c = 0,49$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 3.1
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm : 231, 278
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, UV: Xem mục 3.2 – mục 3.6

3.1. Hợp chất PT3



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT3**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT3** phân lập được ở dạng bột vô định hình, màu vàng. Phân tích dữ liệu phổ 1H -NMR của hợp chất 3 cho thấy các tín hiệu proton thơm của vòng benzen thể ở bốn vị trí 1,3,4,5 tại δ_H 6,65 (2H, s), vòng thơm được thể ở ba vị trí 1,3,4 tại δ_H 6,81 (1H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz), 6,77 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,95 (d, $J = 2,0$ Hz) và ba nhóm methoxy ở 3,84 (6H, s) và 3,85 (3H, s). Phân tích phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra cấu trúc của 3 là một lignan. Trong phổ HMBC của 3 có các tương quan giữa H-7 (δ_H 4,71) và C-1 (δ_C 133,2)/C-2/C-6 (δ_C 104,6), giữa H-2/H- 6 (δ_H 6,65) và C-4 (δ_C 136,5), và giữa các nhóm methoxy (δ_H 3,84) và C-3/C-5 (δ_C 149,4)

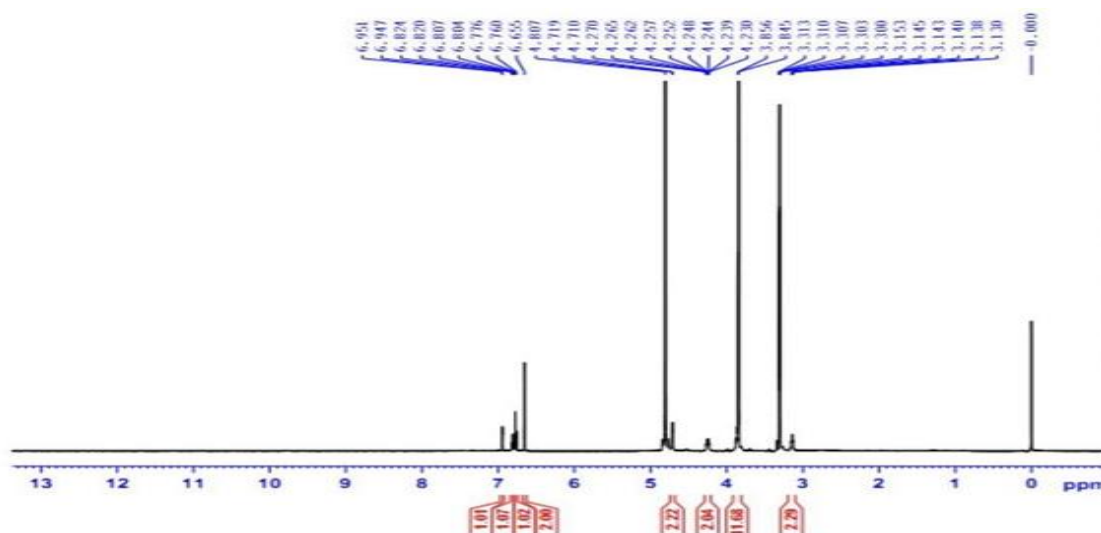
chỉ ra sự hiện diện của hai nhóm methoxy tại C-3 và C-5. Tương quan HMBC giữa H-2' (δ_H 6,95)/H-6' (δ_H 6,81) với C-4' (δ_C 147,4), giữa H-5' (δ_H 6,77) và các proton methoxy (δ_H 3,85) với C-3' (δ_C 149,2) cho biết vị trí của các nhóm hydroxyl và methoxy tại C-3' và C-4'. Như vậy cấu trúc của 3 được xác định là (+) - medioresinol. Bên cạnh đó, dữ liệu phổ ^{13}C - NMR của hợp chất 3 giống với dữ liệu phổ của hợp chất (+)- medioresinol đã được công bố (Fumiko Abe and Tatsuo Yamauchi, 1988) [90].

Bảng 3.1. Phổ NMR của hợp chất PT3 và chất so sánh medioresinol

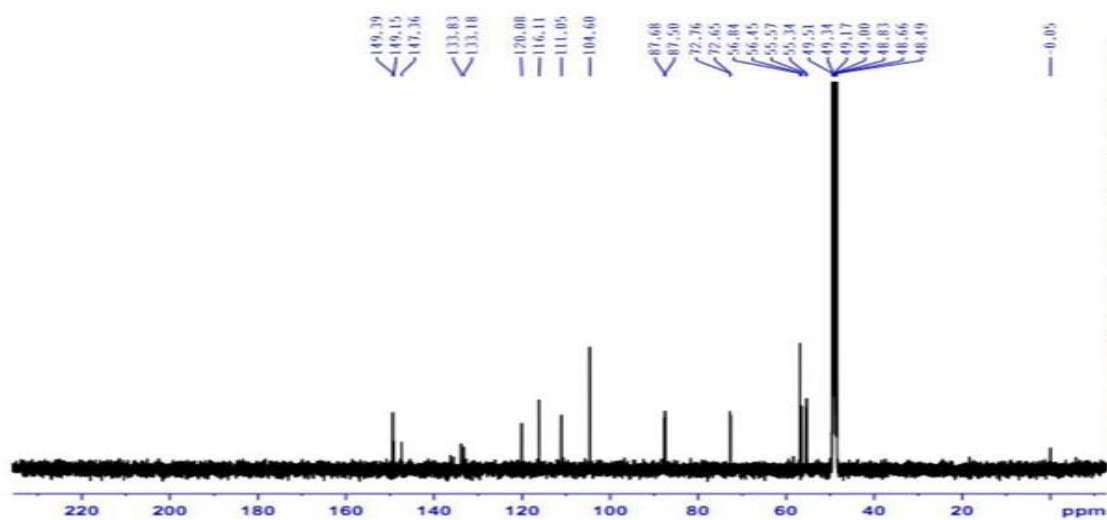
C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	132,3	133,2	-
1'	133,2	133,8	-
2	104,9	104,6	6,65 (s)
2'	111,0	111,1	6,95 (d, 2,0)
3	149,3	149,4	-
3'	147,8	149,2	-
4	137,4	136,5	-
4'	148,8	147,4	-
5	149,3	116,1	-
5'	116,4	116,1	6,77 (d, 8,0)
6	104,9	120,1	6,65 (s)
6'	119,7	120,1	6,81 (dd, 8,0, 2,0)
7	86,6	87,7	4,71 (d, 4,5)
7'	86,4	87,5	4, 71 (d, 4,5)
8	55,0	55,3	3,14 (m)
8'	54,7	55,6	3,14 (m)
9	72,1	72,7	3,86 (m) 4,25 (m)
9'	71,9	72,8	3,86 (m) 4,25 (m)
3-OMe		56,8	3,84 (m)
5-OMe		56,8	3,84 (m)
3'-OMe		56,5	3,85 (m)

a) CD_3OD b 125 MHz, c 500 MHz; δ_C của (+)-medioresinol đo trong CD_3OD [90]

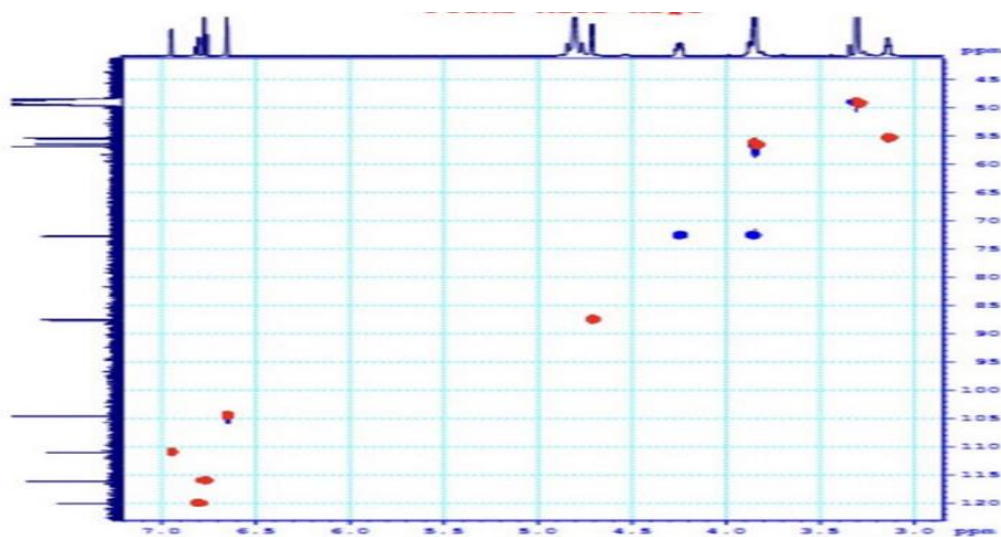
3.2. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT3



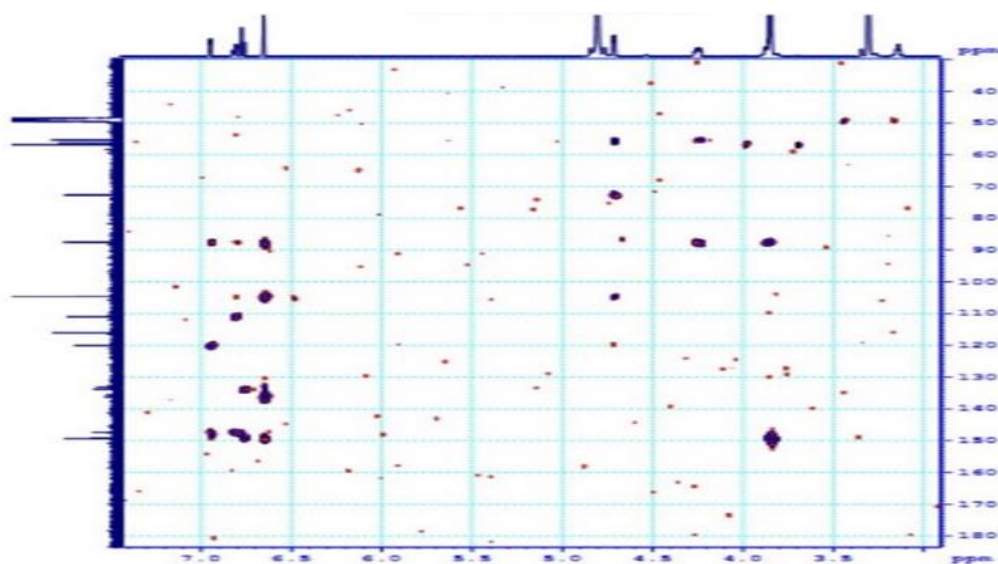
3.3. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT3



3.4. Phổ HSQC của hợp chất PT3



3.5. Phổ HMBC của hợp chất PT3



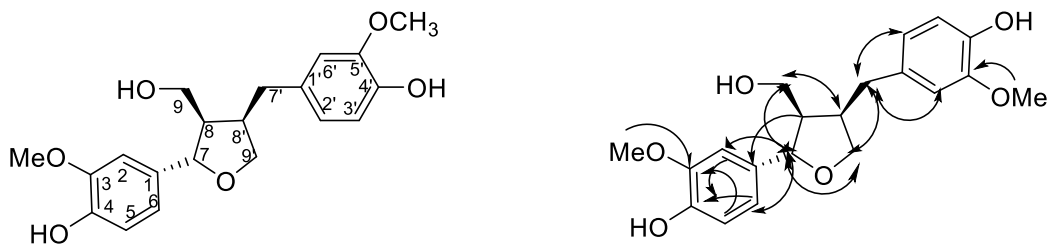
3.6. Phổ UV của hợp chất PT3



4. Phụ lục hợp chất PT4

- Bột vô định hình, màu trắng
- Công thức phân tử $C_{20}H_{24}O_6$ ($M = 360$)
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +32,0^\circ$ ($c = 0,1, \text{MeOH}$)
- Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 4.1
- Phổ IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$: 3387, 2936, 1604, 1516, 1463, 1452, 1431, 1371, 1272, 1236, 1154, 1121, 1032, 855
- Các phổ ^1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, IR: Xem mục 4.2 – mục 4.6

4.1. Hợp chất PT4



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT4**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT4** phân lập được ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ ^1H -NMR cho thấy tín hiệu của ba proton của nhóm methine xuất hiện tại $\delta_{\text{H}} 4,77$ (d, $J = 7,0$ Hz, H-7), 2,39 (m, H-8), và 2,75 (m, H-8'), trong đó, sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp hơn của tín hiệu tại $\delta_{\text{H}} 4,77$ được lý giải là do nhóm methine này phải được gắn với một nguyên tử oxy. Hai cặp tín hiệu xuất hiện tại $\delta_{\text{H}} 3,65$ (1H, dd, $J = 11,0, 6,5$ Hz)/3,84 (1H, $J = 11,0, 6,5$ Hz) và $\delta_{\text{H}} 4,00$ (1H, dd, $J = 13,5, 6,5$

Hz)/3,75 (1H, dd, $J = 13,5, 6,5$ Hz) được xác định là thuộc hai nhóm metylen có nối với nguyên tử oxy bởi các tín hiệu này đã bị dịch chuyển về phía trường thấp.

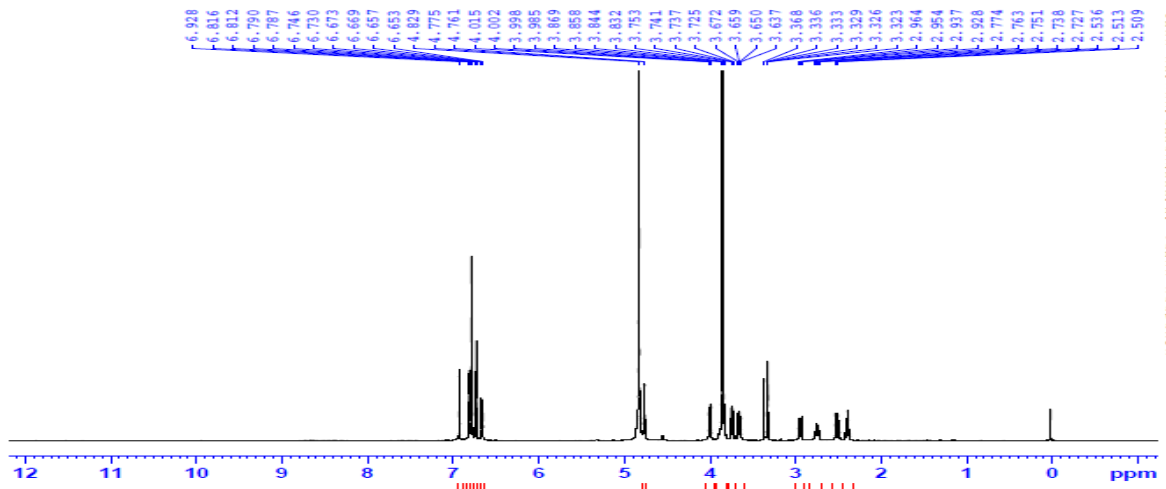
Ngoài ra, tín hiệu của một nhóm CH_2 được nhận biết tại δ_{H} 2,51 (1H, dd, $J = 13,5, 11,0$ Hz)/2,94 (1H, dd, $J = 13,5, 5,0$ Hz), cùng với hai nhóm methoxy cũng được nhận ra bởi tín hiệu tại δ_{H} 3,84 (3H, s) và 3,86 (3H, s). Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 4 xuất hiện 20 tín hiệu đặc trưng cho 20 nguyên tử carbon. Trong đó, sự có mặt của hai vòng thơm đều thế 1,3,4 được xác định bởi hai cặp các tín hiệu tại δ_{C} 135,8, 149,0, 147,1 (3 x C), 110,7, 119,8, 116,0 (3 x CH) và δ_{C} 133,6, 149,0, 145,8 (3 x C), 113,5, 122,2, 116,2 (3 x CH). Ngoài ra, hai carbon CH_2 có nối với nguyên tử oxy được nhận biết tại δ_{C} 60,5 và 73,5, một tín hiệu carbon methine nối với oxy tại δ_{C} 84,0, hai carbon CH khác tại δ_{C} 54,0 và 43,9, một carbon CH_2 tại δ_{C} 33,7 cùng với hai carbon methoxy tại δ_{C} 56,4 (x2). Những kết quả phổ NMR thu được nêu trên cho thấy hợp chất **PT4** thuộc vào lớp chất lignan có hai nhóm methoxy gắn vào hai vòng thơm. Các dữ liệu này hoàn toàn phù hợp cho hợp chất lariciresinol [11]. So sánh trực tiếp các dữ liệu phổ NMR của hai hợp chất này cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn. Cuối cùng, độ quay cực riêng đo được của hợp chất này là +32 phù hợp hoàn toàn với dữ liệu đã được khẳng định cho hợp chất (+)-lariciresinol [91]. Từ những phân tích và kết quả nêu trên, hợp chất **PT4** được xác định là (+)-lariciresinol.

Bảng 4.1. Phổ NMR của hợp chất **PT4** và chất so sánh lariciresinol

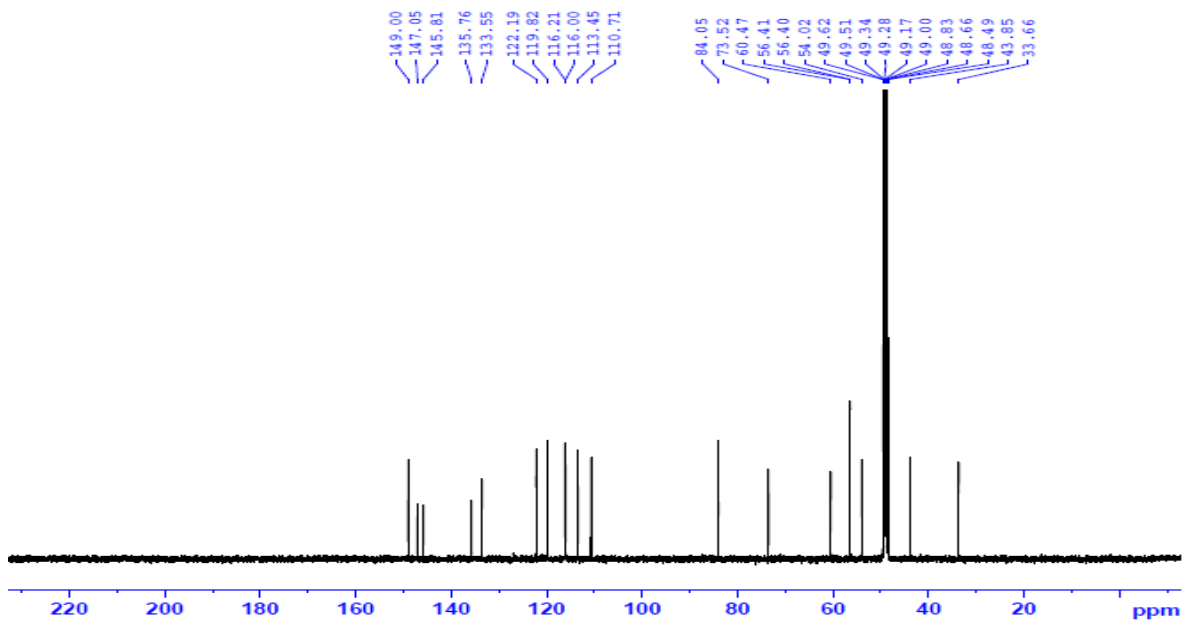
C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	135,8	135,8		1'	133,6	133,6	-
2	110,7	110,7	6,93 (d, 1,5)	2'	113,5	113,5	6,81 (d, 2,0)
3	149,0	149,0	-	3'	149,0	149,0	-
4	147,1	147,1	-	4'	145,8	145,8	-
5	116,0	116,0	6,78 (m)	5'	116,2	116,2	6,74 (d, 8,0)
6	119,8	119,8	6,79 (m)	6'	122,2	122,2	6,68 (dd, 8,0, 2,0)
7	84,1	84,0	4,77 (d, 7,0)	7'	33,7	33,7	2,51 (dd, 13,5, 11,0) 2,94 (dd, 13,5, 5,0)
8	54,0	54,0	2,39 (m)	8'	43,9	43,9	2,75 (m)
9	60,5	60,5	3,65 (dd, 11,0, 6,5) 3,84 (dd, 11,0, 6,5)	9'	73,5	73,5	4,00 (dd, 8,0, 6,5) 3,74 (dd, 8,0, 6,5)
3-OMe	56,4	56,4	3,86 (s)	3'-OMe	56,4	56,4	3,84 (s)

a) CD_3OD b) 125 MHz c) 500 MHz; δ của (+)-lariciresinol đo trong CD_3OD [91]

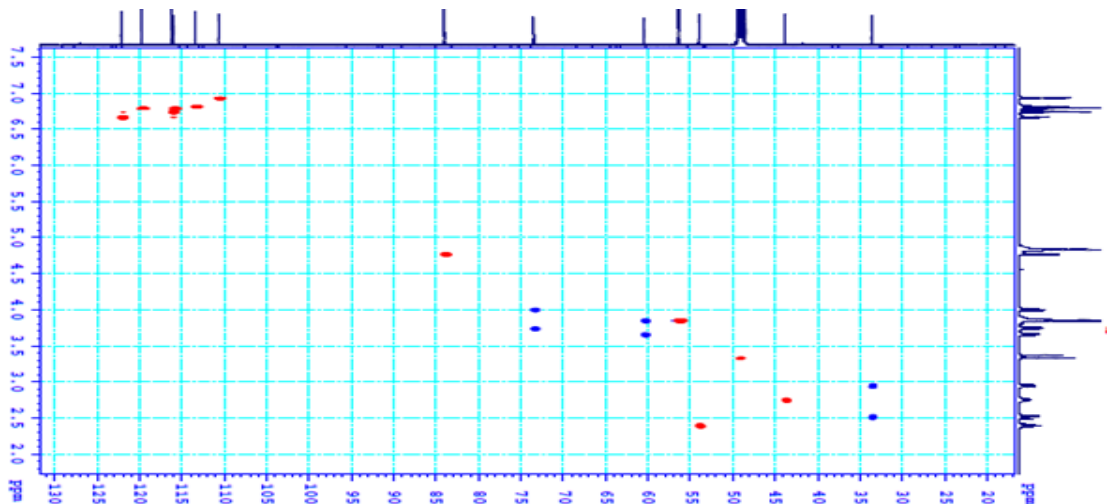
4.2. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT4



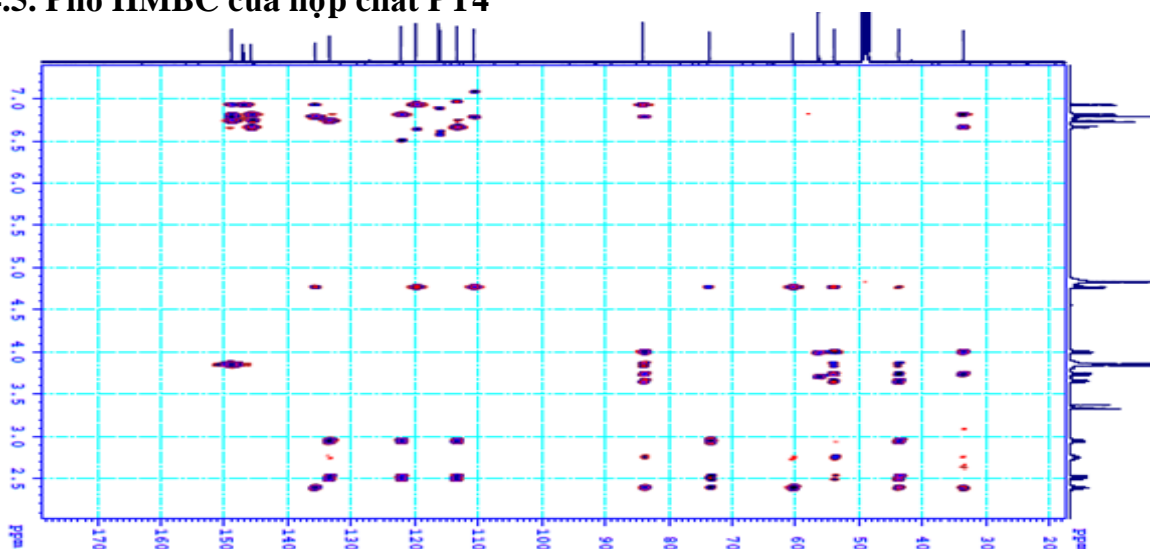
4.3. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT4



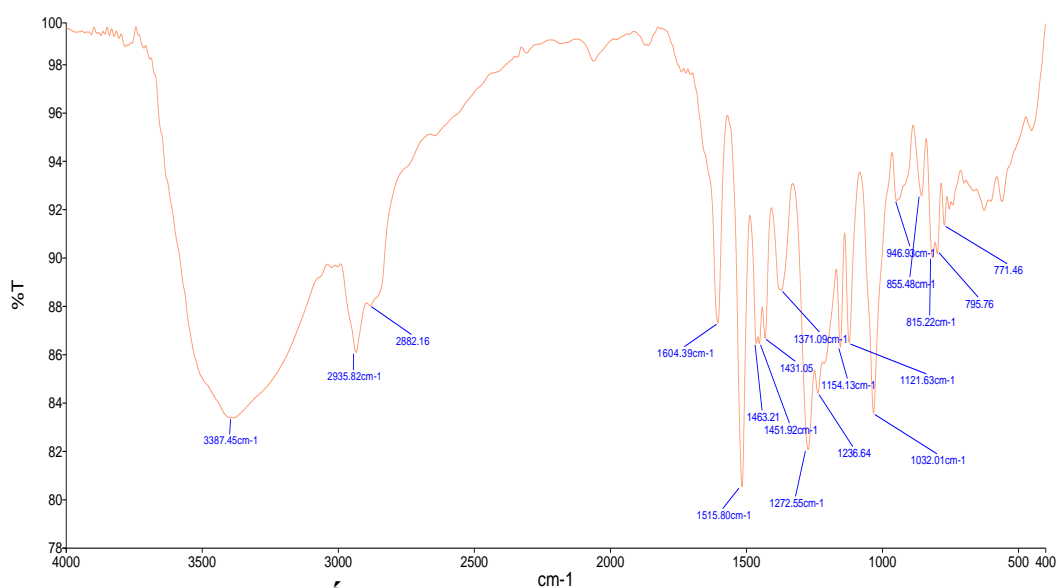
4.4. Phổ HSQC của hợp chất PT4



4.5. Phổ HMBC của hợp chất PT4



4.6. Phổ IR của hợp chất PT4



5. Phụ lục hợp chất PT5

- Bột vô định hình, màu trắng
- Công thức phân tử C₂₀H₂₆O₆ (M = 362)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z [M+Na]⁺ 385,1619 tính toán lý thuyết cho công thức [C₂₀H₂₆O₆Na]⁺ 385,1622 ; Δ = - 0,78 ppm
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ 0 (c = 0,1, MeOH, 4:1)
- Số liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR: Xem Bảng 5.1
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm : 207, 280
- Các phổ HR-ESI -MS, ¹H và ¹³C-NMR, HSQC, UV: Xem mục 5.2 – mục 5.6

5.1. Hợp chất PT5



Hình 5.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT5**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT5** phân lập được ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 385,1619 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{20}H_{26}O_6Na]^+$ 385,1622 ; $\Delta = -0,78$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{20}H_{26}O_6$, $M = 362$ g/mol.

Phân tích phổ 1H -NMR của hợp chất 5 nhận thấy các tín hiệu proton đặc trưng của vòng thơm tại δ_H 6,68 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,62 (2H, d, $J = 2,0$ Hz) và 6,56 (2H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz) chứng minh sự hiện diện của vòng benzen thế ở ba vị trí 1, 3, 4 và 2 nhóm methyl δ_H 3,76 (6H, s). Kết hợp phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho biết 20 nguyên tử carbon của hợp chất 5 bao gồm 2 nhóm methoxy, 4 nhóm methylene, 8 nhóm methine và 6 nguyên tử carbon bậc bốn. Phân tích các dữ liệu phổ của hợp chất 5 nhận thấy đây là một chất thuộc loại diarylbutane lignan. Đối chiếu với tài liệu tham khảo [92], kết luận hợp chất **PT5** là secoisolariciresinol

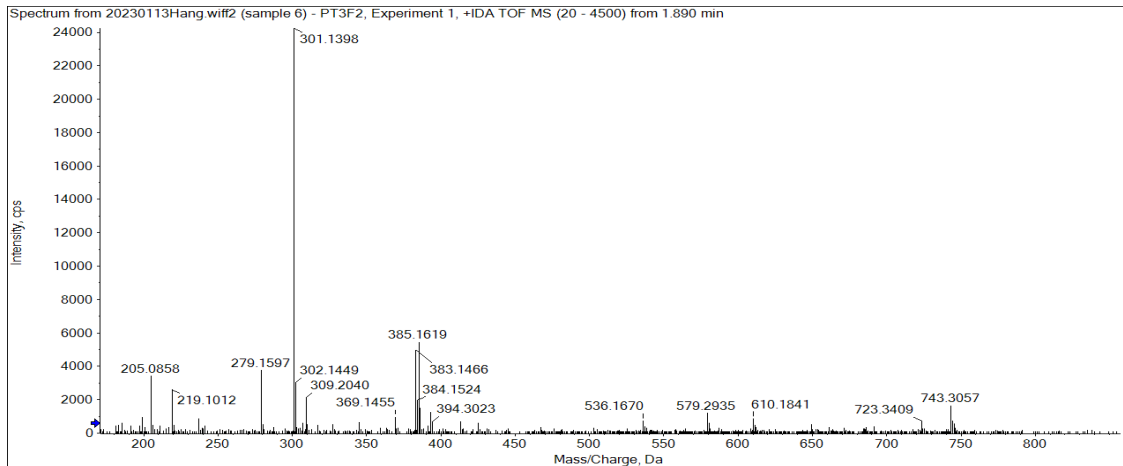
Bảng 5.1. Phổ NMR của hợp chất **PT5** và chất so sánh secoisolariciresinol

C	# δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., $J =$ Hz)
1	133,8	133,9	-
2	113,5	113,4	6,61 (d, 2,0)
3	148,3	148,8	-
4	145,6	145,5	-
5	115,6	115,8	6,68 (d, 8,0)
6	122,5	122,7	6,57 (dd, 8,0, 2,0)
7	36,2	36,1	2,58 (dd, 14,0, 8,0) 2,68 (dd, 14,0, 7,0)
8	44,8	44,2	1,92 (m)
9	61,4	62,1	3,61 (dd, 11,0, 5,0)
1'	133,8	133,9	-
2'	113,5	113,4	6,61 (d, 2,0)
3'	148,3	148,8	-
4'	145,6	145,5	-
5'	115,6	115,8	6,68 (d, 8,0)
6'	122,5	122,7	6,57 (dd, 8,0, 2,0)
7'	36,2	36,1	2,58 (dd, 14,0, 8,0)

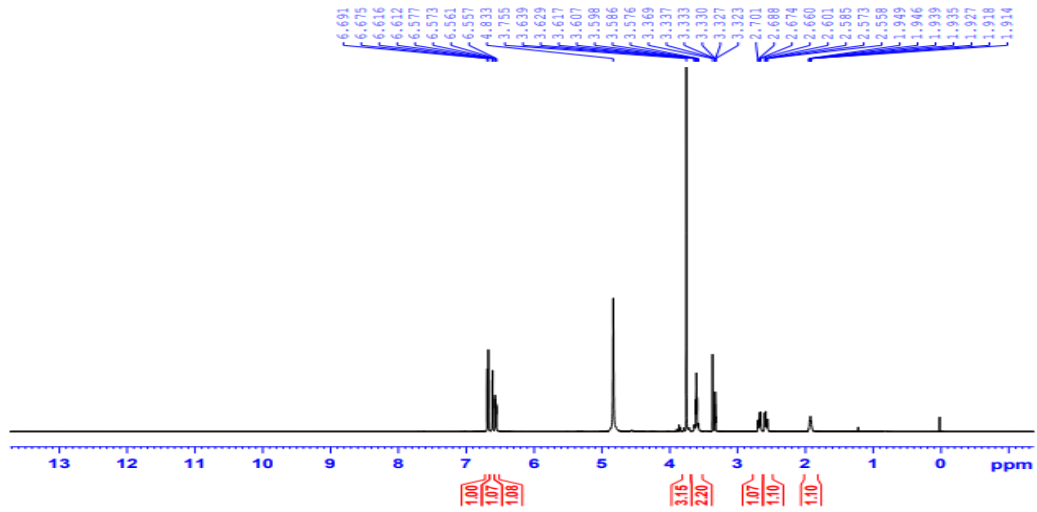
			2,68 (dd, 14,0, 7,0)
8'	44,8	44,2	1,92 (m)
9'	61,4	62,1	3,61 (dd,11,0, 5,0)
3 -OMe	56,3	56,2	3,76(s)
3'-OMe	56,3	56,2	3,76(s)

a)¹CD₃OD. b)125MHZ. c)500MHZ. # δ_C của secoisolariciresinol (CD₃OD) [92].

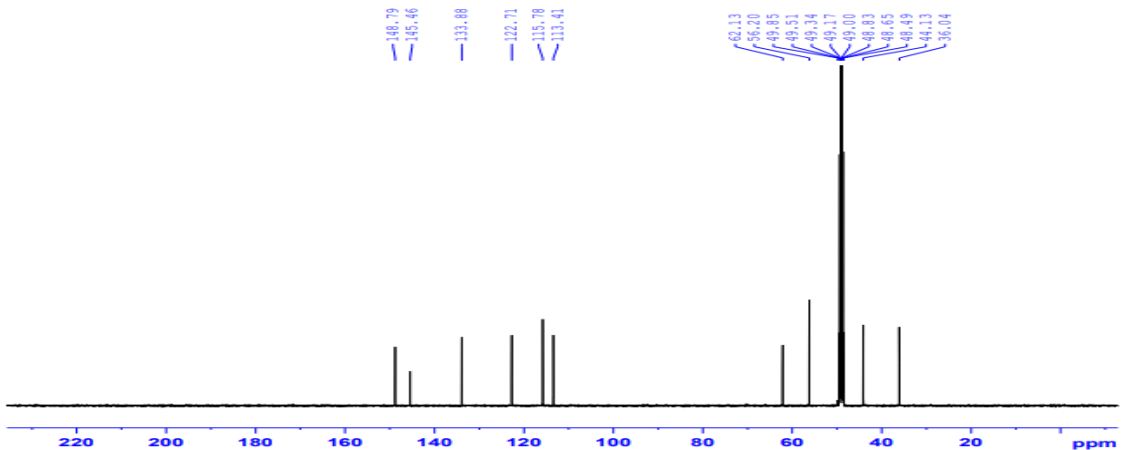
5.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT5

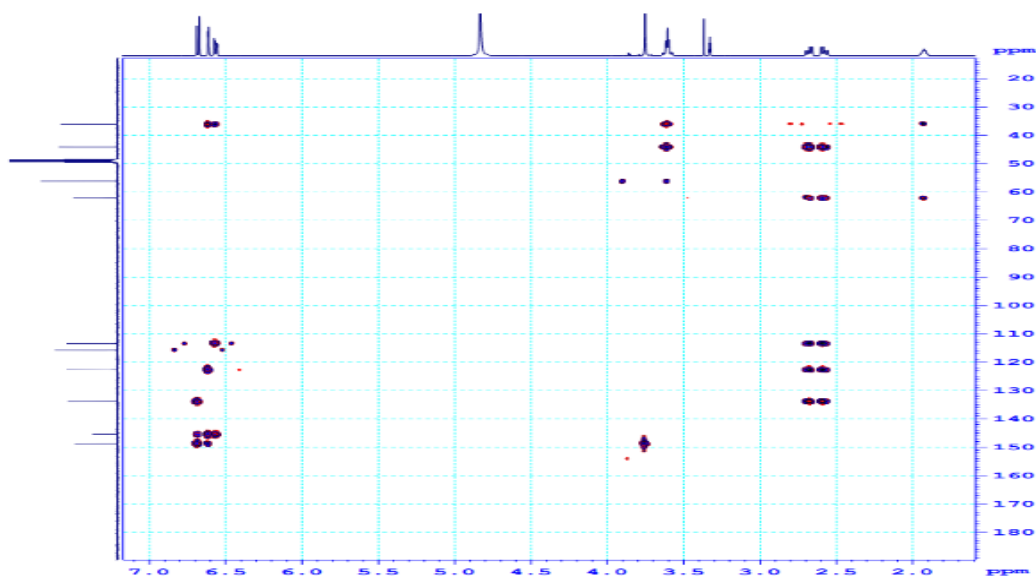


5.3. Phổ ¹H- NMR của hợp chất PT5

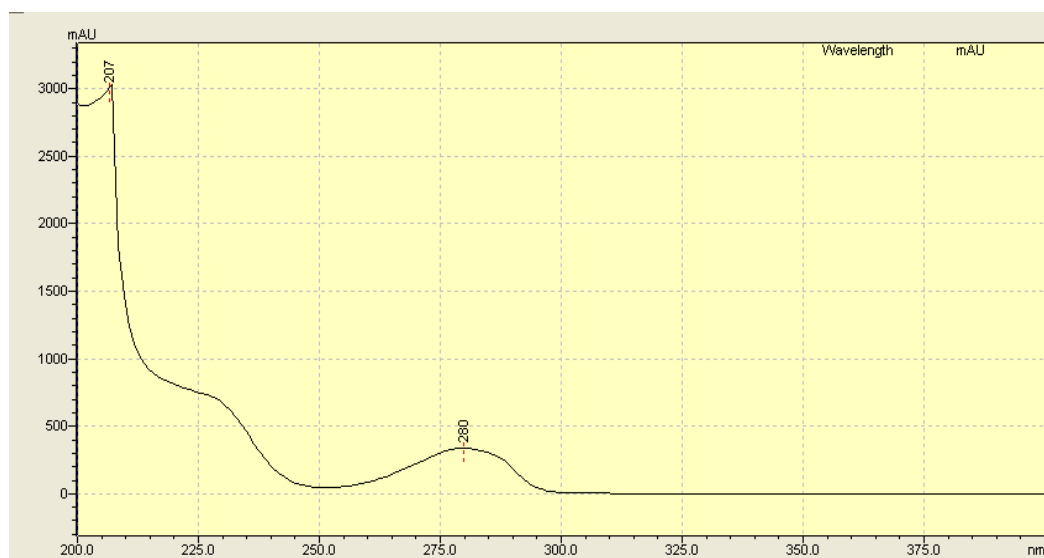


5.4. Phổ ¹³C- NMR của hợp chất PT5





5.6. Phổ UV của hợp chất PT5



6. Phụ lục hợp chất PT6 (Xem chất PT2D1A trang 65 - trang 71)

7. Phụ lục phổ hợp chất PT7

7.1. Hợp chất PT7

- Bột vô định hình, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_5$ ($M = 274$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ 275,0922, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{15}H_{14}O_5H]^+ = 275,0914$, $\Delta = 2,9081$ ppm,
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 26,0^\circ$ ($c = 0,5$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 9
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 7.2 - mục 7.6



Hình 7.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT7**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT7** phân lập được ở dạng vô định hình, màu vàng, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ 275,0922, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{15}H_{14}O_5H]^+ = 275,0914$, $\Delta = 2,9081$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{15}H_{14}O_5$, $M = 274$ g/mol.

