

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ BÌNH YÊN

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT
TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY XÂY RĂNG NHỌN (*Myrsine
semiserrata* Wall.) VÀ CÂY BÀN GIÁC (*Oligoceras eberhardtii*
Gagnep.)**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỮU CƠ

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:

1. Người hướng dẫn: TS. Triệu Quý Hùng, Trường Đại học Hùng Vương – Phú Thọ.
2. Người hướng dẫn: PGS. TS. Phạm Văn Cường, Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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 giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) có khoảng 7,6 triệu người chết hàng năm vì căn bệnh ung thư, điển hình là các nhóm bệnh ung thư phổi, ung thư gan, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư dạ dày, ung thư tiền liệt tuyến, đã chiếm tới hơn 13% số người chết mỗi năm. Tình hình mắc bệnh và tử vong do ung thư có xu hướng ngày càng tăng. Theo ước tính của WHO, số ca tử vong do ung thư trên toàn thế giới sẽ lên đến con số 11,8 triệu mỗi năm vào năm 2030 [1]. Ở Việt Nam, qua thống kê số liệu ghi nhận ung thư tại Hà Nội, Thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh; ước tính mỗi năm ở nước ta có khoảng 150 nghìn bệnh nhân mới mắc ung thư và 75 nghìn người chết vì ung thư; con số này có xu hướng ngày càng gia tăng [2].

Con người đã sớm biết đến việc sử dụng những dược liệu hóa học từ thế kỷ 19 để điều trị ung thư như dùng potassium arsenite để điều trị bệnh bạch cầu tủy đến tận những năm 1930 [3]. Đến nay, rất nhiều hợp chất thiên nhiên và các sản phẩm được tổng hợp, bán tổng hợp từ các hợp chất tự nhiên đã được sử dụng một cách hiệu quả trong việc điều trị, phòng ngừa bệnh ung thư và các bệnh tật khác giúp con người chống lại bệnh tật, nâng cao sức khỏe cộng đồng. Hàng loạt thuốc chữa trị ung thư sử dụng các hoạt chất được phân lập từ tự nhiên như nhóm các hợp chất paclitaxel (Taxol[®]) là một diterpenoid được phân lập từ loài Thông đỏ *Taxus brevifolia* (Taxaceae) hay một số hợp chất khác podophyllotoxin, camptothecin, berbamine, beta-lapachone, acid betulinic, colchicine, curcumin, daphnoretin, ellipticine... và dẫn xuất bán tổng hợp của chúng vinflunine, docetaxel (Taxotere[®]), ... [4,5].

Việt Nam là một nước Đông Nam Á, thuộc khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa có hai mùa rõ rệt thay đổi theo địa hình, mưa nhiều, độ ẩm tương đối cao là điều kiện thuận lợi để thực vật phát triển. Vì vậy, Việt Nam có một hệ thực vật phong phú và đa dạng với trên 12.000 loài, trong đó có trên 3.200 loài thực vật được sử dụng làm thuốc trong Y học dân gian; mở ra tiềm năng lớn về việc nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên từ các loài

thực vật của Việt Nam [6].

Trong khuôn khổ dự án Hợp tác Quốc tế Pháp - Việt “Nghiên cứu hóa thực vật của thảm thực vật Việt Nam”; một số loài *Myrsine* và *Oligoceras* của Việt Nam đã được thu hái và thử hoạt tính sơ bộ. Kết quả cho thấy dịch chiết EtOAc của quả cây *Myrsine semiserrata* Wall. có khả năng ức chế 57,19% tế bào ung thư biểu mô KB ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$. Dịch chiết EtOAc của quả cây *Oligoceras eberhardtii* Gagnep. có khả năng ức chế 37,66% tế bào KB ở nồng độ 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Cho đến nay chưa có công trình trong nước hay quốc tế nào nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của hai loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii* này.

Xuất phát từ những luận điểm trên, nghiên cứu sinh đã lựa chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây xay răng nhọn (*Myrsine semiserrata* Wall.) và cây bản giác (*Oligoceras eberhardtii* Gagnep.)**”.

Mục tiêu của luận án:

- Xác định được thành phần hóa học của loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii* ở Việt Nam.

- Đánh giá được hoạt tính gây độc tế bào ung thư và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập được nhằm tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học, làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo để tạo ra sản phẩm chăm sóc sức khỏe cho cộng đồng.

Nội dung của luận án bao gồm:

1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii*

2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập được.

3. Sử dụng phương pháp mô phỏng nguyên tử nhằm tìm kiếm các chất ức chế GSK-3 β tiềm năng từ các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về đặc điểm thực vật của chi *Myrsine* và chi *Oligoceras*

1.1.1. Đặc điểm thực vật của chi *Myrsine*

1.1.2. Đặc điểm thực vật của chi *Oligoceras*

1.2. Tổng quan các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học chi *Myrsine* và chi *Oligoceras*

1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Myrsine*

1.2.1.1. Các hợp chất flavonoid từ chi *Myrsine*

1.2.1.2. Các hợp chất triterpenoid và saponin từ chi *Myrsine*

1.2.1.3. Các dẫn xuất của arbutin từ chi *Myrsine*

1.2.1.4. Các hợp chất megastigmane glycoside từ chi *Myrsine*

1.2.1.5. Các thành phần khác từ chi *Myrsine*

1.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của chi *Myrsine*

1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

1.2.2.3. Hoạt tính kháng viêm

1.2.2.4. Hoạt tính chống oxi hóa

1.2.2.5. Các hoạt tính khác

1.2.3. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Oligoceras*

1.3. Tổng quan về loài *Myrsine semiserrata* Wall. và *Oligoceras eberhardtii* Gagnep.

1.3.1. Tổng quan về loài *Myrsine semiserrata* Wall.

1.3.2. Tổng quan về loài *Oligoceras eberhardtii* Gagnep.

1.4. Tổng quan về mô hình nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng các phương pháp mô phỏng phân tử

1.4.1. Giới thiệu chung

1.4.2. Tổng quan mô hình sàng lọc ảo tìm kiếm hoạt chất tiềm năng phát triển thuốc

1.4.3. Tổng quan phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử (Docking phân tử)

1.4.4. Tổng quan phương pháp mô phỏng động lực học phân tử

1.4.5. Thông tin chung về enzyme GSK-3 β

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Cây xăng răng nhọn (*Myrsine semiserrata* Wall.)

