

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Hải Ninh

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ
HOẠT TÍNH ỨC CHẾ NO CỦA BA LOÀI *Syzygium
cerasiforme* (Blume) Merr. & L.M.Perry, *Syzygium bullockii*
(Hance) Merr. & L.M.Perry và *Syzygium attopeuense*
(Gagnep.) Merr. & L.M.Perry Ở VIỆT NAM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC
Mã số: 9.44.01.14

Hà Nội - 2024

Công trình được hoàn thành tại Học Viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học

Người hướng dẫn 1: *GS.TS. Nguyễn Văn Tuyền, Học viện Khoa học
và Công nghệ.*

Người hướng dẫn 2: *PGS.TS. Phan Văn Kiệt, Viện Hoá sinh biển.*

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp
Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm
Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 9 giờ 00, ngày 02 tháng
02 năm 2024.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Ngày nay, mặc dù Y học hiện đại phát triển mạnh mẽ song Y học cổ truyền vẫn có vai trò quan trọng, là phương thức chữa bệnh được nhiều người tìm đến. Nghiên cứu tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học đã và đang nhận được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Trong những năm gần đây, rất nhiều công trình nghiên cứu về cây thuốc của hệ thực vật Việt Nam đã được thực hiện và có những đóng góp quan trọng vào việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

Chi *Syzygium* thuộc họ Sim (Myrtaceae) được biết đến là một chi thực vật có hoa. Chi này bao gồm khoảng hàng nghìn loài, nơi sống của chi này trải rộng từ Châu Phi, Madagascar, Đông Nam Á, và Thái Bình Dương. Chi này có độ đa dạng sinh học cao, có những loài còn chưa được mô tả về mặt phân loại thực vật. Hầu hết các loài là cây thường xanh và cây bụi.

Các loài thuộc chi *Syzygium* đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu. Đặc biệt, các nhà khoa học chủ yếu tập trung vào loài *Syzygium aromaticum*. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của loài này đã chỉ ra sự có mặt của các phenolic, terpenoid, flavonoid, sterol v.v... Các hợp chất này thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, kháng nấm, kháng khuẩn và tăng cường miễn dịch mạnh. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học về chi này ở Việt Nam. Mặt khác, trong chương trình sàng lọc tìm kiếm các hoạt chất kháng viêm từ thực vật Việt Nam, dịch chiết methanol của ba loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii*, *S. attopeuense* đều thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO khá cao với giá trị ức chế trong khoảng 73%-78% ở nồng độ 100 µg/mL. Vì vậy, chúng tôi đề xuất đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính ức chế NO

của ba loài *Syzygium cerasiforme* (Blume) Merr. & L.M.Perry, *Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M.Perry và *Syzygium attopeuense* (Gagnep.) Merr. & L.M.Perry ở Việt Nam” giúp định hướng nghiên cứu, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chi *Syzygium* ở Việt Nam theo hướng kháng viêm.

Mục tiêu của luận án:

Nghiên cứu để làm rõ thành phần hóa học chủ yếu của ba loài: *Syzygium cerasiforme* (Blume) Merr. & L.M.Perry, *Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M.Perry và *Syzygium attopeuense* (Gagnep.) Merr. & L.M.Perry thu hái ở Việt Nam, đồng thời đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO đối với tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS trên mô hình *in vitro* của các hợp chất phân lập được.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

1. Phân lập các hợp chất chính từ ba loài *Syzygium cerasiforme*, *Syzygium bullockii* và *Syzygium attopeuense*.
2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất đã phân lập được.
3. Đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên mô hình *in vitro* của các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chi *Syzygium*:

1.1.1. Thực vật học chi *Syzygium*

Chi *Syzygium* (chi Trâm) thuộc họ Myrtaceae (Sim, Đào Kim nương hay Hương Đào), bộ Myrtales (Đào Kim nương), lớp Magnoliopsida (Hai lá mầm), ngành Magnoliophyta (Mộc lan). Phần lớn các loài *Syzygium* là cây thân gỗ và cây bụi thường xanh. Trên thế giới theo trang world flora online chi *syzygium* có tới 1217 loài

còn ở Việt Nam, theo Nguyễn Tiến Bân và cộng sự, Việt Nam có đến 70 loài *Syzygium*.

1.1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học chi *Syzygium*

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy các loài thuộc chi *Syzygium* rất giàu các chất chuyển hóa thứ cấp bao gồm flavonoid, terpenoid, lignan, alkyl phloroglucinol, tanin, và dẫn chất chromone. Trong đó, nhóm hợp chất flavonoid và dẫn chất glycoside của chúng cũng được phân lập nhiều nhất trong các loài thuộc chi *Syzygium*. Nhóm hợp chất terpenoid cũng chiếm số lượng khá lớn chỉ sau flavonoid. Ngoài ra còn các hợp chất chromone glycoside, tanin và phenolic.

1.1.3. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học chi *Syzygium*

Các nghiên cứu cho thấy dịch chiết cũng như các hợp chất phân lập được từ một số loài thuộc chi *Syzygium* đã thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, gây độc tế bào ung thư, chống đái tháo đường, và hoạt tính kháng viêm đáng chú ý.

1.1.4. Tình hình nghiên cứu về chi *Syzygium* ở Việt Nam

Hiện nay, rất ít nghiên cứu về chi *Syzygium* và chưa có nghiên cứu nào đưa ra dữ liệu xác định cấu trúc hoá học và hoạt tính sinh học của các hợp chất trong ba loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii* và *S. attopeuense* ở Việt Nam.

1.2. Giới thiệu về loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii* và *S. attopeuense*

Ba loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii* và *S. attopeuense* có đặc điểm thực vật được mô tả trong và phân bố ở các tỉnh miền Bắc, miền Trung và miền Nam. Ba loài này hiện mới được sử dụng trong y học cổ truyền ở Việt Nam.