Phân tích phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PT7** nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của 15 nguyên tử carbon, bao gồm 12 nguyên tử carbon đặc trưng của vòng thơm (7 nguyên tử carbon bậc bốn và 5 nguyên tử carbon nhóm methine) và 3 nguyên tử carbon no, trong đó tín hiệu tại δ_C 78,8 được quy cho nguyên tử carbon no liên kết trực tiếp với oxi. Phổ 1H -NMR cho thấy sự xuất hiện của 2 proton thơm ghép cặp với nhau ở vị trí meta lần lượt là δ_H 5,86 (d, $J = 2,5$ Hz, H-8) và 5,94 (d, $J = 2,5$ Hz, H-6). Thêm nữa, cũng ở vùng dịch chuyển hoá học đặc trưng của proton thơm, hệ thống spin ABX được phát hiện tại δ_H 6,87 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,77 (d, $J = 8,0$ Hz, H-5') và 6,73 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz, H-6'). Tín hiệu tại δ_H 4,79 (dd, $J = 10,0; 1,5$ Hz, H-2) được quy cho proton nhóm methine gắn trực tiếp với oxy. Ngoài ra ở vùng trường cao, các proton của 2 nhóm methylene: H2-4 [δ_H 2,69 (m)/2,59 (m)] và H2-3 [δ_H 2,10 (m)/1,92 (m)] cũng đã được phát hiện. Đối chiếu với tài liệu tham khảo [94], hợp chất **PT7** được xác định là luteoliflavan

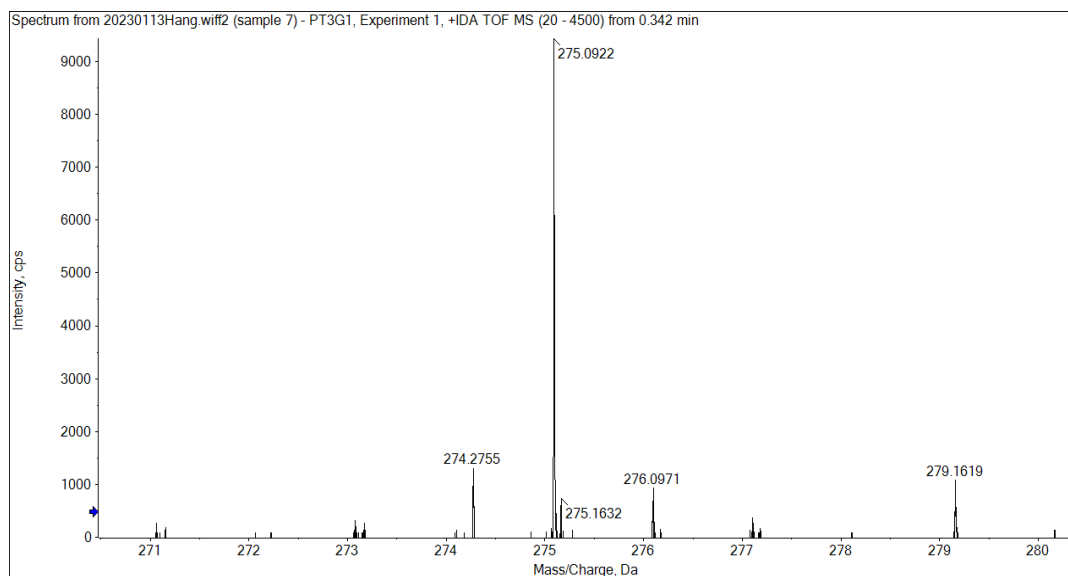
Bảng 7.1. Phổ NMR của hợp chất **PT7** và chất so sánh luteoliflavan

C	# δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)
2	80,0	78,8	4,79 (dd, 10,0, 1,5)
3	66,2	30,8	2,10 (m)/ 1,92 (m)
4	28,0	20,3	2,68 (m)/2,60 (m)
5	157,1	157,9	-
6	94,8	96,0	5,94 (d, 2,0)
7	156,2	157,4	-
8	94,0	96,0	5,86 (d, 2,0)
9	156,2	157,0	-
10	99,0	102,6	-

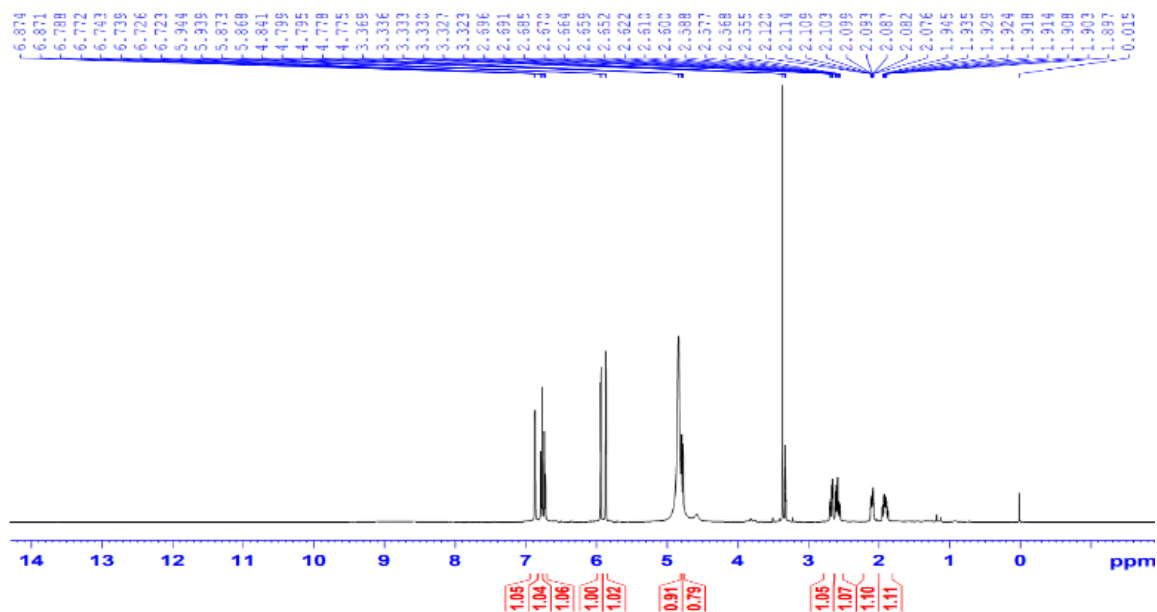
1'	130,8	135,1	-
2'	114,4	114,4	6,87 (d, 2,0)
3'	145,8	146,1	-
4'	145,7	145,8	-
5'	115,0	116,1	6,77 (d, 8,0)
6'	118,0	118,8	6,73 (dd, 8,0, 2,0)

a) CD₃OD^{b)} 125 MHz^{c)} 500 MHz; # δ của luteoliflavan (DMSO-d₆) [94]

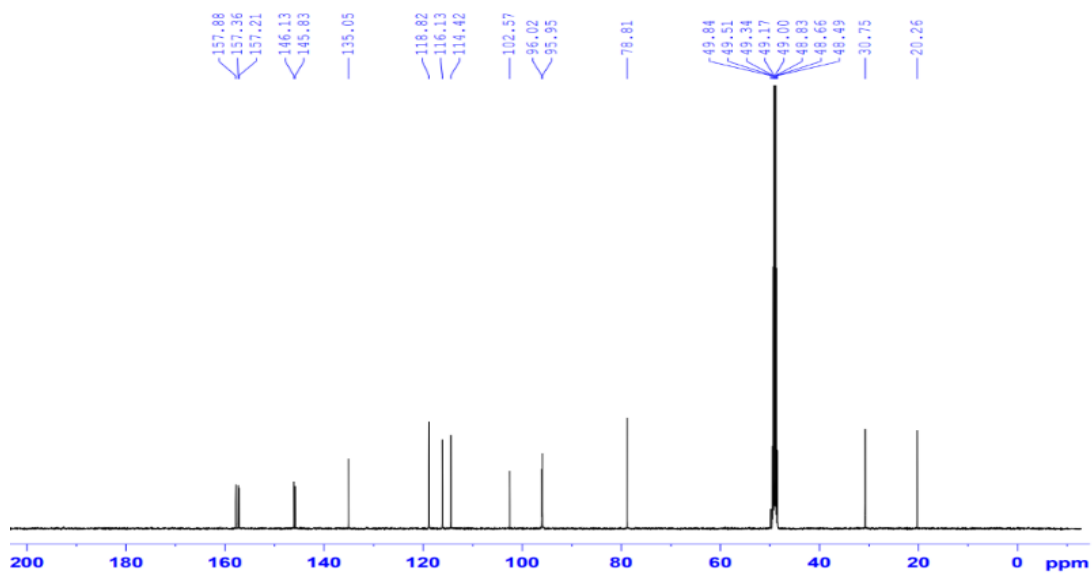
7.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT7



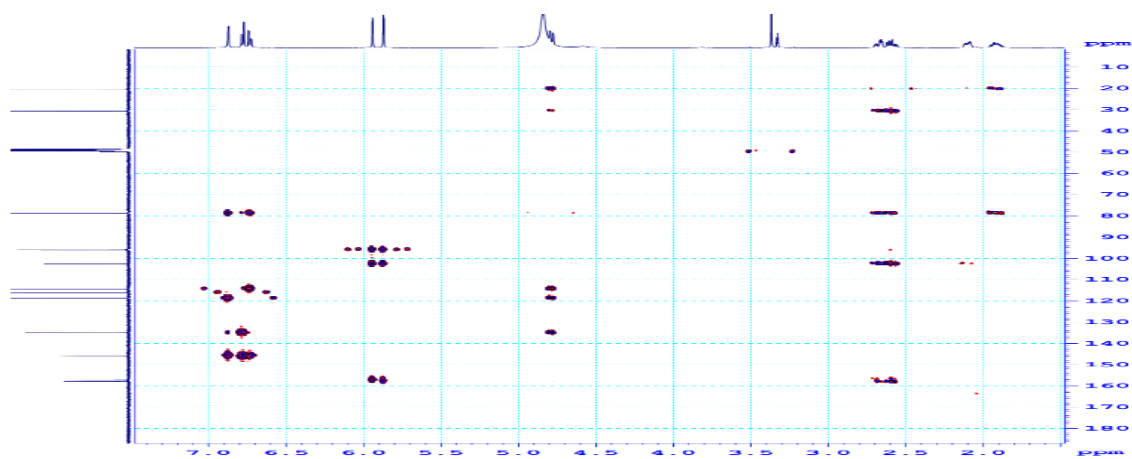
7.3. Phổ ¹H- NMR của hợp chất PT7



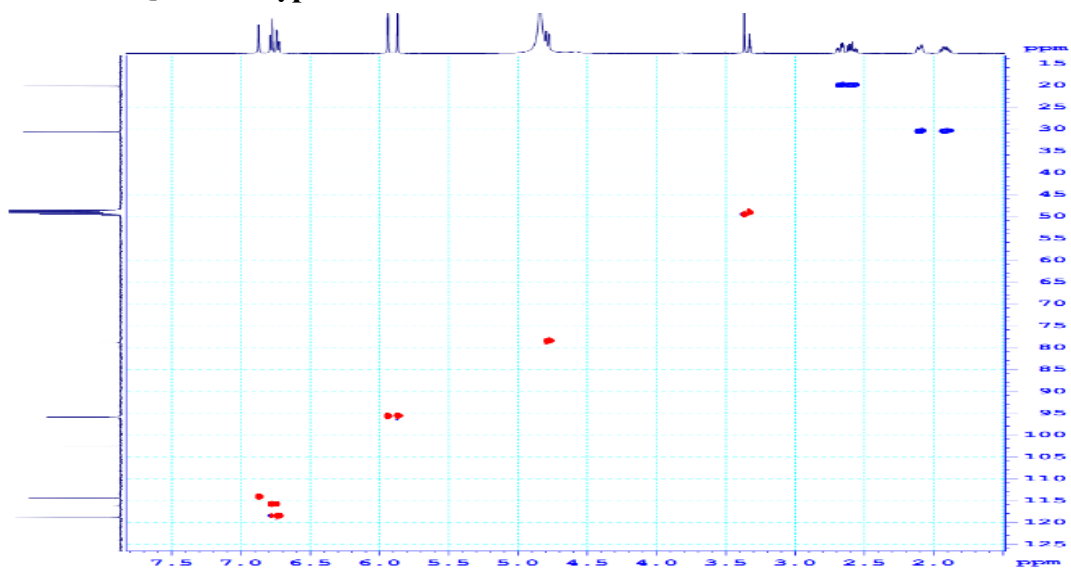
7.4. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT7



7.5. Phổ HMBC của hợp chất PT7



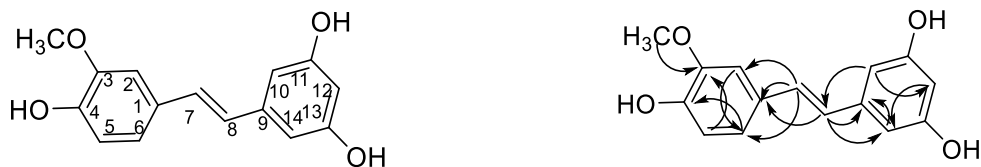
7.6. Phổ HSQC của hợp chất PT7



8. Phụ lục hợp chất PT8

- Chất rắn, màu vàng
- Công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_4$ ($M = 258$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 8.1
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 8.2 - mục 8.5.

8.1. Hợp chất PT8



Hình 8.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT8**

* Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT8** phân lập được ở dạng chất rắn, màu vàng. Phổ 1H NMR của hợp chất **PT8** xuất 6 tín hiệu proton trong vùng các tín hiệu cộng hưởng của vòng thơm. Trong đó ba tín hiệu thuộc vào một vòng thơm với hệ tương tác spin ABX với ba tín hiệu tại δ_H 7,11 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,16 (1H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz), 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz). Ba tín hiệu này lần lượt có tương tác HSQC với ba carbon tại δ_C 110,5, 121,2 và 116,6. Một nhóm methoxy được nhận biết bởi các tín hiệu δ_H 3,91 (3H, s)/ δ_C 56,4 đồng thời nhóm methoxy này được xác định là gắn vào C-3 của vòng thơm nêu trên bởi xuất hiện tín hiệu tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 7,11)/H-5 (δ_H 6,79) với C-3 (δ_C 148,9) đồng thời lại có tương tác HMBC giữa các proton methoxy với C-3. Một vòng thơm khác với hai tín hiệu tại δ_H 6,49 (2H, d, $J = 2,0$ Hz) và δ_H 6,20 (1H, t, $J = 2,0$ Hz) được xác định là có tính đối xứng, trong đó tín hiệu chập tại 6,49 có tương tác HSQC với carbon tại δ_C 105,9 (cường độ cao gấp đôi tín hiệu khác) và tín hiệu tại δ_H 6,20 có tương tác HSQC với tín hiệu tại δ_C 102,7. Một nối đôi với cấu hình *trans* cũng được xác định bằng hai tín hiệu doublet tại δ_H 6,98 và 6,85, trong đó chúng lần lượt có tương tác HSQC với carbon tại δ_C 129,7 và δ_C 127,3. Giá trị hằng số tương tác J của nối đôi này được xác định là 16,0 Hz, khẳng định cấu hình *trans* của nối đôi. Tương tác HMBC giữa proton H-7 (δ_H 6,98) với C-1 (δ_C 131,1), C-2 (δ_C 110,5), C-6 (δ_C 121,2), giữa H-8 (δ_H 6,85) với C-9 (δ_C 141,3), C-10/C-14 (δ_C 105,9) đã khẳng định nối đôi được nối với hai vòng thơm tại C-1 và C-9. Như vậy, hợp chất **PT8** chính là isohapontigenin. Kết quả so sánh các dữ kiện phổ NMR của **PT8** với isohapontigenin được trình bày trong bảng 1 cho thấy sự phù hợp hoàn toàn và kết quả so sánh này một lần nữa chứng tỏ **PT8** chính là isohapontigenin. Hợp chất isohapontigenin được thông báo là có nhiều hoạt tính thú vị, nhất là hoạt tính chống ung thư. Đối chiếu với tài liệu tham khảo [95],

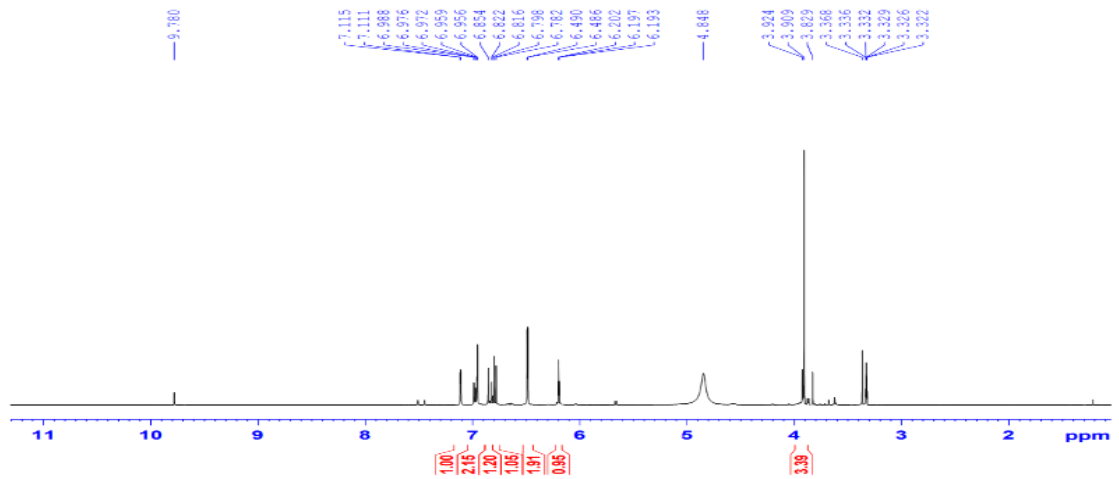
hợp chất **PT8** được xác định là isorhapontigenin.

Bảng 8.1. Phổ NMR của hợp chất **PT8** và chất so sánh isorhapontigenin

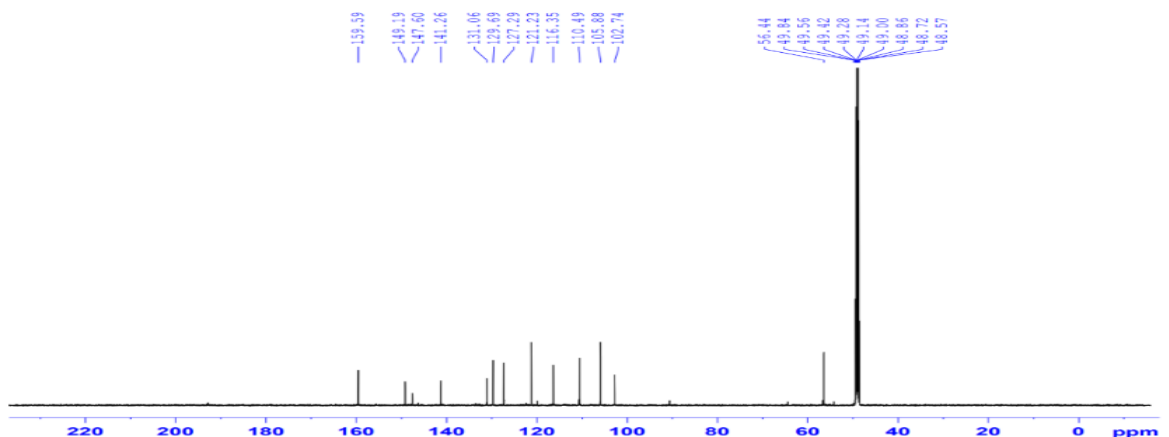
C	# $\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	129,1	131,1	-
2	109,6	110,5	7,11 (1H, d, 2,0)
3	148,5	149,2	-
4	147,1	147,6	-
5	115,9	116,4	6,79 (1H, d, 8,0)
6	120,8	121,2	6,98 (1H, dd, 8,0, 2,0)
7	128,6	129,7	6,98 (1H, d, 16,0)
8	126,4	127,3	6,85 (1H, d, 16,0)
9	140,6	141,3	-
10	105,1	105,9	6,49 (1H, d, 2,0)
11	159,1	159,6	-
12	102,1	102,7	6,20 (1H, t, 2,0)
13	159,1	159,6	-
14	105,1	105,9	6,49 (1H, d, 2,0)
OCH ₃	56,2	56,4	3,91 (3H, s)

a) CD₃OD b) 125 MHz c) 500 MHz; # δ_C của isorhapontigenin đo trong acetone-d₆ [95].

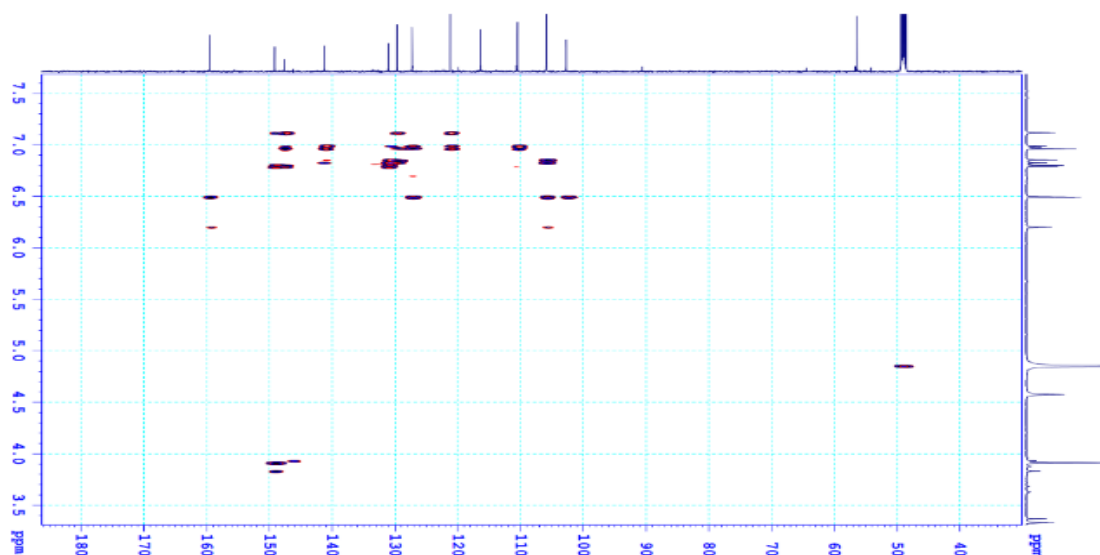
8.2. Phổ ¹H- NMR của hợp chất PT8



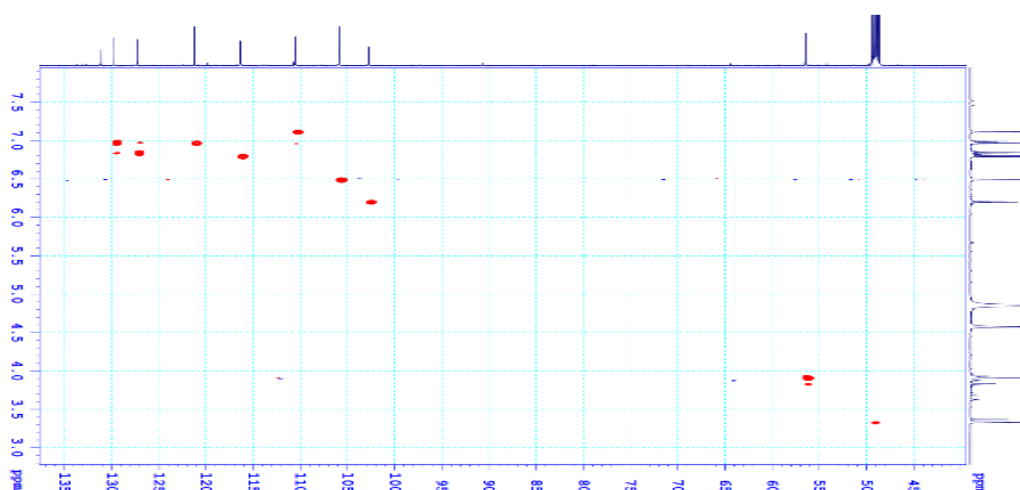
8.3. Phổ ¹³C- NMR của hợp chất PT8



8.4. Phổ HMBC của hợp chất PT8



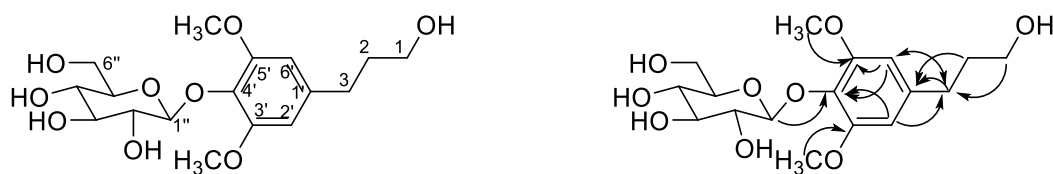
8.5. Phổ HSQC của hợp chất PT8



9. Phụ lục hợp chất PT9

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{17}H_{26}O_9$ ($M = 374$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 397,1473 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{17}H_{26}O_9Na]^+ = 397,14690$, $\Delta = +1,0$ ppm;
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -51,0^\circ$ ($c = 0,5$, MeOH)
- Phổ IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3555, 3405, 2918, 1644, 1614, 1593, 1510, 1464, 1423, 1367, 1333
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 9.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, IR: Xem mục 9.2 - mục 9.7

9.1. Hợp chất PT9



Hình 9.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT9**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT9** phân lập được ở dạng bột vô định hình, không màu, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 397,1473, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{17}H_{26}O_9Na]^+$ = 397,1469 Δ = 1,0072 ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{17}H_{26}O_9$, $M = 374$ g/mol. Hợp chất **PT9** có các phổ NMR đặc trưng của một hợp chất phenylpropane glycoside. Trong đó phần aglycon xuất hiện tín hiệu vòng thơm singlet tại δ_H 6,58 (2H, s) gợi ý sự có mặt của một vòng thơm thế 3,4,5 và có tính đối xứng. Thêm việc xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy mà tín hiệu của chúng đều bị chập vào nhau tại δ_H 3,86 (6H, s) càng cho thấy hai nhóm methoxy này phải nối vào vào vòng thơm tại các vị trí đối xứng C-3 và C-5 của vòng thơm. Một nhánh $CH_2-CH_2-CH_2-OH$ được xác định bởi ba cụm tín hiệu tại δ_H 2,66 (2H, t, $J = 6,8$ Hz), 1,85 (2H, m), và 3,60 (2H, t, $J = 6,8$ Hz). Trong đó ba tín hiệu này lần lượt đều có tương tác với các carbon tại δ_C 33,4, 35,4, và 62,2. Sự có mặt của một phân tử đường glucose cũng được nhận biết bởi các tín hiệu anome δ_H 4,80 (d, $J = 7,8$ Hz)/ δ_C 105,7, cũng như các tín hiệu carbon khác rất điển hình của đường glucose (C-2 \rightarrow C-6: 75,9, 78,0, 71,3, 78,3 (4 x CH), 62,6 CH₂).

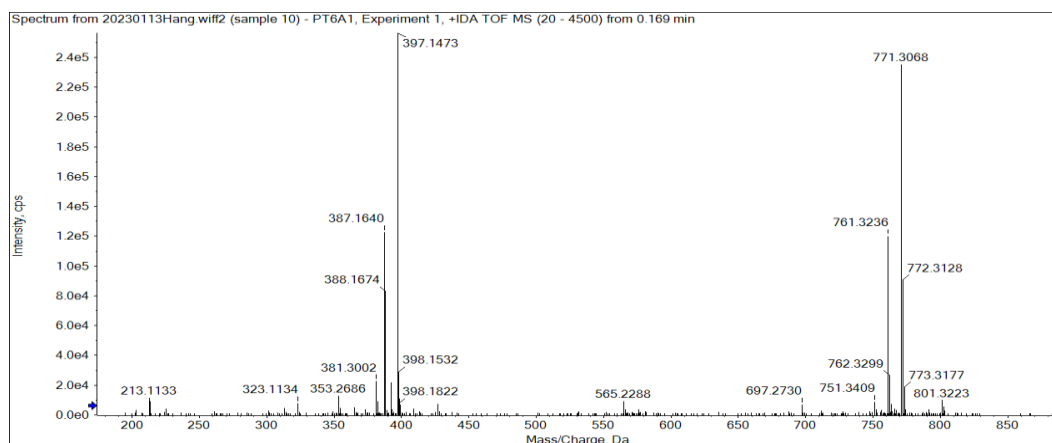
Trên phổ HMBC, tương tác giữa H-3 (δ_H 2,66) với C-1' (140,5) và C-2'/C-6' (δ_C 107,5) chứng tỏ rằng nhánh propanol nối vào vòng thơm tại C-1', tương tác HMBC của proton anome tại δ_H 4,80 với C-4' (δ_C 134,5) cho thấy phân tử đường glucose nối vào C-4' của vòng thơm. Giá trị hằng số tương tác J giữa H-1'' và H-2'' của đường glucose khá cao ($J = 7,8$ Hz) chứng tỏ đã tồn tại liên kết β -glycoside. Như vậy, hợp chất **PT9** phải là dihydrosyringin với công thức phân tử là $C_{17}H_{26}O_9$. Kết quả so sánh các giá trị phổ NMR của hai hợp chất này cho thấy sự phù hợp hoàn toàn. Điều này khẳng định rõ ràng **PT9** đúng là dihydrosyringin.

Bảng 9.1. Phổ NMR của hợp chất **PT9** và chất so sánh dihydrosiringin

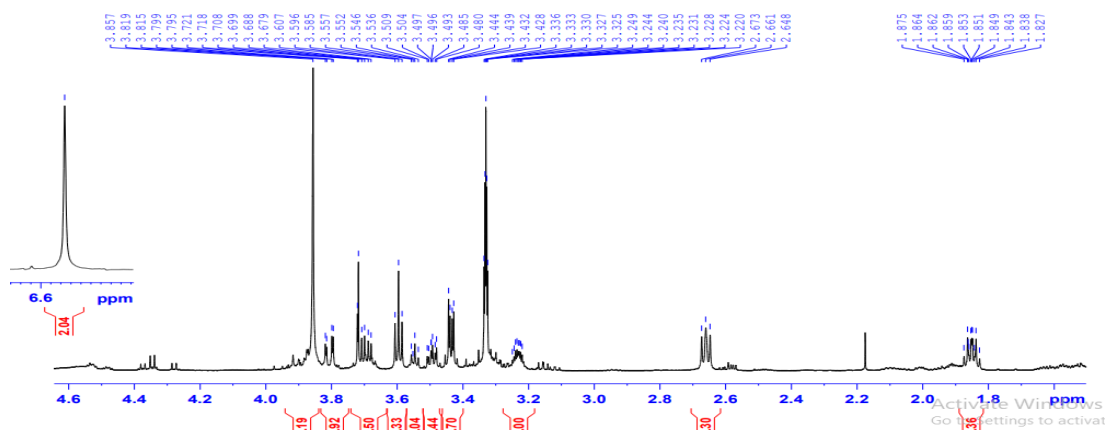
C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	62,1	62,2	3,60 (2H, t, 6,8)
2	35,4	35,4	1,85 (2H, m)
3	33,4	33,4	2,66 (2H, t, 6,8)
1'	140,5	140,5	-
2'	107,5	107,5	6,58 (1H, s)
3'	154,1	154,1	-
4'	134,6	134,5	-
5'	154,1	154,1	-
6'	107,5	107,5	6,58 (1H, s)
1''	105,7	105,7	4,80*
2''	75,7	75,7	3,49 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	77,8	77,8	3,43 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	71,4	71,4	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	78,3	78,3	3,23 (1H, m)
6''	62,6	62,6	3,61 (1H, dd, 12,0, 5,0) 3,80 (1H, dd, 12,0, 2,0)
2xOCH ₃	57,0	57,0	3,86 (6H, s)

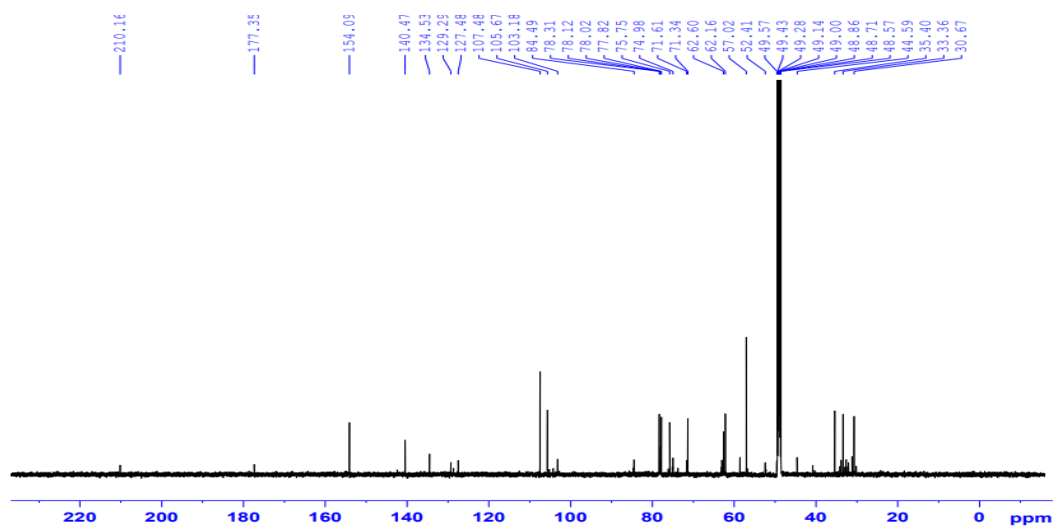
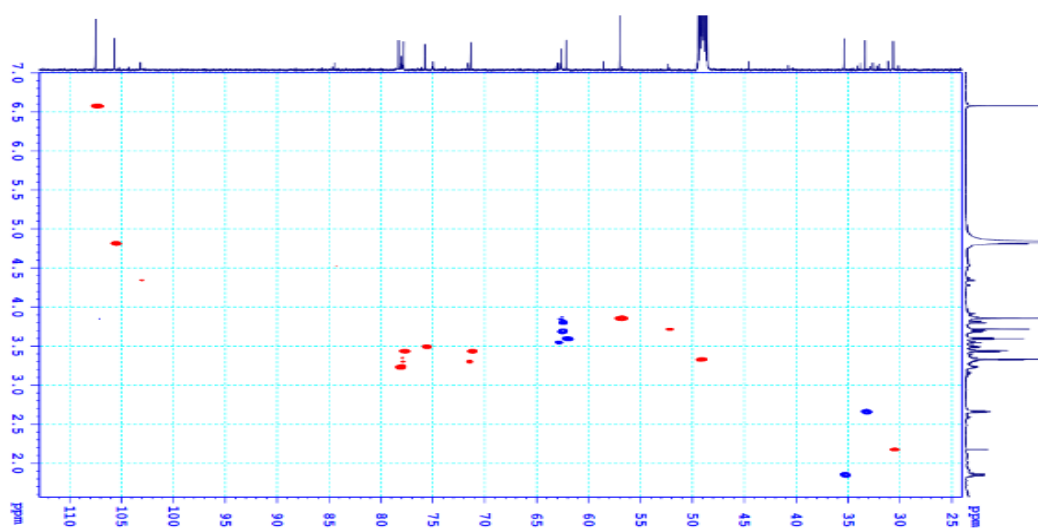
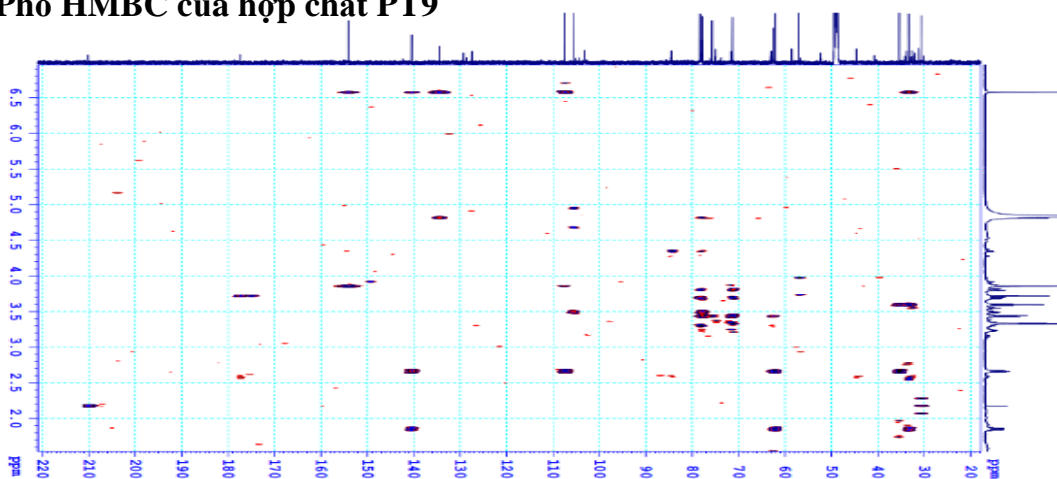
a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz; # δ_C của dihydrosiringin [96]

9.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT9

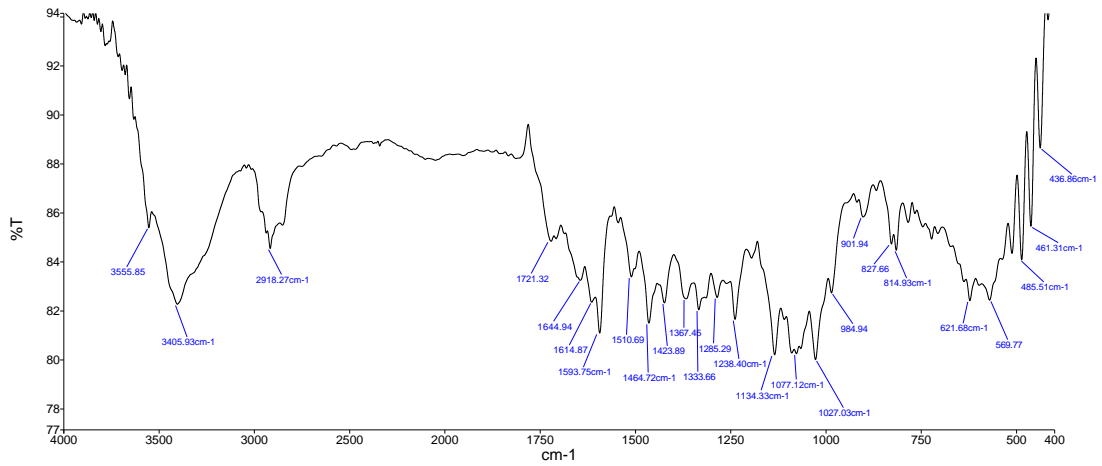


9.3. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT9



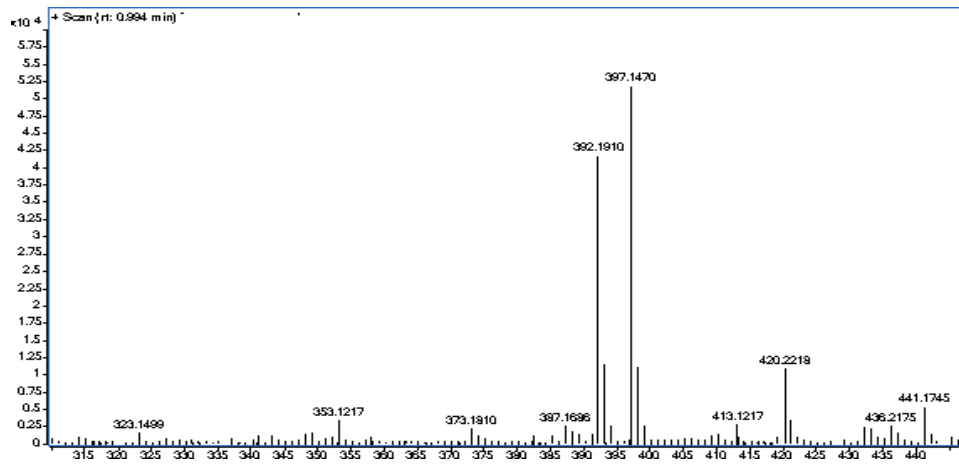
9.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT9**9.5. Phổ HSQC của hợp chất PT9****9.6. Phổ HMBC của hợp chất PT9**

9.7. Phổ IR của hợp chất PT9

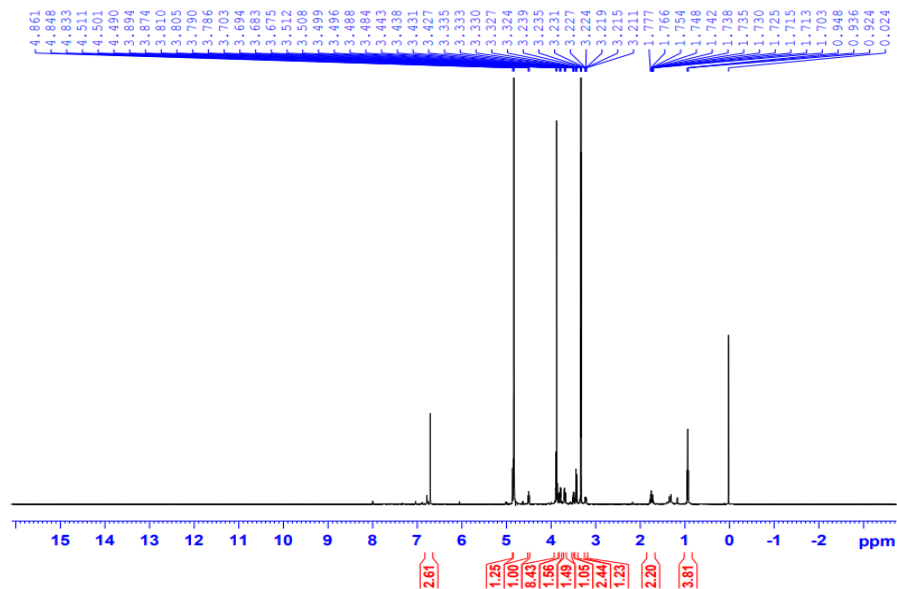


10. Phụ lục hợp chất PT10

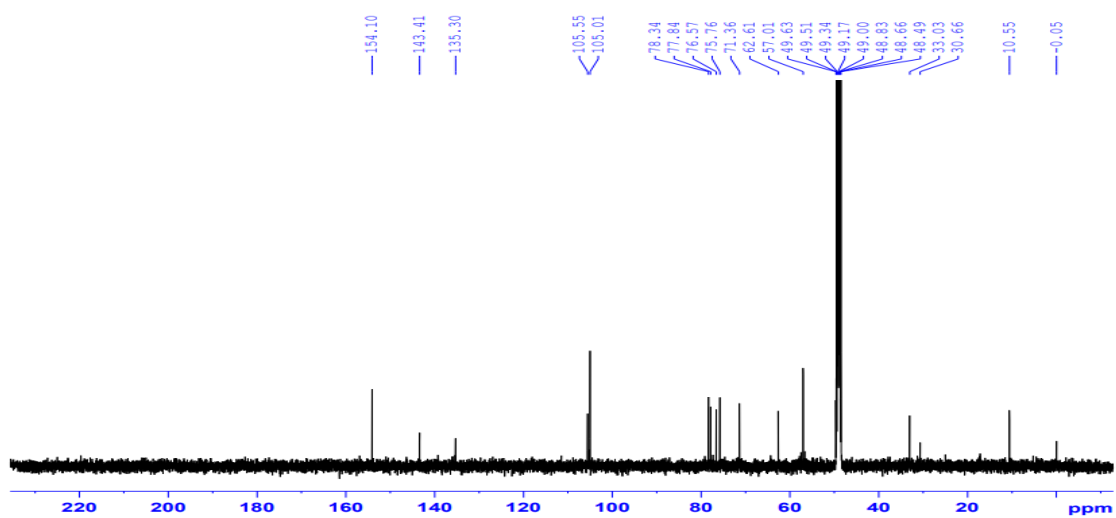
10.1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT10