2.1.2. Cây bản giác (*Oligoceras eberhardtii* Gagnep.)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

2.2.2.1. Phổ khối lượng (MS)

2.2.2.2. Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS)

2.2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

2.2.2.4. Độ quay cực

2.2.2.5. Phương pháp xác định đường

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

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

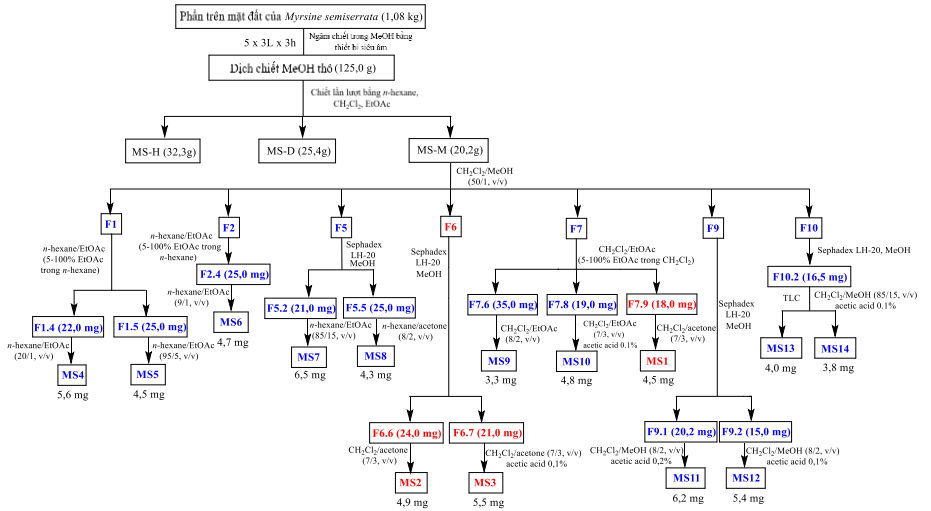
2.2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

2.2.4. Phương pháp docking phân tử

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

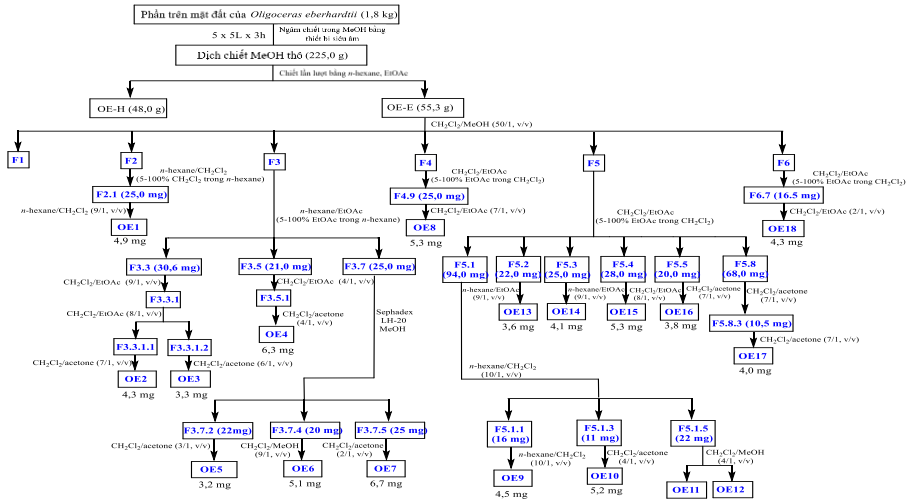
3.1. Phân lập các hợp chất từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*) và cây bản giác (*O. eberhardtii*)

3.1.1. Phân lập các hợp chất từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)



Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

3.1.2. Phân lập các hợp chất từ mẫu cây bản gốc (*O. eberhardtii*)



Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây bản gốc (*O. eberhardtii*)

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

3.2.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

3.2.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ cây bản giác (*O. eberhardtii*)

3.3. Kết quả thử hoạt tính của các hợp chất phân lập từ loài *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

3.3.1. Hoạt tính ức chế gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ loài *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

Các phép thử hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2.3.1. Các hợp chất **MS1-MS14** phân lập từ *M. semiserrata* và **OE1-OE18** phân lập từ *O. eberhardtii* được thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A-549), ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7), ung thư biểu mô (KB). Kết quả thử hoạt tính thể hiện ở bảng 4.31.

3.3.2. Sử dụng mô phỏng lắp ghép phân tử dự đoán cơ chế ức chế GSK-3 β của các hoạt chất tiềm năng phân lập từ *O. eberhardtii*

Sử dụng phương pháp docking phân tử (lắp ghép phân tử) và tính toán động lực phân tử theo mô tả ở 2.2.4 để xác định tư thế liên kết và ái lực gắn kết của các hợp chất phân lập được **OE1 – OE18** với GSK-3 β , đồng thời mô phỏng hoạt động của phức chất ức chế GSK-3 β + trong dung dịch. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.32-4.39.

3.3.3. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

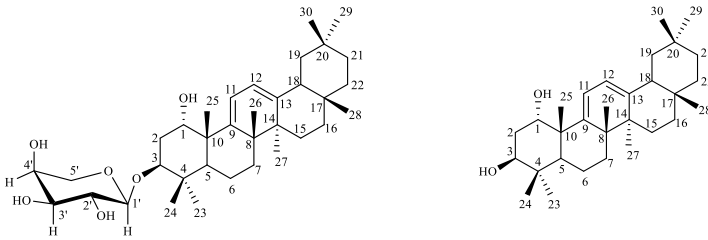
Các hợp chất phân lập **MS1-MS14** và **OE1-OE18** đã được đánh giá khả năng kháng các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ như mô tả ở mục 2.2.3.2. Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 4.40.