1.3. Giới thiệu về hoạt tính kháng viêm

Hoạt tính kháng viêm được nghiên cứu dựa trên sự hiểu biết về quá trình viêm, những biến đổi trong viêm, ảnh hưởng của phản ứng viêm đối với cơ thể và đặc biệt là vai trò của các yếu tố IL6, TNF- α , NO và COX-2 trong viêm.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng tiến hành nghiên cứu bao gồm lá cây *S. cerasiforme* thu hái ở Vĩnh Phúc vào tháng 4 năm 2022, lá và cành cây *S. bullockii* thu hái ở Vĩnh Linh, Quảng Trị vào tháng 7 năm 2022 và lá và cành cây *S. Attopeuense* thu hái ở Vĩnh Linh, Quảng Trị vào tháng 9 năm 2022. Các mẫu này đều được giám định bởi các nhà khoa học và các đơn vị uy tín tại Việt Nam. Các mẫu tiêu bản được lưu tại Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đề tài luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu bao gồm:

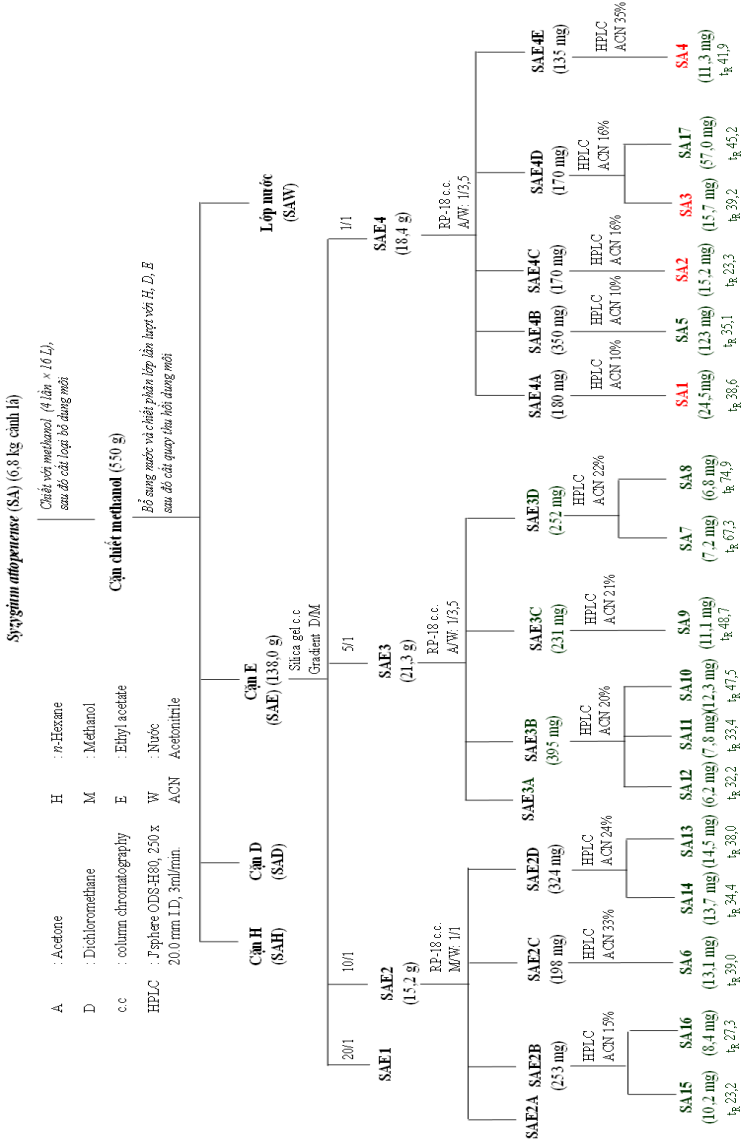
- **Phương pháp phân lập các hợp chất:** Kết hợp các phương pháp sắc ký bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

- **Phương pháp xác định cấu trúc:** Sử dụng các phương pháp phổ hiện đại bao gồm phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) 1 chiều và 2 chiều, phổ lưỡng sắc tròn (CD), phổ hồng ngoại (IR), độ quay cực ($[\alpha]_D$), đo điểm chảy và phương pháp xác định đường.

- **Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO:** Sử dụng phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS sau khi đã kiểm tra độc tính tế bào bằng phương pháp so màu.

3.1.3. Loài *S. attopeuense*

17 hợp chất được phân lập từ loài *S. attopeuense* theo sơ đồ sau:



Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài *S. attopeuense*

3.2. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập được

54 hợp chất phân lập được từ ba loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii* và *S. attopeuense* được trình bày các thông số vật lý như dạng tồn tại, màu sắc, nhiệt độ nóng chảy, độ quay cực riêng và các dữ liệu phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), công thức phân tử, khối lượng phân tử (M).

3.3. Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất phân lập được

Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất phân lập được từ các loài được tổng hợp thành các bảng sau:

- Từ loài *S.cerasiforme* với 20 hợp chất (SL1-SL20)

Bảng 3.1. Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất SL1-SL20

Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)	Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)
SL1	100,00	12,28 ± 1,15	SL11	98,27	51,72 ± 2,85
SL2	99,25	8,52 ± 1,62	SL12	98,67	45,28 ± 2,18
SL3	97,09	7,68 ± 0,87	SL13	99,12	33,38 ± 0,78
SL4	99,56	42,27 ± 1,29	SL14	98,13	51,09 ± 2,13
SL5	99,11	45,13 ± 2,16	SL15	97,66	54,17 ± 2,34
SL6	99,25	9,67 ± 0,57	SL16	96,03	39,54 ± 1,32
SL7	99,24	86,52 ± 2,98	SL17	95,77	6,98 ± 0,57
SL8	99,12	53,71 ± 1,23	SL18	95,11	33,17 ± 0,78
SL9	98,26	45,12 ± 0,98	SL19	95,23	25,51 ± 1,02
SL10	98,67	6,69 ± 0,34	SL20	98,12	58,12 ± 2,34
L-NMMA ^a	90,83	32,5 ± 1,00			

^{a)}Đối chứng dương, [#] ở nồng độ 100 μM

- Từ loài *S. bullockii* với 17 hợp chất (SP1-SP17)

Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất SP1-SP17

Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)	Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)
SP1	94,32	11,58 ± 0,71	SP10	95,78	1,42 ± 0,19
SP2	94,85	13,61 ± 2,55	SP11	91,25	58,08 ± 2,38
SP3	96,04	6,93 ± 0,41	SP12	94,85	13,70 ± 1,25
SP4	97,85	7,09 ± 0,62	SP13	97,58	8,59 ± 0,68
SP5	98,86	7,20 ± 0,51	SP14	94,46	5,71 ± 0,61
SP6	97,41	7,91 ± 0,95	SP15	98,98	6,47 ± 0,69
SP7	81,57	1,89 ± 0,29	SP16	94,15	4,23 ± 0,66
SP8	92,39	9,06 ± 0,55	SP17	94,32	11,30 ± 0,14
SP9	97,43	11,95 ± 0,82	L-NMMA ^a	86,76	33,8 ± 2,6

^a đối chứng dương, [#] ở nồng độ 100 μM

- Từ loài *S. attopeuense* với 17 hợp chất (SA1-SAI7)

Bảng 3.3. Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất SAI-SAI7

Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)	Hợp chất	% tế bào sống sót [#]	IC ₅₀ (μM)
SA1	94,21	18,37 ± 1,38	SA10	97,01	95,14 ± 3,67
SA2	89,68	31,23 ± 2,18	SA11	99,12	> 100
SA3	88,38	35,12 ± 2,53	SA12	97,22	> 100
SA4	93,67	>100	SA13	95,71	98,46 ± 3,51
SA5	87,17	34,89 ± 2,13	SA14	99,26	> 100
SA6	77,22	28,24 ± 1,79	SA15	97,72	78,35 ± 1,66
SA7	94,59	88,55 ± 1,78	SA16	97,72	76,39 ± 2,41
SA8	98,21	89,85 ± 2,08	SA17	98,32	> 100
SA9	99,72	> 100	D*	97,88	15,37 ± 1,42