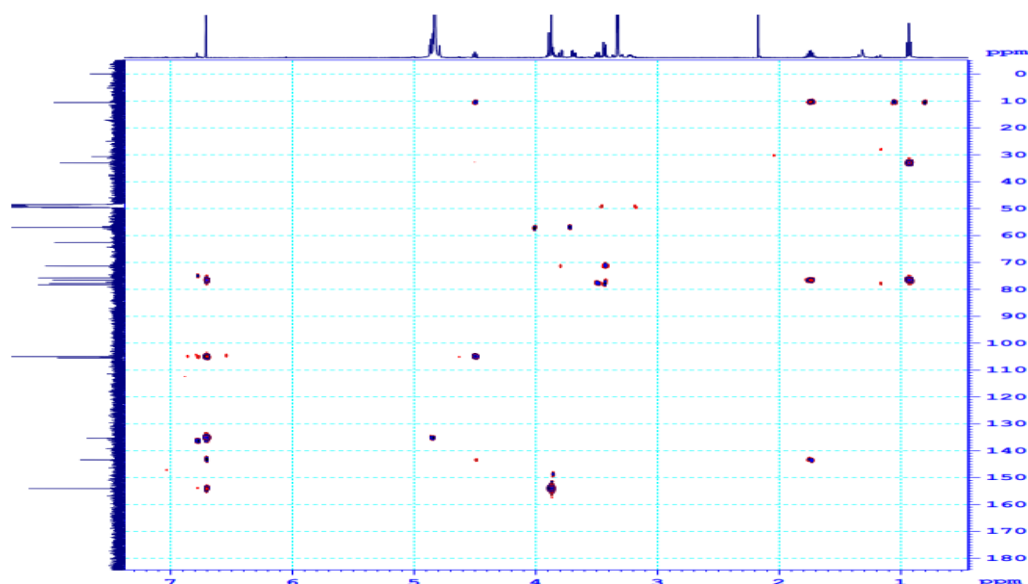
10.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT10



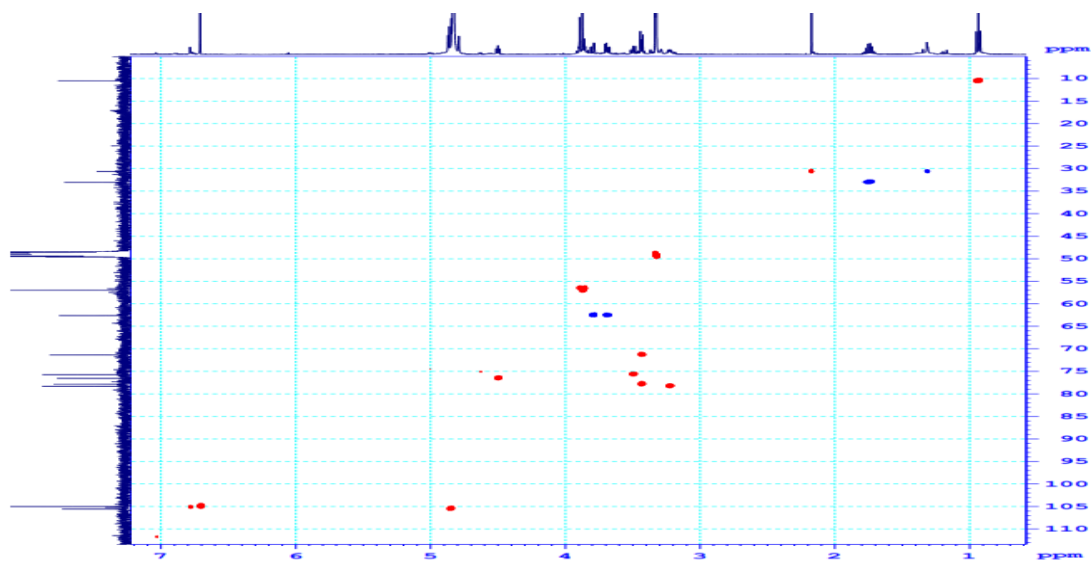
10.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT10



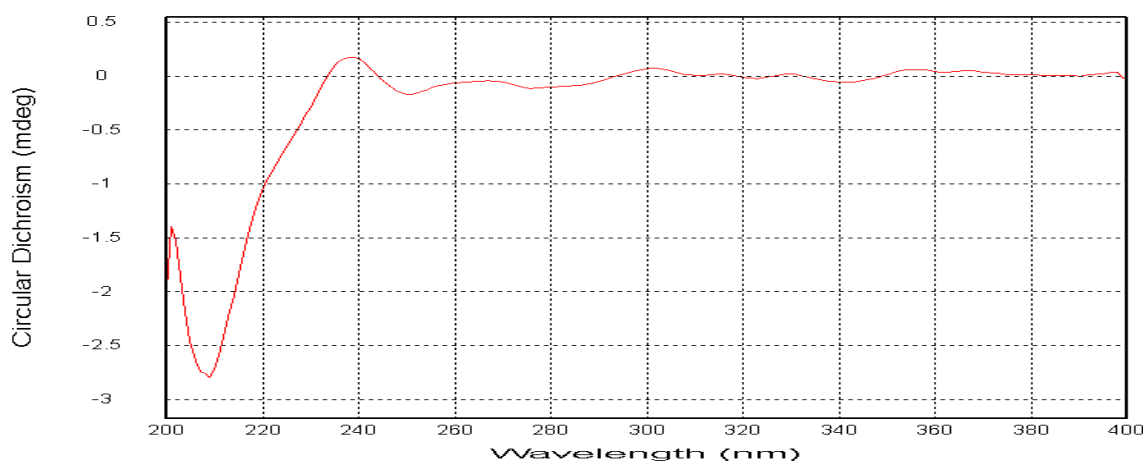
10.4. Phổ HMBC của hợp chất PT10



10.5. Phổ HSQC của hợp chất PT10



10.6. Phổ CD của hợp chất PT10



11. Phụ lục hợp chất PT11

- Bột vô định hình, màu trắng
- Công thức phân tử $C_{19}H_{30}O_8$ ($M = 386$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ 387,2021 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{19}H_{30}O_8H]^+ = 387,20134$, $\Delta = +2,0$ ppm;
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +74^\circ$ ($c = 0,96$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 11.1
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm : 280
- Phổ CD: $\Delta = +240$ nm
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, CD: Xem Phụ lục 11.2- mục 11.7.

11.1. Hợp chất PT11.



Hình 11.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT11**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT11** phân lập được ở dạng bột vô định hình màu trắng, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ 387,2021, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{19}H_{30}O_8H]^+ = 387,2013$, $\Delta = 2,0661$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{19}H_{30}O_8$, $M = 386$ g/mol. Phổ 1H NMR của hợp chất **PT11** đo trong CD_3OD xuất hiện ba tín hiệu methyl singlet tại δ_H 1,04, 1,06 và 1,96, mỗi tín hiệu có cường độ tích phân 3H, và một tín hiệu methyl doublet tại δ_H 1,31 (3H, $J = 6,6$ Hz), 3 tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,89 (1H, s), 6,00 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và δ_H 5,75 (1H, dd, $J = 16,0, 6,6$ Hz). Sự có mặt của proton anome tại δ_H 4,29 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) cùng

với 6 proton khác có độ dịch chuyển hóa học nằm trong khoảng δ_H 3,17-3,87 là vùng của các proton gắn với carbon nối nguyên tử oxy, gợi ý cho sự có mặt của một phân tử đường glucose. Ngoài ra, hai proton tại δ_H 2,20 và 2,62 xuất hiện dưới dạng doublet có hằng số J khá cao ($J = 10,8$ Hz), chứng tỏ hai proton này gắn cùng vào một nguyên tử carbon và hằng số $J = 10,8$ Hz chính là tương tác geminal của hai proton này. Phổ ^{13}C NMR của **PT11** xuất hiện tín hiệu của 19 carbon, trong đó 6 carbon thuộc vào một phân tử đường glucose xuất hiện tại δ_C 101,2, 78,4, 78,2, 74,9, 71,7 và 62,8. Mười ba carbon còn lại được nhận dạng là một carbon keton tại δ_C 201,2, hai nối đôi tại δ_C 167,1, 133,7 x 2, 127,1, bốn nhóm CH_3 tại δ_C 23,4, 24,7, 22,2 và 19,6, hai carbon nối với oxy tại δ_C 74,6 và 80,0, và một carbon methylene tại δ_C 50,7.

Việc xác định loại carbon được thực hiện bởi phổ HSQC. Qua phổ HSQC, các proton gắn trực tiếp với carbon được xác định, qua đó tín hiệu tại δ_C 80,0, 42,9, 167,4, 201,2 không có tương tác với bất kỳ proton nào và tín hiệu tại 50,7 có tương tác với cả hai proton tại 2,20 và 2,62. Những dữ liệu phân tích nêu trên cho thấy hợp chất này dự đoán là (6*S*,9*S*)-roseoside [96]. So sánh dữ liệu phổ NMR của hai hợp chất này thấy có sự trùng khớp hoàn toàn khi đo trong cùng dung môi CD_3OD .

Phổ HMBC cho thấy có tương tác giữa H-1' của đường glucose (4,29) với carbon C-9 (δ_C 75,6) chứng tỏ đường glucose đã nối vào C-9. Các tương tác HMBC khác được mô tả trên hình 10.6. Ngoài ra, nối đôi C-7/C-8 được khẳng định có cấu hình *trans* do hằng số tương tác $J = 16,0$ Hz. Phổ CD của hợp chất **PT11** xuất hiện cực đại tại $\Delta = +240$ nm chứng tỏ cấu hình 6*S* (với cấu hình 6*R* thì $\Delta = -240$ nm). Giá trị $\delta_{\text{C-9}} = 74,6$ chứng tỏ cấu hình 9*S* (với cấu hình 9*R* thì $\delta_{\text{C-9}} = 77,0$ ppm) [98]. Liên kết glycoside được xác định là β bởi giá trị hằng số tương tác giữa H-1' và H-2' ($J = 7.8$ Hz). Từ những kết quả nêu trên, hợp chất **PT11** được khẳng định là (6*S*,9*S*)-roseoside.

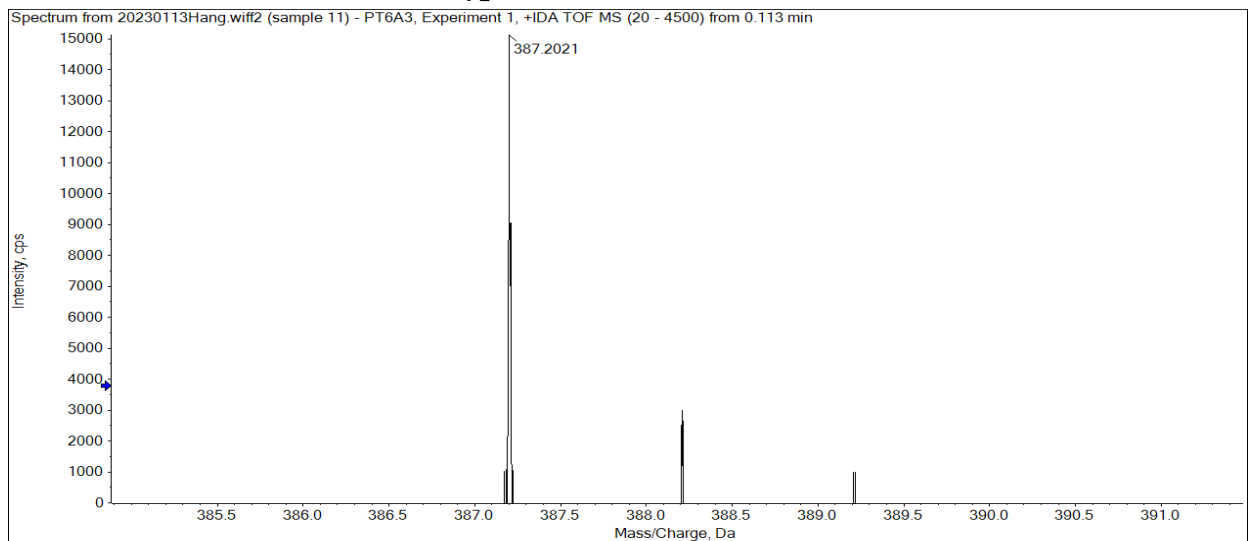
Bảng 11.1. Phổ NMR của hợp chất **PT11** và chất so sánh (6*S*,9*R*)-roseoside

C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	42,36	42,4	-
2	50,66	50,7	2,20 (1H, d, 10,8) 2,62 (1H, d, 10,8)
3	201,09	201,2	-
4	127,20	127,1	5,89 (1H, s)
5	166,90	167,4	-
6	79,98	80,0	-
7	134,12	133,7	6,00 (1H, d, 16,0)
8	133,80	133,7	5,75 (1H, dd, 16,0, 6,6)
9	74,70	74,6	4,53 (1H, m)
10	22,22	22,2	1,31 (3H, d, 6,6)
11	23,47	23,4	1,06 (3H, s)
12	24,74	24,7	1,04 (3H, s)
13	19,39	19,6	1,96 (3H, s)

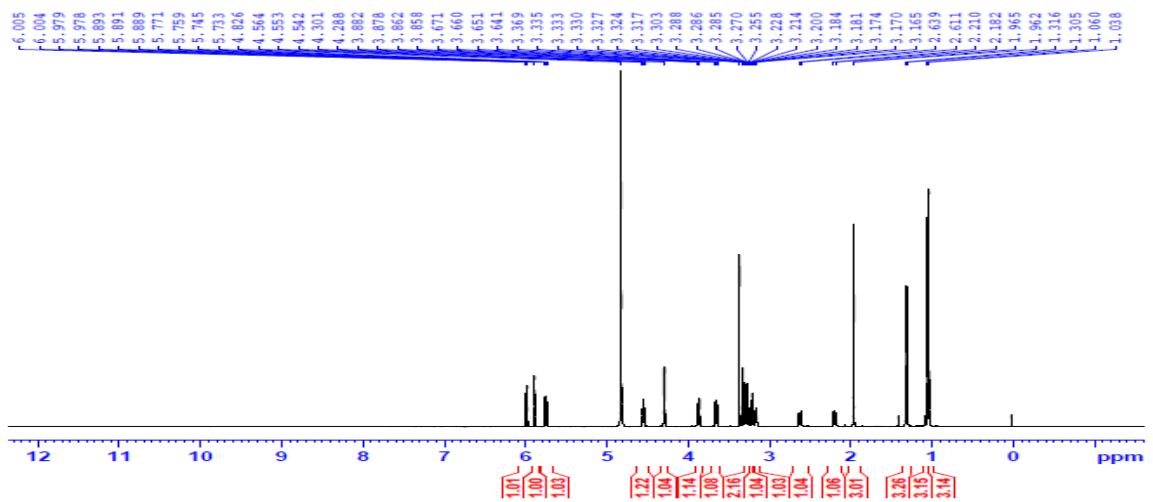
Glc			
1'	100,29	100,2	4,29 (1H, d, 7,8)
2'	75,00	74,9	3,20 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'	78,25	78,4	3,30 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'	71,76	71,7	3,27 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'	78,12	78,2	3,17 (1H, m)
6'	62,90	62,8	3,65 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,87 (1H, dd, 12,0, 2,0)

a) CD₃OD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz; # δ_C của (6*S*,9*R*)-roseoside [98]

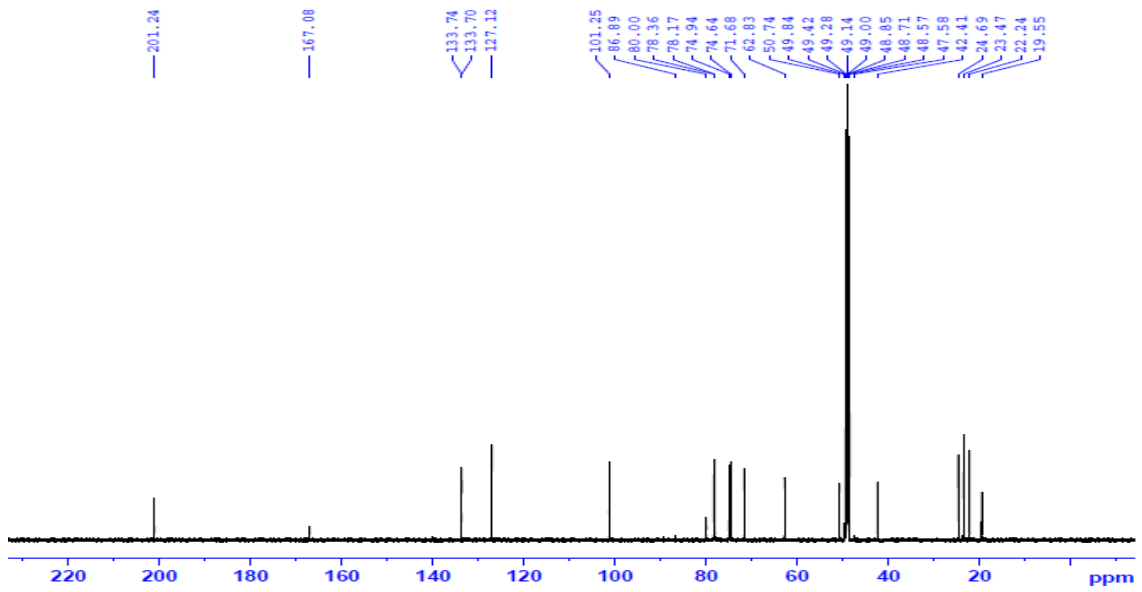
11.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT11



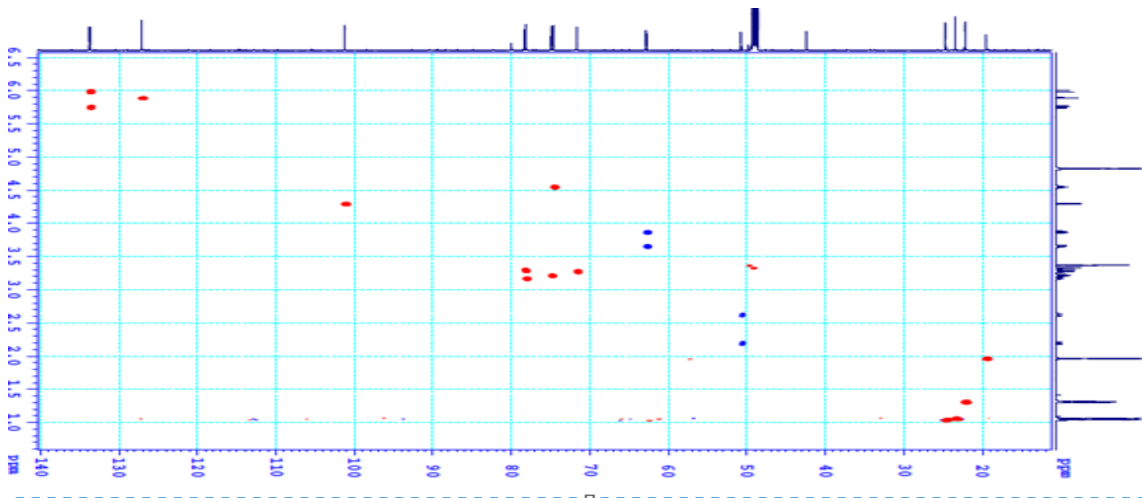
11.3. Phổ ¹H - NMR của hợp chất PT11



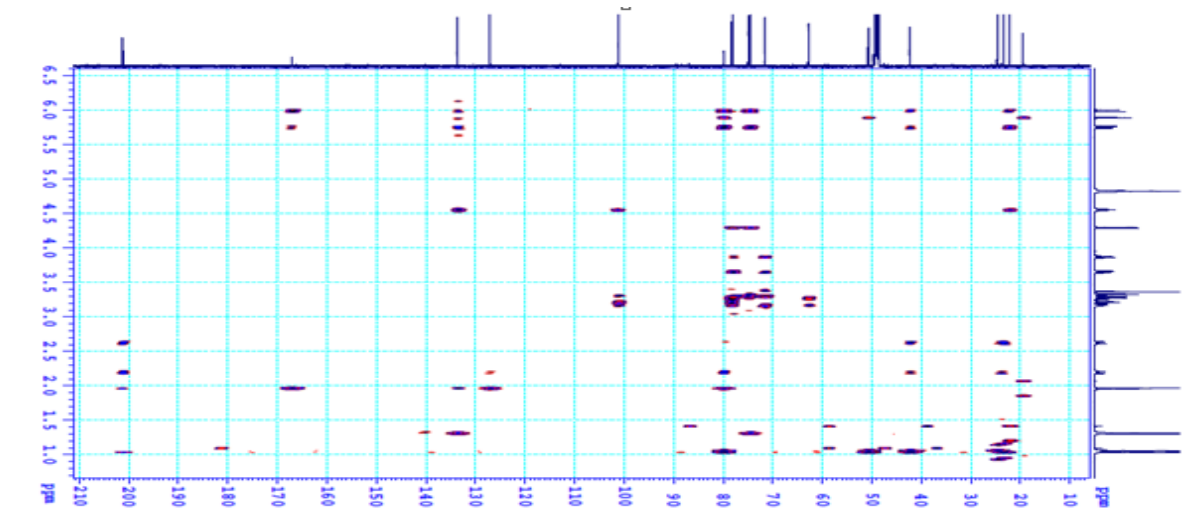
11.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT11



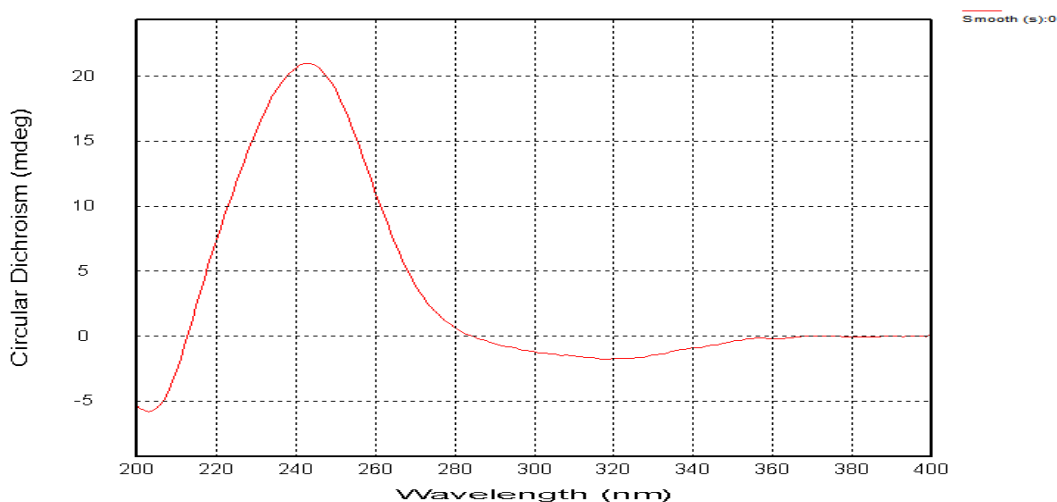
11.5. Phổ HSQC của hợp chất PT11



11.6. Phổ HMBC của hợp chất PT11



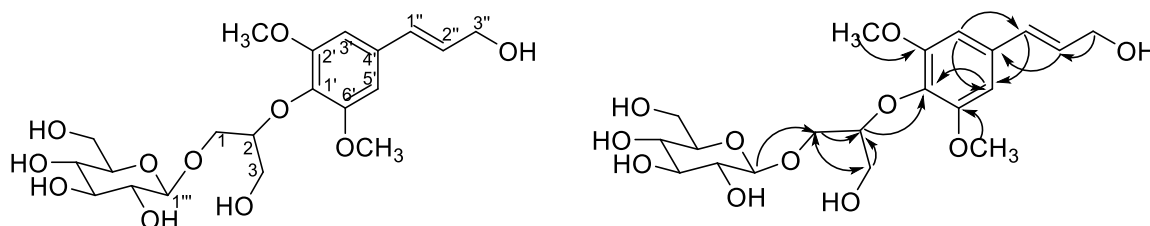
11.7. Phổ CD của hợp chất PT11



12. Phụ lục hợp chất PT12

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{20}H_{30}O_{11}$ ($M = 446$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic m/z 447,1877 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{30}O_{11}H]^+ = 447,1861$, $\Delta = 3,5779$ ppm; và pic m/z 469,1692 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{30}O_{11}Na]^+ = 469,168$, $\Delta = 2,558$ ppm
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 12.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 12.2 - mục 12.6

12.1. Hợp chất PT12



Hình 12.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất PT12

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất PT12 chất bột, vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT12 xuất hiện pic ion m/z 447,1877 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{30}O_{11}H]^+ = 447,1861$, $\Delta = 3,5779$ ppm; và pic m/z 469,1692 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{30}O_{11}Na]^+ = 469,168$, $\Delta = 2,558$ ppm. Như vậy, công thức phân tử của hợp chất này được xác định chính xác là $C_{20}H_{30}O_{11}$, $M = 446$ g/mol.

Phổ ^1H NMR của hợp chất này xuất hiện tín hiệu singlet của vòng thơm duy nhất tại δ_{H} 6,74 (2H), cùng với tín hiệu singlet khác đặc trưng cho nhóm methoxy tại δ_{H} 3,86 (6H). Điều này cho phép dự đoán sự có mặt của một vòng thơm thế 3,4,5 trong đó hai vị trí 3 và 5 sẽ được nối với hai nhóm methoxy tạo ra một vòng thơm đối xứng trục bậc hai. Một nối đôi ngoài vòng được nhận ra bởi hai tín hiệu tại δ_{H} 6,55 (1H, d, $J = 16,2$ Hz) và δ_{H} 6,33 (1H, dd, $J = 16,2, 5,4$ Hz). Giá trị hằng số tương tác J của nối đôi này khá lớn, chứng tỏ cấu hình của nối đôi này là *trans*. Tín hiệu doublet của hai proton tại δ_{H} 4,22 (d, $J = 5,4$ Hz) có tương tác HSQC với tín hiệu carbon tại 63,6 phù hợp cho một nhóm CH_2OH . Giá trị hằng số tương tác $J = 5,4$ Hz, đúng bằng một giá trị J của proton nối đôi tại 6,33 gợi ý rằng nhóm CH_2OH này liền cạnh ngay nối đôi nêu trên. Dự đoán này được khẳng định chính xác bằng phổ HMBC với sự xuất hiện tín hiệu HMBC rất rõ giữa proton nhóm CH_2OH với cả hai carbon của nối đôi tại δ_{C} 131,4 và δ_{C} 129,4. Mặt khác, tín hiệu HMBC tương tác giữa proton của nối đôi tại δ_{H} 6,55 với cả carbon vòng thơm tại δ_{C} 104,9 (x2) và δ_{C} 134,9 chứng tỏ mạch nhánh này đã gắn vào vòng thơm trên trục đối xứng của vòng thơm này. Ngoài sự có mặt của một phân tử đường glucose được nhận biết thông qua tín hiệu proton anome (δ_{H} 4,31, d, $J = 7,8$ Hz), carbon anome (δ_{C} 104,7) còn xuất hiện tín hiệu của một cấu trúc là dẫn xuất của glyceryl $\text{HOCH}_2\text{-CH(O-)-CH}_2\text{-O-}$ với bộ ba tín hiệu carbon tại δ_{C} 62,1 (CH_2), 83,0 (CH), 69,4 (CH_2), trong đó tín hiệu thấp nhất tại δ_{C} 62,1 phù hợp với nhóm CH_2OH tự do, và tín hiệu cao hơn tại δ_{C} 69,4 phù hợp với nhóm CH_2O - mà nhóm này được cho là phải gắn vào một nhóm thế khác (không phải là nhóm oxymethylen tự do). Trên phổ HSQC, các tín hiệu proton tương ứng với các carbon đã được xác định. Trong đó tín hiệu tại 4,18 vừa có tương tác HSQC với carbon tại δ_{C} 83,0, vừa có tương tác HMBC với carbon tại δ_{C} 62,1, 69,4 và đặc biệt là với C-1' (δ_{C} 136,5) chứng tỏ rằng cấu trúc glyceryl đã được nối vào vòng thơm từ carbon CH với C-1'. Mặt khác, tương tác HMBC của proton anome tại δ_{H} 4,31 với carbon CH_2 của nhánh glyceryl tại δ_{C} 69,4 chứng tỏ đây chính là vị trí mà phân tử đường nối vào thông qua liên kết ete. Các tương tác HMBC chính đã được phân tích và chỉ rõ trên hình vẽ. Với kết quả phân tích nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất **PT12** sẽ tương ứng với công thức phân tử là $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$. Kết quả phổ khối lượng phân giải cao đã cho kết quả hoàn toàn chính xác với sự xuất hiện của pic ion m/z 469,1692 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, kết quả tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{11}\text{Na}$: 469,1680, với sai số rất nhỏ, $\Delta = -2,6$ ppm. Từ những phân tích nêu trên, hợp chất **PT12** được xác định là 1-O- β -D-glucopyranosyl-2-{2,6-dimethoxy-4-[1-(*E*)-propen-3-ol]phenoxy}propan-3-ol. Theo tra cứu, cho đến nay chưa có công bố nào về các dữ kiện phổ NMR của hợp chất này. Đây là lần đầu

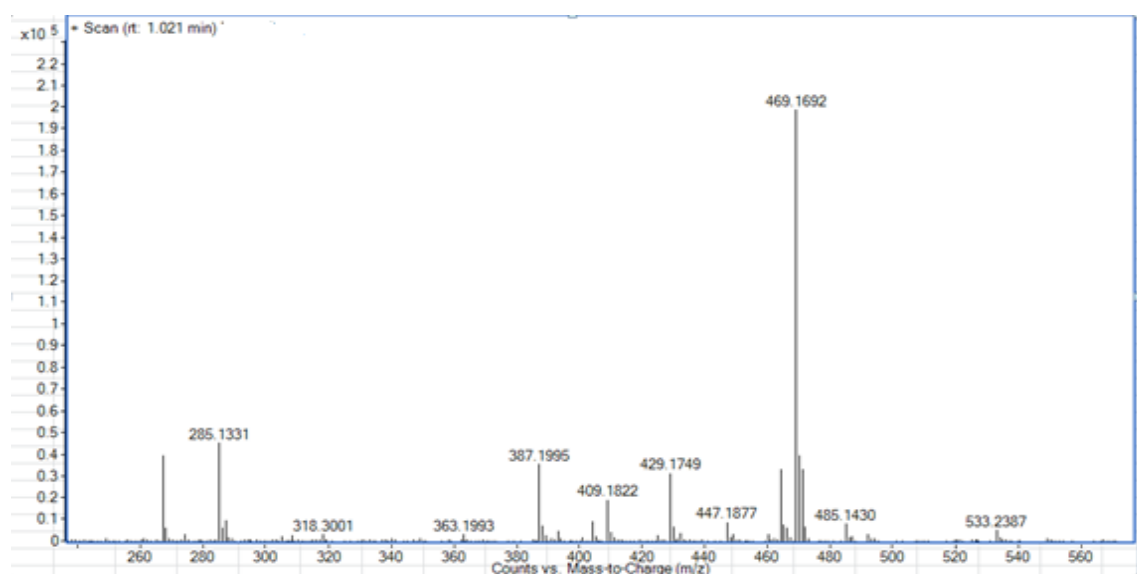
tiên các dữ kiện phổ của hợp chất này được xác định bằng đầy đủ phổ ^1H NMR và HSQC, HMBC cũng như lần đầu được công bố.

Bảng 12.1. Phổ NMR của hợp chất PT12.

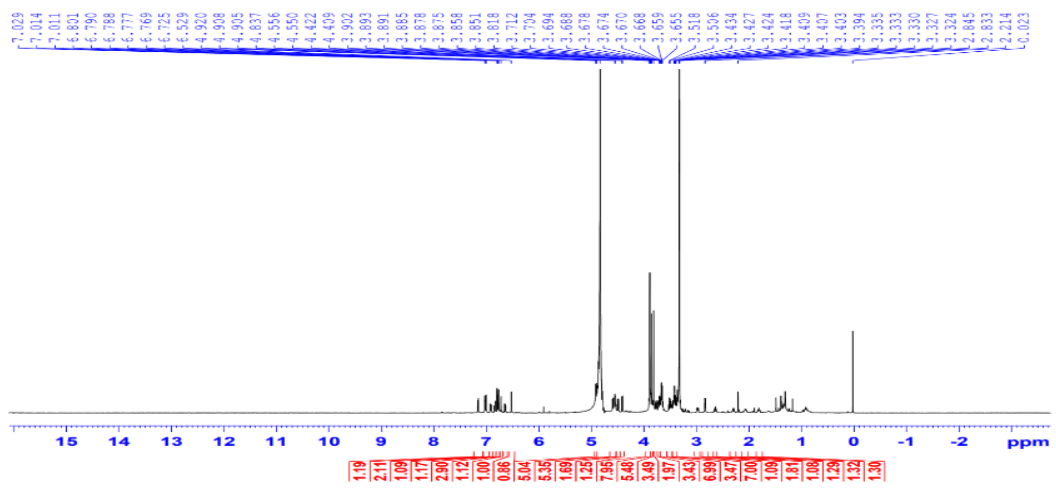
C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	69,4	4,14 (1H, m)/ 3,89 (1H, m)
2	83,0	4,18 (1H, m)
3	62,1	3,73 (1H, m)/ 3,87 (1H, m)
1'	136,5	-
2'	154,7	-
3'	104,9	6,74 (1H, s)
4'	134,9	-
5'	104,9	6,74 (1H, s)
6'	154,7	-
1''	131,4	6,55 (1H, d, 16,2)
2''	129,9	6,33 (1H, dt, 16,2, 5,4)
3''	63,6	4,22 (2H, d, 5,4)
1'''	104,7	4,31 (1H, d, 7,8)
2'''	75,1	3,20 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'''	77,9	3,36 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	71,7	3,29 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	78,0	3,28 (1H, m)
6'''	62,8	3,87 (1H, dd, 12,0, 2,0) 3,67 (1H, dd, 12,0, 5,0)
2xOCH ₃	56,7	3,86 (6H, s)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz

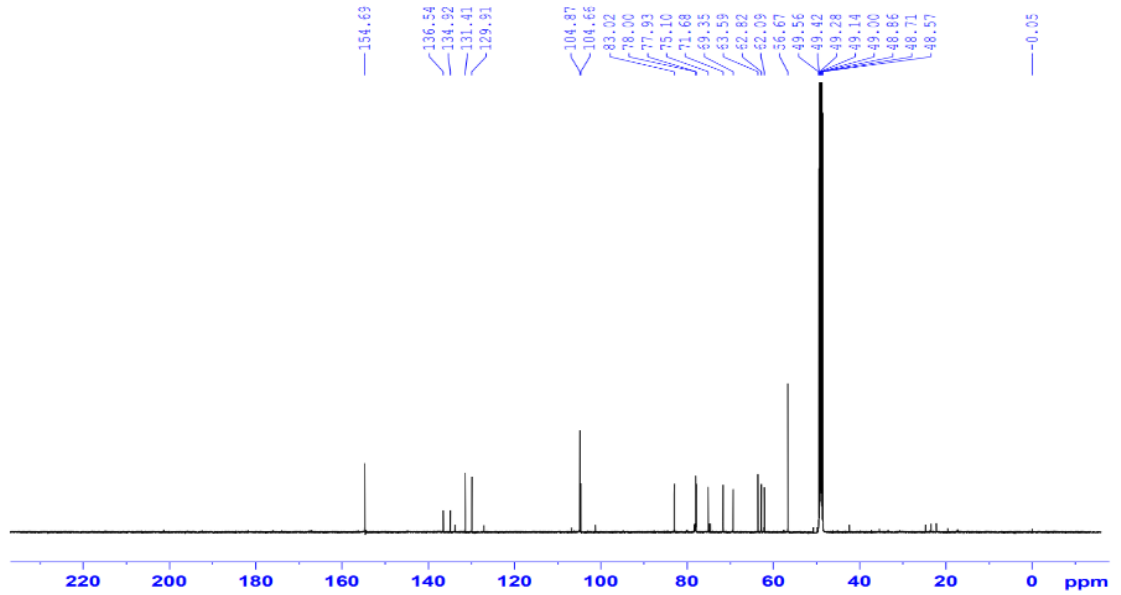
12.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT12



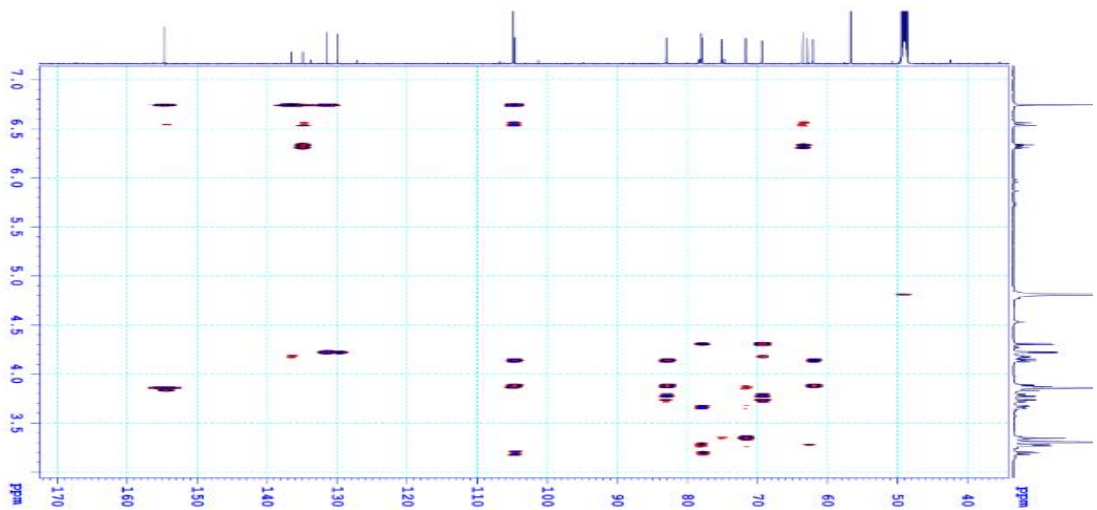
12.3. Phổ ¹H- NMR của hợp chất PT12



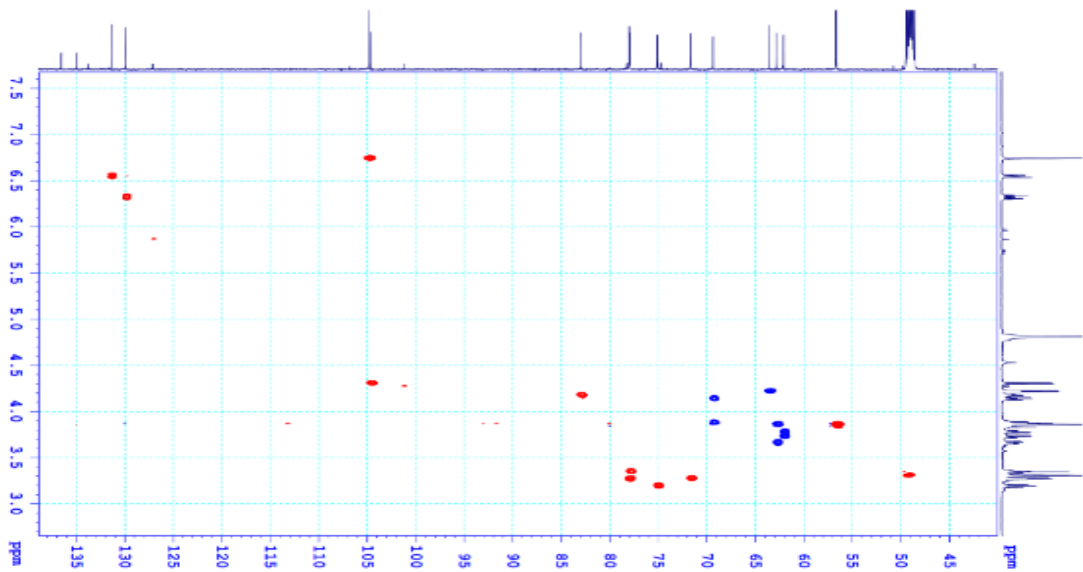
12.4. Phổ ¹³C- NMR của hợp chất PT12



12.5. Phổ HMBC của hợp chất PT12



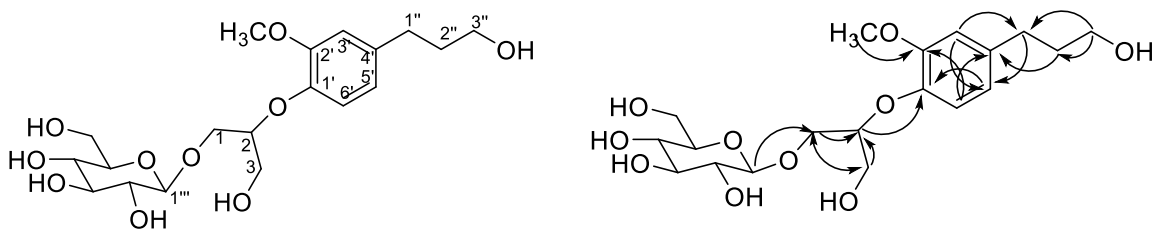
12.6. Phổ HSQC của hợp chất PT12



13. Phụ lục hợp chất PT13

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{19}H_{30}O_{10}$ ($M = 406$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic m/z 419,1914 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{19}H_{30}O_{10}H]^+ = 419,1912$, $\Delta = 0,48$ ppm; và pic m/z 441,1748 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{19}H_{30}O_{10}Na]^+ = 441,1731$, $\Delta = 3,85$ ppm; và pic m/z 436,2186 $[M+NH_4]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{19}H_{30}O_{10}NH_4]^+ = 436,2177$, $\Delta = 2,06$ ppm.
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 13.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 13.2 - mục 13.6

13.1. Hợp chất PT13



Hình 13.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT13**

**Biện giải xác định cấu trúc:*

Hợp chất **PT13** cũng nhận được dưới dạng chất bột, vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PT13** xuất hiện pic ion m/z 419,1914 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{19}H_{30}O_{10}H]^+ = 419,1912$, $\Delta = 0,48$ ppm; và pic m/z

441,1748[M+Na]⁺, tính toán lý thuyết [C₁₉H₃₀O₁₀Na]⁺ = 441,1731, Δ = 3,85ppm; và pic m/z 436,2186[M+NH₄]⁺, tính toán lý thuyết [C₁₉H₃₀O₁₀NH₄]⁺ = 436,2177, Δ = 2,06 ppm Như vậy, công thức phân tử của hợp chất này được xác định chính xác là C₁₉H₃₀O₁₀, M = 418 g/mol.