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập

4.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

4.1.1.1. Hợp chất **MS1**: *Myrsineoside A (3-O- α -L-arabinopyranosyl juglangenin A)* (chất mới)



MS1

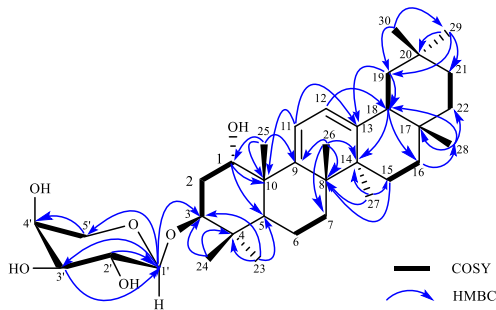
Juglangenin A

Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS1** và hợp chất tham khảo

Hợp chất **MS1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, góc quay cực là $[\alpha]_D^{24} +17,9$ (c 0,24, MeOH). Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **MS1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 611,3718 $[M + K]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử là $C_{35}H_{56}O_6K^+$ m/z 611,3708) cho phép xác định công thức phân tử của **MS1** là $C_{35}H_{56}O_6$ (với độ bất bão hòa $\Delta = 8$). Trên phổ hồng ngoại của **MS1** cho thấy đỉnh hấp thụ của liên kết đôi $C=C$ ở 1638 cm^{-1} , 1559 cm^{-1} và nhóm hydroxyl ở 3441 cm^{-1} .

Trên phổ $^1\text{H NMR}$ của **MS1** xuất hiện tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_H 0,90 (3H, s, H-30), 0,92 (3H, s, H-24), 0,93 (3H, s, H-28), 0,94 (3H, s, H-29), 1,09 (3H, s, H-27), 1,14 (3H, s, H-23), 1,19 (3H, s, H-26) và 1,26 (3H, s, H-25), cùng tín hiệu của hai proton olefin tại δ_H 5,73 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11) và 5,60 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-12). Bên cạnh đó tín hiệu của hai proton oxymethine được xác định tại δ_H 4,17 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-1) và 3,69 (1H, dd, $J = 4,8, 12,0$ Hz, H-3) và có sự xuất hiện tín hiệu chồng chéo ở vùng aliphatic (δ_H 3,52 – 3,86 ppm). Tín hiệu của hai proton olefin tại δ_H 5,73 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11) và 5,60 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-12) với hằng số tương tác $J = 6,0$ Hz cùng với tín hiệu của 4 carbon olefin tại δ_C 118,3 (C-11), 121,7 (C-12), 149,1 (C-13), 151,5 (C-9) trên phổ $^{13}\text{C NMR}$ cho phép xác định sự hiện diện của một hệ diene liên hợp. Ngoài ra, phổ $^1\text{H NMR}$ của **MS1** còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của một proton anomer tại δ_H 4,31 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-1') cùng các tín hiệu khác của 3 nhóm oxymethin tại δ_H 3,52 (1H, m, H-3'), δ_H 3,54 (1H, dd, $J = 3,0; 12,2$ Hz, H_a-5'), δ_H 3,58 (1H, dd, $J = 6,6; 8,4$ Hz, H-2'), δ_H 3,82 (1H, m, H-4') và 1 nhóm oxymethylene tại δ_H 3,86 (1H, dd, $J = 2,5; 12,2$ Hz, H_b-5'). Phân tích phổ $^{13}\text{C NMR}$ và DEPT với sự hỗ

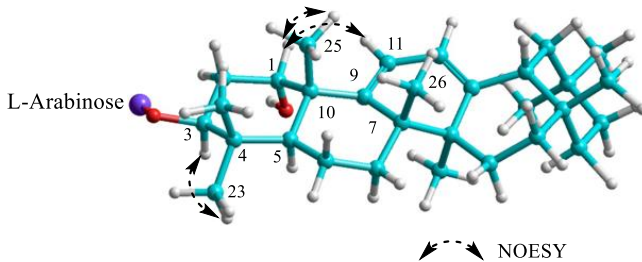
trợ của tương tác HSQC của **MS1** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 35 nguyên tử carbon trong đó 30 nguyên tử carbon được gán cho phần aglycone và các tín hiệu cho thành phần đường được tạo thành từ một đơn vị đường có 5 carbon. Cụ thể là có tín hiệu của 8 nhóm methyl tại δ_C 16,9 (C-24), 20,7 (C-27), 21,9 (C-26), 24,1 (C-29), 26,4 (C-25), 28,7 (C-23), 29,3 (C-28), 33,7 (C-30), 8 nhóm methylene tại δ_C 18,5 (C-6), 26,8 (C-15), 28,1 (C-16), 32,9 (C-7), 33,2 (C-2), 35,6 (C-21), 38,1 (C-22), 48,1 (C-19), 1 nhóm oxymethylene tại δ_C 66,5 (C-5'), 6 nhóm oxymethin tại δ_C 74,2 (C-1), 85,3 (C-3), 107,4 (C-1'), 72,9 (C-2'), 74,4 (C-3'), 69,6 (C-4'), 2 nhóm methine sp^2 tại δ_C 118,3 (C-11), 121,7 (C-12), 2 nhóm methine sp^3 tại δ_C 45,9 (C-5), 47,1 (C-18) và 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Từ các dữ liệu trên cùng với giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1,2'} = 6,6$ Hz, $J_{2,3'} = 8,4$ Hz) cho phép dự đoán sự có mặt của một gốc đường α -arabinopyranose [123, 124].