D* dexamethasone là chất đối chứng dương, [#] ở nồng độ 100 μM

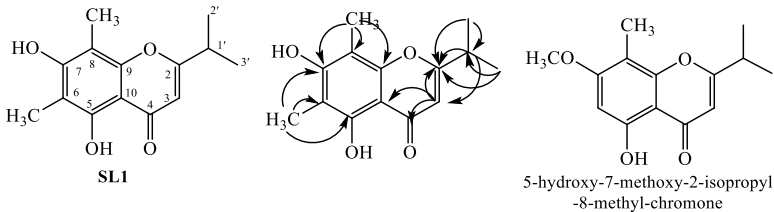
CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

4.1. Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của loài *S. cerasiforme*

4.1.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *S. cerasiforme*

4.1.1.1. Hợp chất SL1: 5,7-Dihydroxy-2-isopropyl-6,8-dimethyl-4H-chromen-4-one (hợp chất mới)

Hợp chất **SL1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt.



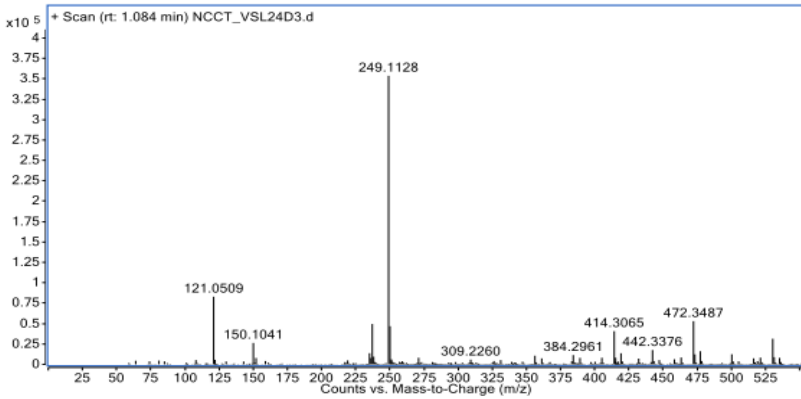
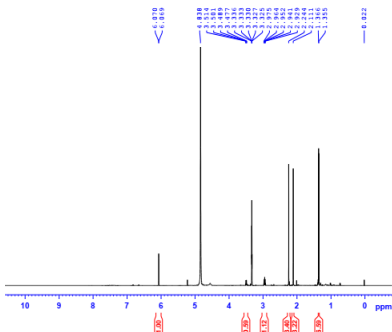
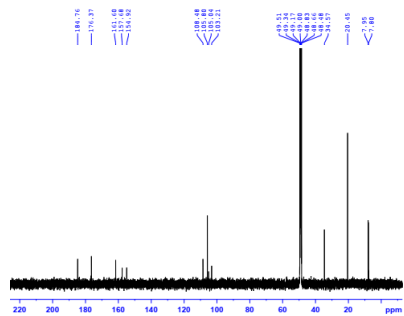
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **SL1**

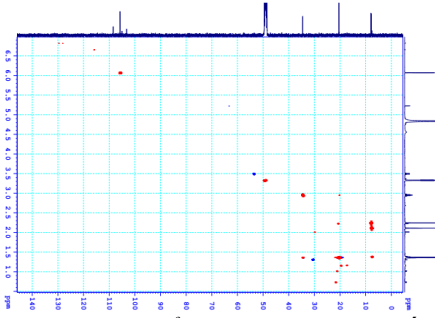
Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **SL1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 249,1128 $[M+H]^+$ (phổ ion dương) và m/z 247,0975 $[M-H]^-$ (phổ ion âm), kết hợp với dữ kiện phổ ^{13}C NMR và HSQC cho phép xác định công thức phân tử $C_{14}H_{16}O_4$. Phổ ^{13}C NMR và HSQC cho thấy có tín hiệu cộng hưởng của 14 nguyên tử carbon trong đó có 4 nhóm methyl, 2 nhóm methine và 8 carbon bậc 4. Hai proton methine tại δ_H 6.07 (H-3) và δ_H 2.96 (H-1') có tương tác HSQC với carbon tương ứng là δ_C 105,8 và 34,6. Hai nhóm methyl xuất hiện dưới dạng tín hiệu đôi tại δ_H 1,36 (6H, d, $J = 6,6$ Hz) cùng với tín hiệu nhóm methine (δ_H 2,96, sept.) cho thấy sự có mặt của nhóm isopropyl. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **SL1** (Bảng 4.1) cho thấy có sự tương đồng với dữ liệu của hợp chất 5-hydroxy-7-methoxy-2-isopropyl-8-methylchromone. Do đó, có thể dự đoán hợp chất **SL1** có khung chromen-4-one.

Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất *SLI*

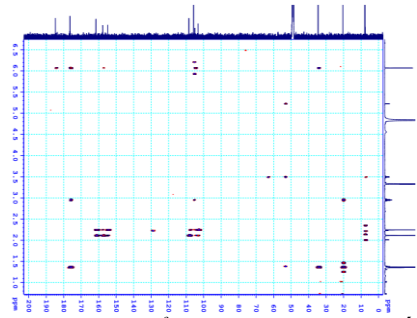
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, J = Hz)	C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, J = Hz)
2	176,4	-	9	154,9	-
3	105,8	6,07 (s)	10	105,0	-
4	184,8	-	1'	34,6	2,96 (sept., 6,6)
5	157,7	-	2'	20,5	1,36 (d, 6,6)
6	108,5	-	3'	20,5	1,36 (d, 6,6)
7	161,6	-	6-CH ₃	7,8	2,11 (s)
8	103,2	-	8-CH ₃	8,0	2,24 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b150MHz, ^c600MHz.