Phổ ¹³C NMR của hợp chất **PT13** xuất hiện 19 tín hiệu của 19 nguyên tử carbon, trong đó có 6 tín hiệu của một vòng thơm tại δ_C 138,3, 146,5, 151,9 (3 x C) và 3 CH tại δ_C 114,1, 119,3 và 121,8; sáu tín hiệu của một phân tử đường glucose tại δ_C 104,8, 75,1, 77,9, 71,6, 78,0 (5x CH) và δ_C 62,6 (CH₂); một nhánh propanol tại δ_C 32,7, 35,5 và 62,2 (2x CH₂); cùng với một nhóm methoxy tại 56,6. Phổ ¹H NMR của hợp chất **PT13** cùng với phổ HSQC đã xác định được các proton tại 2,65, 1,83, 3,59 lần lượt có tương tác với các carbon tại 32,7, 35,5 và 62,2. Mặt khác, proton CH₂ tại 2,65 có tương tác HMBC với ba carbon của vòng thơm tại δ_C 138,3 (C), δ_C 114,1 (CH), δ_C 121,8 (CH), đồng thời hai carbon CH này lại lần lượt có tương tác với các proton tại δ_H 6,86 (1H, d, J = 1,8 Hz) và δ_H 6,76 (1H, dd, J = 8,0, 1,8 Hz) chứng tỏ rằng nhánh propanol nối vào carbon C-1 (δ_C 138,3). Vòng thơm này được xác định là bị thế 3,4 bởi vì hệ tương tác proton kiểu ABX, trong đó nhóm methoxy nối với C-3 bởi có tương tác HMBC giữa proton methoxy với C-3 (δ_C 151,9). Bộ tín hiệu tại δ_C 62,1 (CH₂)/δ_H 3,80 (m); δ_C 81,3 (CH)/δ_H 4,36 (m); δ_C 68,9 (CH₂)/δ_H 4,08 (m) và 3,84 (m) cho thấy sự có mặt của cấu trúc glyceryl, trong đó hai carbon cộng hưởng dịch chuyển về phía trường thấp hơn (81,3 và 68,9) cho thấy chúng đều bị thế tại các vị trí này. Điều này cũng được chứng minh bằng phổ HMBC. Tương tác HMBC giữa proton tại 4,36 với C-4' của vòng thơm (146,5) khẳng định vòng thơm nối với C-2 (CH) của glyceryl. Mặt khác, proton anome của phân tử đường glucose tại 4,35 có tương tác HMBC với C-1 (68,9) của nhánh glyceryl. Giá trị hằng số tương tác J của proton anome (7,8 Hz) cho thấy sự hình thành liên kết β-glycoside. Từ những phân tích phổ nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất **PT13** được khẳng định là 1-O-(β-D-glucopyranosyl)-2-[2-methoxy-4-(ω-hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol.

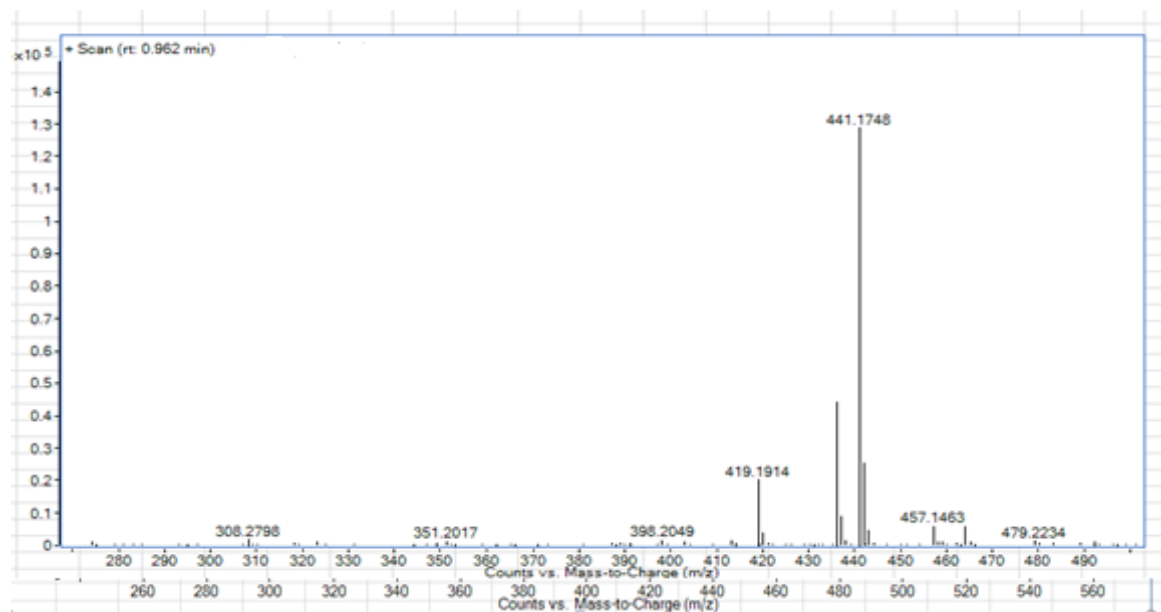
Bảng 13.1. Phổ NMR của hợp chất **PT13** và chất so sánh 1-O-(β-D-glucopyranosyl)-2-[2-methoxy-4-(ω-hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol.

C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (mult., J = Hz)
1	68,9	4,08 (1H, m)/ 3,84 (1H, m)
2	81,3	4,36 (1H, m)
3	62,1	3,80 (1H, m)/ 3,87 (1H, m)

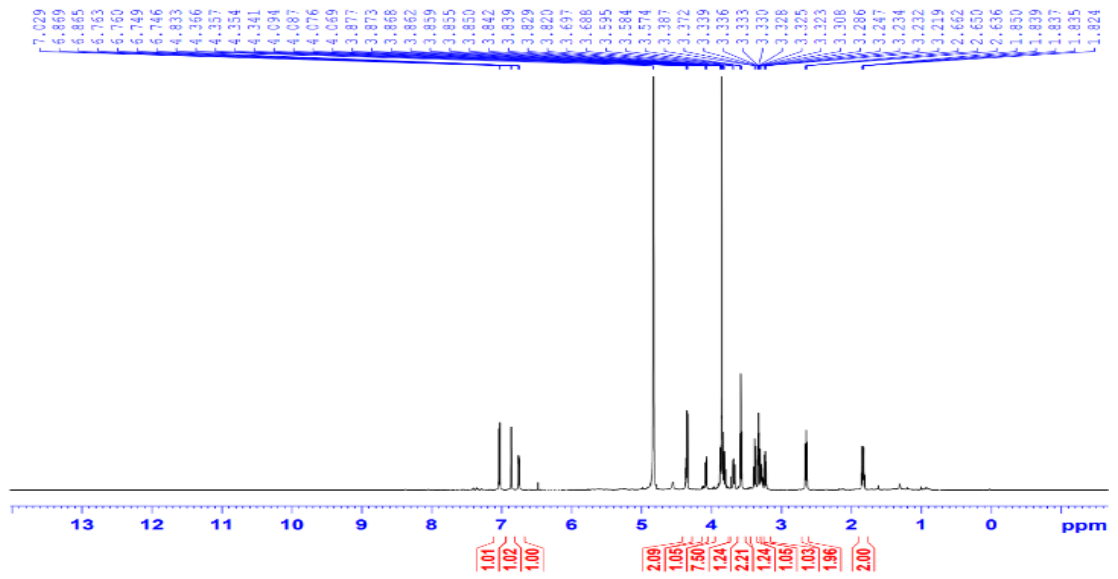
1'	146,5	-
2'	151,9	-
3'	114,1	6,86 (1H, d, 1,8)
4'	138,3	-
5'	121,8	6,76 (1H, dd, 8,0, 1,8)
6'	119,3	7,03 (1H, d, 8,0)
1''	32,7	2,65 (1H, t, 7,2)
2''	35,5	1,83 (1H, m)
3''	62,2	3,59 (2H, t, 6,8)
1'''	104,8	4,35 (1H, d, 7,8)
2'''	75,1	3,23 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'''	77,9	3,38 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	71,6	3,31 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	78,0	3,28 (1H, m)
6'''	62,6	3,85 (1H, dd, 12,0, 2,0) 3,68 (1H, dd, 12,0, 5,0 Hz)
OCH ₃	56,5	3,86 (6H, s)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz

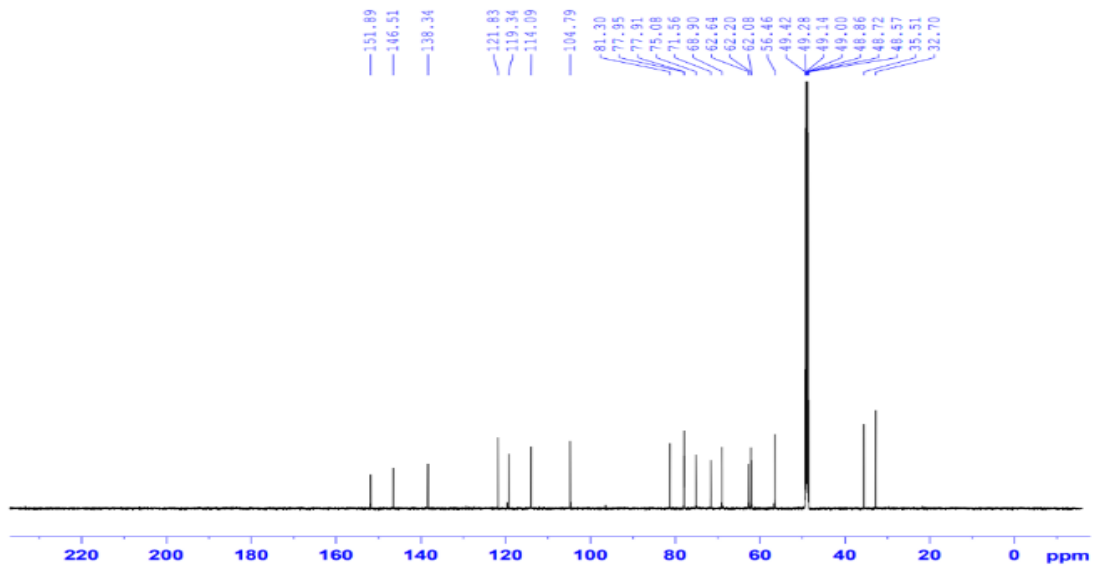
13.2. Phổ HR-ESI₋MS của hợp chất PT13



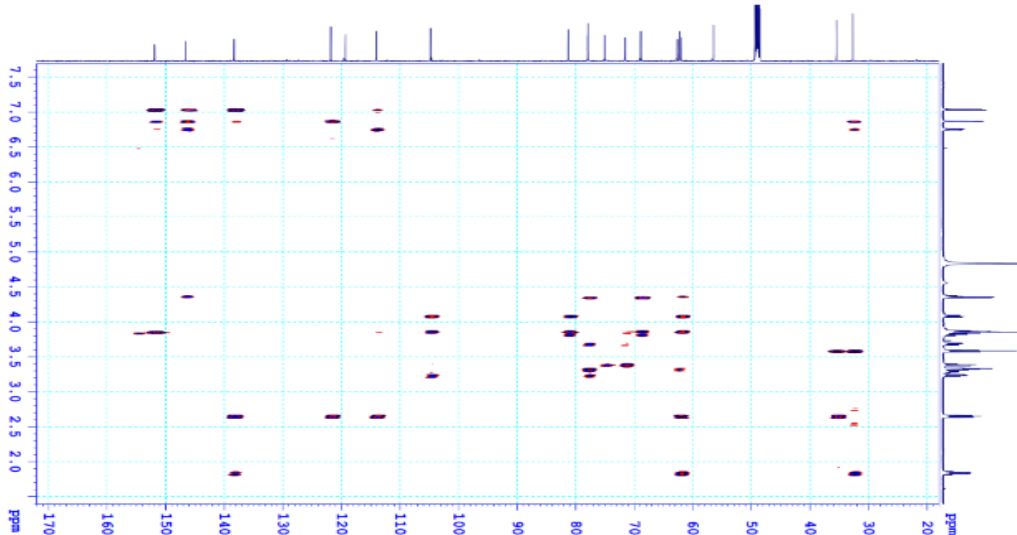
13.3. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT13



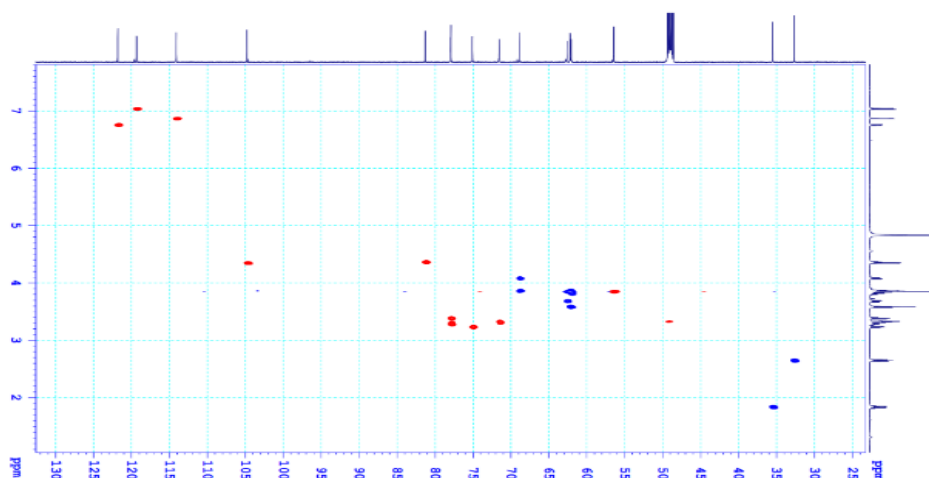
13.4. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT13



13.5. Phổ HMBC của hợp chất PT13



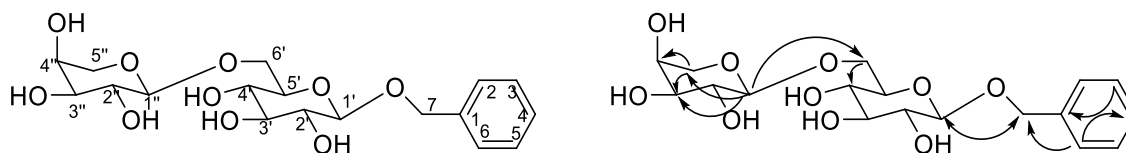
13.6. Phổ HSQC của hợp chất PT13



14. Phụ lục hợp chất PT14

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{18}H_{26}O_{10}$ ($M=402$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 14.1
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 14.2 - mục 14.5
-

13.1. Hợp chất PT14



Hình 14.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT14**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT14** thu được dưới dạng chất bột vô định hình, không màu. Phổ 1H NMR của hợp chất này thấy rõ sự có mặt của một vòng thơm thế mono bởi chỉ có 5 tín hiệu proton vùng vòng thơm rất điển hình. Sự có mặt của vòng thơm thế mono này càng được khẳng định chắc chắn nhờ thêm phổ ^{13}C NMR với sự xuất hiện 4 tín hiệu carbon vùng vòng thơm duy nhất tại δ_C 139,1 (C), 129,2 (CH), 129,3 (CH), 128,7 (CH) trong đó hai pic 129,2 và 129,3 có cường độ cao gấp đôi do tính đối xứng của vòng thơm thế mono. Trên phổ NMR, tín hiệu nhóm CH_2-O tại δ_C 71,9/ δ_H 4,93 (1H, d, $J = 12,0$ Hz) và 4,68 (1H, d, $J = 12,0$ Hz) được cho là gắn vào vòng thơm bởi hai proton của nhóm này hoàn toàn biệt lập, không hề có tương tác nào khác ngoài tương tác geminal giữa chúng với nhau tạo thành hai tín hiệu doublet có J khá cao (12,0 Hz). Mặt khác, phổ HMBC cũng xuất hiện các tín hiệu

tương tác của proton của nhóm CH₂-O này với các tín hiệu của vòng thơm rất rõ nét. Ngoài ra, hai tín hiệu proton anome tại δ_H 4,39 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) và δ_H 4,76 (1H, d, 6,6 Hz) lần lượt có tương tác HSQC với hai carbon tại δ_C 103,4 và δ_C 105,2 khẳng định cho sự có mặt của hai phân tử đường. Xem xét số lượng nguyên tử carbon của hợp chất thông qua phổ ¹³C NMR cho thấy ngoài nhóm benzyl nêu trên còn có thêm 11 carbon khác tương ứng với 11 tín hiệu trên phổ này. Điều này gợi ý cho sự có mặt của một đường hexose và một đường 5 carbon. Sau khi phân tích các phổ ¹H NMR và ¹³C NMR, kết hợp với phổ HSQC thấy bộ sáu tín hiệu carbon δ_C 103,4, 75,1, 77,9, 71,7, 76,9 (5CH) và δ_C 69,5 (CH₂) thuộc về một đường glucose, trong đó nhóm C-6 CH₂-O được khẳng định là đã bị thế tại đây do tín hiệu cộng hưởng của chúng dịch chuyển mạnh về phía trường thấp hơn (δ_C 68,5) so với nhóm CH₂OH tự do (trong khoảng 61,5-62,6). Năm tín hiệu carbon còn lại bao gồm carbon anome (δ_C 105,2), carbon CH₂ (δ_C 66,7) và ba carbon CH khác (δ_C 73,4, 74,2, 69,4) rõ ràng thuộc về một đường 5C vòng sáu. Đặc biệt, tín hiệu carbon tại δ_C 69,4 có tương tác HSQC với proton tại δ_H 3,82, trong khi tín hiệu proton này xuất hiện là một tín hiệu đơn, pic tù (broad singlet) cho thấy proton này phải chiếm vị trí equatorial, tương ứng với đường arabinopyranose. Tín hiệu tương tác HMBC giữa proton anome của đường arabinopyranose với C-6 của đường glucose (δ_C 69,5) tín hiệu tương tác HMBC của proton anome của đường glucose (δ_H 4,39) với C-7 của vòng benzyl đã khẳng định rõ ràng các liên kết glycoside của phân tử này, đó là đường arabinopyranose nối với C-6 của glucose, đường glucose này nối vào nhóm CH₂ của nhóm benzyl qua liên kết ete. Từ những phân tích phổ nêu trên, hợp chất **PT14** được khẳng định là benzyl O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside. Theo tra cứu của chúng tôi, các dữ kiện phổ ¹H; ¹³C-NMR của hợp chất này đã được công bố dưới dạng bộ số liệu mà chưa được gán các giá trị cụ thể vào từng vị trí carbon hay proton [99]. Đây là lần đầu tiên dữ kiện phổ NMR của hợp chất benzyl O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside được công bố đầy đủ với không những phổ NMR một chiều mà còn được phân tích kỹ lưỡng bằng phổ hai chiều HSQC và HMBC

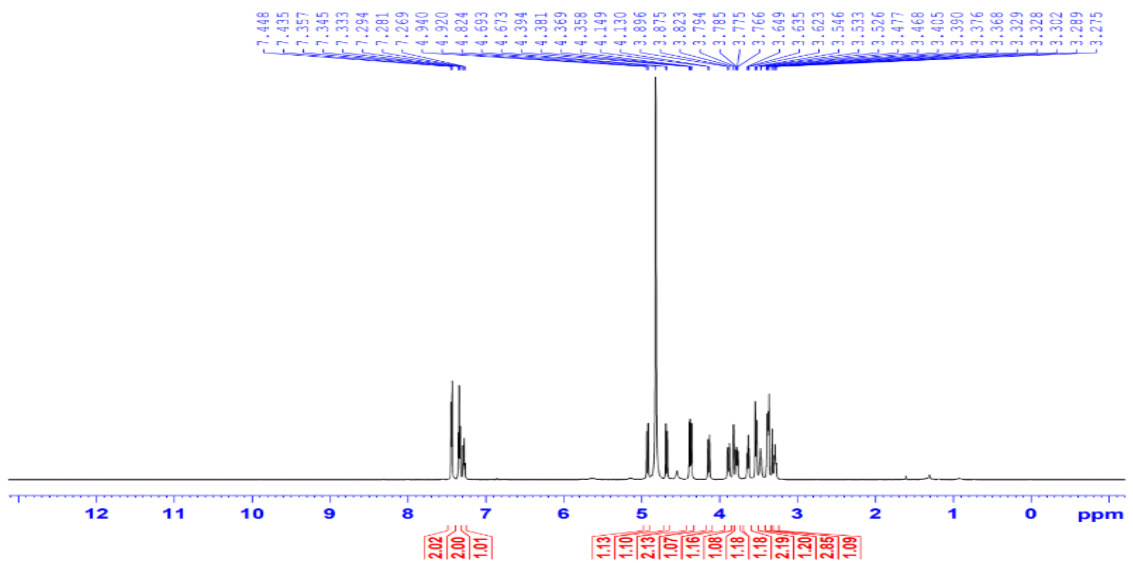
Bảng 14.1. Phổ NMR của hợp chất **PT14** và chất so sánh benzyl O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	137,5	139,1	-
2	129,5	129,2	7,44 (1H, d, 8,0)
3	129,4	129,3	7,34 (1H, dd, 8,0, 8,0)
4	129,2	128,7	7,28 (1H, dd, 8,0, 8,0)
5	129,4	129,3	7,34 (1H, dd, 8,0, 8,0)
6	129,5	129,2	7,44 (1H, d, 8,0)
7	72,3	71,9	4,93 (1H, d, 12,0) 4,48 (1H, d, 12,0)

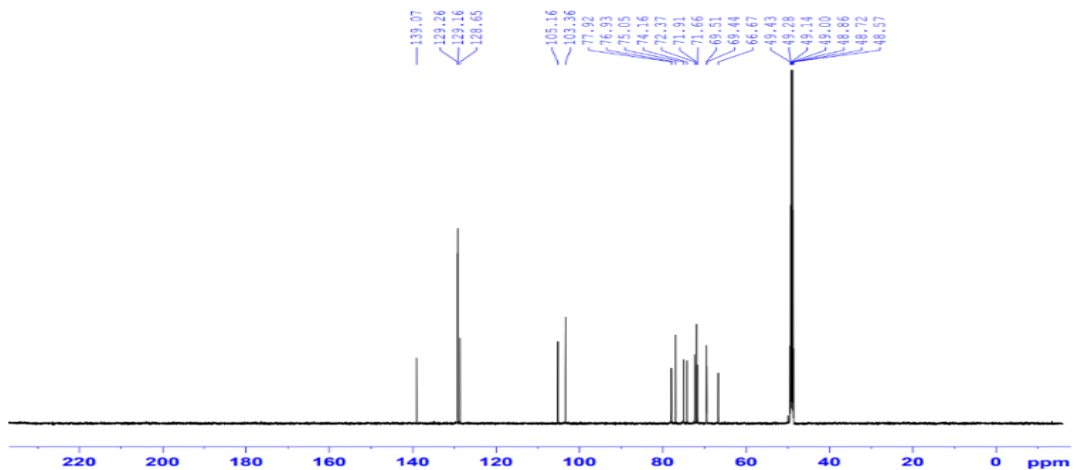
1'	102,1	103,4	4,39 (1H, d, 7,8)
2'	73,8	75,1	3,28 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'	75,8	77,8	3,39 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'	70,2	71,7	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'	76,5	76,9	3,47 (1H, m)
6'	69,1	69,5	3,78 (1H, dd, 11,4, 5,4) 4,14 (1H, dd, 11,4, 2,0)
1''	104,4	105,2	4,76 (1H, d, 6,6)
2''	71,5	72,4	3,64 (1H, dd, 8,4, 6,6)
3''	73,0	74,2	3,53 (1H)
4''	69,0	69,4	3,82 (1H, br s)
5''	66,9	66,7	3,88 (1H, d, 12,6) 3,53 (1H, d, 12,6)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz, δ_C của *benzyl O-α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside*[99]

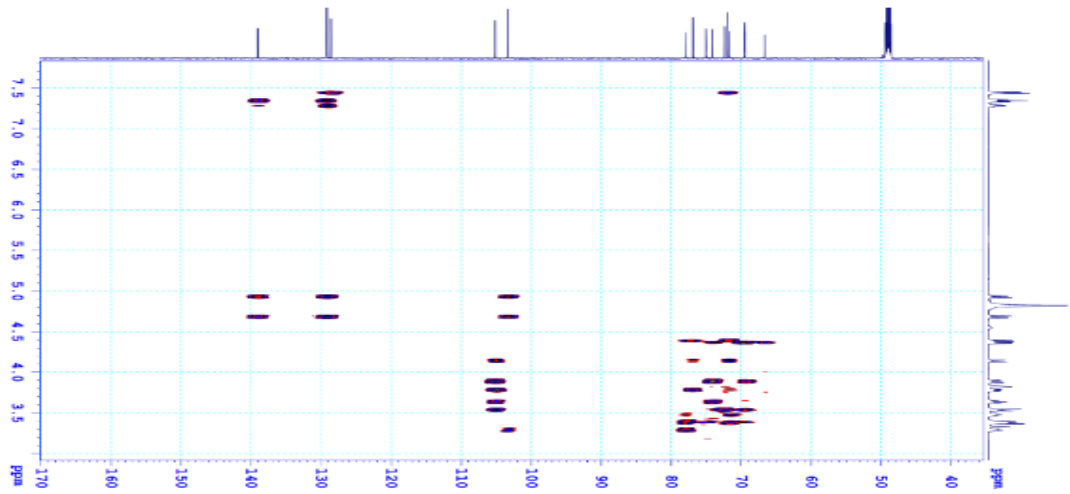
14.2. Phổ ¹H- NMR của hợp chất PT14



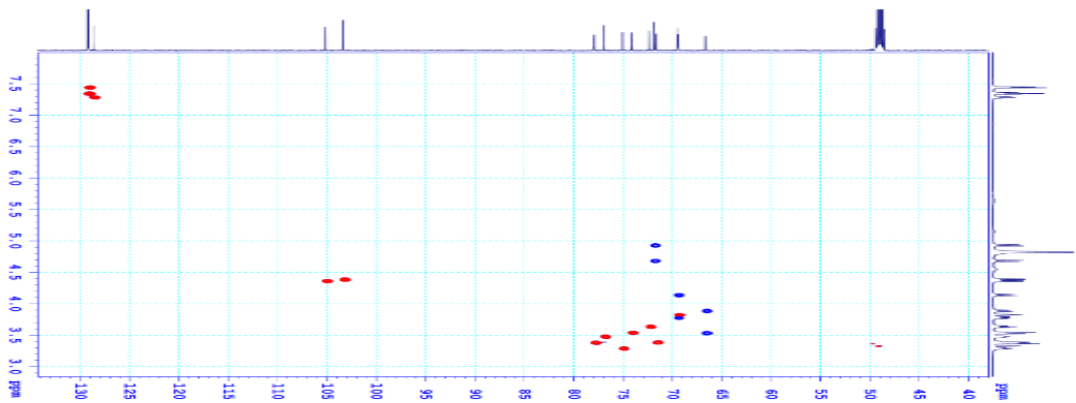
14.3. Phổ ¹³C- NMR của hợp chất PT14



14.4. Phổ HMBC của hợp chất PT14



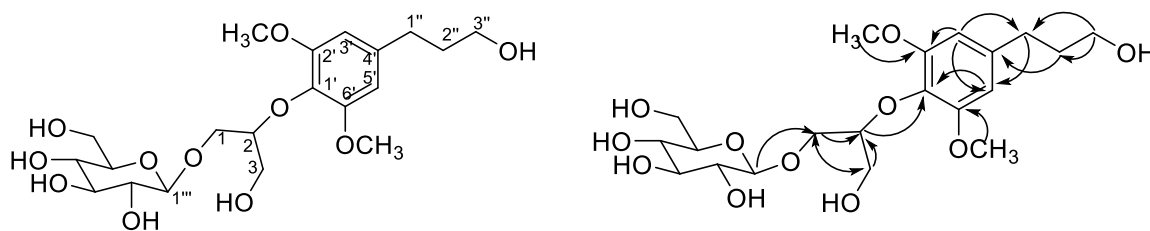
14.5. Phổ HSQC của hợp chất PT14



15. Phụ lục phổ hợp chất PT15

15.1. Hợp chất PT15

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{20}H_{32}O_{11}$ ($M = 446$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 449,2025 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{32}O_{11}H]^+ = 449,2017$, $\Delta = 1,78$ ppm; và pic m/z 471,1845 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{32}O_{11}Na]^+ = 471,1837$, $\Delta = 1,70$ ppm
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 15.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 15.2 - mục 15.5



Hình 15.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT15**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT15** chất bột, vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PT15** xuất hiện pic ion m/z 449,2025 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{32}O_{11}H]^+ = 449,2017$, $\Delta = 1,78$ ppm; và pic m/z 471,1845 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{32}O_{11}Na]^+ = 471,1837$, $\Delta = 1,70$ ppm; và pic m/z 466,2286 $[M+NH_4]^+$, tính toán lý thuyết $[C_{20}H_{32}O_{11}NH_4]^+ = 466,2283$, $\Delta = 0,64$ ppm. Như vậy, công thức phân tử của hợp chất này được xác định là $C_{20}H_{32}O_{11}$, $M = 448$ g/mol.

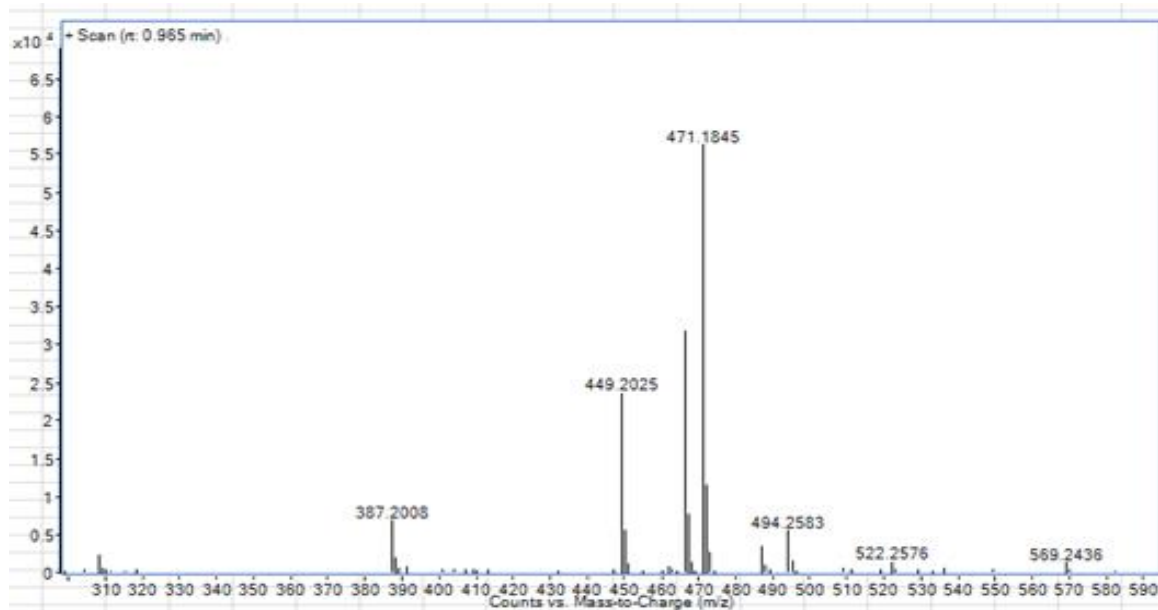
Các phổ NMR của hợp chất **PT15** gần tương tự như các phổ tương ứng của hợp chất **PT12** cho thấy đây cũng là một hợp chất phenolic kiểu phenyl propanol glycoside. Điểm khác biệt có thể nhận thấy rõ nét là các tín hiệu của một nối đôi *trans* ngoài vòng ở hợp chất **PT12** đã không còn trên các phổ NMR của hợp chất **PT15**, thay vào đó là có thêm hai tín hiệu methylen no tại 33,3/2,66 (2H, dd, $J = 7,2, 7,2$ Hz) và 35,4/1,85 (2H, m), đồng thời tín hiệu của nhóm oxymethylen tại C-3 cũng có thay đổi cả về giá trị độ dịch chuyển hóa học và cả dạng pic chuyển từ doublet thành triplet, cộng hưởng tại 62,2/3,59 (2H, t, $J = 6,6$ Hz). Điều này cho thấy sự có mặt của nhánh $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$. Các tín hiệu còn lại của một vòng thơm thế 1,3,4,5, hai nhóm methoxy đối xứng gắn vào C-3, C-5 của vòng thơm, cấu trúc dẫn xuất glyceryl nối với một phân tử đường glucose tại C-1 và nối với vòng thơm tại C-2 hoàn toàn tương tự như cấu trúc của hợp chất **PT12**. Cấu trúc này đã được khẳng định chính xác bằng các phổ HSQC kết hợp với phổ HMBC. Các tương tác HMBC đã được mô tả rất cụ thể trên hình vẽ. Như vậy, công thức phân tử của hợp chất này sẽ có khối lượng phân tử ít hơn của hợp chất **PT12**, tức là tương ứng với công thức $C_{20}H_{32}O_{11}$, $M = 448$. Từ những phân tích nêu trên, hợp chất **PT15** được khẳng định là 1-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]propan-3-ol.