Hình 4.10. Các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **MS1**

Các liên kết trực tiếp giữa các proton và carbon của **MS1** được xác định dựa trên việc phân tích phổ HSQC. Trên phổ COSY của **MS1** quan sát thấy sự hiện diện của bảy hệ tương tác spin – spin của các proton cạnh nhau được đánh dấu bằng các đường đậm trong hình 4.10 bao gồm H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/CH₂-5', H-1/CH₂-2/H-3, H-5/CH₂-6/CH₂-7, H-11/H-12, CH₂-15/CH₂-16, H-18/CH₂-19 và CH₂-21/CH₂-22. Từ các dữ liệu phổ NMR thu được của **MS1** và các phân tích trên gợi ý hợp chất **MS1** là một triterpenoid có khung oleanane tương tự như hợp chất đã biết juglanguenin A [125]. Vị trí của đơn vị đường được xác định dựa trên phổ HMBC giữa tương tác H-1' của gốc đường (δ_H 4,31) với C-3 (δ_C 85,3) của phần oleanane aglycon, điều này cho phép ta xác định vị trí của gốc đường được đính tại C-3 (Hình 4.10).

Bên cạnh đó trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa Me-23 (δ_H 1,14) và Me-24 (δ_H 0,92) với C-3 (δ_C 85,3), C-4 (δ_C 40,4), C-5 (δ_C 45,9) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này được gắn vào C-4. Tương tác HMBC giữa Me-25 (δ_H 1,28) với C-1 (δ_C 74,2), C-5 (δ_C 45,9), C-10 (δ_C 45,7), và C-9 (δ_C 151,5); giữa Me-26 (δ_H 1,19) với C-8 (δ_C 43,7), C-9 (δ_C 151,5) và C-14 (δ_C 42,1); giữa Me-27 (δ_H 1,09) với C-8 (δ_C 43,7), C-13 (δ_C 149,1), C-14 (δ_C 42,1) và C-15 (δ_C 26,8); giữa Me-28 (δ_H 0,93) với C-16 (δ_C 28,1), C-17 (δ_C 33,2), C-18 (δ_C 47,1) và C-22 (δ_C 38,1) cho phép xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đính trực tiếp lần lượt tại C-10, C-8, C-14 và C-17 của phần oleanane aglycon (Hình 4.10). Tương tác giữa proton của nhóm Me-29 (δ_H 0,94) và Me-30 (δ_H 0,90) với C-19 (δ_C 48,1), C-20 (δ_C 31,9) và C-21 (δ_C 35,6) và sự tương tác lẫn nhau của 2 nhóm methyl này cho phép xác định vị trí của hai nhóm methyl được gắn tại C-20. Ngoài ra, trên phổ HMBC còn quan sát được sự tương tác xa giữa H-11 (δ_H 5,73), H-12 (δ_H 5,60), Me-25 (δ_H 1,26), Me-26 (δ_H 1,19) đến C-9 (δ_C 151,5), và từ H-11 (δ_H 5,73) và Me-27 (δ_H 1,09) đến C-11 (δ_C 24,1) cho phép xác định khung olean-9(11),12-diene của **MS1**.



Hình 4.12. Các tương tác NOESY chính của hợp chất **MS1**

Cấu hình tương đối của hợp chất **MS1** được xác định dựa trên các giá trị hằng số tương tác và phổ NOESY. Trên phổ NOESY xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H-1 (δ_H 4,17) và H-11 (δ_H 5,73)/Me-25 (δ_H 1,26), giữa Me-24 (δ_H 0,92) và Me-25 (δ_H 1,26), từ đó kết luận H-1 định hướng β . Proton ở vị trí C-3 định hướng α được xác định bằng tương tác trên phổ NOESY của H-3 (δ_H 3,69) và Me-23 (δ_H 1,14). Thêm nữa, sự phân tách của H-1 (t, $J = 3,0$ Hz) và H-3 (dd, $J = 4,8; 12,0$ Hz) càng khẳng định rõ nhóm hydroxy ở C-1 và nhóm *O*-glycoside ở C-3 định hướng lần lượt là α và β .

Phân tích các tương tác trên phổ NOESY của **MS1** cho thấy tương tác giữa $H_{\alpha-3}/H-3'$ và $H-1'$ gợi ý proton tại vị trí C-1' định hướng α . Bên cạnh đó khi so sánh độ dịch chuyển hóa học tại C-3 (δ_C 85,3) của **MS1** (có sự chuyển dịch ra trường thấp) so với giá trị phổ ^{13}C NMR tại 73,0 (C-3) của juglangenin A [125] cho thấy sự phù hợp của nhóm *O*-glycoside ở vị trí C-3 trong **MS1**. Từ những thông tin trên cho thấy cấu trúc hợp chất **MS1** tương tự như juglangenin A, ngoại trừ sự xuất hiện của một đơn vị đường trong **MS1** thay vì nhóm OH ở C-3 trong juglangenin A.

Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của **MS1** và hợp chất tham khảo

C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	72,8	74,2	4,17 (t, 3,0)	19	46,7	48,1	1,09 (m) 1,72 (m)
2	31,7	33,2	2,04 (m) 2,22 (m)	20	31,1	31,9	-
3	73,0	85,3	3,69 (dd, 4,8; 12,0)	21	34,6	35,6	1,15 (m) 1,40 (m)
4	39,0	40,4	-	22	37,0	38,1	1,31 (m) 1,52 (m)
5	44,3	45,9	1,49 (m)	23	28,7	28,7	1,14 (s)
6	17,4	18,5	1,59 (m) 1,70 (m)	24	15,6	16,9	0,92 (s)
7	32,4	32,9	1,40 (br ddd, 2,4; 2,4; 15,0) 1,76 (m)	25	25,7	26,4	1,26 (s)
8	42,5	43,7	-	26	21,0	21,9	1,19 (s)
9	150,3	151,5	-	27	20,3	20,7	1,09 (s)
10	45,0	45,7	-	28	28,2	29,3	0,93 (s)
11	117,0	118,3	5,73 (d, 6,0)	29	23,7	24,1	0,94 (s)
12	119,9	121,7	5,60 (d, 6,0)	30	33,2	33,7	0,90 (s)
13	149,0	149,1	-	Ara			
14	40,7	42,1	-	1'		107,4	4,31 (d, 6,6)
15	25,6	26,8	1,09 (m) 1,92 (m)	2'		72,9	3,58 (dd, 6,6; 8,4)
16	27,0	28,1	0,91 (m) 2,06 (m)	3'		74,4	3,52 (m)
17	32,2	33,3	-	4'		69,6	3,82 (m)
18	45,8	47,1	2,19 (m)	5'		66,5	3,54 (dd, 3,0; 12,2) 3,86 (dd, 2,5; 12,2)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d100 MHz, [#]δ_C: Số liệu của juglangerin A đo trong CDCl₃ [125].