Hình 4.2. Phổ (+)-HR-ESI-MS của hợp chất *SLI*Hình 4.3. Phổ ¹H NMR của hợp chất *SLI*Hình 4.4. Phổ ¹³C NMR của hợp chất *SLI*



Hình 4.5. Phổ HSQC của hợp chất **SL1**

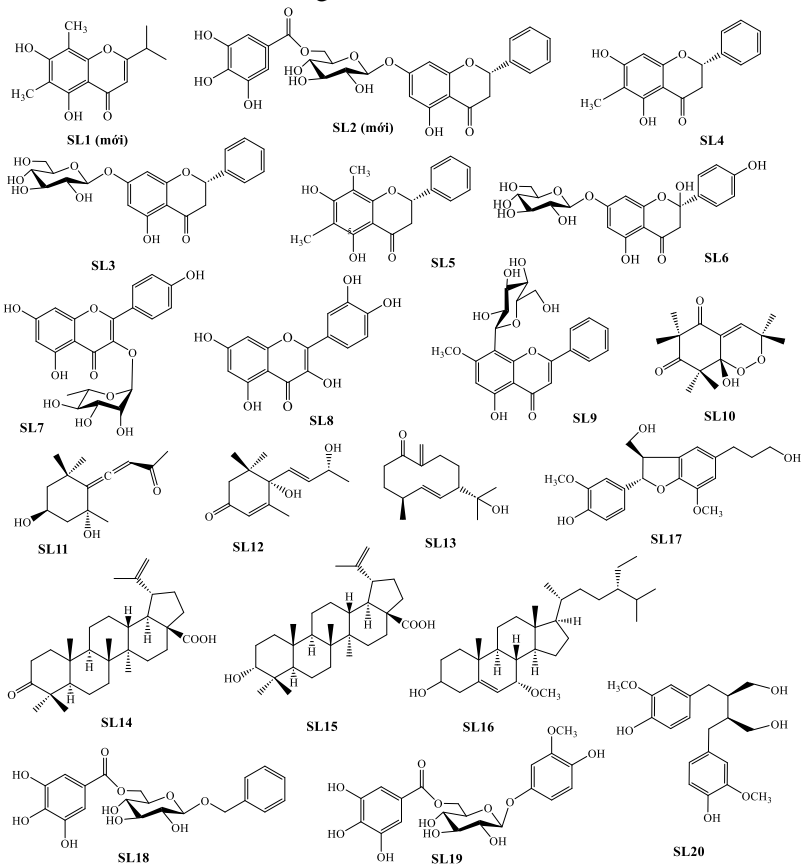


Hình 4.6. Phổ HMBC của hợp chất **SL1**

Phần nhánh isopropyl được xác định liên kết với C-2 thông qua phân tích dữ liệu phổ HMBC, với sự xuất hiện tương tác giữa proton H-2' và H-3' (δ_H 1,36) với C-2 (δ_C 176,4)/C-1' (δ_C 34,6), giữa H-1' (δ_H 2,96) với C-2 và C-3 (δ_C 105,8), và giữa H-3 (δ_H 6,07) với C-4 (δ_C 184,8)/C-2/C-1'. Hai nhóm methyl được xác định gắn với carbon C-6, C-8 và hai nhóm hydroxyl gắn vào C-5 và C-7 bằng các tín hiệu tương tác HMBC giữa các proton 6-CH₃ (δ_H 2,11) với C-5 (δ_C 157,7)/C-6 (δ_C 108,5)/C-7 (δ_C 161,6) và giữa proton của 8-CH₃ (δ_H 2,24) với C-7/C-8 (δ_C 103,2)/C-9 (δ_C 154,9). Từ những phân tích dữ liệu phổ ở trên, hợp chất **SL1** được xác định là 5,7-dihydroxy-2-isopropyl-6,8-dimethyl-4*H* chromen-4-one. Đây là một hợp chất mới.

Bằng việc phân tích kết hợp các dữ liệu phổ HR-ESI-MS, phổ NMR 1 chiều, 2 chiều, phổ CD tương tự đã xác định được trúc của 20 hợp chất phân lập được từ loài *S. cerasiforme*, trong đó có 2 hợp chất mới **SL1** và **SL2**. Hợp chất mới **SL1** (5,7-dihydroxy-2-isopropyl-6,8-dimethyl-4*H* chromen-4-one) có cấu trúc khung chromone và hợp chất **SL2** (5,7-dihydroxyflavanone 7-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl glucopyranoside) là một dẫn xuất galloyl glycoside của flavanone với điểm mới là nhánh galloyl được gắn thêm vào phần

đường. Cấu hình tuyệt đối của trung tâm lập thể C-2 được xác định là 2S thông qua dữ liệu phổ lưỡng sắc tròn CD. Cấu trúc **SL1**, **SL2** lần đầu tiên được tìm thấy từ loài *S. cerasiforme*. Các hợp chất đã biết **SL3-SL9** là các hợp chất thuộc nhóm flavonoid trong đó **SL3-SL6** là các hợp chất flavanone và dẫn chất glycoside của flavanone, các hợp chất **SL7**, **SL8** là các hợp chất có khung flavonol, **SL9** có khung flavonone. Ba hợp chất **SL14-SL16** có khung terpenoid. Các hợp chất còn lại thuộc các nhóm khung khác nhau.



Hình 4.34. Cấu trúc hoá học của các hợp chất **SL1-SL20**

4.1.2. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ loài *S. cerasiforme*

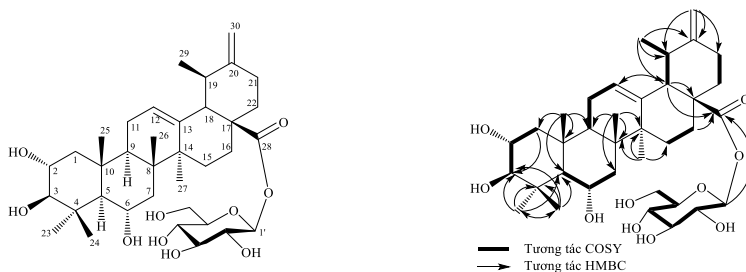
Kết quả Bảng 3.1 cho thấy, tất cả các hợp chất đều không thể hiện độc tính đáng kể trong thử nghiệm độc tính tế bào bằng phương pháp MTT. Hợp chất **SL1, SL2, SL5, SL6, SL10, SL17** có khả năng ức chế hiệu quả quá trình sản xuất NO trên dòng tế bào đã được hoạt hóa bằng LPS với nồng độ ức chế IC₅₀ trong khoảng 6,69 - 12,28 μM và **SL19** ức chế mức trung bình IC₅₀ 25,51 μM so với chất đối chứng dương L-NMMA với giá trị IC₅₀ 32,50 μM. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính ức chế yếu hơn với giá trị IC₅₀ trong khoảng từ 33,17-86,51 μM. Xét về sự liên quan giữa cấu trúc và tác dụng kháng viêm của các hợp chất phân lập được có thể đưa ra nhận định rằng những hợp chất flavanone có hoạt tính ức chế sự sản xuất NO đáng kể hơn so với các hợp chất flavone.

4.2. Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của loài *S. bullockii*.