Bảng 15.1. Phổ NMR của hợp chất **PT15** và chất so sánh 1-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol

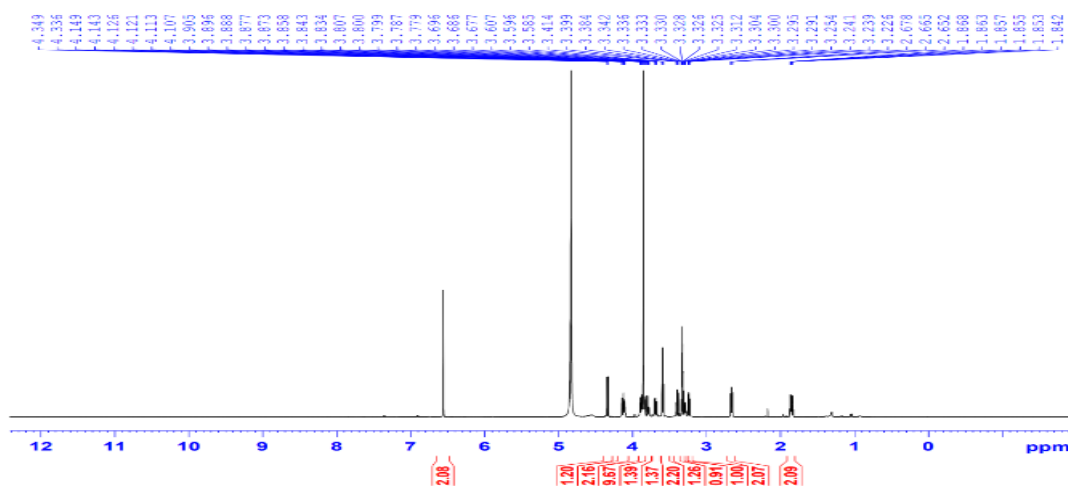
C		$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J = Hz)
1	67,5	69,1	4,13 (1H, m) 3,89 (1H, m)
2	81,4	83,4	4,11 (1H, m)
3	60,3	62,0	3,84 (1H, m) 3,79 (1H, m)
1'	133,5	135,9	-
2'	152,6	154,4	-
3'	105,5	106,7	6,56 (1H, s)
4'	137,9	140,1	-
5'	105,5	106,7	6,56 (1H, s)
6'	152,6	154,4	-
1''	32,1	33,3	2,66 (1H, t, 7,2)
2''	34,3	35,4	1,85 (1H, m)
3''	60,2	62,2	3,59 (2H, t, 6,6)
1'''	103,1	104,8	4,34 (1H, d, 7,8)
2'''	73,5	75,1	3,24 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'''	76,6	77,9	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	70,1	71,6	3,32 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	76,9	77,9	3,30 (1H, m)
6'''	61,1	62,7	3,87 (1H, dd, 12,0, 2,0) 3,68 (1H, dd, 12,0, 5,0)
2xOCH ₃	55,9	56,6	3,86 (6H, s)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz, # δ_C của 1-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(ω -hydroxypropyl)-phenoxy]-propan-3-ol [100]

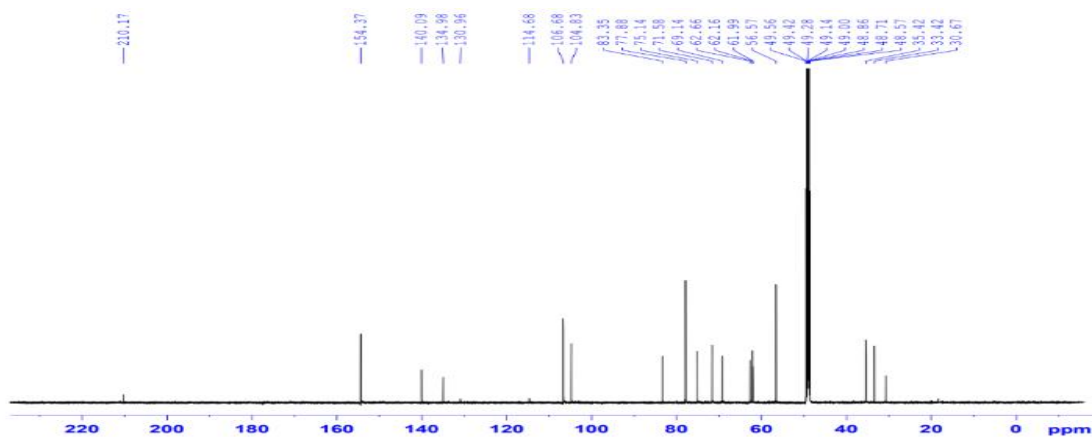
15.2. Phổ HR - ESI - MS của hợp chất PT15



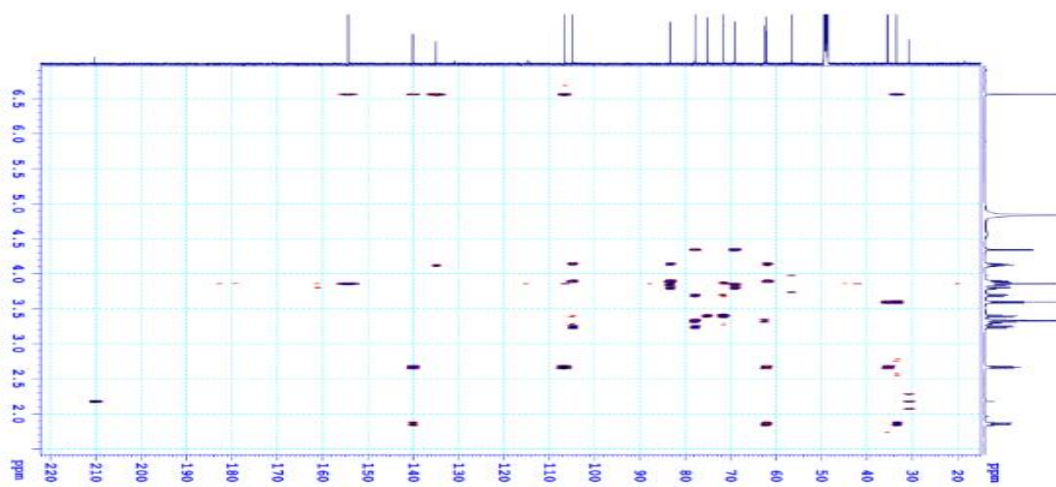
15.3. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT15



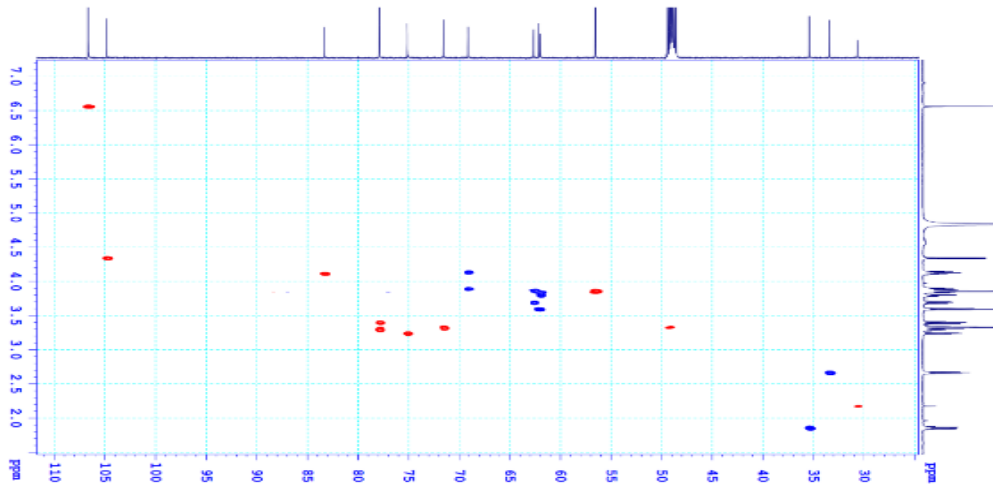
15.4. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT15



15.5. Phổ HMBC của hợp chất PT15



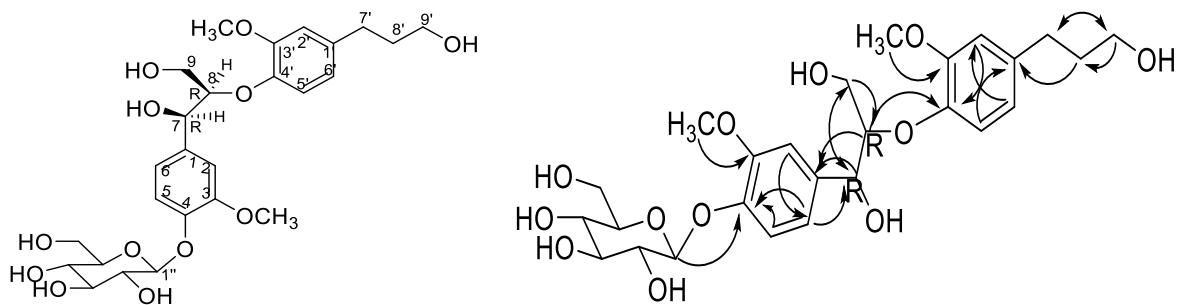
15.6. Phổ HSQC của hợp chất PT15



16. Phụ lục hợp chất PT16

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{26}H_{36}O_{12}$ ($M = 540$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 16.1
- Các phổ, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 16.2 - mục 16.5

16.1. Hợp chất PT16



Hình 16.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT16**

Biện giải xác định cấu trúc:

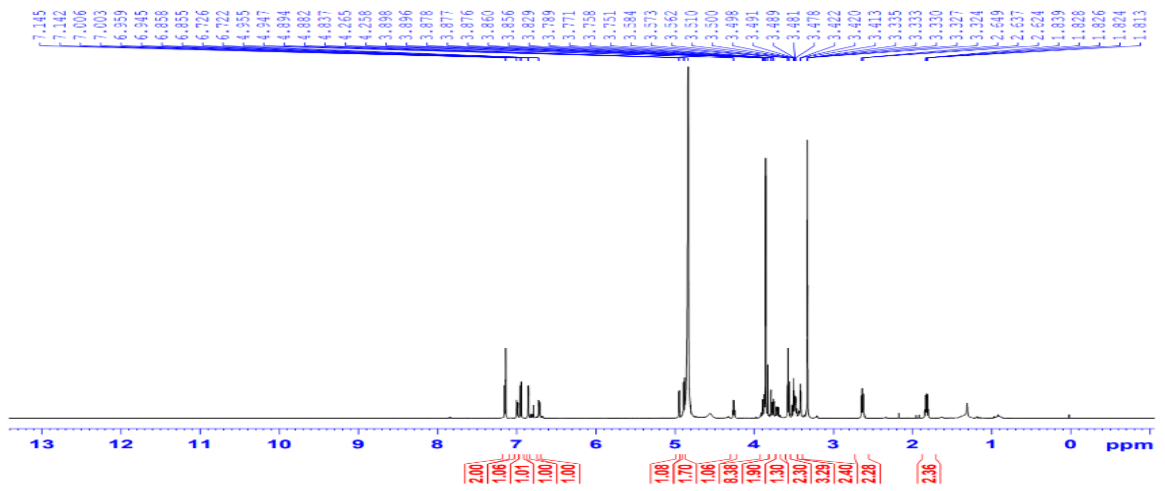
Hợp chất **PT16** là chất bột, vô định hình không màu. **PT16** có các phổ NMR gần như trùng khớp với các phổ NMR tương ứng của hợp chất **PT17**, mặc dù trên thiết bị HPLC thì hai hợp chất này có thời gian lưu không trùng nhau. Điều này cho thấy hai hợp chất này sẽ là đồng phân của nhau về cấu hình tại C-7 và C-8. Giá trị hằng số tương tác $J_{H-7/H-8} = 4,8$ Hz, tương tự như của hợp chất **PT17** phù hợp với cấu hình tương đối threo. Mặt khác, phổ CD của hợp chất **PT16** có hiệu ứng ngược với của hợp chất **PT17** (xem hình vẽ) (-238 nm) hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của hợp chất (7*R*,8*R*)-threo-4,7,9,9'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside. [101]

Bảng 16.1. Phổ NMR của hợp chất **PT16** và chất so sánh (7*R*,8*R*)-threo-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O-β-D-glucopyranoside

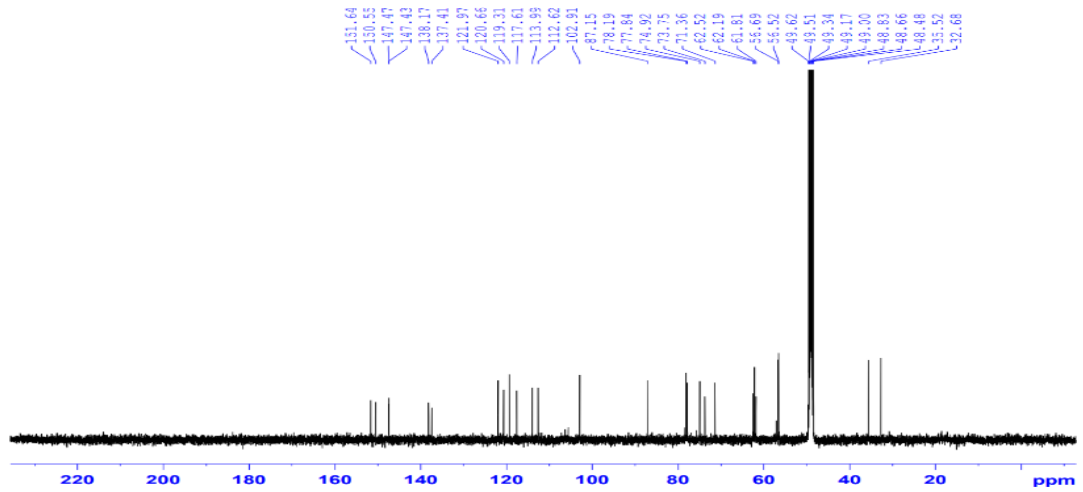
C	δ _C	δ _C ^{a,b}	^{a,c} δ _H (mult., J = Hz)
1	135,77	137,4	-
2	111,20	112,6	7,14 (1H, d, 1,2)
3	148,28	150,6	-
4	145,46	147,4	-
5	114,53	117,6	7,15 (1H, d, 8,0)
6	118,65	120,7	7,00 (1H, dd, 8,0, 1,2)
7	70,72	73,8	4,95 (1H, d, 4,8)
8	84,51	87,2	4,27 (1H, m)
9	59,96	61,8	3,49 (1H, dd, 12,0, 5,0) 3,71 (1H, dd, 12,0, 4,2)
1'	135,25	138,2	-
2'	112,73	114,0	6,85 (1H, d, 1,2 Hz)
3'	149,51	151,6	-
4'	146,15	147,4	-
5'	115,96	119,3	6,95 (1H, d, 8,0)
6'	120,12	122,0	6,72 (1H, dd, 8,0, 1,2)
7'	31,27	32,7	2,64 (2H, t, 7,2)
8'	34,48	35,5	1,83 (2H, m)
9'	60,14	62,2	3,59 (2H, t, 6,8)
1''	100,13	102,9	4,90 (1H, d, 7,8)
2''	73,23	74,9	3,50 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	76,96	77,8	3,48 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	69,93	71,4	3,41 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	76,86	78,2	3,42 (1H, m)
6''	60,62	62,5	3,87 (1H, dd, 12,0, 1,2) 3,70 (1H, dd, 12,0, 4,2)
3-OCH ₃	55,43	56,7	3,86 (3H, s)
3'-OCH ₃	55,56	56,5	3,87 (3H, s)

^{a)} CD₃OD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz, [#]δ_C của (7*R*,8*R*)-threo - 7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O-β-D-glucopyranoside đo trong(DMSO-d₆) [101]

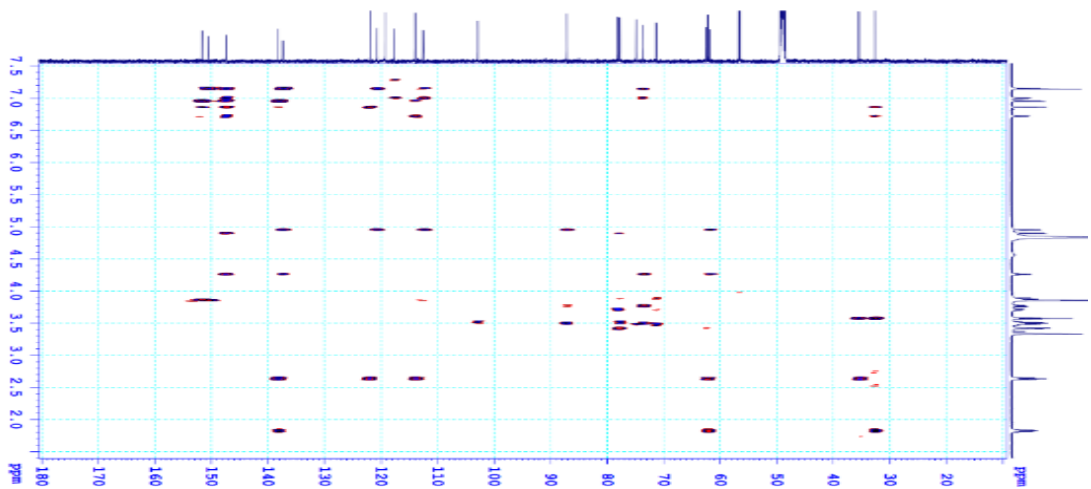
16.2. Phổ ^1H - NMR của hợp chất PT16



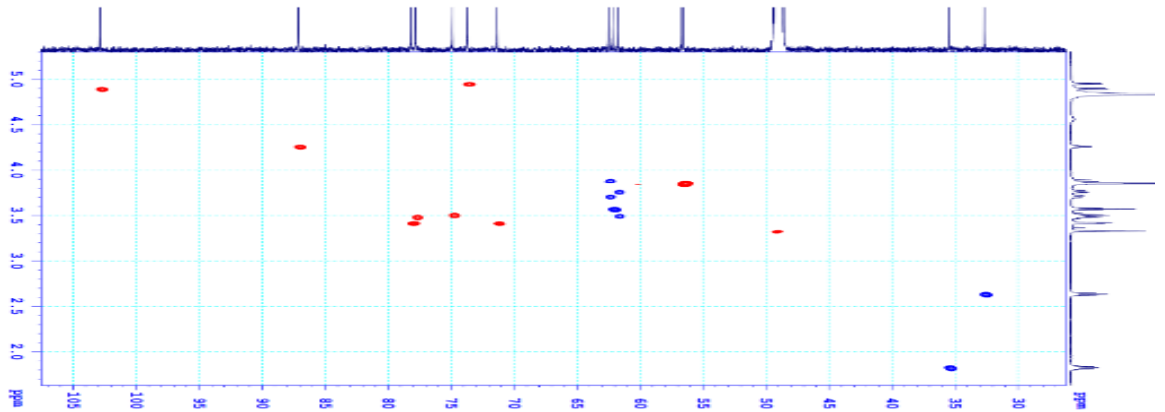
16.3. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất PT16



16.4. Phổ HMBC của hợp chất PT16



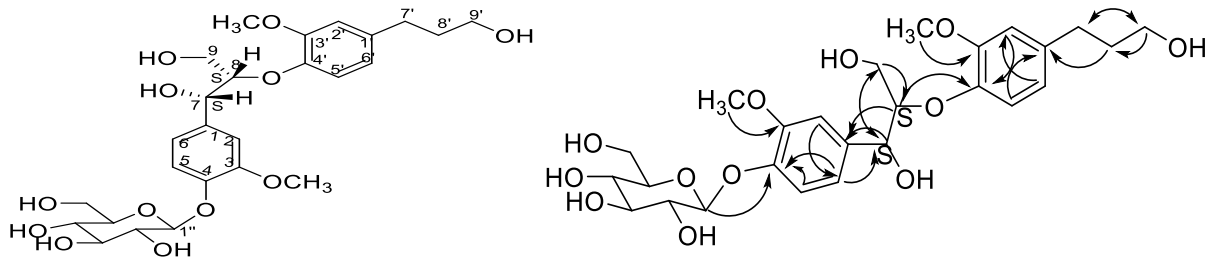
16.5. Phổ HSQC của hợp chất PT16



17. Phụ lục hợp chất PT17

17.1. Hợp chất PT17

- Bột vô định hình, không màu
- Công thức phân tử $C_{26}H_{36}O_{12}$ ($M=540$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 17.1
- Các phổ, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 17.2 - mục 17.5



Hình 17.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT17**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT17** nhận được dưới dạng chất bột vô định hình không màu. Phổ 1H NMR của hợp chất này xuất hiện 6 tín hiệu proton vòng thơm tại δ_H 7,14 (1H, d, $J = 1,2$ Hz), δ_H 7,15 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 7,00 (1H, dd, $J = 8,0, 1,2$ Hz), δ_H 6,85 (1H, d, $J = 1,2$ Hz), δ_H 6,95 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 6,72 (1H, dd, $J = 8,0, 1,2$ Hz). Các proton này rõ ràng thuộc về hai vòng thơm thế 3,4 bởi từng cặp một chúng tương tác với nhau theo kiểu hệ tương tác ABX. Một nhánh propanol $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$ được nhận biết bởi cụm ba tín hiệu tại δ_H 2,64 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), δ_H 1,83 (2H, m), δ_H 3,59 (2H, t, $J = 6,8$ Hz); hai nhóm methoxy tại δ_H 3,87 (3H, s) và δ_H 3,86 (3H, s). Ngoài ra, sự có mặt của một phân tử đường glucose được nhận biết bởi sự có mặt của một proton anome tại δ_H 4,90 (1H, d, $J = 7,2$ Hz), đồng thời còn có thêm các tín hiệu của các proton oxymethine tại δ_H 4,26 và 4,95, proton

oxymethylen tại δ_H 3,49/3,71. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **PT17** xuất hiện tín hiệu 26C. Rõ ràng là, ngoài 6 tín hiệu của đường glucose, hai tín hiệu của hai nhóm methoxy thì còn lại 18C (trong đó có hai vòng thơm) vừa đúng bằng hai đơn vị phenylpropane của một hợp chất lignan (C6-C3 x 2). Với hai vòng thơm thế 3,4 nêu trên, dễ dàng nhận thấy hai nhóm methoxy đã nối vào vị trí C-3 và C-3' nhờ vào phổ HMBC khi xuất hiện tương tác HMBC của các proton methoxy với các carbon C-3 và C-3' này. Vị trí nối của phân tử đường glucose được xác định là C-4 bởi tương tác HMBC của proton anome với C-4 (147,4). Đồng thời, cũng bằng phổ HMBC, nhánh CH(OH)-CH(CH₂OH)-O cũng dễ dàng xác định nối vào C-1 của vòng thơm đầu tiên do không chỉ có tương tác của H8 (4,26) với C-1 (137,4) mà còn có tương tác HMBC của proton H-7 (4,95) với cả ba carbon của vòng thơm là C-1 (137,4), C-2 (112,6) và C-6 (120,7). Mặt khác, tương tác HMBC của proton H-8 (4,26) với C-4' của vòng thơm thứ hai cũng khẳng định được vị trí nối giữa hai đơn vị phenylpropane nêu trên. Nhánh phenylpropanol CH₂-CH₂-CH₂OH đã gắn vào C-1' của vòng thơm thứ hai bởi có tương tác rất rõ nét giữa H-8' với C-1 và giữa H-7' với C-1', C-2' và C-6'. Cấu trúc dự đoán của hợp chất **PT17** được nêu ra trên hình vẽ. Liên kết β -glycoside cũng được xác định do hằng số tương tác J lớn (7,2 Hz) của proton anome. Giá trị hằng số tương tác J H-7/H-8 = 5,4 Hz cho thấy dạng cấu hình threo tại C-7 và C-8 [102]. Đặc biệt, phổ CD của hợp chất **PT17** cho hiệu ứng Cotton (+) tại 235 nm hoàn toàn xác định cấu hình 7*S*,8*S* của hợp chất này. Từ những phân tích nêu trên, hợp chất **PT17** được khẳng định là (7*S*,8*S*)-threo-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside.

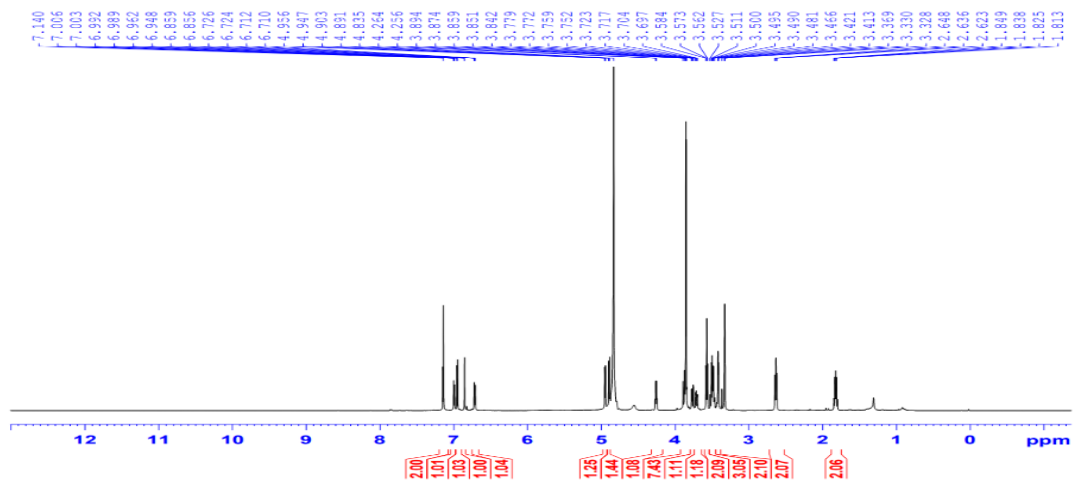
Bảng 17.1. Phổ NMR của hợp chất **PT17** và chất so sánh (7*S*,8*S*)-threo-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxyl-8-O-4'-neolignan-4-O- β -D-glucopyranoside

C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	135,76	137,4	-
2	111,19	112,6	7,14 (1H, d, 1,2)
3	148,28	150,6	-
4	145,44	147,4	-
5	114,48	117,6	7,15 (1H, d, 8,0)
6	118,68	120,7	7,00 (1H, dd, 8,0, 1,2)
7	70,66	73,7	4,95 (1H, d, 5,4)
8	84,47	87,1	4,26 (1H, m)
9	59,95	61,8	3,49 (1H, dd, 12,0, 5,0) 3,71 (1H, dd, 12,0, 4,2)
1'	135,25	138,2	-
2'	112,73	114,0	6,85 (1H, d, 1,2)

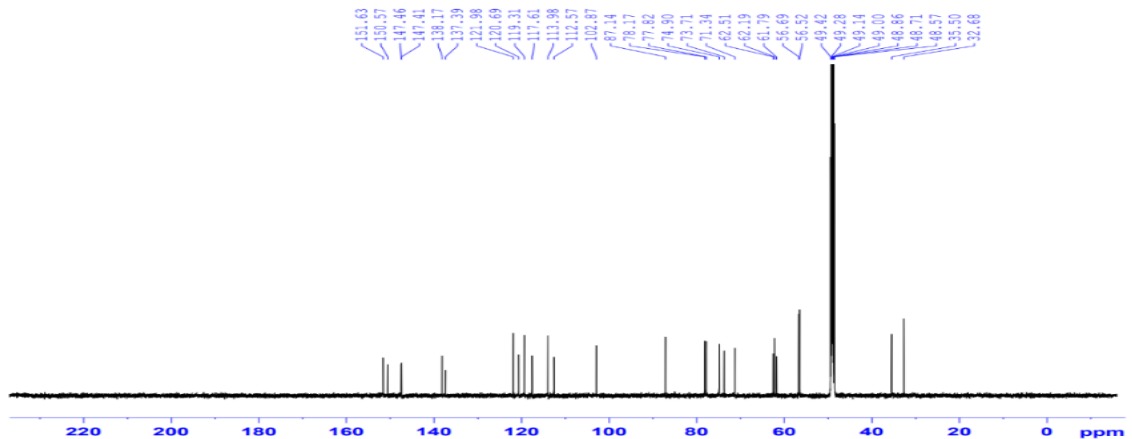
3'	149,51	151,6	-
4'	146,14	147,4	-
5'	115,90	119,3	6,95 (1H, d, 8,0)
6'	120,13	122,0	6,72 (1H, dd, 8,0, 1,2)
7'	31,28	32,7	2,64 (2H, t, 7,2)
8'	34,49	35,5	1,83 (2H, m)
9'	60,16	62,2	3,59 (2H, t, 6,8)
1''	100,04	102,9	4,90 (1H, d, 7,8)
2''	73,24	74,9	3,50 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	76,97	77,8	3,48 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	69,63	71,3	3,41 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	76,87	78,2	3,42 (1H, m)
6''	60,60	62,5	3,87 (1H, dd, 12,0, 1,2) 3,70 (1H, dd, 12,0, 4,2)
3-OCH ₃	55,44	56,7	3,86 (3H, s)
3'-OCH ₃	55,56	56,5	3,87 (3H, s)

a) CD₃OD, ^b)125 MHz, ^c)500 MHz, δ_c của (7*S*,8*S*)-threo-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan-4-O-β-D-glucopyranoside đo trong DMSO-d₆[102]

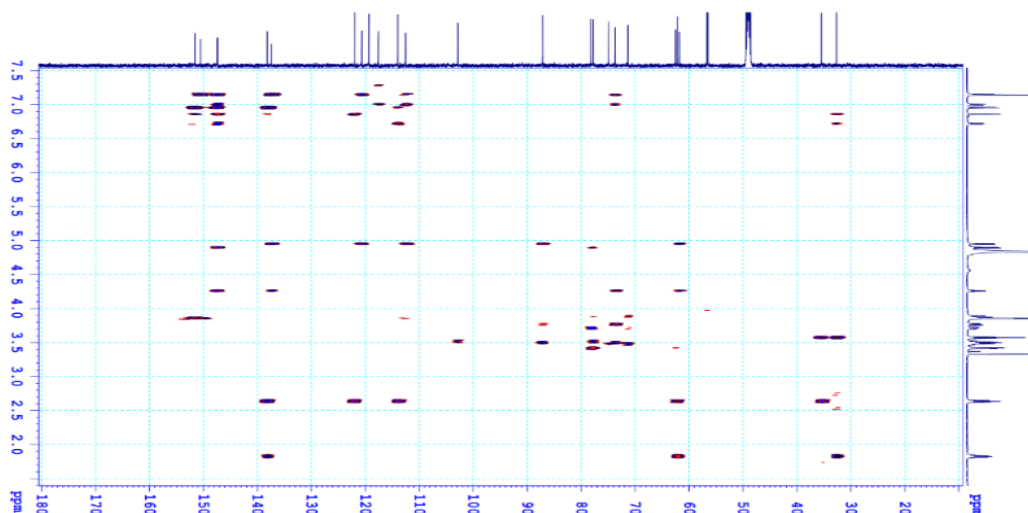
17.2. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PT17



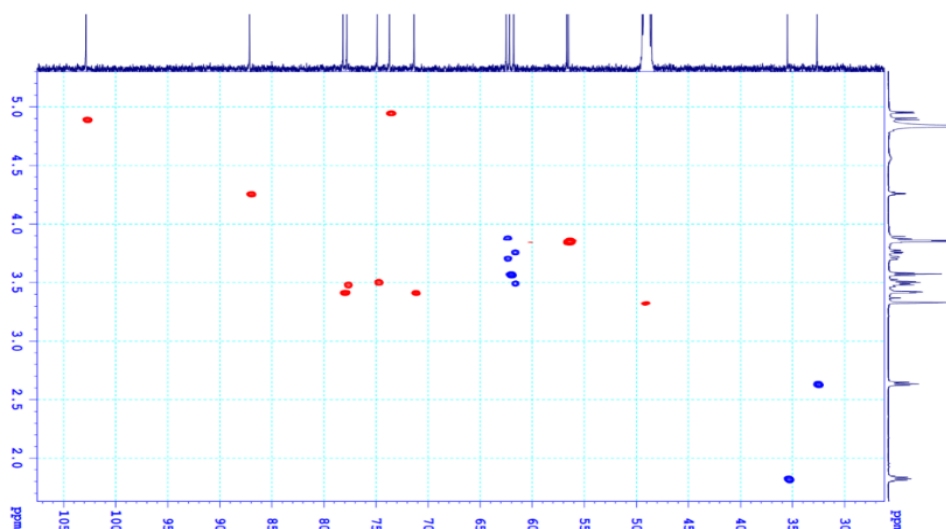
17.3. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PT17



17.4. Phổ HMBC của hợp chất PT17



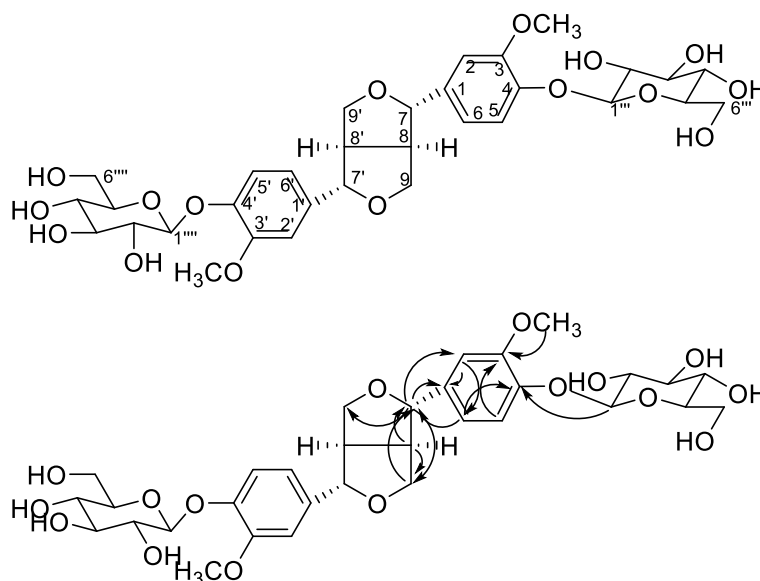
17.5. Phổ HSQC của hợp chất PT17



18. Phụ lục hợp chất PT18

- Chất rắn, màu trắng
- Công thức phân tử $C_{32}H_{42}O_{16}$ ($M=682$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 18.1
- Các phổ, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 18.2 - mục 18.5

18.1. Hợp chất PT18



Hình 18.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT18**

**Biện giải xác định cấu trúc:*

Hợp chất **PT18** chọn chất **PT18** là chất rắn, màu trắng. Phổ NMR của hợp chất **PT18** xuất hiện các tín hiệu của vòng thơm thế ABX tại δ_C 111,7/ δ_H 7,04 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), δ_C 119,8/ δ_H 6,93 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz), δ_C 118,1/ δ_H 7,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), tín hiệu carbon CH nối với oxi tại δ_C 87,0/ δ_H 4,77 (d, $J = 4,2$ Hz), nhóm CH_2 nối với oxi tại δ_C 72,9/ δ_H 3,89 (dd, $J = 12,0, 3,6$ Hz) và 4,26 (dd, $J = 12,0, 6,6$ Hz), một nhóm CH tại δ_C 55,5/ δ_H 3,13 (m), nhóm methoxy tại δ_C 55,5/ δ_H 3,89 (s). Ngoài ra, sự có mặt của phân tử đường glucose được nhận biết bởi tín hiệu carbon anome tại δ_C 102,8 cùng với proton anome tương ứng tại δ_H 4,89 (d, $J = 7,8$ Hz) và các tín hiệu CH (δ_C 74,9, 77,8, 71,3, 78,2), CH_2 (δ_C 62,5). Các số liệu nêu trên được xác định thông qua phổ HSQC và được giới thiệu trên bảng. Việc xác định vị trí nối của nhóm methoxy và đường glucose vào vòng thơm được xác định thông qua các tương tác HMBC. Với hệ tương tác ABX đã được xác định trên thì hai nhóm thế sẽ được cho là gắn vào vị trí 3,4 của vòng thơm. Tương tác HMBC của proton methoxy với C-3 (151,0), tương tác của proton anome (4,89) với C-4 (147,5), cùng với các tương tác giữa H-2 với C-3/C-4/C-6, giữa H-6 với C-1/C-4/C-5, giữa H-5 với C-1/C-3/C-4 và không có tương tác HMBC giữa H-6 với C-3 (151,0) chứng tỏ C-3 có độ dịch chuyển hóa học là 151,0, và đây chính là vị trí nối của nhóm methoxy với vòng thơm. Như vậy, phân tử đường được xác định là nối vào C-4. Với các dữ liệu và phân tích nêu trên, hợp chất **PT18** được dự đoán là pinosresinol-4,4'-di-O- β -D-glucoside. Các tương tác HMBC khác giữa H-7 với C-9/C-8/C-1/C-2, giữa H-2 với C-7, giữa H-6 với C-7, giữa H-8 với C-7/C-9/C-1 đã khẳng định chính xác cấu trúc dự đoán nêu trên. Các tín hiệu phổ NMR của hợp chất này đã bị trùng nhau do tính đối xứng của phân tử. Điều này càng khẳng định rõ là phân tử có hai nhóm methoxy và hai phân tử đường. Các số liệu phổ NMR của

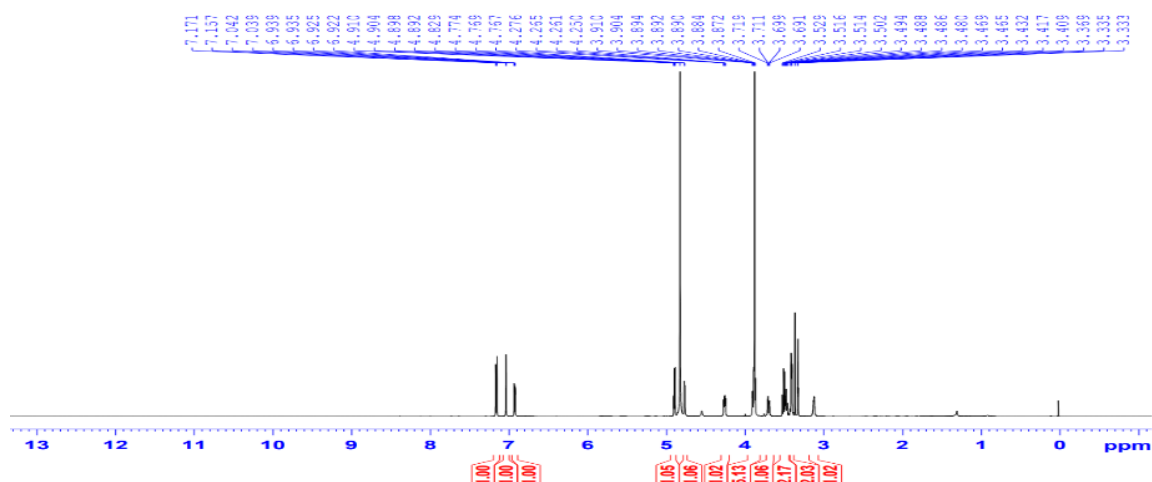
hợp chất **PT18** được so sánh với các dữ liệu phổ NMR tương ứng của hợp chất pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucoside [103] cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn. Đặc biệt là cả hai hợp chất này cùng được đo trong CD₃OD nên các dữ kiện phổ NMR gần như trùng khớp ở tất cả các vị trí (bảng 3.17). Như vậy, hợp chất **PT18** được khẳng định là pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucoside.

Bảng 18.1. Phổ NMR của hợp chất **PT18** và chất so sánh pinoresinol diglucoside

C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1, 1'	137,5	137,5	-
2, 2'	111,7	111,7	7,04 (2H, d, 1,8)
3, 3'	151,0	151,0	-
4, 4'	147,5	147,5	-
5, 5'	118,1	118,1	7,16 (2H, d, 8,0)
6, 6'	119,8	119,8	6,93 (2H, dd, 8,0, 1,8)
7, 7'	87,1	87,0	4,77 2H, d, 4,2)
8, 8'	55,5	55,5	3,13 (2H, m)
9, 9'	72,8	72,9	3,89 (2H, dd, 12,0, 3,6) 4,26 (2H, dd, 12,0, 6,6)
2xOCH ₃	55,5	55,5	3,89 (6H, s)
Glc			
1''', 1''''	100,9	100,8	4,89 (1H, d, 7,8)
2''', 2''''	74,9	74,9	3,51 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''', 3''''	77,8	77,8	3,48 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''', 4''''	71,3	71,3	3,41 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''', 5''''	78,2	78,2	3,40 (1H, m)
6''', 6''''	62,5	62,5	3,70 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,89 (1H, dd, 12,0, 2,0)

a) CD₃OD b) 125 MHz, c) 500 MHz; # δ_C của pinoresinol diglucoside [103]

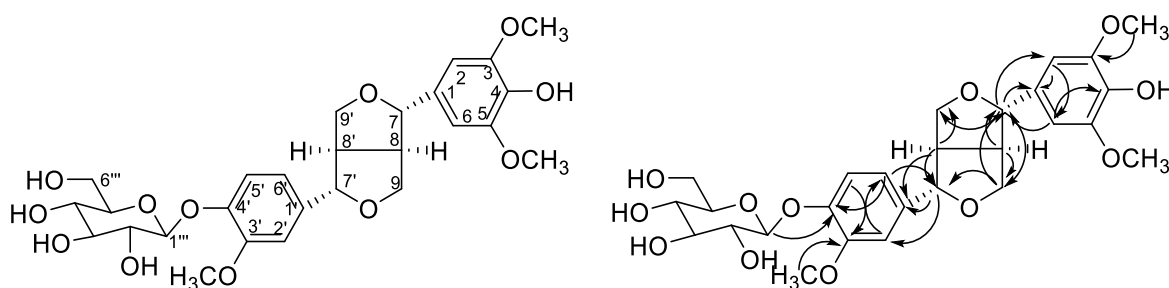
18.2. Phổ ¹H-NMR của hợp chất PT18



19. Phụ lục hợp chất PT19

19.1. Hợp chất PT19

- Chất rắn không màu
- Công thức phân tử $C_{27}H_{34}O_{12}$ ($M = 550$)
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +0,0^\circ$ ($c = 0,6$, MeOH)
- Phổ HRESIMS xuất hiện pic ion m/z tại 585,1702 $[M+Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{34}O_{12}Cl]^- = 585,1739$
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 19.1
- Các phổ HRESIMS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 19.2 - mục 19.6



Hình 19.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT19**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT19** thu được dưới dạng chất rắn không màu. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z tại 585,1702 $[M+Cl]^-$. Tính toán lý thuyết: $[C_{27}H_{34}O_{12}Cl]^- = 585,1739$; $\Delta = 6,3$ ppm khẳng định công thức phân tử của hợp chất này là $C_{27}H_{34}O_{12}$, $M = 550$ g/mol.

Phổ NMR của hợp chất này cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế 3,4 với hệ tương tác spin ABX của các proton tại δ_H 7,05 (d, $J = 1,8$ Hz), 7,17 (d, $J = 8,0$ Hz), 6,94 (dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz) cùng với các giá trị carbon tương ứng được xác định thông qua phổ HSQC tại δ_C 111,7, 118,1, 119,8. Một vòng thơm khác thế 3,4,5 có tính chất đối xứng được nhận ra bởi tín hiệu δ_H 6,68 (2H, s) / δ_C 104,6. Các tín hiệu tại δ_H 4,79 (1H, d, $J = 4,8$ Hz) / δ_C 87,1, δ_H 4,74 (1H, d, $J = 4,8$ Hz) / δ_C 87,6, δ_H 3,15 (2H, m, 2 x CH) / δ_C 55,5, δ_H 3,90 (2H, m) và 4,30 (2H, m) / δ_C 72,8 (2 x CH_2) hoàn toàn phù hợp với sự có mặt của một phần cấu trúc vòng bis-tetrahydrofuran của 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octane-type lignan [104]. Liên kết C-8/C-8' của các hợp chất lignan có cấu tạo kiểu furofuranic có trong tự nhiên có đặc trưng với cấu hình *cis* của hai proton H-8 và H-8' và trên phổ 1H NMR của các hợp chất này xuất hiện tín hiệu CH tại 3,15 - 3,18 (2H, m) của H-8 và

H-8' cũng như tín hiệu CH nối với oxy tại 4,79 - 4,90 (d, $J = 4,8 - 5,0$ Hz) [41]. Ngoài ra có ba nhóm methoxy được xác định tại δ_C 56,8/ δ_H 3,89 (3H, s), δ_C 56,8/ δ_H 3,87 (6H, s), trong đó có hai nhóm methoxy đã bị chập lại do tính chất đối xứng của phân tử. Cuối cùng, các tín hiệu của một phân tử đường glucose cũng được nhận biết bởi tín hiệu đặc trưng tại δ_C 102,9/ δ_H 4,89 (d, $J = 7,8$ Hz) của carbon và proton anome, cùng với 4 tín hiệu CH khác (δ_C 74,9/ δ_H 3,52; δ_C 77,8/ δ_H 3,47; δ_C 71,4/ δ_H 3,41; δ_C 78,2/ δ_H 3,42) và tín hiệu của nhóm CH₂ nối với oxy tại δ_C 62,5/ δ_H 3,71 (dd, $J = 12,0, 5,0$ Hz) và 3,89 (dd, $J = 12,0, 1,8$ Hz).