Tiến hành thủy phân hợp chất **MS1** trong môi trường HCl để thu được đường đơn. Nhóm đường trong **MS1** được xác định là L-arabinose với góc quay cực $[\alpha]^{24}_D = +102$ (c 0,1, H₂O) và hệ số Rf = 0,53 phù hợp với giá trị góc quay cực riêng của đường L-arabinose trên các tài liệu đã công bố trước đó [123,124] và so sánh trên bản mỏng TLC của đường L-arabinose chuẩn. Từ tất cả những phân tích dữ liệu phổ trên cho phép xác định được cấu trúc của hợp chất **MS1** là 3-O-α-L- arabinopyranosyl juglangerin A, đây là hợp chất mới và được đặt tên riêng là myrsineoside A.

4.1.1.2. Hợp chất **MS2**: Myrsineoside B (3-O-α-L-arabinopyranosyl castanopsol) (chất mới)

4.1.1.3. Hợp chất **MS3**: Myrsineoside C (3-O-β-D-xylopyranosyl castanopsol) (chất mới)

4.1.1.4. Hợp chất **MS4**: Lupeol acetate

4.1.1.5. Hợp chất **MS5**: Taraxerone

4.1.1.6. Hợp chất **MS6**: Kazinol B

4.1.1.7. Hợp chất **MS7**: Kazinol A

4.1.1.8. Hợp chất **MS8**: 4'-O-methyl-8-prenylnaringenin

4.1.1.9. Hợp chất **MS9**: Cucurbitacin D

4.1.1.10. Hợp chất **MS10**: Cucurbitacin H

4.1.1.11. Hợp chất **MS11**: Eclalbasaponin II

4.1.1.12. Hợp chất **MS12**: Spergulacin

4.1.1.13. Hợp chất **MS13**: Kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranoside

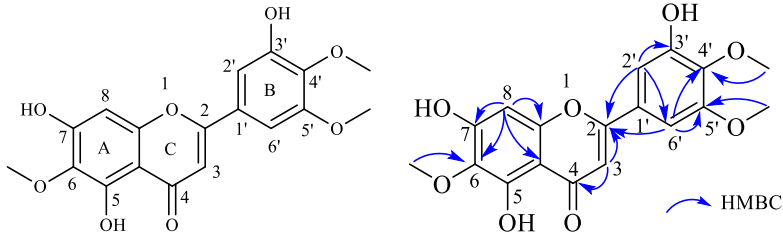
4.1.1.14. Hợp chất **MS14**: Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside

4.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ cây bản giác O. eberhardtii

4.1.2.1. Hợp chất **OE1**: Lupeol acetate

4.1.2.2. Hợp chất **OE2**: 5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone

Hợp chất **OE2** được phân lập dưới dạng chất bột màu vàng nhạt. Trên phổ ¹H NMR của **OE2** xuất hiện tín hiệu của ba nhóm methoxy tại δ_H 3,89 (3H, s, 6-OCH₃), 3,91 (3H, s, 4'-OCH₃), 3,96 (3H, s, 5'-OCH₃) cùng bốn nhóm methine *sp*² tại δ_H 6,59 (1H, s, H-8), 6,65 (1H, s, H-3), 7,09 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-2'), 7,13 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-6').



Hình 4.50. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE2**

Bảng 4.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE2** và hợp chất tham khảo

C	[*] δ _C ^{d, c}	δ _C ^{a, c}	δ _H ^{b, c} (dạng tín hiệu, J = Hz)
2	165,7	165,7	-
3	105,1	105,1	6,65 (s)
4	184,2	184,3	-
4a	105,9	105,9	-
5	153,9	154,0	-
6	132,9	132,9	-
7	154,7	154,7	-
8	95,4	95,4	6,59 (s)
8a	158,9	158,9	-
1'	127,8	127,8	-
2'	103,1	103,2	7,09 (d, 2,4)
3'	155,0	155,1	-
4'	141,2	141,3	-
5'	152,3	152,3	-
6'	108,8	108,8	7,13 (d, 2,4)
4'-OCH ₃	61,1	61,1	3,91 (s)
5'-OCH ₃	56,7	56,7	3,96 (s)
6'-OCH ₃	60,9	60,9	3,89 (s)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d125 MHz, ^{*}δ_C của 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone đo trong CD₃OD [139]

Phổ ¹³C NMR của **OE2** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon bao gồm mười nguyên tử carbon thơm không liên kết hydro tại δ_C 105,1 – 165,7, một nhóm carbonyl tại δ_C 184,3 (C-4), hai carbon methine sp² tại δ_C 95,4 (C-8) của vòng A, δ_C 105,1 (C-3) của vòng C và hai carbon methine của vòng B tại δ_C 103,2 (C-2') và 108,8 (C-6'). Từ các dữ liệu phổ ở trên gợi ý **OE2** là một flavone. Thêm nữa, trên phổ COSY không quan sát thấy các hệ tương tác spin – spin của các

proton cạnh nhau nào, đồng thời, trên phổ HMBC xuất hiện các tương tác của H-3 (δ_H 6,65) với C-2 (δ_C 165,7), C-4 (δ_C 184,3), C-4a (δ_C 105,9); H-8 (δ_H 6,59) với C-6 (δ_C 132,9), C-7 (δ_C 154,7), C-8a (δ_C 158,9), C-4a (δ_C 105,9); H-2' (δ_H 7,09) với C-2 (δ_C 165,7), C-3' (δ_C 155,1), C-4' (δ_C 141,3) và C-6' (δ_C 108,8); H-6' (δ_H 7,13) với C-2 (δ_C 165,7), C-4' (δ_C 141,3), C-5' (δ_C 152,3) khẳng định vị trí của các carbon C-3, C-8, C-2', C-6' tương ứng. Ngoài ra vị trí của các nhóm methoxy 4'-OCH₃, 5'-OCH₃, 6-OCH₃ tại C-4', C-5', C-6 được gán dựa trên cơ sở quan sát được các tương tác HMBC từ các proton của các nhóm methoxy 4'-OCH₃ với C-4', 5'-OCH₃ với C-5' và 6-OCH₃ với C-6. So sánh số liệu phổ của **OE2** với tài liệu đã công bố trước đó về hợp chất 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone [139] cho thấy phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể khẳng định **OE2** là 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone.