4.2.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *S. bullockii*

4.2.1.2. Hợp chất **SP1: Syzybulloside A (2α,3β,6α-trihydroxyurs-12,20(30)-dien-28-oic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester)**

Hợp chất **SP1** thu được có dạng bột không màu. Phổ IR của hợp chất **SP1** đã cho thấy sự có mặt của các nhóm chức hydroxy (3401 cm⁻¹), carboxyl (1734 cm⁻¹), olefinic 1646 cm⁻¹) và ether 1070 cm⁻¹). Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của **SP1** xuất hiện pic ion giả phân tử m/z 683,3563 [M+Cl]⁻ (Δ = -0,6 ppm) kết hợp với dữ liệu phổ ¹³C NMR và HSQC cho phép xác định công thức phân tử của **SP1** là C₃₆H₅₆O₁₀.



Hình 4.34. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của **SP1**

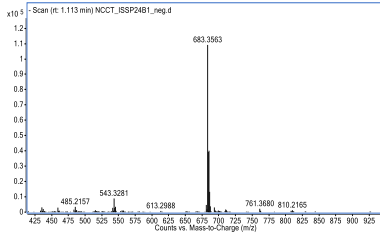
Bảng 4.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất **SP1**

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	47,9	0,94 (dd, 14,4, 9,5) <i>ax</i> 1,93 (dd, 14,4, 4,5) <i>eq</i>	19	38,4	2,46 (m)
2	69,1	3,63 (ddd, 10,0, 9,5, 4,5) <i>ax</i>	20	154,2	-
3	84,6	2,89 (d, 10,0) <i>ax</i>	21	33,2	2,25 (m), 2,37 (m)
4	41,0		22	39,7	1,67 (m), 1,92 (m)
5	61,3	1,01 (d, 10,5) <i>ax</i>	23	32,2	1,35 (s)
6	68,8	3,99 (ddd, 10,5, 10,5, 4,0) <i>ax</i>	24	17,5	1,04 (s)
7	45,5	1,60 (m), 1,64 (m)	25	18,0	1,09 (s)
8	42,0	-	26	19,1	0,93 (s)
9	48,4	1,61 (dd, 9,5, 5,5)	27	23,9	1,24 (s)
10	41,3	-	28	177,2	-
11	25,4	1,98 (m), 2,00 (m)	29	16,7	1,05 (d, 7,0)
12	127,4	5,31 (br t, 3,5)	30	105,5	4,71 (brs), 4,66 (brs)
13	138,8	-	1'	95,8	5,37 (d, 7,5)
14	43,6	-	2'	73,9	3,32 (dd, 9,0, 7,5)
15	29,2	1,18 (m), 2,03 (m)	3'	78,3	3,42 (t, 9,0)
16	25,2	1,90 (m), 2,31 (m)	4'	71,2	3,37 (t, 9,0)
17	49,5	-	5'	78,6	3,34 (m)
18	56,3	2,33 (d, 11,0)	6'	62,4	3,67 (dd, 12,0, 5,0) 3,81 (dd, 12,0, 2,0)

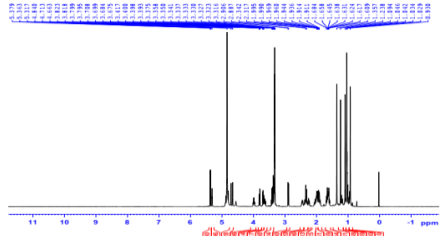
^ađo trong CD_3OD , ^b125MHz, ^c500M

Phổ 1H , ^{13}C NMR và HSQC của **SP1** đã cho thấy tín hiệu đặc trưng của một triterpene 5 vòng 6 cạnh và 6 carbon của một đơn vị đường hexose (Bảng 4.18). Dữ liệu phổ NMR của **SP1** khá giống với dữ liệu tương ứng của hợp chất syzygiumursanolide C (**SP4**) ngoại trừ sự xuất hiện tín hiệu của nhóm methyl thay thế cho nhóm hydroxymethylene tại C-23. Phần đường glucose liên kết với

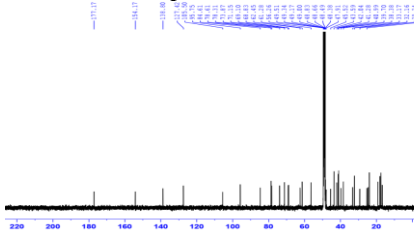
aglycone ở vị trí của carbon ketone (C-28) được xác định dựa vào tương tác trên phổ HMBC giữa proton anomer H-1' (δ_H 5,37) với C-28 (δ_C 177,2). Ba nhóm hydroxy được xác định là gắn với carbon ở C-2, C-3 và C-6 dựa vào tương tác HMBC giữa H-23 (δ_H 1,35)/H-24 (δ_H 1,04) với C-3 (δ_C 84,6)/C-4 (δ_C 41,0)/C-5 (δ_C 61,3) và tương tác COSY giữa các proton H-3 (δ_H 2,89)/H-2 (δ_H 3,63) và H-5 (δ_H 1,01)/H-6 (δ_H 3,99). Định hướng liên kết của các nhóm hydroxy được xác định thông qua hằng số tương tác và tương tác trong không gian giữa các proton trên phổ NOESY. Hằng số tương tác lớn $^3J_{HH} = 9,5$ Hz của H-2/H-3 và $^3J_{HH} = 10,5$ Hz của H-5/H-6 cho thấy các proton H-2/H-3 và H-5/H-6_{ax} có định hướng *trans/axial*. Tương tác trong không gian của các proton trên phổ NOESY giữa H_{ax}-2 (δ_H 3,63)/H₃-24 (δ_H 1,04), H-3 (δ_H 2,89)/H₃-23 (δ_H 1,35), H-3/H-5 (δ_H 1,01), H-6 (δ_H 3,99)/H₃-25 (δ_H 1,35) và H-6/H₃-26 (δ_H 0,93) đã xác định cấu hình β của H-2 và H-6 và cấu hình α của H-3. Các tương tác trên phổ NOESY nêu trên cho thấy liên kết *trans* giữa các vòng A/B, B/C của khung triterpene 5 vòng của khung ursane. Tương tác giữa H₃-27 (δ_H 1,24) với H-19 (δ_H 2,46) đã xác định 2 vòng D/E ghép với nhau kiểu *cis* và định hướng liên kết của 2 proton H-27 và H-19 là $\alpha/axial$. Dựa vào định hướng liên kết của của H-19 ($\alpha/axial$), proton H₃-29 được xác định là β -*equatorial*. Khi đó tương tác NOESY giữa H₃-29 với H-18 đã xác định H-18 định hướng β . Liên kết đường glycoside cũng được xác định là dạng β thông qua hằng số tương tác lớn $J = 7,5$ Hz của proton anomer tại δ_H 5,37 và hằng số tương tác giữa các proton carbinol trong phần đường bao gồm $J_{H-1'/H-2'} = 7,5$ Hz, $J_{H-2'/H-3'} = 9,0$ Hz, $J_{H-3'/H-4'} = 9,0$ Hz và $J_{H-4'/H-5'} = 9,0$ Hz đã xác định các proton H-1', H-2', H-3', H-4', H-5' đều chiếm vị trí *axial*, đặc trưng cho một nhánh β -glucopyranosyl. Phần đường được xác định là D-glucose bằng