Tất cả các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton tương ứng với carbon được xác định bằng phổ HSQC. Phân tích chi tiết các tương tác HMBC cho thấy H-2'/H-6' (hai proton đối xứng) có tương tác HMBC với C-7' (δ_C 87,6), C-3'/C-5' (δ_C 149,4) và C-4' (δ_C 136,2), trong khi proton của hai nhóm methoxy đối xứng có tương tác HMBC với C-3' và C-5' chứng tỏ hai nhóm methoxy này nối vào C-3' và C-5'. Vị trí C-4' được cho là có nhóm OH gắn vào mà không phải nhóm methoxy khác, hay gốc đường glucose gắn vào bởi vì trên phổ HMBC nhóm methoxy còn lại có tương tác với C-3 (147,5) và proton anome có tương tác HMBC với C-4 (151,0), trong khi các proton thuộc hệ tương tác spin ABX đều có tương tác HMBC với C-3 và C-4 nêu trên. Như vậy có thể khẳng định vòng thơm thế 1,3,4 có gắn phân tử đường vào C-4 và nhóm methoxy vào C-3.

Với phân tích nêu trên có thể nhận biết hợp chất **PT19** là isoeucommin A, một hợp chất lignan có công thức phân tử là C₂₇H₃₄O₁₂

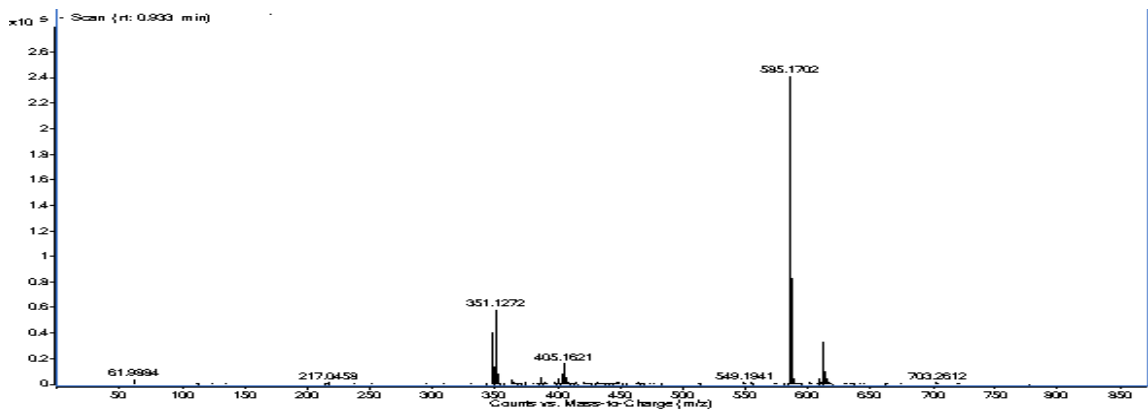
Bảng 19.1. Phổ NMR của hợp chất **PT19** và chất so sánh isoeucommin A

C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	133,2	133,1	-
2	104,6	104,6	6,68 (1H, s)
3	149,4	149,4	-
4	137,5	136,2	-
5	149,4	149,4	-
6	104,6	104,6	6,68 (1H, s)
7	87,7	87,6	4,74 (1H, d, 4,8)
8	55,6	55,5	3,15 (1H, m)
9	72,8	72,8	4,30 (1H, m)/3,90 (1H, m)
1'	137,5	137,5	-
2'	111,7	111,7	7,05 (1H, d, 1,8)
3'	147,6	147,5	-
4'	151,0	151,0	-
5'	118,1	118,1	7,17 (1H, d, 8,0)

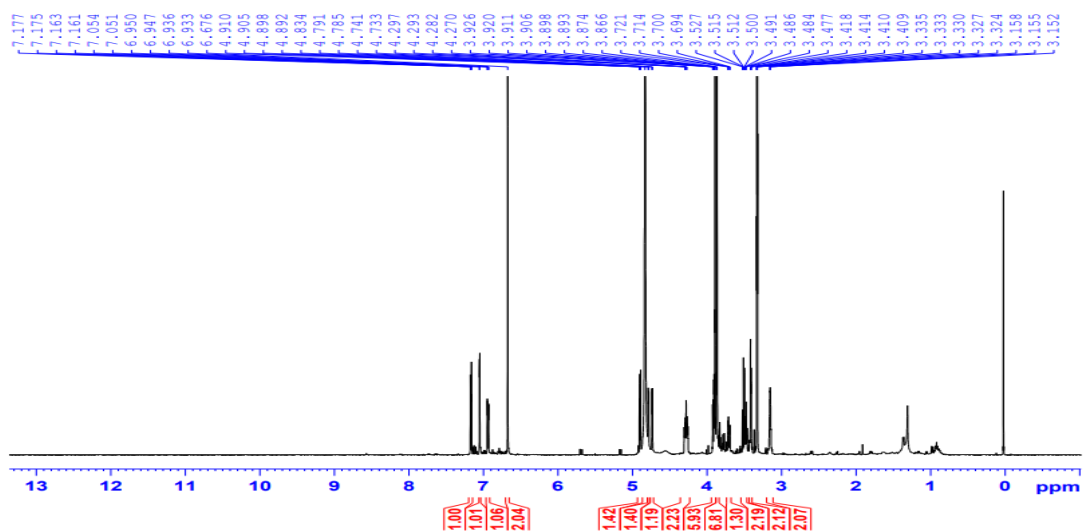
6'	119,8	119,8	6,94 (1H, dd, 8,0, 1,8)
7'	87,1	87,1	4,79 (1H, d, 4,8)
8'	55,6	55,5	3,15 (1H, m)
9'	72,8	72,8	4,30 (1H, m) 3,90 (1H, m)
2xOCH ₃	56,9	55,8	3,89 (6H, s)
OCH ₃	56,8	56,8	3,89 (3H, s)
Glc			
1'''	102,9	102,9	4,89 (1H, d, 7,8)
2'''	75,0	74,9	3,52 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'''	77,9	77,8	3,47 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	71,4	71,4	3,41 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	78,3	78,2	3,42 (1H, m)
6'''	62,6	62,6	3,71 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,89 (1H, dd, 12,0, 2,0)

a) CD₃OD, b)125 MHz, c)500 MHz; # δ C của isoeucommin A (CD₃OD) [104]

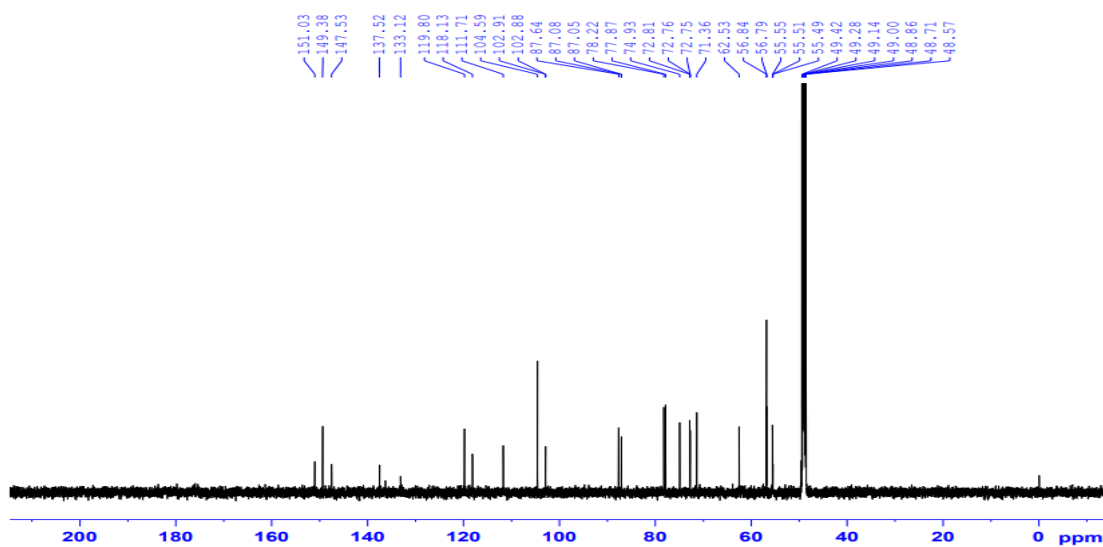
19.2. Phổ HR-ESI- MS của hợp chất PT19



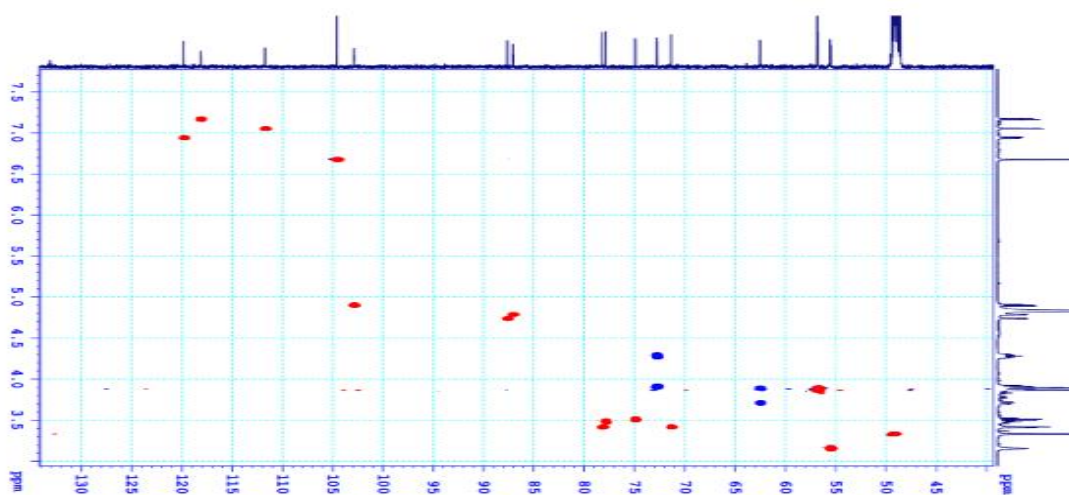
19.3. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT19



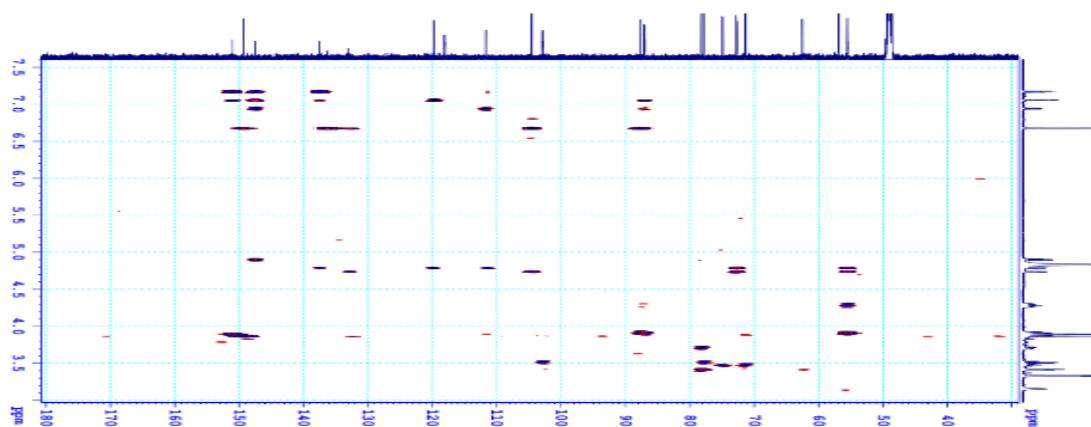
19.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT19



19.5. Phổ HSQC của hợp chất PT19



19.6. Phổ HMBC của hợp chất PT19

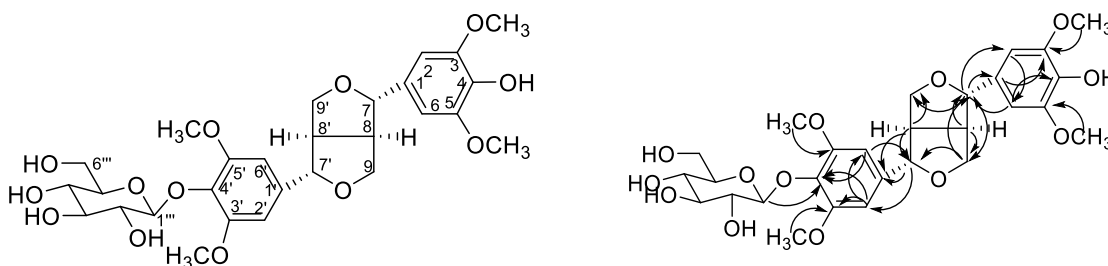


20. Phụ lục hợp chất **PT20** (Xem chất PT2B1A trang 59 - 65)

21. Phụ lục phổ hợp chất **PT21**

21.1. Hợp chất **PT21**

- Bột vô định hình màu nâu
- Công thức phân tử $C_{28}H_{36}O_{13}$ ($M = 580$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 603,2067 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{36}O_{13}Na]^+ = 603,20481$, $\Delta = +3,2$ ppm;
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -20,8^\circ$ ($c = 0,7$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 21.1
- Các phổ HR- ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC: Xem mục 21.2 - mục 21.6



Hình 21.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT21**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT21** cũng thu được dưới dạng chất bột vô định hình, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 603,2067, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{36}O_{13}Na]^+ = 603,2048$, $\Delta = 3,15$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{28}H_{36}O_{13}$, $M = 580$ g/mol. Các phổ NMR của hợp chất này gần tương tự với các phổ tương ứng của hợp chất pinoresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside. Điểm khác biệt rõ nét đó là ở vùng tín hiệu của vòng thơm chỉ còn hai tín hiệu singlet duy nhất tại δ_H 6,68 và 6,74 (CH), mỗi tín hiệu tương ứng với 2H. Điều này cho thấy sự có mặt của hai vòng thơm thế 3,4,5 và mỗi vòng thơm đều có trục đối xứng bậc hai. Điều này được làm sáng tỏ hơn khi phân tích phổ ^{13}C -NMR. Ở vùng các tín hiệu của vòng thơm, mỗi vòng thơm chỉ còn 4 tín hiệu, chúng xuất hiện thành hai cặp tương ứng với hai vòng thơm tại δ_C 133,1 (C), 104,6 (CH), 149,4 (C), 137,1 (C) và 139,6 (C), 104,9 (CH), 154,4 (C), 135,6 (C). Trên các phổ NMR, bốn nhóm methoxy cũng được nhận biết bởi các tín hiệu δ_C 56,9/ δ_H 3,87 (6H, 2 x CH_3) và δ_C 57,1/ δ_H 3,88 (6H, 2 x CH_3).

Bốn nhóm methoxy này được xác định gắn vào các vị trí C-3, C-5, C-3', C-5' của hai vòng thơm tạo ra tính đối xứng trục bậc hai đối với mỗi vòng thơm. Điều

này được khẳng định bằng tương tác HMBC giữa các proton methoxy với các carbon của vòng thơm.

Do tính đối xứng nên các pic δ_C 149,4, 104,6, 154,4 và 104,9 đều có cường độ cao gấp đôi các tín hiệu tương ứng. Sự tồn tại của cấu trúc tetrahydro -1H, 3H-furo[3,4-c]furan cũng được nhận biết bởi các tín hiệu tạo thành từng cặp như hai nhóm CH₂-O (δ_C 72,9/72,9; δ_H 4,30 (2H), 3,93 (2H), hai nhóm CH-O tại δ_C 87,2/ δ_H 4,79 (d, $J = 4,2$ Hz) và δ_C 87,6/ δ_H 4,74 (d, $J = 4,2$ Hz), hai nhóm CH khác tại δ_C 55,7 và 55,5/ δ_H 3,16 (2H, m). Cuối cùng, một phân tử đường glucose được nhận biết bởi tín hiệu carbon và proton anome δ_C 102,8/ δ_H 4,88 (d, $J = 7,8$ Hz). Giá trị hằng số tương tác J này khá cao cho thấy phù hợp với liên kết β -glycoside. Các tín hiệu khác của phân tử đường glucose tại 75,7 (CH), 77,8 (CH), 71,4 (CH), 77,8 (CH) và 62,6 (CH₂) hoàn toàn phù hợp đối với các tín hiệu của đường glucose. Với những phân tích phổ nêu trên, để phân tử có tính đối xứng, bắt buộc phân tử đường glucose và một nhóm OH phải liên kết tại C-4 và C-4' thông qua liên kết C-O-C.

Như vậy, hợp chất **PT21** được nhận dạng là một hợp chất lignan acanthoside B sau khi so sánh các dữ kiện phổ của hợp chất **PT21** với các dữ kiện phổ đã công bố cho hợp chất acanthoside B và cho sự phù hợp hoàn toàn[106].

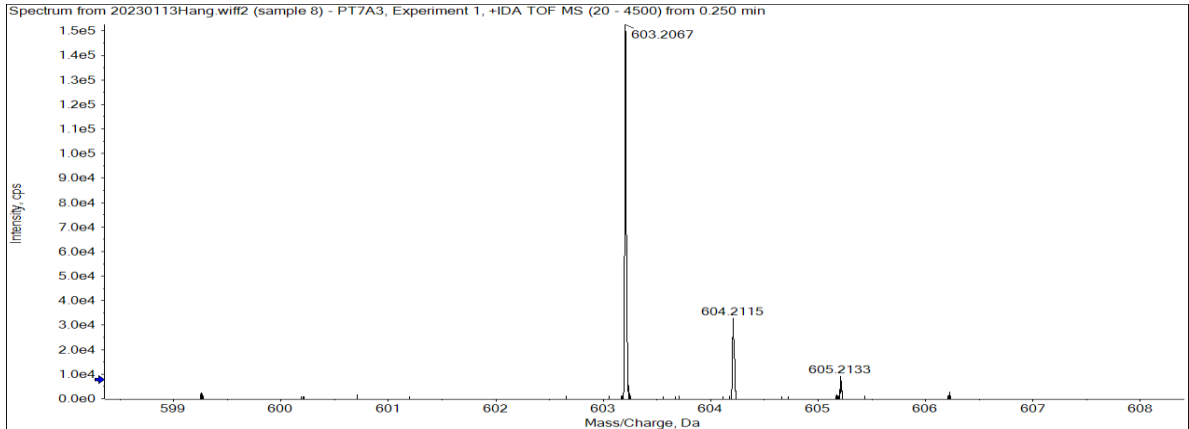
Bảng 21.1. Phổ NMR của hợp chất **PT21** và chất so sánh acanthoside B

C	# δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	131,5	133,1	-
2	104,0	104,6	6,68 (1H, s)
3	148,0	149,4	-
4	135,1	135,1	-
5	148,0	149,4	-
6	104,0	104,6	6,68 (1H, s)
7	85,3	87,6	4,74 (1H, d, 4,8)
8	53,6	55,7	3,16 (1H, m)
9	71,2	72,9	4,30 (1H, dd, 12,0, 6,0) 3,93 (1H, dd, 12,0, 3,0)
1'	134,1	135,6	-
2'	104,4	104,9	6,74 (1H, s)
3'	152,6	154,4	-
4'	137,2	139,6	-
5'	152,6	154,4	-
6'	104,4	104,9	6,74 (1H, s)
7'	85,1	87,2	4,78 (1H, d, 4,8)
8'	53,6	55,5	3,16 (1H, m)
9'	71,2	72,9	4,30 (1H, dd, 12,0, 6,0) 3,93 (1H, dd, 12,0, 3,0)
2xOCH ₃	56,1	56,9	3,87 (6H, s)
2xOCH ₃	56,5	57,1	3,88 (6H, s)
Glc			
1'''	102,9	105,4	4,88 (1H, d, 7,8)
2'''	74,2	75,7	3,50 (1H, dd, 9,0, 7,8)

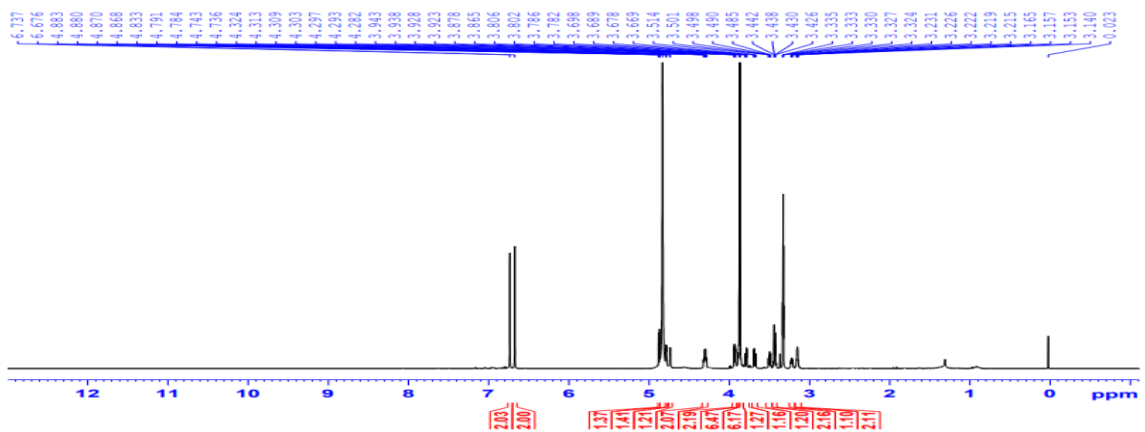
3'''	76,5	77,8	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'''	70,1	71,4	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'''	77,1	78,3	3,23 (1H, m)
6'''	61,1	62,6	3,68 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,80 (1H, dd, 12,0, 2,0)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz; # δ_C của acanthoside B (DMSO-d₆) [106]

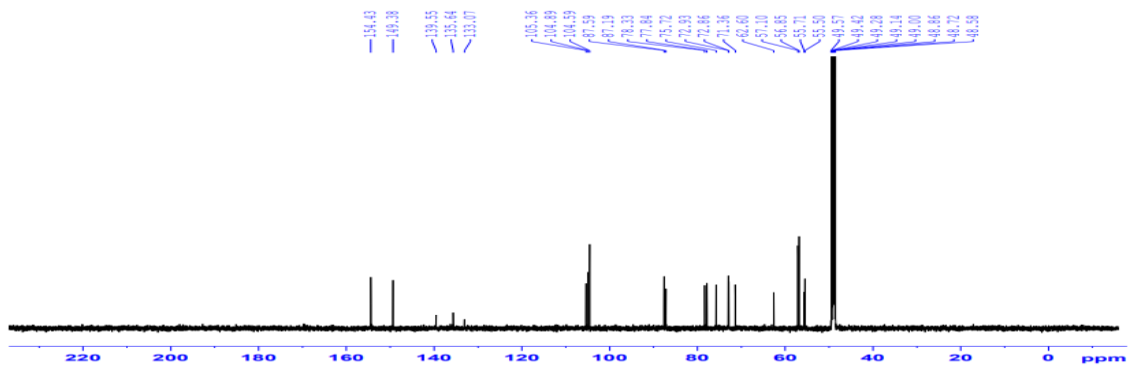
21.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT21



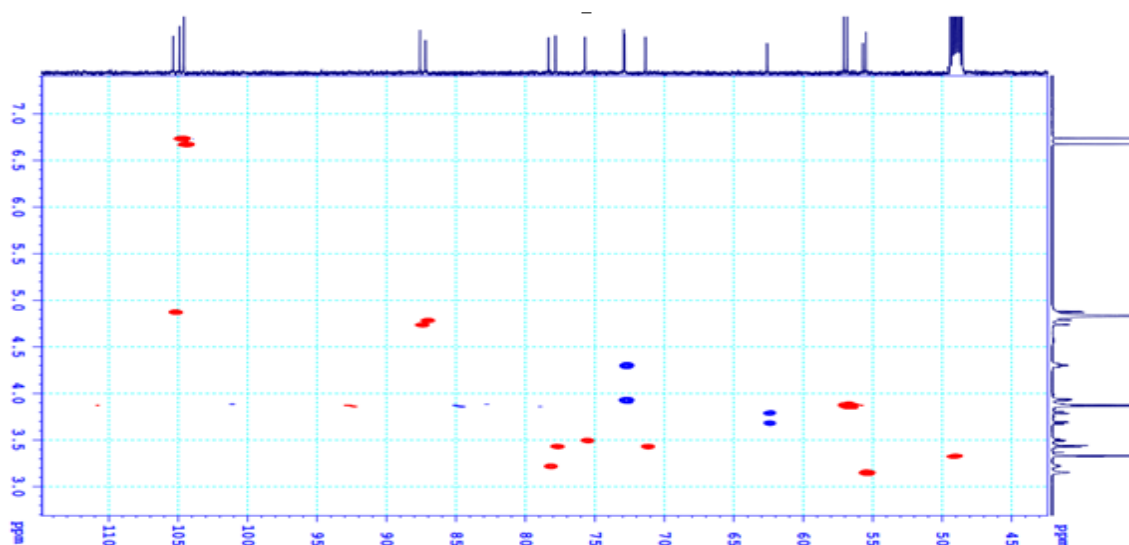
21.3. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT21



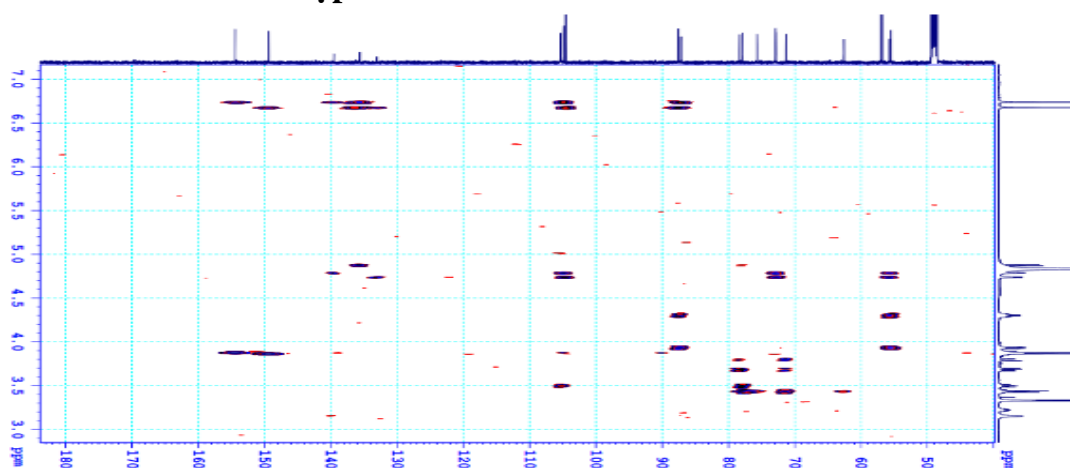
21.4. Phổ ¹³C NMR của hợp chất PT21



21.5. Phổ HSQC của hợp chất PT21



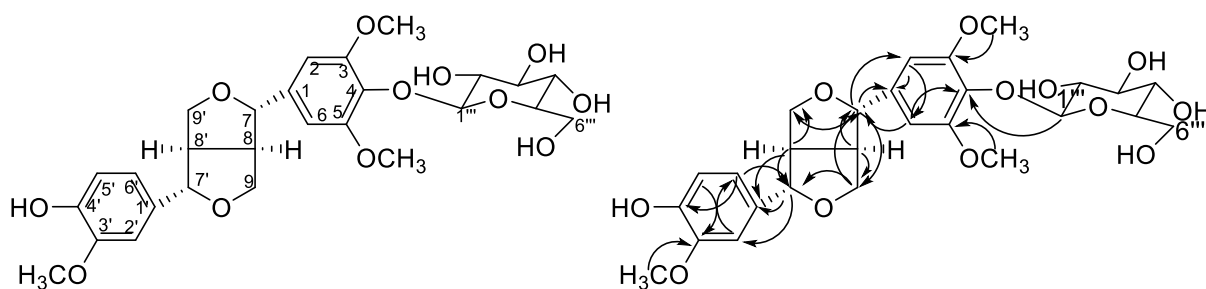
21.6. Phổ HMBC của hợp chất PT21



22. Phụ lục hợp chất PT22

22.1. Hợp chất PT22

- Bột vô định hình màu trắng
- Công thức phân tử $C_{27}H_{34}O_{12}$ ($M = 550$)
- Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion $m/z [M+Na]^+$ 573,1961 tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{34}O_{12}Na]^+ = 573,19425$, $\Delta = +3,3$ ppm;
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -20,8^\circ$ ($c = 2,4$, MeOH)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 22.1
- UV (MeOH) λ_{max} nm: 204, 233, 278
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, UV. Xem mục 22.2 - mục 22.6



Hình 22.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT22**

* *Biện giải xác định cấu trúc:*

Hợp chất **PT22** thu được dưới dạng bột vô định hình, phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z $[M+Na]^+$ 573,1961, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{34}O_{12}Na]^+ = 573,1942$, $\Delta = 3,315$ ppm, công thức phân tử được xác định là $C_{27}H_{34}O_{12}$, $M = 550$ g/mol. Phổ NMR của hợp chất này có dạng phổ của một hợp chất lignan glycoside. Trong đó cặp các tín hiệu gồm có hai nhóm CH_2 nối với nguyên tử oxy [δ_C 72,8, 72,9/ δ_H 3,91 (2H, m) và 4,29 (2H, m)], hai nhóm oximethine [δ_C 87,2, 87,5/ δ_H 4,79 (1H, d, $J = 4,2$ Hz) và 4,73 (1H, d, $J = 4,2$ Hz)], hai nhóm CH no [δ_C 55,3, 55,8/ δ_H 3,15 (2H, m)] cho thấy sự có mặt của cấu trúc tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan của hợp chất pinoresinol. Sự có mặt của ba tín hiệu proton có tương tác theo hệ spin ABX tại δ_H 6,97 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)/ 6,83 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz)/ 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) khẳng định sự có mặt của một vòng thơm thế 3,4. Một vòng thơm khác được cho là thế 3,4,5 có tính đối xứng trục bậc hai được nhận biết bởi tín hiệu tại 6,74 (2H, s). Các tín hiệu singlet tại 3,88 (9H) có tương tác HMBC với các tín hiệu carbon tại δ_C 56,4 và 57,1 (trong đó tín hiệu tại δ_C 57,1 có cường độ cao gấp đôi tín hiệu tại δ_C 56,4) tương ứng với ba nhóm methoxy, trong đó có tín hiệu hai nhóm methoxy chập hoàn toàn vào nhau khẳng định rằng hai nhóm methoxy chập nhau phải gắn vào vòng thơm đối xứng ở vị trí 3,5, nhóm methoxy còn lại được dự đoán gắn vào vòng thơm thế 3,4. Một phân tử đường cũng được nhận biết bởi các tín hiệu proton cộng hưởng trong vùng δ_H 3,30-4,88 ppm, trong đó proton anome được xác định tại δ_H 4,88 (1H, d, $J = 7,8$ Hz). Với những phân tích nêu trên, hợp chất 14 được dự đoán là có 27 nguyên tử carbon. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất này xuất hiện 25 tín hiệu vừa đúng của 27 nguyên tử carbon (do một vòng thơm đối xứng nên có hai cặp tín hiệu carbon chập vào nhau). Ngoài 3 nhóm methoxy, 6 carbon của một phân tử đường thì 18 tín hiệu còn lại vừa đúng với cấu trúc hợp chất lignan với các đơn nguyên là C6-C3. Các tín hiệu proton gắn vào từng nguyên tử C được xác định thông qua phổ HSQC.

Vị trí của các nhóm thế cũng như cấu trúc của cả phân tử hợp chất **PT22** được xác định nhờ phổ HMBC. Các tương tác HMBC chính của hợp chất này được chỉ ra trên hình vẽ. Đối với vòng thơm thế 3',4', nhóm methoxy được cho là gắn vào C-3' và nhóm OH được cho là gắn vào C-4' bởi không xuất hiện tín hiệu tương tác của H-6' (6,83) với C-3' (149,2), vị trí carbon mà tại đó có tương tác HMBC của các proton methoxy (3,88) vào carbon này. Sự không xuất hiện tương tác HMBC nêu trên do H-6' và C-3' nằm ở vị trí para với nhau. Vòng thơm này được liên kết với cấu trúc tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan tại C-7' bởi xuất hiện tương tác HMBC của H-7' (4,73) với ba tín hiệu carbon C-1', C-2' và C-6. Ở vòng thơm còn lại, rõ ràng phân tử đường phải nối với vaong thơm này tại C-4 thì mới có thể tạo ra tính đối xứng cho vòng thơm này. Điều này cũng được khẳng định chính xác bằng tín hiệu tương tác HMBC giữa H-2 với C-4, và đồng thời có tương tác giữa proton anome (4,88) với C-4. Mặt khác, so sánh các dữ kiện phổ của hợp chất **PT22** với các dữ kiện tương ứng của hợp chất có cấu trúc như phân tích nêu trên, eucommin A, cho thấy có sự phù hợp hoàn toàn [107]. Như vậy có thể kết luận hợp chất **PT22** đúng là eucommin A.

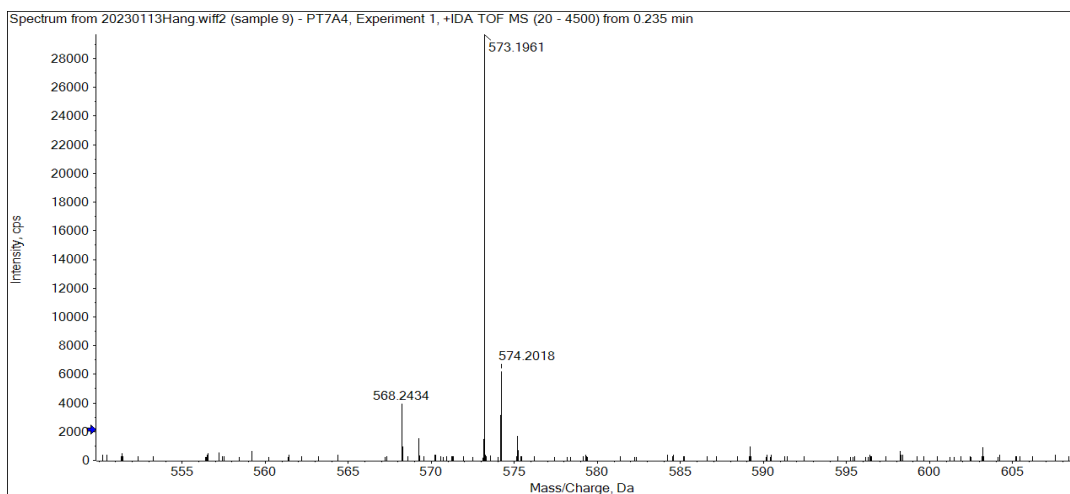
Bảng 22.1. Phổ NMR của hợp chất **PT22** và chất so sánh eucommin A

C	[#] δ _C	δ _C ^{a,b}	^{a,c} δ _H (mult., J = Hz)
1	134,1	139,6	-
2	104,5	104,9	6,74 (1H, s)
3	152,7	154,4	-
4	137,3	135,7	-
5	152,7	154,4	-
6	104,5	104,9	6,74 (1H, s)
7	85,1	87,2	4,79 (1H, d, 4,8)
8	53,6	55,3	3,15 (1H, m)
9	71,3	72,9	4,29 (1H, m)/ 3,91 (1H, m)
1'	132,3	133,8	-
2'	110,7	110,0	6,97 (1H, d, 1,8)
3'	147,6	149,2	-
4'	146,0	147,4	-
5'	115,2	116,1	6,79 (1H, d, 8,0)
6'	118,7	120,1	6,83 (1H, dd, 8,0, 1,8)
7'	85,1	87,5	4,73 (1H, d, 4,2)
8'	53,8	55,8	3,15 (1H, m)
9'	71,1	72,8	4,29 (1H, m) 3,91 (1H, m)

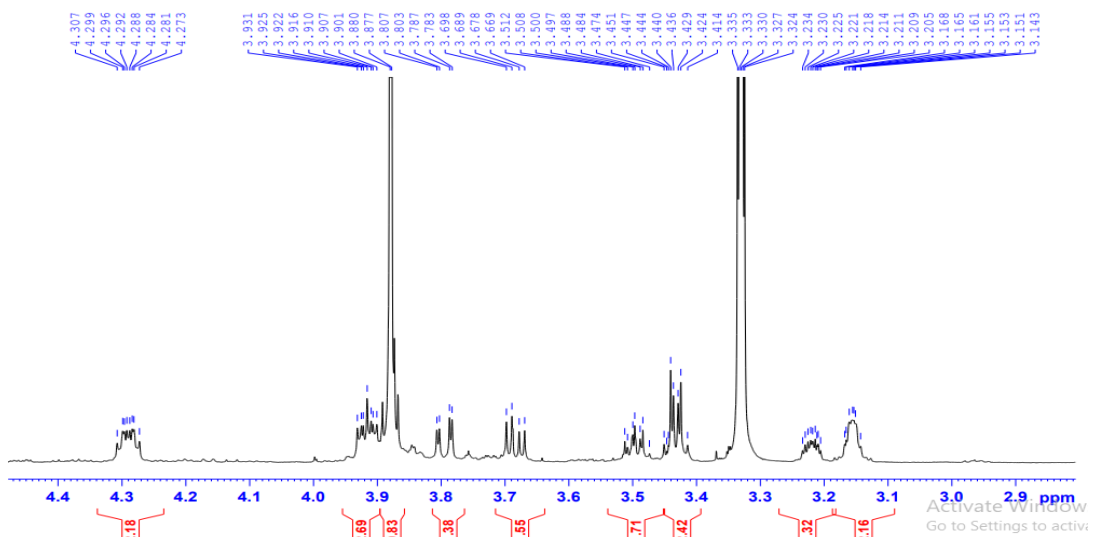
2xOCH ₃	56,5	57,1	3,88 (6H, s)
OCH ₃	55,8	56,5	3,88 (3H, s)
Glc			
1''	103,0	105,4	4,88 (1H, d, 7,8)
2''	74,3	75,7	3,50 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	76,5	77,9	3,43 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	70,5	71,4	3,42 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	77,1	78,4	3,22 (1H, m)
6''	61,1	62,6	3,68 (1H, dd, 12,0, 5,5) 3,79 (1H, dd, 12,0, 2,0)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz; # δ_C eucommin A (DMSO-d₆) [107]

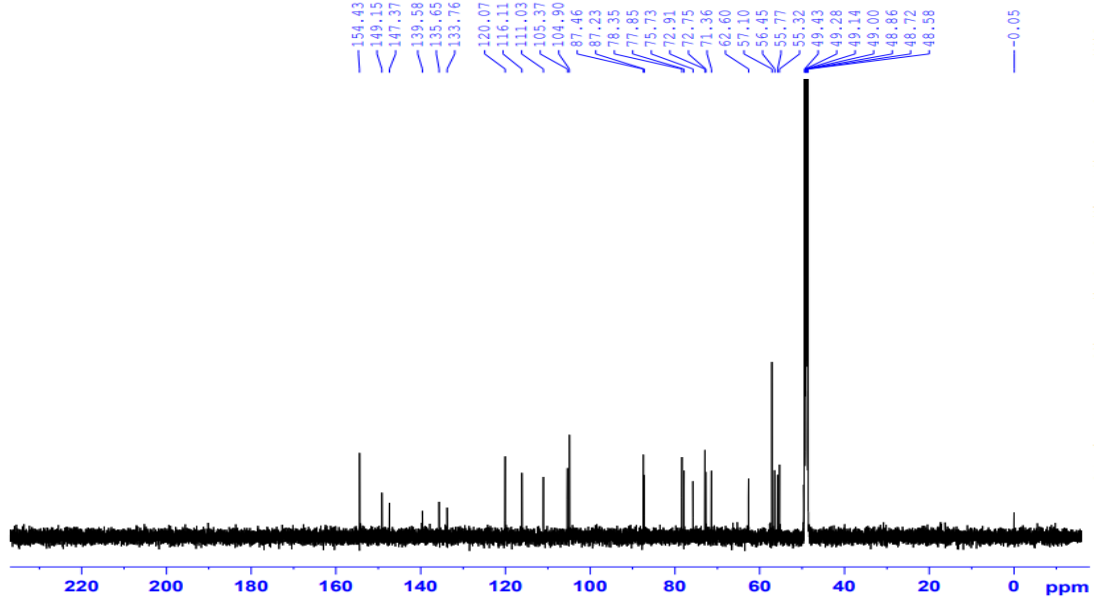
22.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT22