4.1.2.3. Hợp chất **OE3**: 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'- trimethoxyflavone

4.1.2.4. Hợp chất **OE4**: Dehydrovomifoliol

4.1.2.5. Hợp chất **OE5**: Protocatechuic acid

4.1.2.6. Hợp chất **OE6**: Chrysocriol-7-O- β -D-glucopyranoside

4.1.2.7. Hợp chất **OE7**: 7Z-roseoside

4.1.2.8. Hợp chất **OE8**: 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'- trimethoxyflavanone

4.1.2.9. Hợp chất **OE9**: Lup-20(29)-ene

4.1.2.10. Hợp chất **OE10**: 23-deoxojessic acid

4.1.2.11. Hợp chất **OE11**: Cucurbitacin F

4.1.2.12. Hợp chất **OE12**: 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one

4.1.2.13. Hợp chất **OE13**: Lupeol

4.1.2.14. Hợp chất **OE14**: 3-(E)-Coumaroyltaraxerol

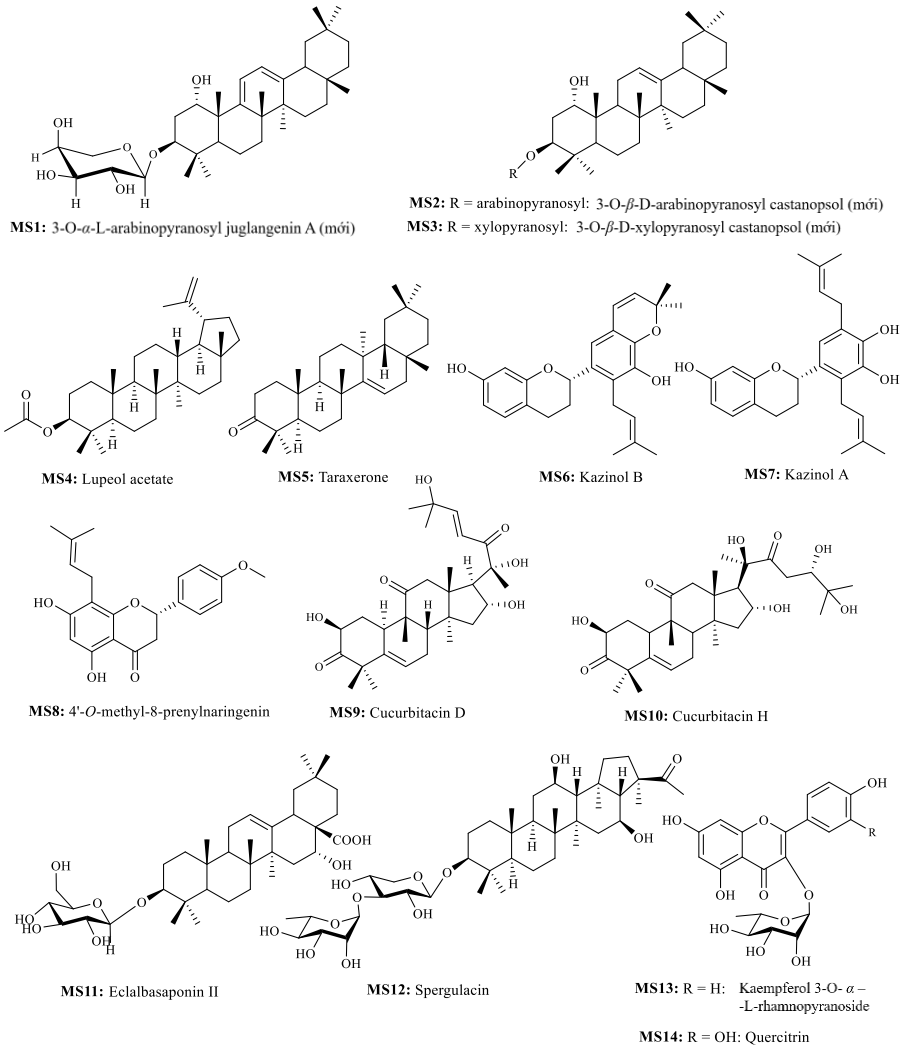
4.1.2.15. Hợp chất **OE15**: 4'-O-methyl-8-prenylnaringenin