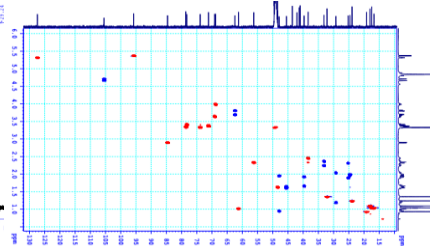
Hình 4.35. Phổ (-)-HR-ESI-MS của hợp chất SPI



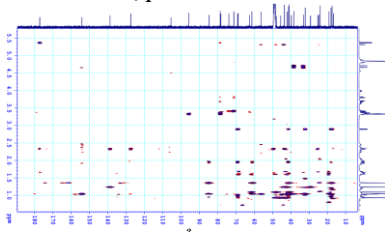
Hình 4.36. Phổ ^1H NMR của hợp chất SPI



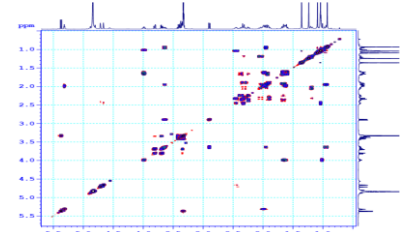
Hình 4.37. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất SPI



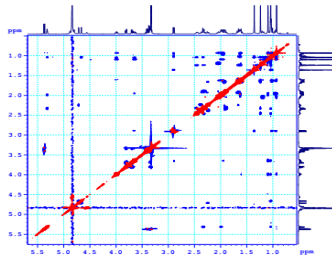
Hình 4.38. Phổ HSQC của hợp chất SPI



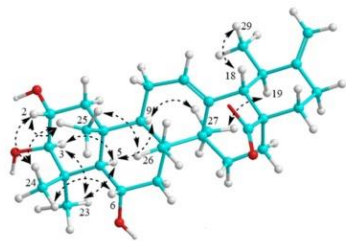
Hình 4.39. Phổ HMBC của hợp chất SPI



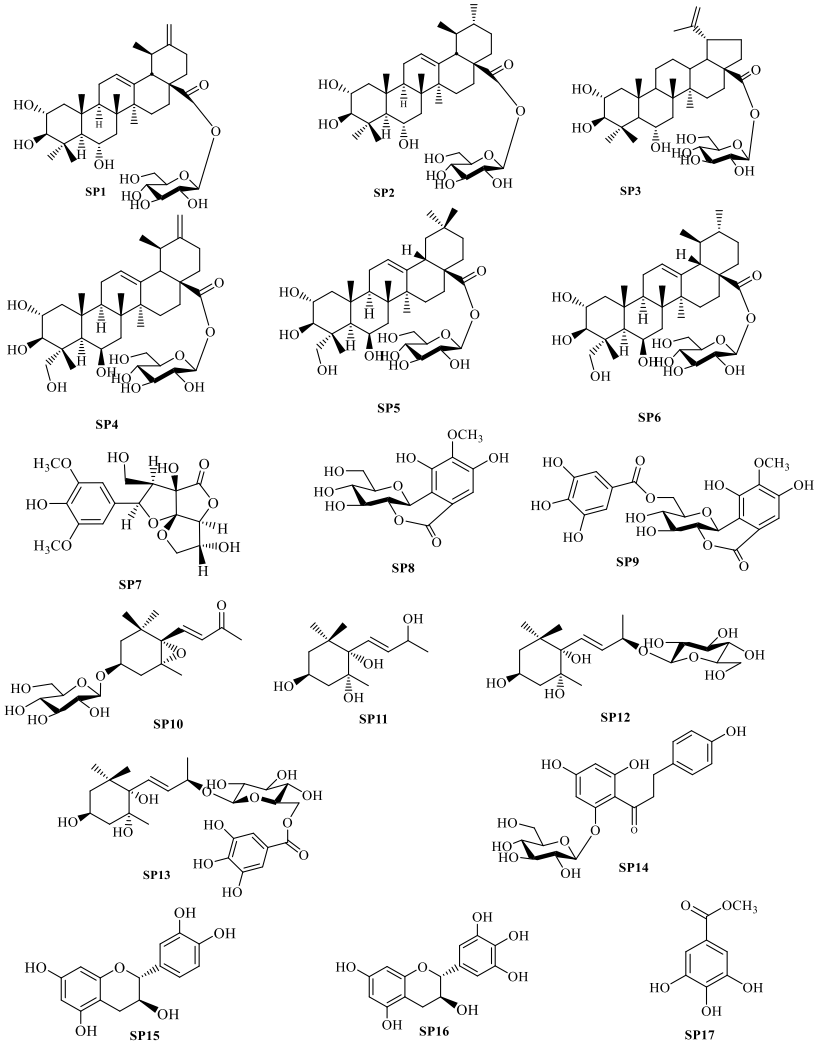
Hình 4.40. Phổ ^1H - ^1H COSY của hợp chất SPI



Hình 4.41. Phổ NOESY và các tương tác chính của hợp chất SPI



phương pháp thủy phân acid hợp chất **SP1** để thu được đường glucose và xác định độ quay cực riêng của đường này. Tín hiệu góc quay cực dương của phân tử đường ($[\alpha]_D^{25} : +27,6$) thu được khẳng định cấu hình đường D-glucose.



Hình 4.63. Cấu trúc hoá học của các hợp chất **SP1-SP17**

Từ dữ liệu phổ NMR, hợp chất SP1 được xác định là $2\alpha,3\beta,6\alpha$ -trihydroxyurs-12,20(30)-dien-28-oic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester. Đây là hợp chất mới và được nhóm nghiên cứu đặt tên là syzybulloside A.

Việc xác định cấu trúc 17 hợp chất (**SP1-SP17**) phân lập từ loài *S. bullockii* cũng được thực hiện tương tự bằng việc phân tích các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo.

Kết quả là đã xác định được 3 hợp chất mới (**SP1-SP3**) được đặt tên là syzybulloside (A-C) và 14 hợp chất đã biết (**SP4-SP17**). Ba hợp chất mới đều có khung triterpene 5 vòng trong đó nhóm methyl tại vị trí C-23 đã thay cho nhóm hydroxymethylene là điểm mới và khác so với hợp chất triterpen 5 vòng đã biết **SP4-SP6**. Cấu hình tương đối của các hợp chất mới được xác định bằng phương pháp phổ NOESY. Định hướng liên kết các nhóm hydroxy tại các vị trí C-2, C-3, C-6 lần lượt là 2α , 3β , 6α . Các hợp chất còn lại có cấu trúc là các flavanol (**SP15**, **SP16**), megastigmane và dẫn chất (**SP10-SP13**), và cấu trúc khác (**SP7**, **SP8**). Cấu trúc hoá học của các hợp chất được thể hiện ở Hình 4.63.