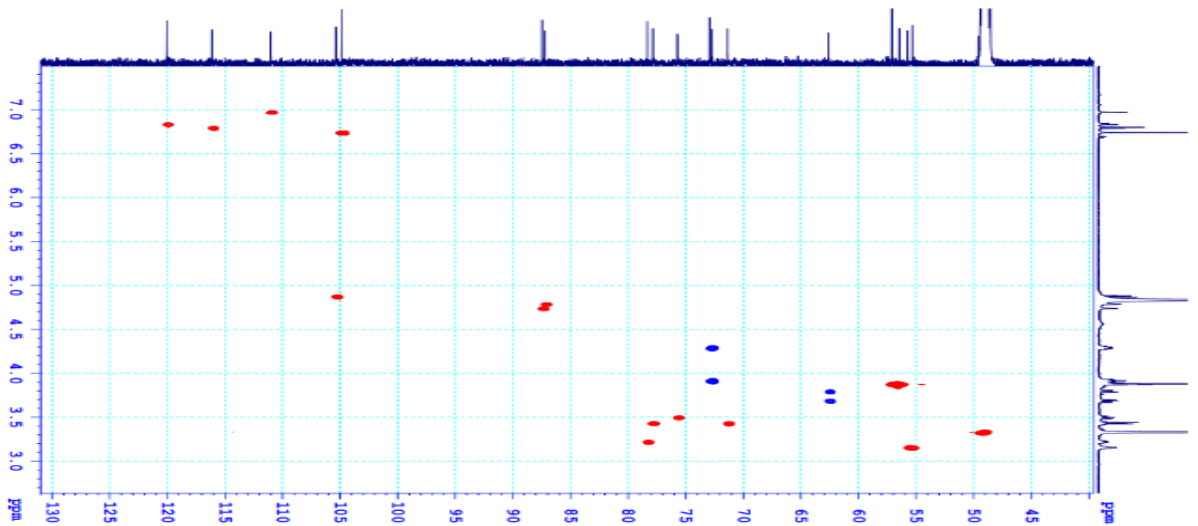
22.3. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT22



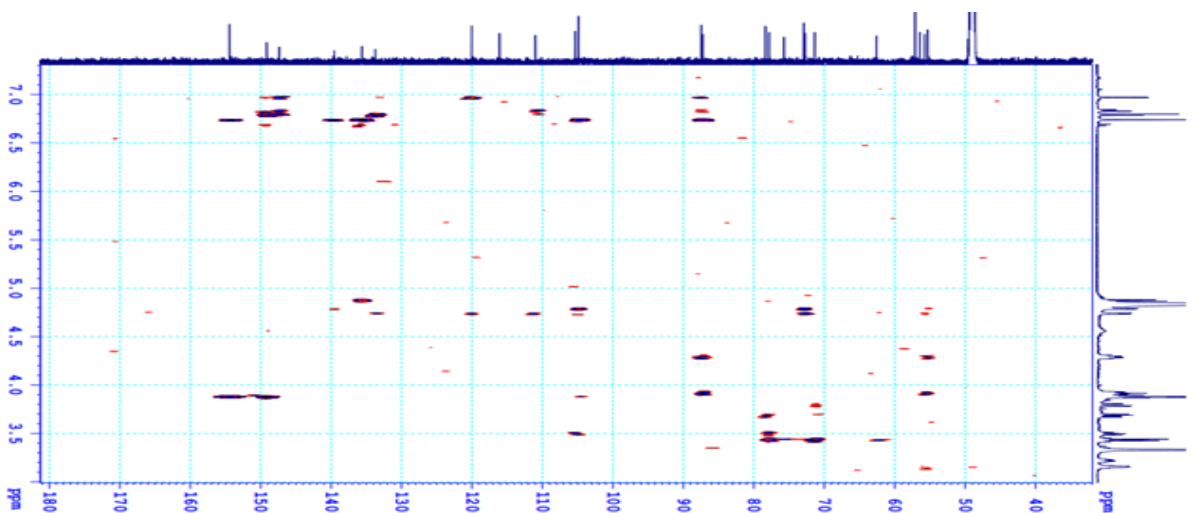
22.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT22



22.5. Phổ HSQC của hợp chất PT22



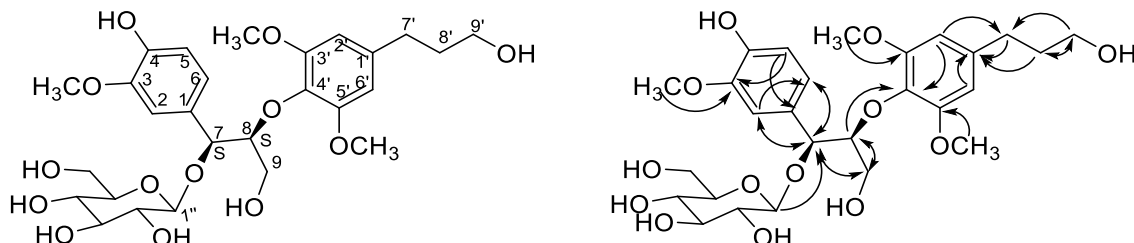
22.6. Phổ HMBC của hợp chất PT22



23. Phụ lục phổ hợp chất PT23

- Bột vô định hình màu trắng
- Công thức phân tử $C_{27}H_{38}O_{13}$ ($M = 570$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 23.1
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC Xem mục 23.2 - mục 23.5

23.1. Hợp chất PT23



Hình 23.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT23**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Hợp chất **PT23** có các phổ NMR khá tương tự như các phổ NMR tương ứng của hợp chất **PT15** cho thấy chúng đều là các hợp chất phenylpropanol glycoside. Tuy nhiên, trên phổ NMR của hợp chất **PT23** có thể nhận rõ sự xuất hiện thêm một vòng thơm thế ABX cùng với một nhóm methoxy. Vòng thơm thế 1,3,4 có hệ tương tác proton ABX được nhận biết tại δ_H 7,11 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), δ_H 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 6,94 (1H, dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz), đồng thời các proton này lần lượt có tương tác HSQC với các carbon tại 112,6, 115,7, 121,4. Nhóm methoxy được cho là gắn vào vị trí C-3 của vòng thơm bởi có tương tác HMBC giữa proton H-5 (δ_H 6,78)/H-2 (δ_H 7,11) với C-3 (δ_C 148,6), của proton OCH₃ với C-3 (δ_C 148,6), trong khi đó không xuất hiện tín hiệu HMBC giữa H-6 (δ_H 6,94) với C-3 do chúng nằm ở vị trí *para* với nhau trong vòng thơm. Vòng thơm này được khẳng định là nối với C-7 bởi có tương tác HMBC mạnh giữa H-7 (δ_H 5,16) với C-1 (δ_C 132,0)/C-2 (δ_C 112,6)/ C-6 (δ_C 121,4), cũng như tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 4,27) với C-1 (δ_C 132,0). Cấu trúc của hợp chất này được chỉ ra trên hình vẽ. Các vị trí nối của phân tử đường glucose với C-7 được khẳng định bởi tương tác HMBC giữa proton anome (δ_H 4,26) với C-7, cầu nối ete C-8-O-C-4' được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 4,27) với C-4' (δ_C 134,5), tương tự như vậy, hai nhóm methoxy nối vào C-3' và C-5' cũng được khẳng định bằng phổ HMBC như chỉ ra trên hình vẽ. Giá trị J của proton anome khá lớn (7.8 Hz) cho thấy sự có mặt của liên kết β -glycoside. Hằng số tương tác $J_{H-7/H-8} = 6,6$ Hz cùng với hiệu ứng Cotton dương tại 230 ($\Delta\epsilon +2.00$) nm cho thấy hợp chất này có cấu hình hoàn toàn giống với hợp chất rousinoside đã công bố [108]. Mặt khác độ quay cực riêng của hợp chất **PT23** đo

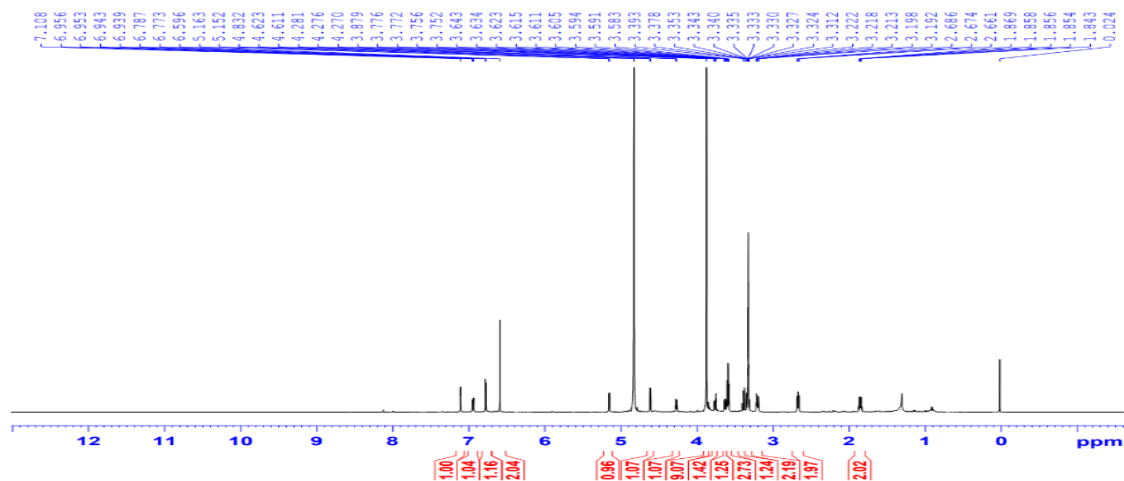
được là $[\alpha]^{25}_D = 21,5^\circ$ hoàn toàn phù hợp với giá trị độ quay cực riêng của hợp chất rousinoside là $[\alpha]^{22}_D = 21,3^\circ$. Từ những kết quả nêu trên, hợp chất **PT23** được xác định là rousinoside

Bảng 23.1. Phổ NMR của hợp chất **PT23** và chất so sánh rourinoside

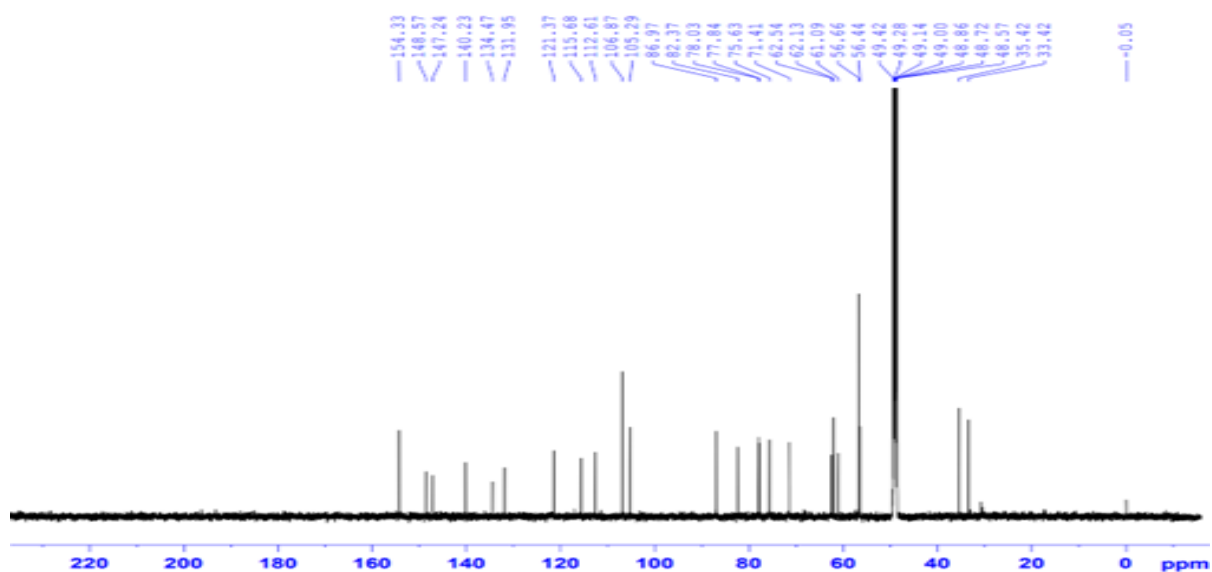
C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	131,0	132,0	-
2	111,6	112,6	7,11 (1H, d, 1,8)
3	147,7	148,6	-
4	146,4	147,2	-
5	114,8	115,7	6,78 (1H, d, 8,0)
6	120,4	121,4	6,94 (1H, dd, 8,0, 1,8)
7	81,4	82,4	5,16 (1H, d, 6,6)
8	86,1	87,0	4,27 (1H, m)
9	60,2	61,1	3,60 (1H, dd, 11,4, 5,0) 3,20 (1H, dd, 11,4, 5,0)
1'	139,4	140,2	-
2'	105,9	106,9	6,60 (1H, s)
3'	153,4	154,3	-
4'	133,5	134,5	-
5'	153,4	154,3	-
6'	105,9	106,9	-
7'	32,5	33,4	2,67 (2H, t, 7,0)
8'	34,6	35,4	1,85 (2H, m)
9'	61,2	62,1	3,59 (2H, t, 7,0)
1''	104	105,3	4,62 (1H, d, 7,8)
2''	74,7	75,6	3,23 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	77,2	77,8	3,40 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	70,5	71,4	3,32 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	76,9	78,0	3,20 (1H, m)
6''	61,6	62,5	3,75 (1H, dd, 12,0, 2,0) 3,63 (1H, dd, 12,0, 5,0)
2xOCH ₃	55,7	56,6	3,86 (6H, s)
OCH ₃	55,5	56,4	3,88 (3H, s)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz, δ_C rourinoside [108]

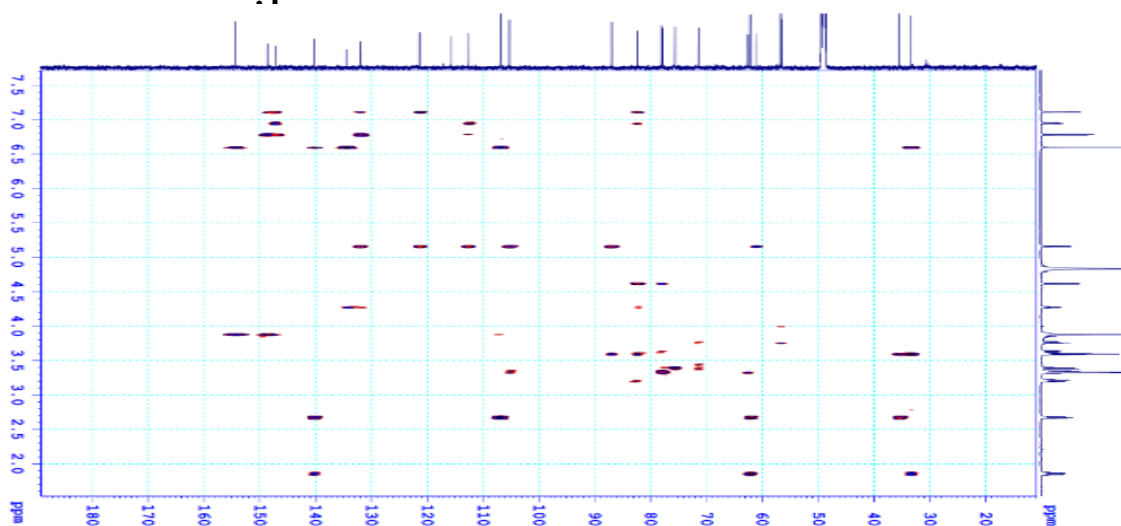
23.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT23



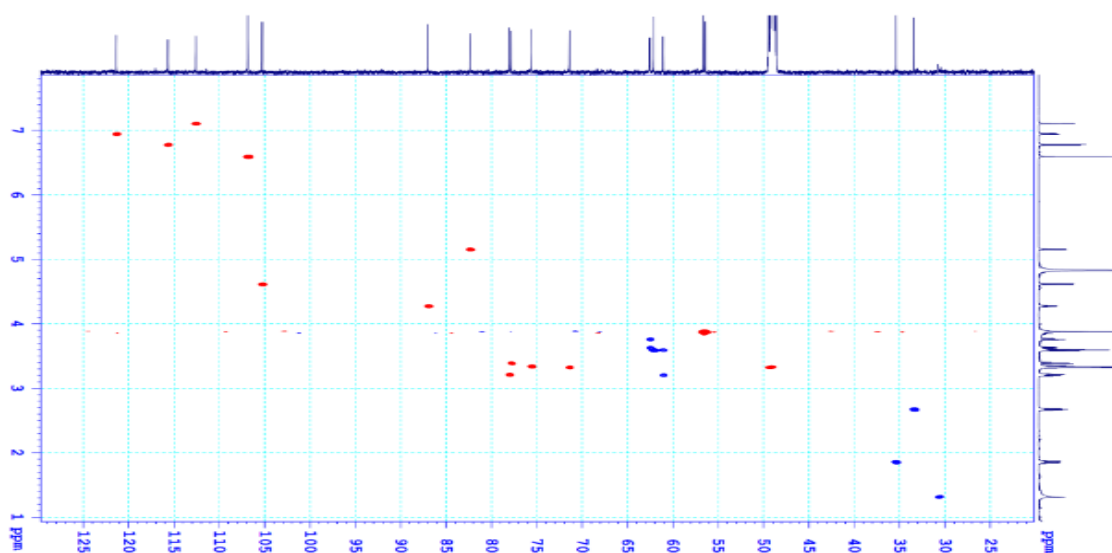
23.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT23



23.4. Phổ HMBC của hợp chất PT23



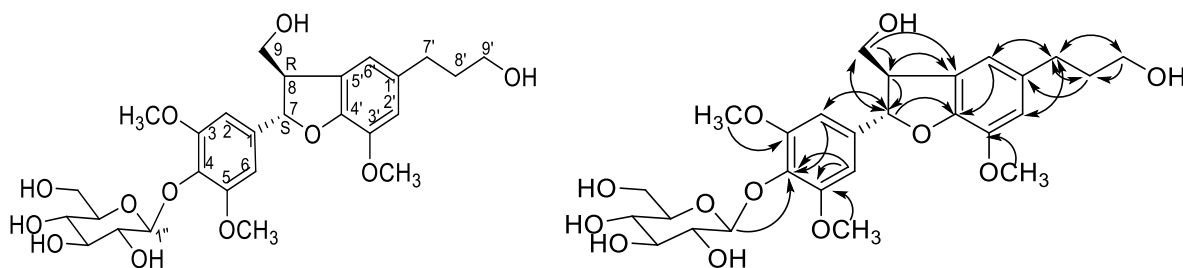
23.5. Phổ HSQC của hợp chất PT23



24. Phụ lục hợp chất PT24

- Bột vô định hình không màu
- Công thức phân tử $C_{27}H_{36}O_{12}$ ($M = 552$)
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 24.1
- Các phổ 1H và ^{13}C -NMR, HSQC. Xem mục 24.2 - mục 24.4

24.1. Hợp chất PT24



Hình 24.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT24**

**Biện giải xác định cấu trúc:*

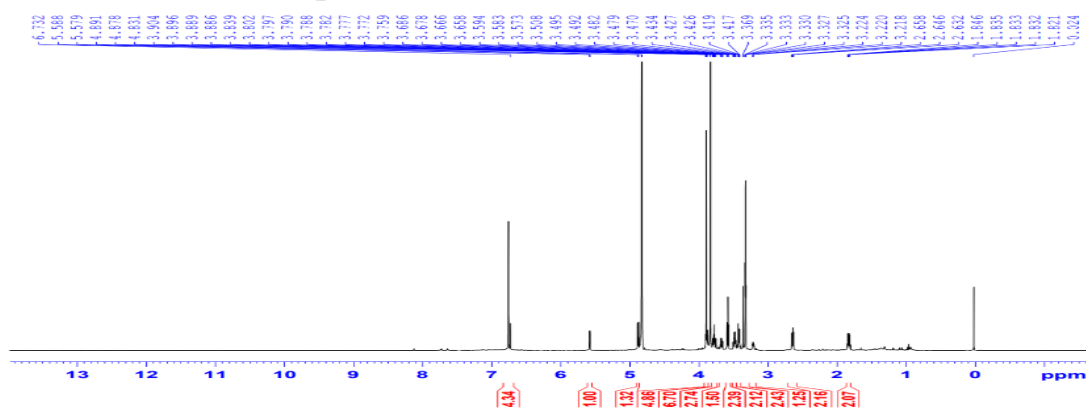
Phổ NMR của hợp chất **PT24** có dạng phổ của một hợp chất neolignane glycoside. Trong đó, một phân tử đường glucose được nhận diện thông qua các tín hiệu của carbon và proton anome tại δ_C 105,3 và δ_H 4,88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz); ba nhóm methoxy, trong đó có hai nhóm tương đương nhau và chập tín hiệu vào nhau tại δ_C 57,0/ δ_H 3,81 (6H, s), còn một nhóm biệt lập tại δ_C 56,9/ δ_H 3,89 (3H, s); một vòng thơm thế 1,3,4,5 và có tính đối xứng trục bậc hai do xuất hiện tín hiệu singlet tại 6,76 với cường độ tích phân tương ứng với 2H; một nhánh propanol được nhận ra bởi cụm các tín hiệu tại δ_C 32,9/ δ_H 2,56 (2H, dd, $J = 7,2, 7,2$ Hz), δ_C 35,8/ δ_H 1,83 (2H, m), và δ_C 62,2/ δ_H 3,58 (2H, t, $J = 6,6$ Hz). Ngoài ra còn có hai tín hiệu proton vòng thơm xuất hiện dưới dạng singlet tại δ_H 6,73 và 6,76, tín hiệu oxymethine tại 88,5/5,58 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 55,8/3,47 (1H, m) và tín hiệu nhóm oxymethylen tại 65,1/3,77 (m) và 3,88 (m). Những dữ kiện phổ nêu trên được xác định nhờ vào phân tích phổ HSQC. Các dữ kiện trên cho thấy đây là một hợp chất neolignane glycoside, với cấu trúc tương tự hợp chất (7S,8R)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside [109]. Các dữ kiện phổ của hợp chất **PT24** đem so sánh với các dữ kiện phổ tương ứng của hợp chất (7S,8R)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside [109] cho thấy sự phù hợp hoàn toàn. Ngoài ra, phổ HMBC cũng được phân tích chi tiết và cho các tương tác như nêu ra trên hình vẽ.

Bảng 24.1. Phổ NMR của hợp chất **PT24** và chất so sánh (7*S*,8*R*)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-*O*- β -D-glucopyranoside

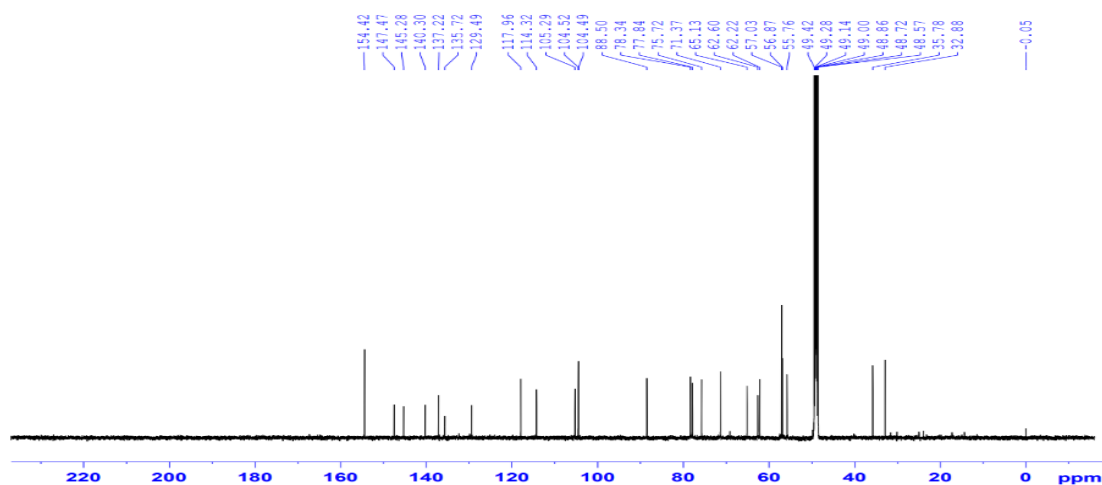
C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	140,3	140,3	-
2	104,4	104,5	6,76 (1H, s)
3	154,4	154,4	-
4	135,6	135,7	-
5	154,4	154,4	-
6	104,4	104,5	6,76 (1H, s)
7	88,5	88,5	5,58 (1H, d, 5,4)
8	55,8	55,8	3,47 (1H, m)
9	65,1	65,1	3,88 (1H, dd, 11,4, 5,0) 3,77 (1H, dd, 11,4, 5,0)
1'	137,2	137,2	-
2'	114,2	114,3	6,76 (1H, s)
3'	145,3	145,3	-
4'	147,4	147,5	-
5'	129,4	129,5	-
6'	117,9	118,0	6,73 (1H, s)
7'	32,9	32,9	2,65 (2H, t, 7,0)
8'	35,8	35,8	1,83 (2H, m)
9'	62,2	62,2	3,58 (2H, t, 7,0)
1''	105,2	105,3	4,88 (1H, d, 7,8)
2''	75,7	75,7	3,48 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3''	78,3	77,8	3,42 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4''	71,3	71,4	3,43 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5''	77,8	78,3	3,22 (1H, m)
6''	62,5	62,6	3,78 (1H, dd, 12,0, 2,0) 3,68 (1H, dd, 12,0, 5,0)
2xOCH ₃	57	57,0	3,81 (6H, s)
3'-OCH ₃	56,8	56,9	3,89 (3H, s)

^{a)} CD₃OD, ^{b)} 125 MHz, ^{c)} 500 MHz, δ_C (7*S*,8*R*)-5-methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-*O*- β -D-glucopyranoside [109]

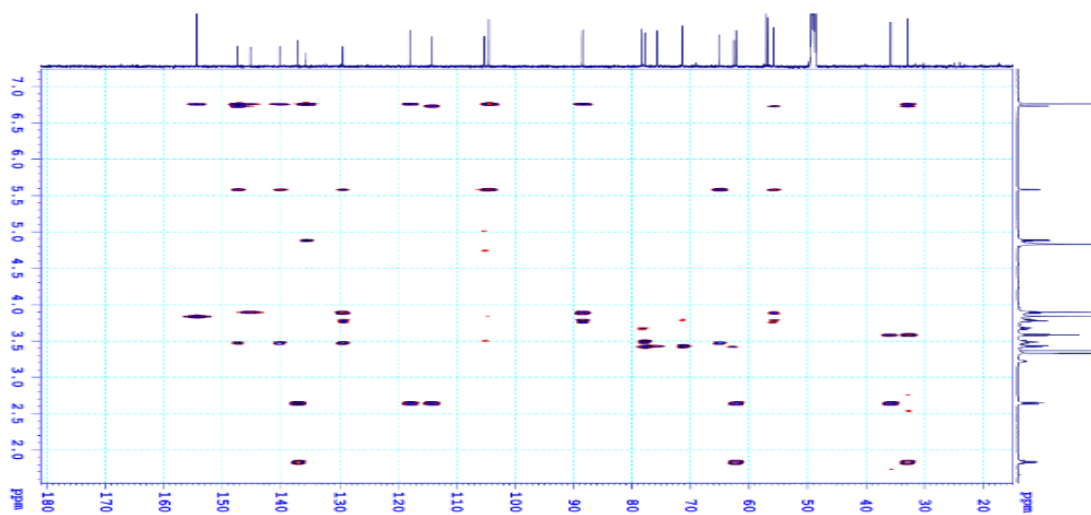
24.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất PT24



24.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT24

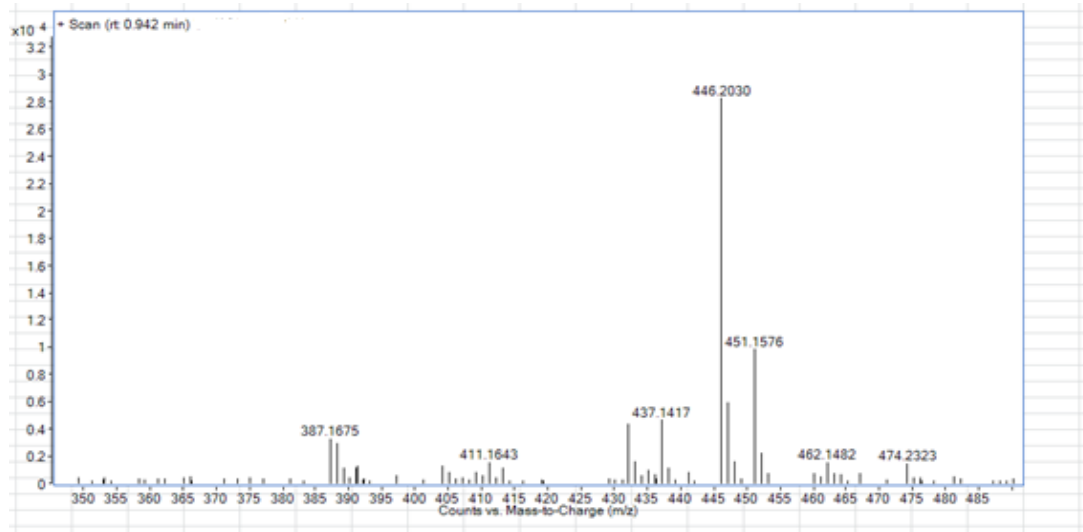


24.4. Phổ HMBC của hợp chất PT24

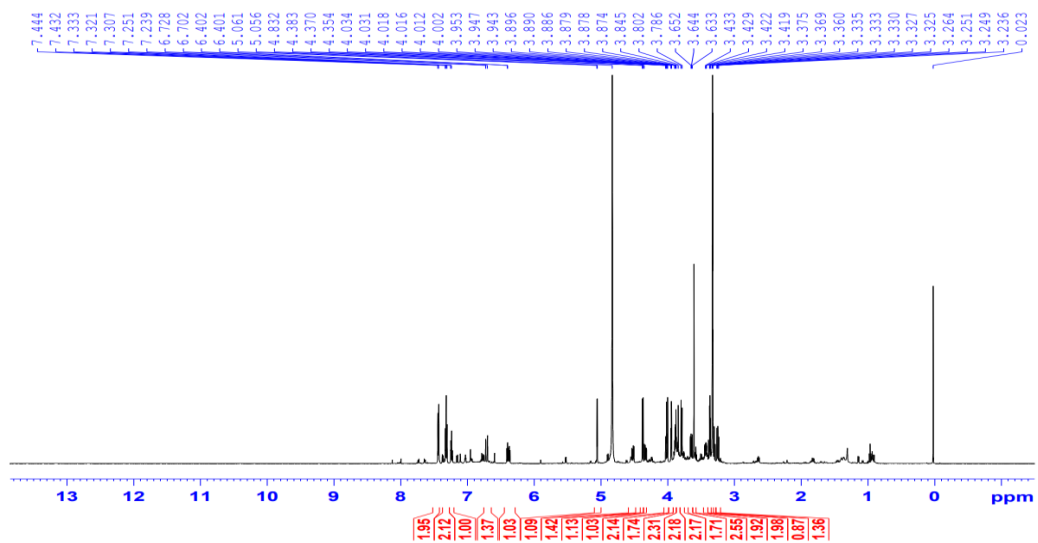


25. Phụ lục phổ hợp chất PT25

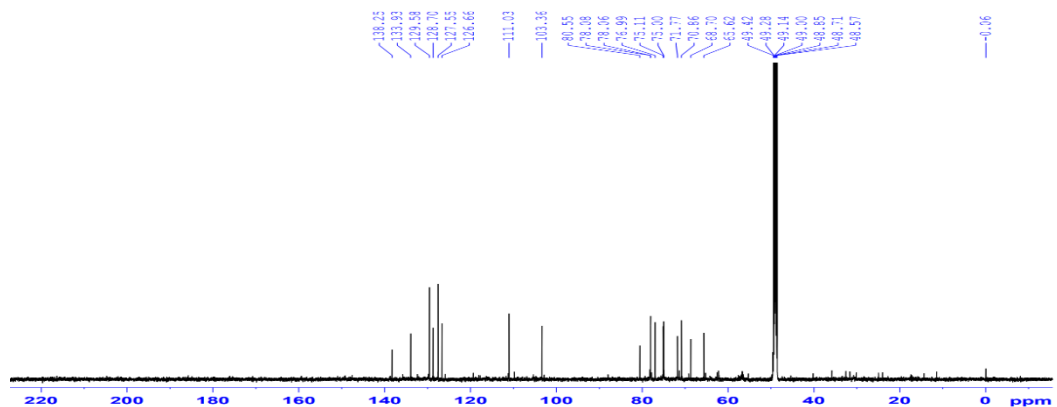
25.1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT25



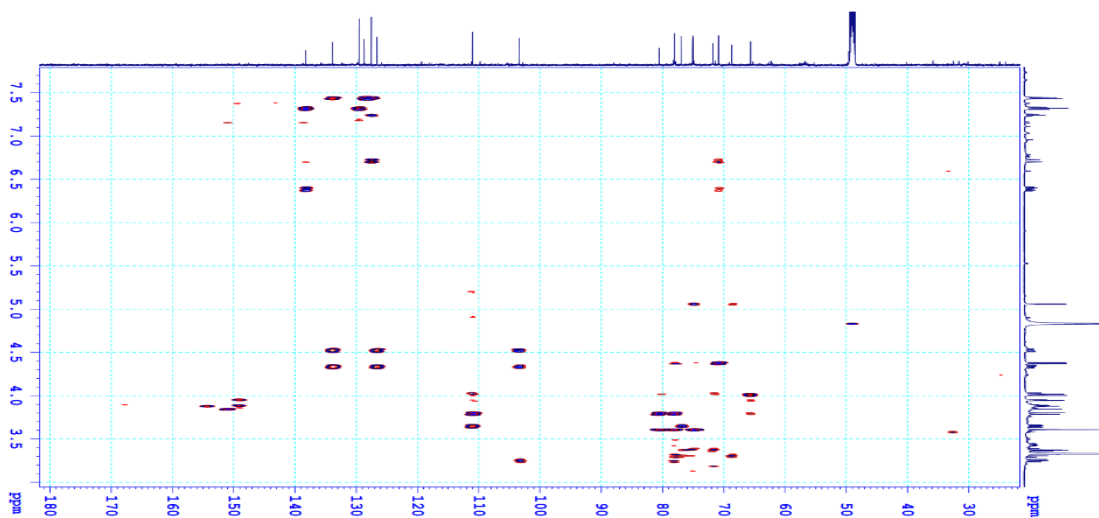
25.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT25



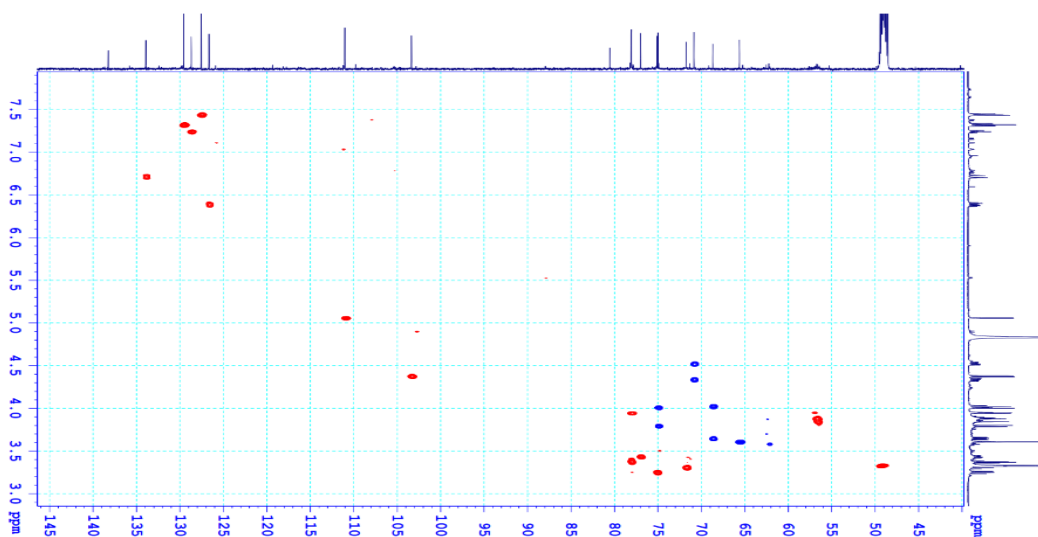
25.3. Phổ ¹³C NMR của hợp chất PT25



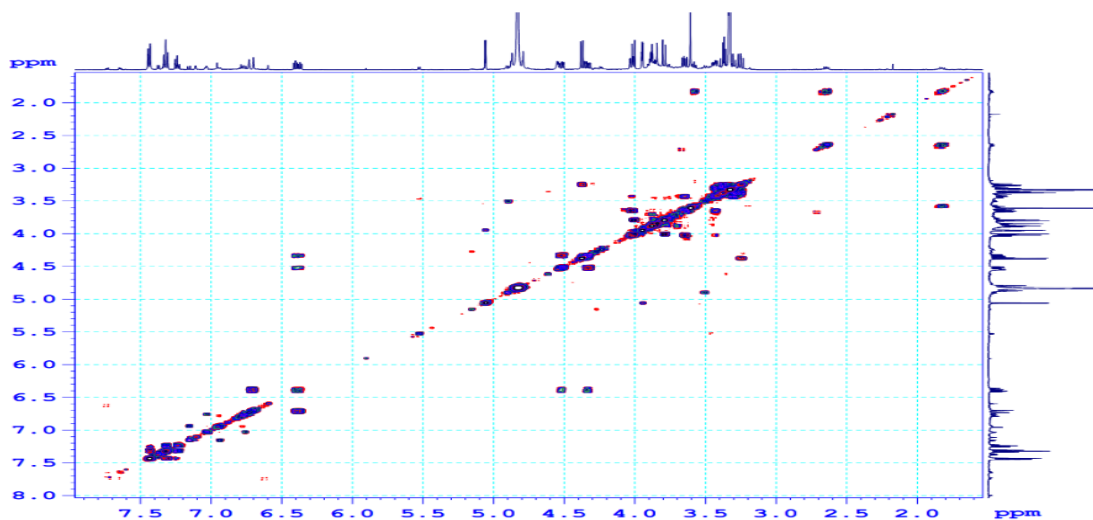
25.4. Phổ HMBC của hợp chất PT25



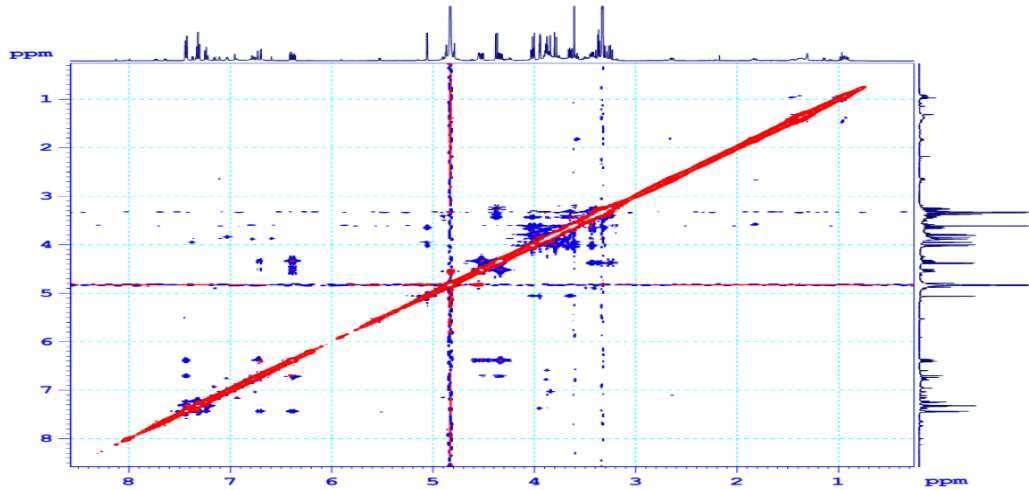
25.4. Phổ HSQC của hợp chất PT25



25.5. Phổ COSY của hợp chất PT25

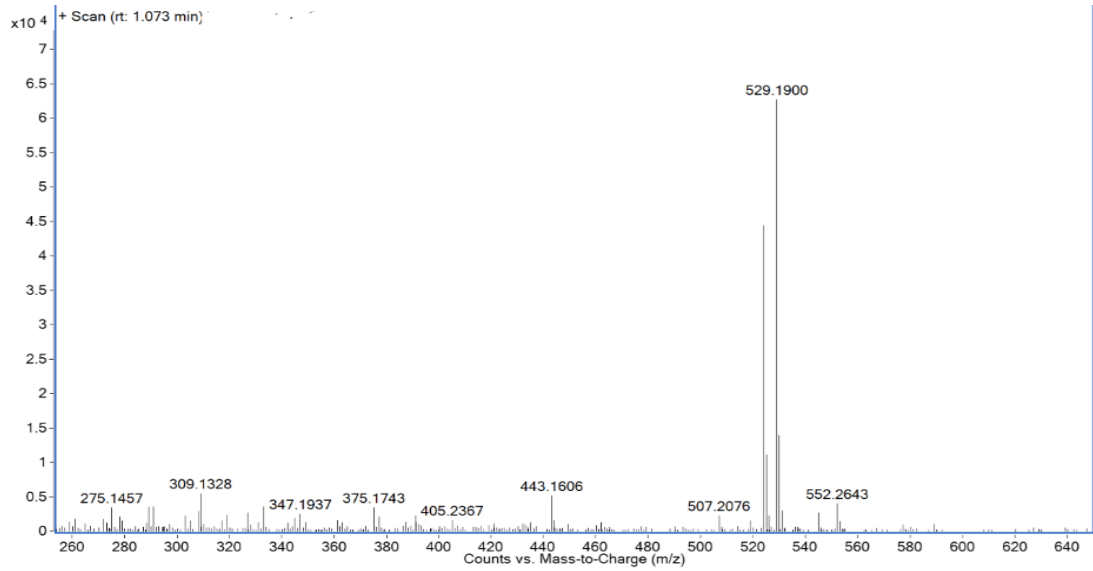


25.6. Phổ NOESY của hợp chất PT25

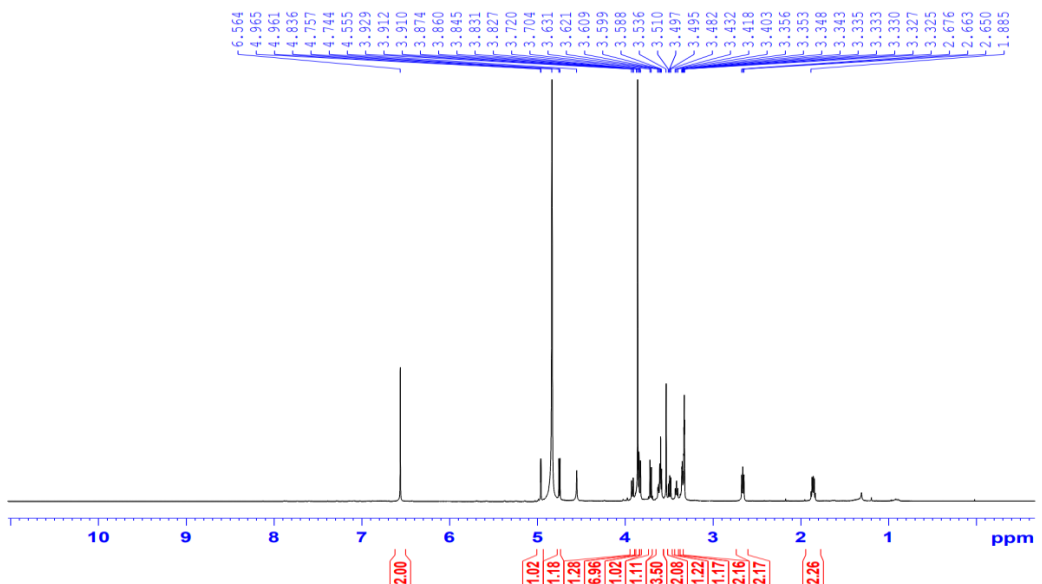


26. Phụ lục phổ hợp chất PT26

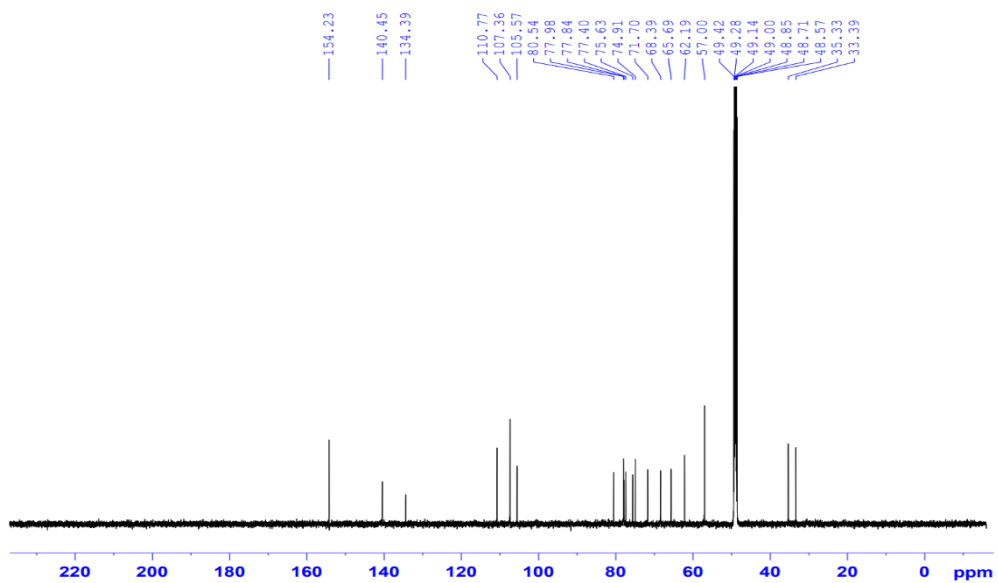
26.1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PT26