4.1.2.16. Hợp chất **OE16**: 6,7,8-trimethoxycoumarin

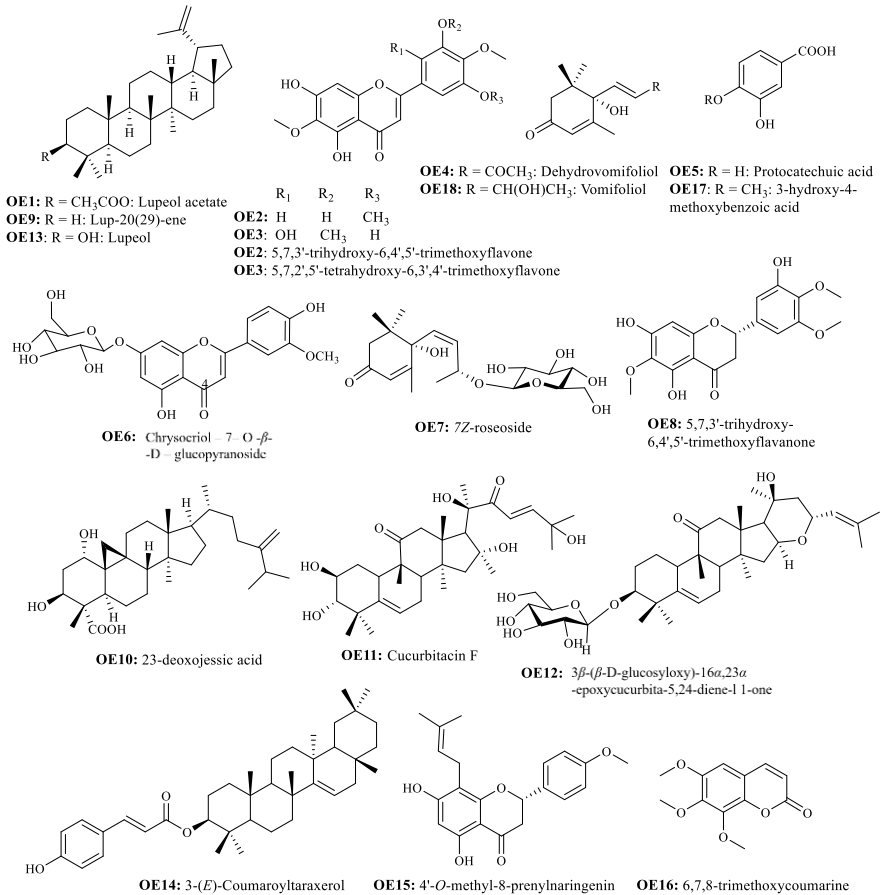
4.1.2.17. Hợp chất **OE17**: 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid

4.1.2.18. Hợp chất **OE18**: Vomifoliol

4.1.3. Kết quả phân lập các hợp chất (**MS1-MS14**, **OE1-OE18**) từ loài *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*



Hình 4.70. Các hợp chất MS1-MS14 phân lập từ *M. semiserrata*



Hình 4.71. Các hợp chất **OE1-OE18** phân lập từ *O. eberhardtii*

4.2. Đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

4.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii* trên 4 dòng tế bào ung thư ở người gồm: ung thư phổi (A549), ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7), ung thư biểu mô (KB) (Bảng 4.31) cho thấy: Hợp chất cucurbitacin D (MS9) phân lập từ *M. semiserrata* thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với dòng ung thư KB, HepG2, MCF-7 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 2,05 ± 0,05; 2,32 ± 0,07; 5,45 ± 0,15 μM trong khi

cucurbitacin H (MS10) chỉ thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh với dòng ung thư biểu mô ($IC_{50} = 6,76 \pm 0,15$).

*Bảng 4.31. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii**

Mẫu	IC ₅₀ (μM)			
	KB	HepG2	A549	MCF7
MS1	74,87 ± 2,27	129,82 ± 0,84	71,06 ± 3,74	123,81 ± 1,92
MS2	32,80 ± 0,77	79,18 ± 1,09	23,39 ± 2,02	73,58 ± 1,18
MS3	104,95 ± 2,66	177,21 ± 0,39	43,57 ± 1,41	192,01 ± 4,37
MS4	-	-	-	-
MS5	-	-	-	-
MS6	49,11 ± 2,70	61,98 ± 3,72	72,22 ± 0,15	196,53 ± 5,07
MS7	-	-	-	-
MS8	137,65 ± 2,90	-	-	-
MS9	2,05 ± 0,05	2,32 ± 0,07	72,38 ± 3,44	5,45 ± 0,15
MS10	6,76 ± 0,15	11,21 ± 0,34	185,12 ± 1,04	37,56 ± 1,22
MS13	-	-	-	-
MS14	-	-	-	-
OE1	-	-	-	-
OE2	-	-	-	-
OE3	142,84 ± 8,08	196,03 ± 3,48	157,66 ± 2,15	197,58 ± 3,96
OE6	-	-	-	-
OE8	-	-	-	-
OE9	-	-	-	-
OE12	41,32 ± 2,13	36,42 ± 1,84	38,34 ± 1,28	102,32 ± 1,60
OE13	122,18 ± 3,46	160,51 ± 1,74	101,54 ± 2,35	140,79 ± 2,55
OE14	-	-	-	-
OE15	-	-	-	-
Ellipticine*	1,78 ± 0,02	1,75 ± 0,02	1,75 ± 0,02	1,78 ± 0,02

(*): Chất đối chứng, (-): Các chất có $IC_{50} > 200 \mu M$

MS10 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình với hai dòng HepG2 ($IC_{50} = 11,21 \pm 0,34$) và MCF7 ($IC_{50} = 37,56 \pm 1,22 \mu M$). Cả hai hợp chất này thể hiện