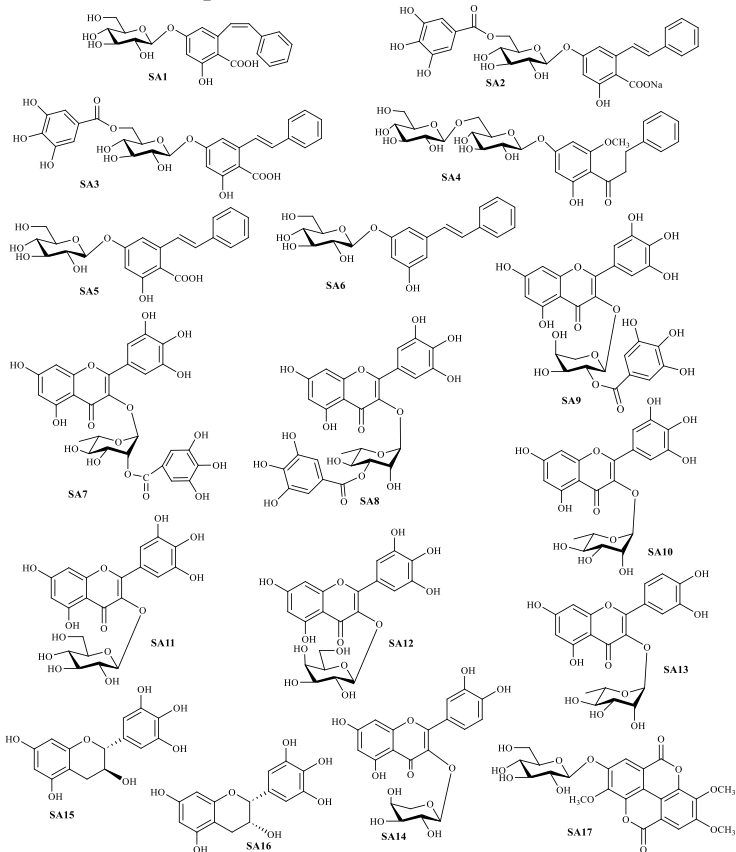
4.2.2. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ loài *S. bullockii*

Trong thử nghiệm MTT, tại nồng độ 100 μ M, các hợp chất **SP1-SP17** không gây độc tính tế bào. Từ kết quả ở Bảng 3.2, cho thấy các hợp chất phân lập được (trừ hợp chất **SP11** có hoạt tính yếu) đều thể hiện khả năng ức chế hiệu quả sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 được hoạt hóa Lipopolysaccharide với nồng độ ức chế trung bình IC_{50} trong khoảng 1,42 đến 13,70 μ M, thấp hơn nhiều so với đối chứng dương là L-NMMA ($IC_{50} = 33,8 \mu$ M).

4.3. Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của loài *S. attopeuense*

4.3.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *S. attopeuense*

Từ loài *S. attopeuense* đã phân lập được 17 hợp chất (SA1-SA17). Thông qua phân tích các dữ liệu phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 và 2 chiều đã xác định được trong số 17 hợp chất có 4 chất mới (SA1-SA4) được đặt tên là syzyceroside A-D (SA1-SA4) và 13 hợp chất đã biết.



Hình 4.85. Cấu trúc hoá học của các hợp chất SA1-SA17

Trong số 4 hợp chất mới thì có 3 hợp chất **SA1-SA3** có cấu trúc khung stilbene còn 1 hợp chất **SA4** là dẫn chất glycoside của chalcone. Các hợp chất đã biết **SA4-SA17** có 2 hợp chất **SA5** và **SA6** cũng chứa khung stilbene, các hợp chất còn lại hầu hết là các dẫn chất glycoside của flavonol (**SA7-SA14**) với các loài đường khác nhau gồm: glucose, galactose, arabinose, rhamnose. Điểm mới của các hợp chất khung stilbene đó là về cấu dạng *Z* của hợp chất **SA1** và thêm nhánh galloyl ở hợp chất **SA2** (dạng muối Natri), **SA3** so với hợp chất galylusaccin đã biết. Cấu trúc hoá học của các hợp chất được thể hiện ở Hình 4.85.

4.3.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ loài *S. attopeuense*

Mười bảy hợp chất **SA1-SA17** đều không thể hiện độc tính trên dòng tế bào thử nghiệm. Kết quả thử hoạt tính kháng viêm ở Bảng 3.3 cho thấy các hợp chất **SA1-SA3**, **SA5** và **SA6** là những dẫn chất khung stilbene có khả năng ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 đã được kích hoạt bởi LPS với các giá trị IC_{50} tương ứng: $18,37 \pm 1,38$, $31,23 \pm 2,18$, $35,12 \pm 2,53$, $28,24 \pm 1,79$ và $34,89 \pm 2,13 \mu\text{M}$ so với đối chứng dương (dexamethasone) có IC_{50} là $15,37 \pm 1,42 \mu\text{M}$. Hợp chất mới **SA1** có cấu hình *Z* (*cis*) tại liên kết đôi C7/C8 thể hiện hoạt tính tốt hơn hẳn các hợp chất **SA2**, **SA3**, **SA5** và **SA6** có cấu hình *E* (*trans*). Các hợp chất **SA7**, **SA8**, **SA10**, **SA15**, **SA16** ức chế rất yếu sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 76,39 đến 95,14. Các hợp chất còn lại được cho là không có hoạt tính kháng viêm do IC_{50} lớn hơn $100 \mu\text{M}$. Kết quả này cho thấy hợp chất khung stilbene đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS.

KẾT LUẬN

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của 3 loài *S. cerasiforme* thu hái ở tỉnh Vĩnh Phúc, *S. bullockii* và *S. attopeuense* thu hái tỉnh Quảng Trị. Bằng cách sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ hiện đại đã phân lập và xác định cấu trúc 54 hợp chất trong đó có 9 hợp chất mới từ 3 loài: *S. cerasiforme*, *S. bullockii* và *S. attopeuense*.

1. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

- Từ lá của loài *S. cerasiforme* đã phân lập và xác định cấu trúc 20 hợp chất (**SL1-SL20**), bao gồm 2 hợp chất mới **SL1** (5,7-dihydroxy-2-isopropyl-6,8-dimethyl-4*H*-chromen-4-one), **SL2** (5,7-dihydroxyflavanone 7-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl)glucopyranoside) và 18 hợp chất đã biết (**SL3-SL20**): pinocembrin-7-*O*- β -D-glucopyranoside, strobopinin, demethoxymatteucinol, (2*S*)-hydroxynaringenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside, afzelin, quercetin, kaplanin, endoperoxide G3, vomifoliol, litseagermacrane, 3-epibetulinic acid, betulonic acid, schleicheol 2, (7*S*,8*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol, benzyl-6'-*O*-galloyl- β -D-glucopyranoside, 3-methoxy-4-hydroxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)-glucopyranoside, secoisolariciresinol.