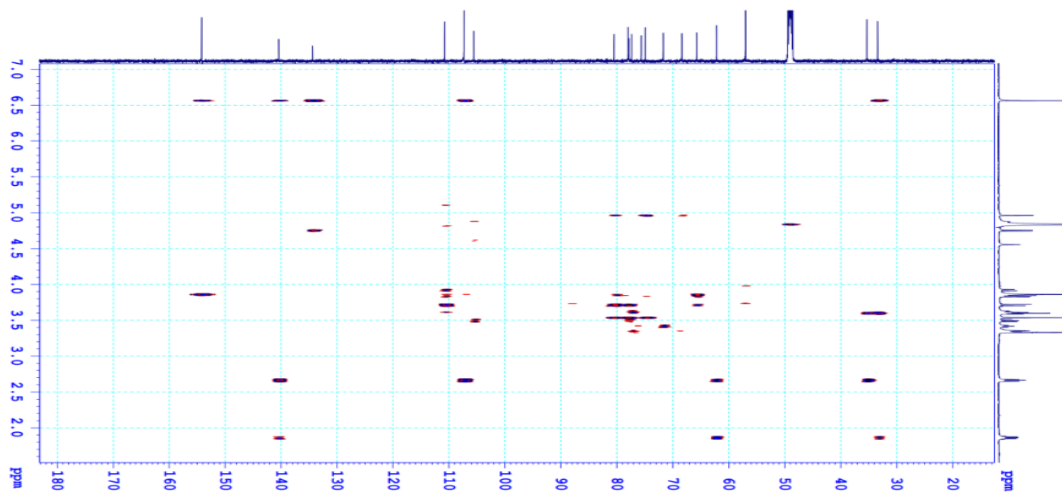
26.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT26



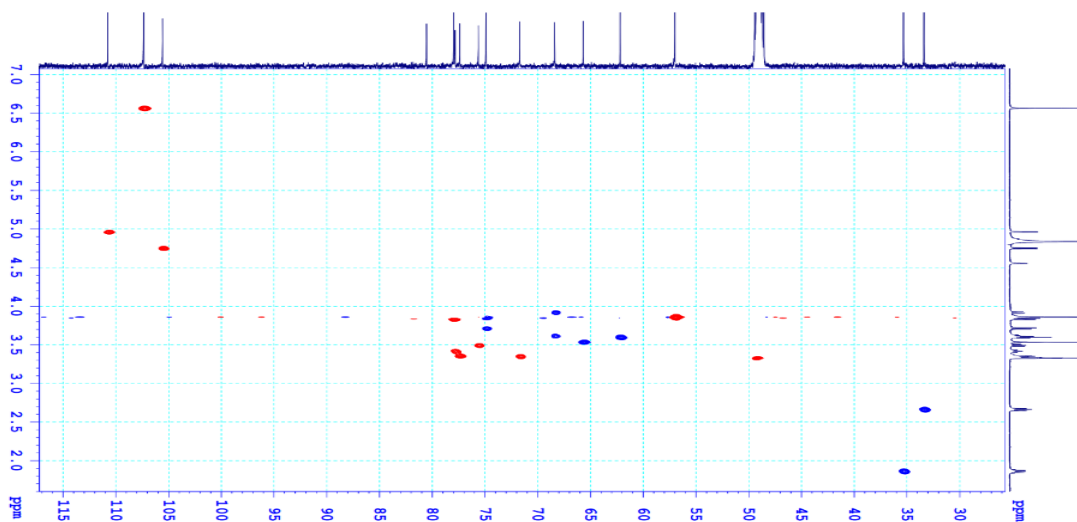
26.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT26



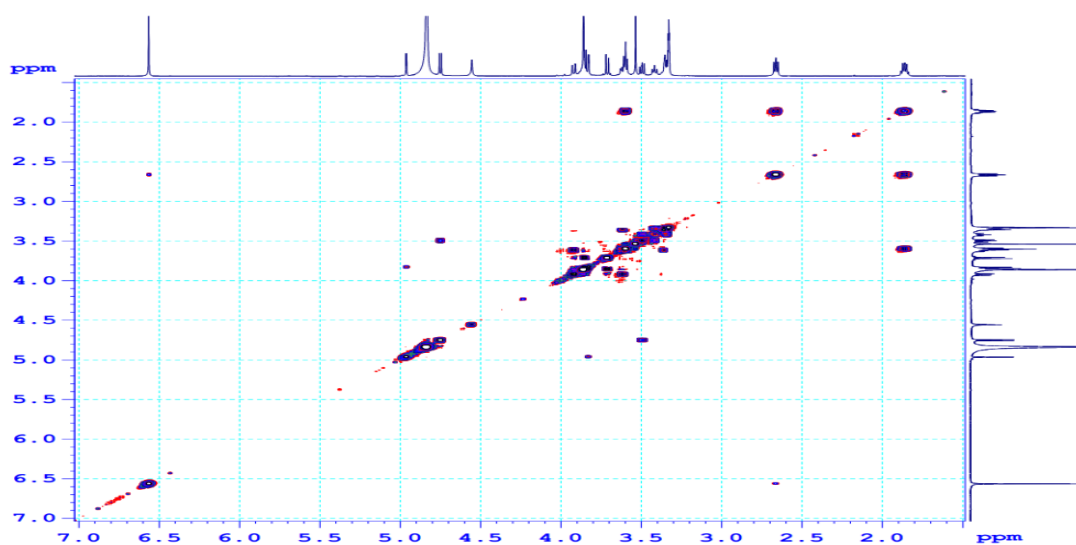
26.4. Phổ HMBC của hợp chất PT26



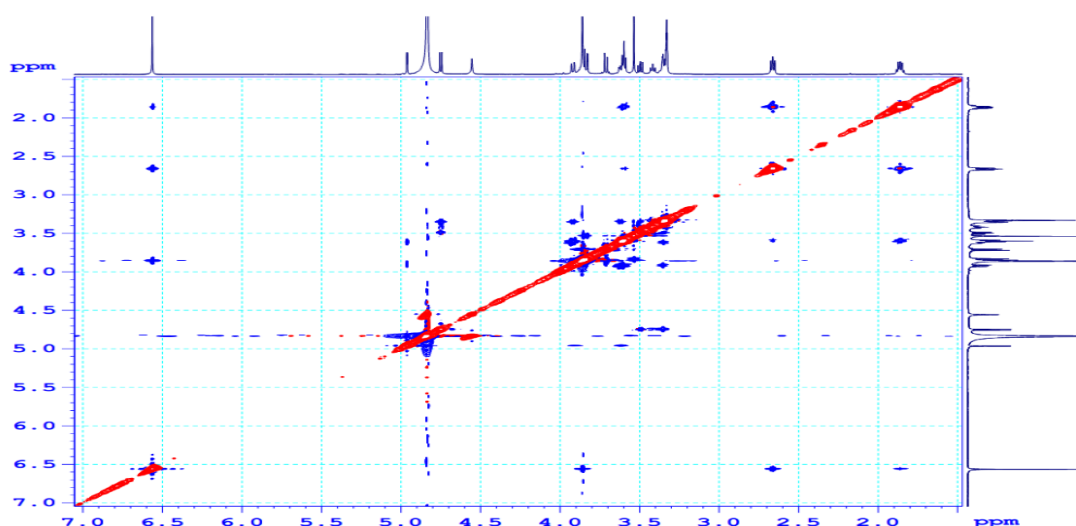
26.5. Phổ HSQC của hợp chất PT26



26.6. Phổ COSY của hợp chất PT26



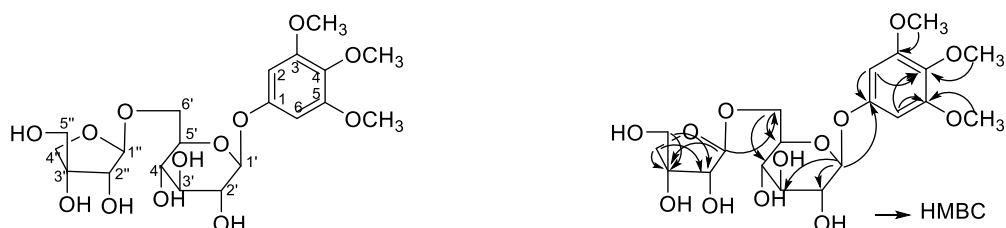
26.7. Phổ NOESY của hợp chất PT26



27. Phụ lục phổ hợp chất PT27

- Bột vô định hình không màu
- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS với sự xuất hiện các pic ion m/z 501,1592 $[M+Na]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}Na]^+$: 501,1579, $\Delta = +2,6$ ppm; m/z 496,2029 $[M+NH_4]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}NH_4]^+$ = 496,2025, $\Delta = +0.8$ ppm; m/z 479,1755 $[M+H]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}H]^+$ = 479,1759 $\Delta = -0.8$ ppm.
- Công thức phân tử $C_{20}H_{30}O_{13}$, $M = 478$
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 27.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC. Xem mục 27.2 - mục 27.5

27.1. Hợp chất PT27



Hình 27.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT27**

**Biện giải xác định cấu trúc:*

Hợp chất **PT27** có công thức phân tử $C_{20}H_{30}O_{13}$, $M = 478$ được xác định thông qua phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS với sự xuất hiện các pic ion m/z 501,1592 $[M+Na]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}Na]^+$: 501,1579, $\Delta = +2,6$ ppm; m/z 496,2029 $[M+NH_4]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}NH_4]^+ = 496,2025$, $\Delta = +0.8$ ppm; m/z 479,1755 $[M+H]^+$, $[C_{20}H_{30}O_{13}H]^+ = 479,1759$ $\Delta = -0.8$ ppm.

Phổ 1H NMR của hợp chất này xuất hiện tín hiệu proton vòng thơm tại δ_H 6,48 có cường độ tích phân 2H, dạng pic singlet cho thấy đây là 2 proton thơm của một vòng benzene thế 1,3,4,5 đối xứng. Ba nhóm methoxy tương ứng với hai tín hiệu singlet tại δ_H 3,84 (6H) và δ_H 3,73 (3H) cho thấy ba nhóm này được thế vào vòng thơm tại các vị trí C-3,4,5 để tạo nên vòng thơm đối xứng trục bậc hai. Điều này còn được khẳng định rõ ràng bằng việc xuất hiện chỉ có 4 tín hiệu C tại δ_C 155,9, 154,8, 135,0 (3 x C) và 96,5 (CH), trong đó carbon tại 154,8 có cường độ cao gấp đôi C bậc bốn khác được gán cho C-3 và C-5, nơi có hai nhóm methoxy gắn vào. Các tương tác HMBC của các tín hiệu proton methoxy tại δ_H 3,84 với carbon tại δ_C 154,8, của proton tại δ_H 3,73 với carbon tại δ_C 135,0 rõ ràng khẳng định ba nhóm methoxy đã gắn vào C-3,4,5. Ngoài ra, trên phổ NMR còn khẳng định sự có mặt của hai phân tử đường, trong đó có một đường glucose và một đường apiose. Các tín hiệu carbon tại δ_C 103,2, 74,9, 77,9, 71,6, 77,0, (5 x CH), 68,7 (CH₂) có tương tác HSQC với các proton tương ứng tại δ_H 4,75 (d, $J = 7,8$ Hz), 3,43 (dd, $J = 9,0, 7,8$ Hz), 3,46 (dd, $J = 9,0, 9,0$ Hz), 3,35 (dd, $J = 9,0, 9,0$ Hz), 3,60 (m), và 3,62/4,06. Trong khi đó các proton tại δ_H 5,60 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 3,89 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 3,97 và 3,77 (d, $J = 9,6$ Hz), và 3,56 (2H, s) lần lượt có tương tác HMBC với carbon tại δ_C 110,9, 77,9, 74,9 và 65,4. Độ dịch chuyển hóa học của carbon C-6 glc khá cao (δ_C 68,7) chứng tỏ sự hình thành liên kết glycoside tại vị trí carbon này. Điều này còn được chứng minh qua tương tác HMBC rất rõ giữa H-1 api với C-6 glc và ngược lại giữa H-6 glc với C-1 api. Các dữ liệu phổ NMR của hợp chất này hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu phổ tương ứng đã công bố cho hợp chất 3,4,5-

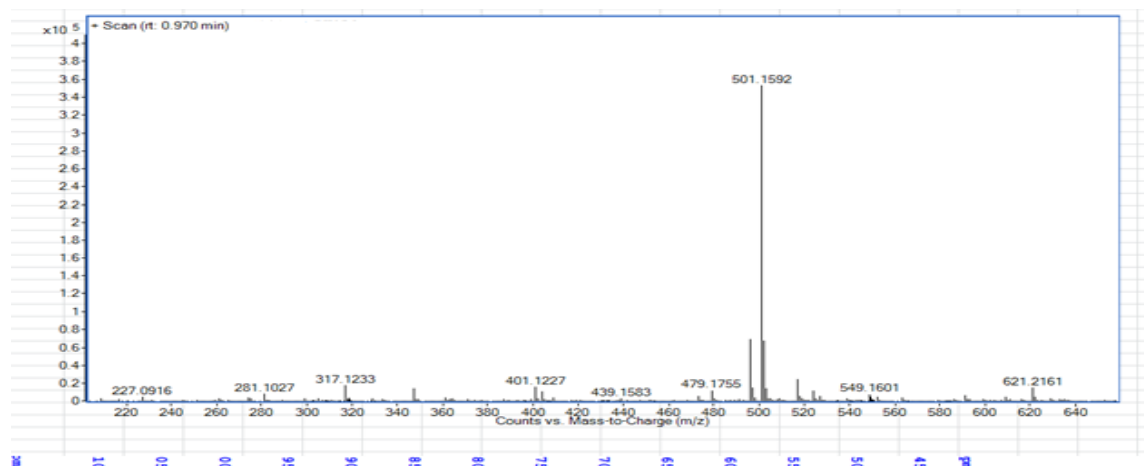
trimethoxyphenol 1-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, hay còn gọi là kelampayoside A [112].

Bảng 27.1. Phổ NMR của hợp chất **PT27** và chất so sánh *kelampayoside A*

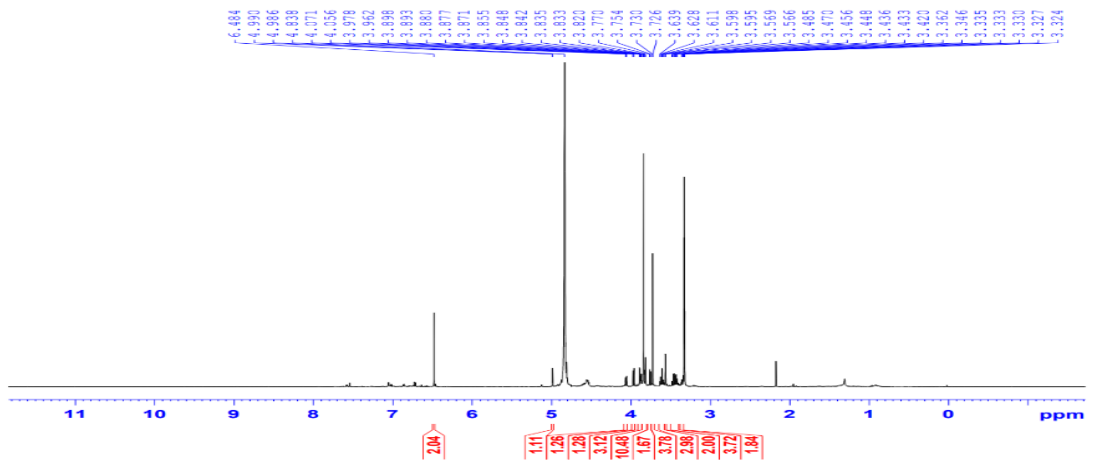
C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J = Hz)
1	134,6	155,9	-
2	96,4	96,5	6,48 (1H, s)
3	154,8	154,8	-
4	156,0	135,0	-
5	154,8	154,8	-
6	96,4	96,5	6,48 (1H, s)
1'	103,2	103,2	4,75 (1H, d, 7,8)
2'	74,9	74,9	3,43 (1H, dd, 9,0, 7,8)
3'	77,9	77,9	3,46 (1H, dd, 9,0, 9,0)
4'	71,6	71,6	3,35 (1H, dd, 9,0, 9,0)
5'	77,0	77,0	3,60 (1H, m)
6'	68,8	68,7	3,62 (1H, dd, 12,0, 5,0) 4,06 (1H, dd, 12,0, 1,2)
1''	110,9	110,9	5,00 (1H, d, 2,4)
2''	77,9	77,9	3,89 (1H, d, 2,4)
3''	80,5	80,5	-
4''	74,9	74,9	3,97 (1H, d, 9,6) 3,77 (1H, d, 9,6)
5''	65,4	65,4	3,56 (2H, s)
2xOCH ₃	56,7	56,7	3,84 (6H, s)
OCH ₃	61,2	61,2	3,73 (3H, s)

a) CD₃OD, b) 125 MHz, c) 500 MHz, δ_C của *kelampayoside A* [112]

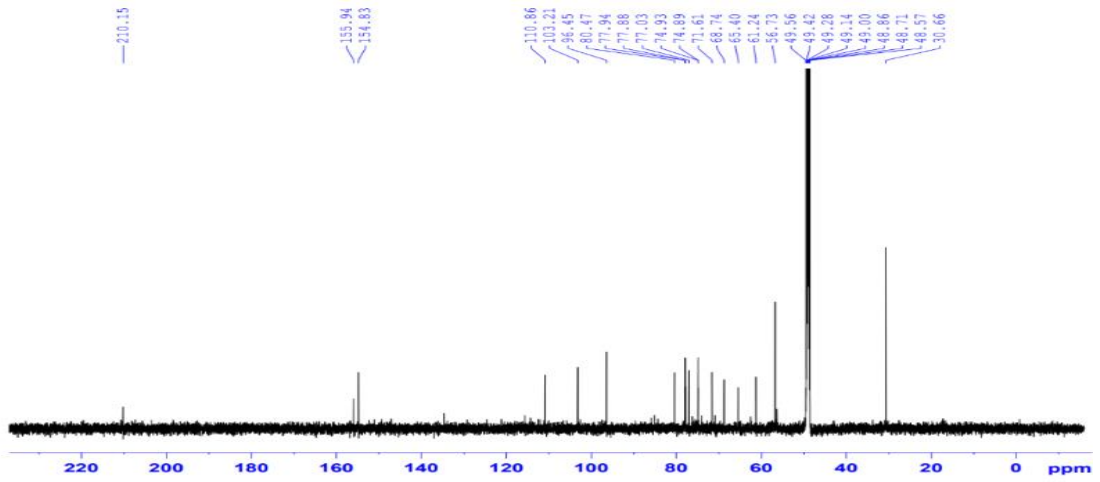
27.2. Phổ HR – ESI - MS của hợp chất **PT27**



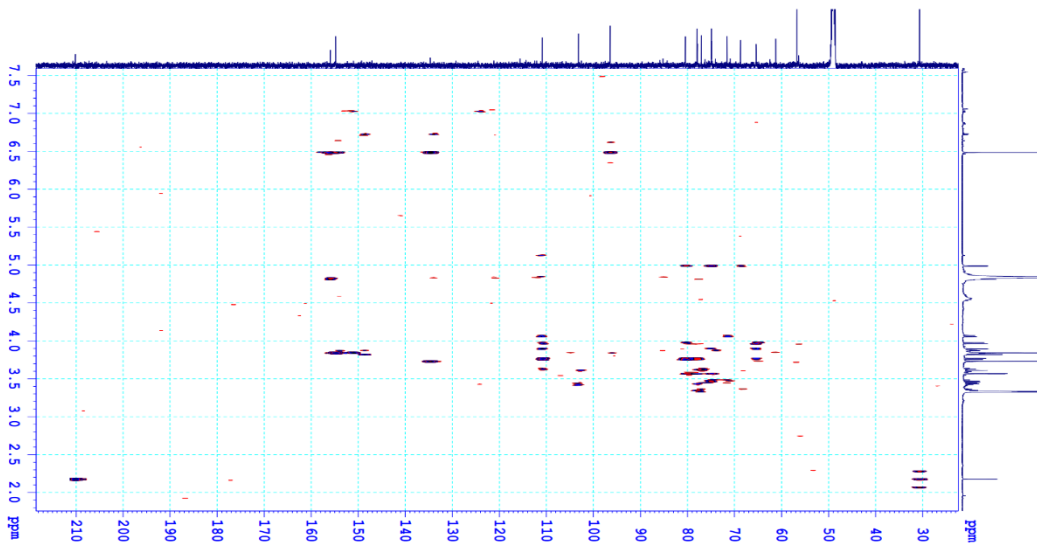
27.3. Phổ ^1H NMR của hợp chất PT27



27.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất PT27



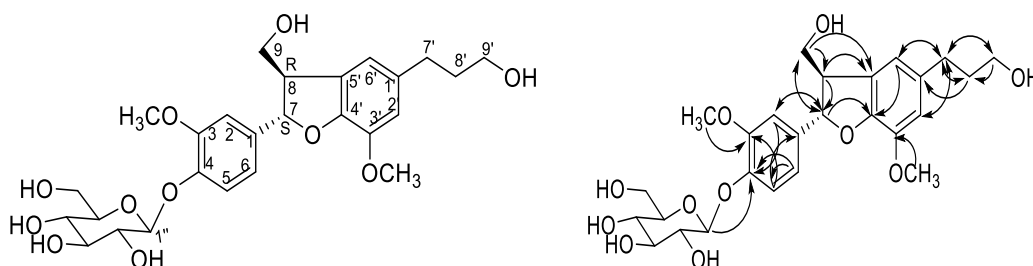
27.5. Phổ HMBC của hợp chất PT27



28. Phụ lục phổ hợp chất PT28

28.1. Hợp chất PT28

- Bột vô định hình không màu
- Công thức phân tử $C_{26}H_{34}O_{11}$, $M = 522$
- Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR: Xem Bảng 28.1
- Các phổ HR-ESI-MS, 1H và ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC Xem mục 28.2 - mục 28.5



Hình 28.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất **PT28**

*Biện giải xác định cấu trúc:

Các phổ NMR của hợp chất **PT28** khá tương tự với các phổ tương ứng của hợp chất **PT24**, cho thấy đây cũng là một hợp chất neolignan glycoside. Điểm khác biệt rõ nhất đó là tín hiệu singlet (2H) của vòng thơm trên phổ của **PT24** không còn nữa mà đã được thay thế bằng các tín hiệu phù hợp hoàn toàn với một vòng thơm thế 1,3,4. Đó là ba tín hiệu proton tương tác với nhau kiểu hệ ABX tại δ_H 7,05 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ_H 7,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 6,95 (1H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz), đồng thời các tín hiệu này có tương tác HSQC với ba tín hiệu carbon đặc trưng tương ứng tại δ_C 111,2, 119,4 và 119,1. Phân tử đường glucose vẫn được xác định nối vào C-4 bởi sự có mặt của tương tác HMBC giữa proton anome tại 4,90 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) với C-4 (147,6), trong khi đó nhóm methoxy gắn vào C-3 do có tương tác HMBC của proton methoxy với C-3. Các dữ kiện phổ của hợp chất **PT28** được so sánh với các dữ kiện đã công bố cho hợp chất urolignoside cho thấy sự phù hợp hoàn toàn. Việc gán các giá trị phổ NMR được thực hiện nhờ phổ NMR hai chiều HSQC và HMBC. Đặc biệt các kết quả phân tích phổ HMBC cho thấy cấu trúc của hợp chất **PT28** chính xác là urolignoside, một hợp chất neolignane glycoside[113].

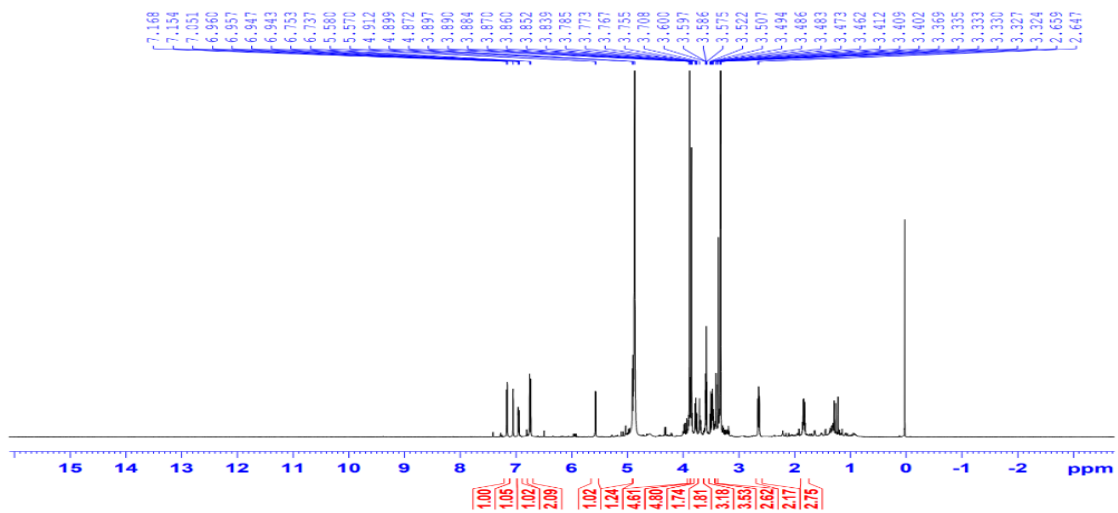
Bảng 28.1. Phổ NMR của hợp chất **PT28** và chất so sánh urolignoside

C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	137,2	138,4	
2	114,3	111,2	7,05 (1H, d, 2,0)
3	145,4	151,0	-

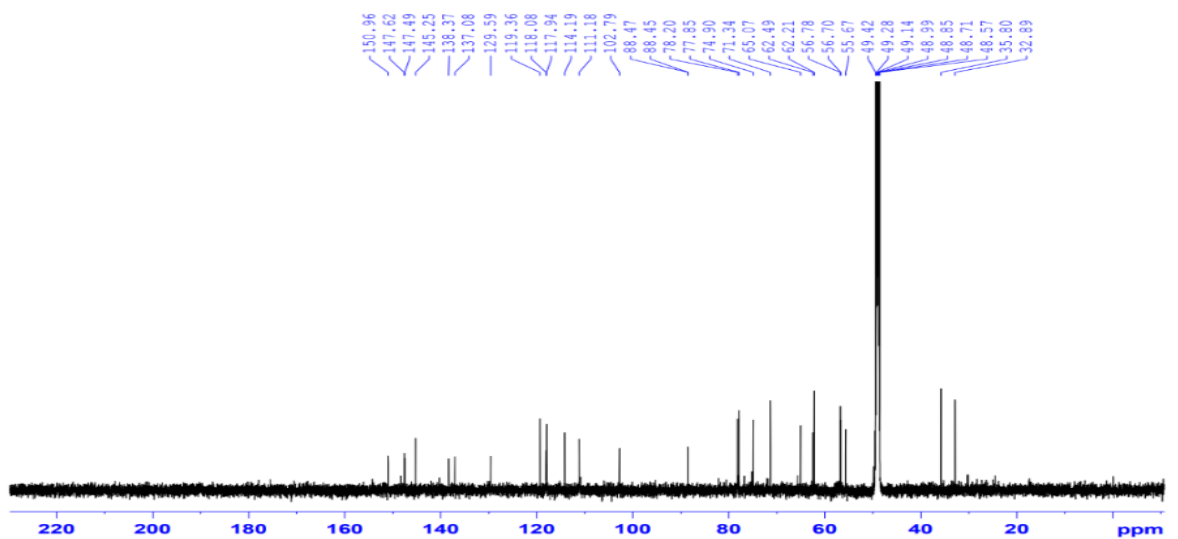
4	147,7	147,6	-
5	129,7	119,4	7,16 (1H, d, 8,0)
6	118,2	118,1	6,95 (1H, dd, 8,0, 2,0)
7	88,6	88,5	5,58 (1H, d, 6,0)
8	55,8	55,7	3,47 (1H, m)
9	62,4	65,1	3,87 (1H, dd, 11,4, 5,0) 3,77 (1H, dd, 11,4, 5,0)
1'	138,5	137,1	-
2'	111,4	114,2	6,75 (1H, s)
3'	151,1	145,3	-
4'	147,6	147,5	-

a)¹CD₃OD, b)¹²⁵ MHz, c)⁵⁰⁰ MHz, δ_c urolignoside [113].

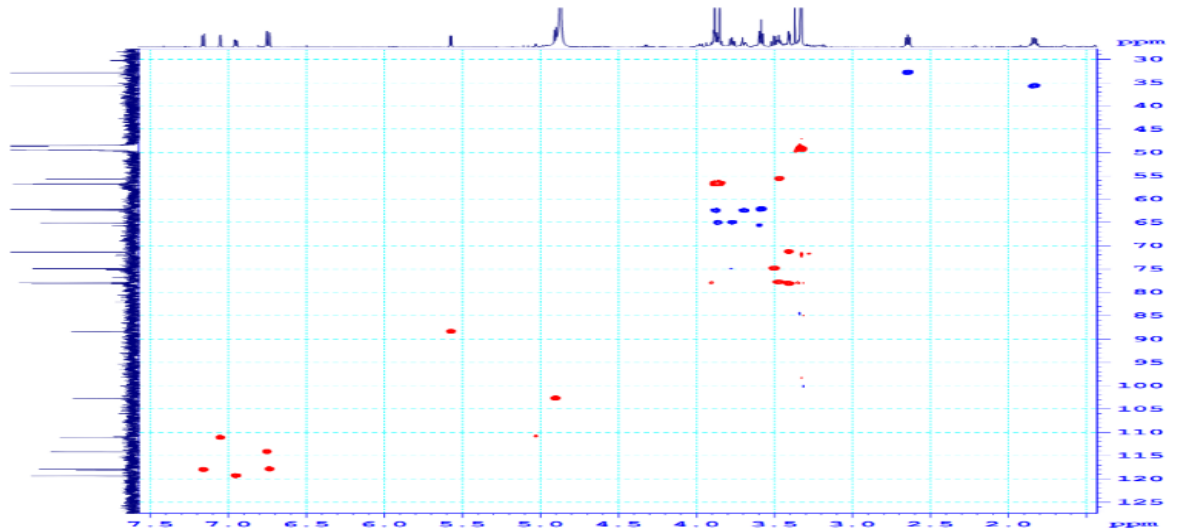
28.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất PT28



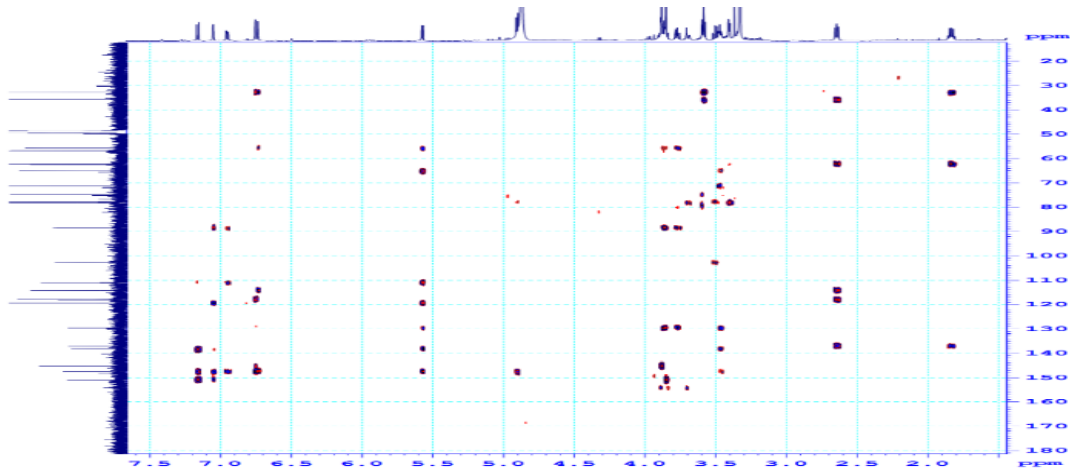
28.3. Phổ ¹³C NMR của hợp chất PT28



28.4. Phổ HMBC của hợp chất PT28



28.5. Phổ HSQC của hợp chất PT28



29. Quy trình thử nghiệm *invitro* xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid

- Gan chuột được tách, nghiền và đồng thể hóa trong dung dịch đệm $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH=7,4) ở nhiệt độ 0-4°C theo tỉ lệ gan chuột: dung dịch đệm là 1:10.
- Cứ 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ khác nhau thêm vào 1 ml dịch đồng thể, thêm 0,1 ml hệ Fenton (FeSO_4 0,1 mM: H_2O_2 15mM theo tỉ lệ 1:1) vào 0,8 ml dung dịch đệm $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH=7,4). Ủ hỗn hợp thu được trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 37°C.
- Cho vào 1 ml tricloacetic acid 10% để dừng phản ứng. Sau đó cho vào máy li tâm (12000 vòng/ 5 phút).

- Cho 1 ml thiobarbituric acid 0,8% phản ứng với dịch trong thu được (theo tỉ lệ 2:1), ủ 15 phút ở 100°C. Sau đó làm lạnh và tiến hành đo quang ở bước sóng $\lambda = 532 \text{ nm}$.

Sử dụng Trolox làm chất đối chứng dương.

- Kết quả được tính theo biểu thức:

$$\% \text{ ức chế} = [(OD_C - OD_T)/OD_C] \times 100$$

OD_C : Mật độ quang học của giếng chứng không chứa mẫu thử

OD_T : Mật độ quang học của mẫu thử

30. Quy trình thử nghiệm *invitro* xác định khả năng ức chế sản sinh NO

- Đưa vào đĩa 96 giếng tế bào RAW 264,7 nồng độ 2×10^5 tb/giếng (ở 37°C và 5% CO₂) trong 24h.
- Sau đó thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.
- Ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau (trong thời gian 2h) trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 µg/ml) trong 24h.
- Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G-Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/ml.
- Bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA) để xác định Nitrite (NO₂⁻). Cụ thể là, 100 µl môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µl Griess reagent: 50 µl of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µl 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.
- Ủ hỗn hợp này trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ phòng, sử dụng máy microplate reader để xác định hàm lượng nitrite (đo ở bước sóng 540nm).
- Dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ để xác định hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu theo biểu thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}}/\text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Lặp lại 3 lần, sử dụng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4 để tính giá trị IC₅₀.

31. Quy trình thử nghiệm *invitro* xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT

- Lấy 10 µl chất thử cho vào các giếng để có nồng độ tương tự nồng độ của thí nghiệm NO.

- Cho tiếp vào các giếng đã có chất thử 190 μ l tế bào (đã điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp). Giếng làm đối chứng chứa dung môi DMSO 1%. Để đĩa nuôi cấy trong tủ ấm CO₂ trong thời gian 24 giờ (37°C, 5% CO₂).
- Sau 24 giờ cho vào mỗi giếng 10 μ l MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Loại bỏ môi trường, lấy 50 μ l (DMSO) 100% hòa tan tinh thể formazan.
- Tiến hành đo quang ở bước sóng 540 nm
- Xác định lượng tế bào sống sót theo biểu thức:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})}$$