- Từ lá và cành của loài *S. bullockii* đã phân lập và xác định cấu trúc 17 hợp chất (**SP1-SP17**), bao gồm 3 hợp chất mới (**SP1-SP3**) được đặt tên là syzybulloside (A-C) và 14 hợp chất đã biết (**SP4-SP17**): chebuloside II, 2 α ,3 β ,6 β ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, amarusine A, bergenin, 11-*O*-galloylbergenin, icariside B2, (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetraol, actinidioionoside, actinidioionoside 6'-*O*-gallate, phloridzoid, (+)-catechin, (+)-gallo catechin, methyl gallate.

- Từ lá và cành của loài *S. atlopeuense* đã phân lập và xác định cấu trúc 17 hợp chất (**SA1-SA17**), bao gồm 4 chất mới (**SA1-SA4**) được đặt tên là syzycoside A-D và 13 hợp chất đã biết (**SA5-SA17**): quadranoside IV, pinosilvin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, gaylussacin, myricetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*-(3''-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, myricetin 3-*O*- β -D-(2''-galloyl)- α -arabinopyranoside, myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, myricetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, quercitrin, guaijaverin, (+)-gallocatechin, ellagic acid 3,3',4'-tri-*O*-methyl ether 4-*O*- β -D-glucopyranoside.

2. Kết quả nghiên cứu về hoạt tính ức chế sự sản sinh NO

Đã đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của dòng tế bào RAW264.7 bị kích thích bởi LPS của 54 hợp chất phân lập được từ 3 loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii*, *S. atlopeuense*. Kết quả cho thấy những hợp chất là dẫn chất glycoside của flavanone có hoạt tính ức chế đáng kể, các hợp chất terpenoid thể hiện hoạt tính tốt và các dẫn chất glycosidse của stilbene đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS.

- Trong số 20 hợp chất từ loài *S. cerasiforme*, hợp chất **SL1**, **SL2**, **SL5**, **SL6**, **SL10**, **SL17** có hoạt tính khá tốt với giá trị IC_{50} từ 6,69 đến 12,28 μ M, **SL19** ức chế mức trung bình (IC_{50} 25,51 μ M) so với chất đối chứng dương L-NMMA (IC_{50} = 32,50 μ M). Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính yếu hơn với giá trị IC_{50} =33,17 ~ 86,51 μ M.

- Trong số 17 hợp chất phân lập từ loài *S. bullockii*, trừ hợp chất **SP11** có hoạt tính yếu, các hợp chất còn lại đều thể hiện hoạt tính mạnh với giá trị IC_{50} = 1,42 ~ 13,70 μ M, thấp hơn so với đối chứng dương L-NMMA (IC_{50} = 33,8 μ M).

- Trong số 17 hợp chất phân lập từ loài *S. atlopeuense*, hợp chất **SA1-SA3**, **SA5** và **SA6** có khả năng ức chế trung bình đối với sự sản

sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích hoạt LPS với IC_{50} từ 18,37 đến 35,12 μM so với đối chứng dương dexamethasone (IC_{50} 15,37 μM). Các hợp chất **SA7**, **SA8**, **SA10**, **SA15**, **SA16** ức chế rất yếu với $IC_{50} = 76,39 \sim 95,14 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại không thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO với $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đây là nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 của 3 loài *S. cerasiforme*, *S. bullockii*, *S. attopeuse*.

- Đã phân lập và xác định được 2 hợp chất mới từ loài *S. cerasiforme*: **SL1** (5,7-dihydroxy-2-isopropyl-6,8-dimethyl-4H chromen-4-one) và **SL2** (5,7-dihydroxyflavanone 7-O- β -D-(6''-O-galloyl glucopyranoside). Cả hai hợp chất này đều thể hiện hoạt tính tốt với giá trị IC_{50} tương ứng là 12,28 và 8,52 μM .

- Đã phân lập và xác định được 3 hợp chất mới từ loài *S. bullockii* (syzybulloside A-C). Các hợp chất mới này đều thể hiện hoạt tính ức chế NO khá tốt với giá trị IC_{50} tương ứng là 11,58, 13,61 và 6,93, μM . Ngoài ra, hợp chất **SP4** cũng thể hiện hoạt tính ức chế NO tốt với $IC_{50} = 7,09 \mu\text{M}$.

- Đã phân lập và xác định được 4 hợp chất mới từ loài *S. attopeuense* (syzyceroside A-D). Trong đó 3 hợp chất **SA1** (syzyceroside A), **SA2** (syzyceroside B), **SA3** (syzyceroside C) thể hiện hoạt tính trung bình còn **SA4** (syzyceroside D) không thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Bui Hai Ninh**, Duong Thi Dung, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Nguyen Xuan Nhiem, Truong Thi Thu Hien, Do Thi Trang, Nguyen Van Tuyen, Le Tuan Anh, Nguyen Thi Hoai, Phan Van Kiem. *New isopropyl chromone and flavanone glucoside compounds from the leaves of Syzygium cerasiforme (Blume) Merr. & L.M.Perry and their inhibition of nitric oxide production*. Chemistry & Biodiversity, 2023, doi.org/10.1002/cbdv.202201048.
2. Bui Huu Tai, **Bui Hai Ninh**, Pham Hai Yen, Duong Thi Dung, Nguyen Huy Hoang, Nguyen Xuan Nhiem, Nguyen Van Tuyen, Le Tuan Anh, Phan Van Kiem. *New nitric oxide production inhibitors from Syzygium bullockii*. Journal of Natural Medicines, 2023, doi: 10.1007/s11418-023-01725-7.
3. Phan Van Kiem, **Bui Hai Ninh**, Bui Huu Tai, Nguyen Xuan Nhiem, Pham Thi Hai Yen, Nguyen Huy Hoang, Do Thi Trang, Duong Thi Dung, Nguyen Van Tuyen, Le Tuan Anh. *Undescribed phenolic glycoside from Syzygium attopeuense and their inhibition of nitric oxide production*. Chemistry & Biodiversity, 2023, doi: 10.1002/cbdv.202301037.
4. **Bui Hai Ninh**, Duong Thi Dung, Nguyen Van Tuyen, Bui Huu Tai, Phan Van Kiem. *Chemical constituents of Syzygium cerasiforme leaves and their nitric oxide inhibitory activity in LPS-activated RAW264.7 cells*. Vietnam Journal of Chemistry, 2023, doi: 10.1002/vjch.202300107.