gây độc yếu đối với dòng tế bào A549. Hai hợp chất mới myrsineoside B (**MS2**) và myrsineoside C (**MS3**) cũng thể hiện khả năng gây độc tế bào ở mức trung bình đối với dòng tế bào A549 lần lượt ở các giá trị IC_{50} tương ứng là $23,39 \pm 2,02$ và $43,57 \pm 1,41$ μM trong khi đó chúng thể hiện gây độc yếu hơn đối với các dòng tế bào HepG2 và MCF7. Bên cạnh đó hợp chất mới MS2 còn thể hiện khả năng gây độc tế bào trung bình dòng ung thư biểu mô với giá trị IC_{50} là $32,80 \pm 0,77$ μM trong khi **MS3** thể hiện gây độc tế bào yếu ở dòng tế bào ung thư này. Ngoài ra, kết quả ở bảng 4.31 còn cho thấy hợp chất mới myrsineoside A (**MS1**) và hai hợp chất đã biết *Kazinol B* (**MS6**), 4'-*O*-methyl-8-prenylaringenin (**MS8**) cũng có biểu hiện gây độc tế bào yếu với bốn dòng tế bào ung thư thử nghiệm trên trong khi các chất còn lại (**MS4**, **MS5**, **MS7**, **MS13**, **MS14**) phân lập từ *M. semiserrata* không gây độc với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Hợp chất 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one (**OE12**) phân lập từ *O. eberhardtii* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình với ba dòng ung thư biểu mô, ung thư gan và ung thư phổi với các giá trị IC_{50} tương ứng là $41,32 \pm 2,13$; $36,42 \pm 1,84$ và $38,34 \pm 1,28$ μM so với chất đối chứng dương ellipticine ($IC_{50} = 1,78$ μM), bên cạnh đó hai hợp chất lupeol (**OE13**) và 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone (**OE3**) thể hiện hoạt tính gây độc yếu với cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị IC_{50} trong khoảng 101,54-197,58 μM . Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính gây độc ở các nồng độ nghiên cứu trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* có hoạt tính tốt đều là các triterpenoid. Hai hợp chất **MS9**, **MS10** có khung cucurbitacin thể hiện hoạt tính tốt hơn so với các saponin mới có khung oleanane **MS1**, **MS2** và **MS3**. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của hợp chất cucurbitacin D đã được nghiên cứu rất nhiều từ đầu thế kỉ XX, chủ yếu được phân lập từ họ Cucurbitaceae, các hoạt tính chống ung thư biểu hiện mạnh trên các dòng tế bào khác nhau như ung thư vú, phổi, gan, tử cung, tuyến tụy, ...[157]. Điều thú vị là hợp chất cucurbitacin D (**MS9**) lần đầu tiên được phân lập từ loài *M. semiserrata* có biểu hiện ức chế tế bào ung thư vú và ung thư gan mạnh hơn nhiều so với cucurbitacin D phân lập từ loài *Cucumis prophetarum* (IC_{50} : 26,7 μM (MCF-7), 5,0 μM (HepG2)) [158]. Đối với cucurbitacin H thì có ít nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào, chỉ có một nghiên cứu gần đây năm 2020 của nhóm tác giả Neha Kapoor và các cộng sự cho thấy cucurbitacin H là một trong

những thành phần của thuốc có thể chống lại SARS-CoV-2 [159]. Điều đó cho thấy trong nghiên cứu hiện tại của NCS, cucurbitacin H (**MS10**) tách từ *M. semiserrata* có hoạt tính chống ung thư mạnh với dòng tế bào ung thư biểu mô rất quý báu, hứa hẹn cho những nghiên cứu tiếp theo trong việc chữa trị loại ung thư này.

4.2.2. Sử dụng mô phỏng lắp ghép phân tử dự đoán cơ chế ức chế GSK-3 β của các hoạt chất tiềm năng phân lập từ *O. eberhardtii*

4.2.2.1. Kiểm tra sự phù hợp khả năng tính toán của phiên bản mVina với 11 chất ức chế GSK-3 β đã biết

4.2.2.2. Sử dụng mô hình docking phân tử và mô phỏng động học phân tử tính toán đối với các chất phân lập được từ *O. eberhardtii*

a) Sử dụng docking phân tử trong tính toán đối với các chất phân lập được từ *O. eberhardtii*

Bảng 4.36. Ái lực liên kết của 18 hợp chất phân lập được từ *Oligoceras eberhardtii* đến GSK-3 β (ΔG_{Dock} kcal. mol $^{-1}$)

TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}	TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}
1	OE1	-8,2	11	OE11	-7,9
2	OE2	-8,6	12	OE12	-9,4
3	OE3	-8,4	13	OE13	-9,1
4	OE4	-6,5	14	OE14	-8,5
5	OE5	-6,8	15	OE15	-7,7
6	OE6	-8,7	16	OE16	-7,5
7	OE7	-6,3	17	OE17	-7,0
8	OE8	-5,7	18	OE18	-6,2
9	OE9	-6,4	19	indirubin-3'-monoxime	-10,5
10	OE10	-8,6			

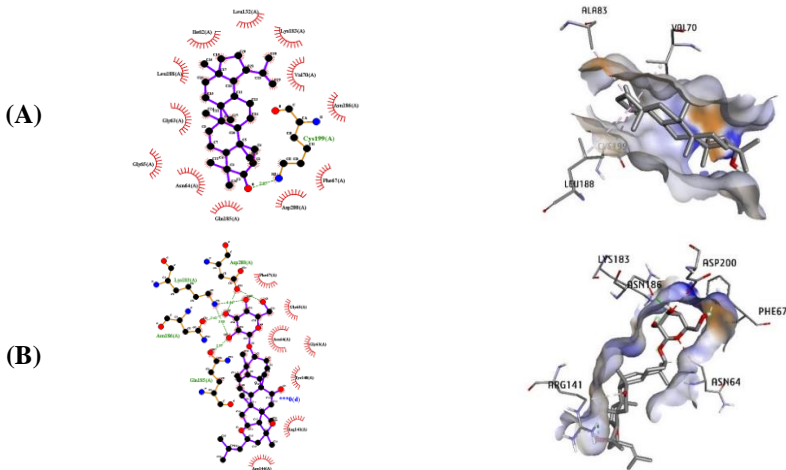
Ái lực liên kết của 18 hợp chất phân lập từ *Oligoceras eberhardtii* đến GSK-3 β được dự đoán bằng mVina (bảng 4.36). Đặc biệt, năng lượng tự do liên kết dao động từ -9,4 đến -5,7 kcal. mol $^{-1}$, giá trị trung bình là $-7,6 \pm 0,2$ kcal.mol $^{-1}$.

Trong 18 hợp chất này có hai hợp chất gồm lupeol (**OE13**) và 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one (**OE12**) được cho là có thể ức chế GSK-3 β với ái lực liên kết gần nhất với ChEMBL365229, đây là chất thực nghiệm có ái lực liên kết lớn nhất. Cụ thể, kết quả được trình bày ở bảng 4.37. Dựa trên các tài liệu đã công bố trước đây, có thể thấy vùng hoạt động của protein GSK-3 β được cấu thành bởi một số amino axit quan trọng gồm: Ile62, Asp133,

Val135, Gln185, Asn186, Cys199, Asp200. Trong các nghiên cứu phát triển thuốc, các chất ức chế thường nhắm tới hình thành liên kết với những amino axit này nhằm ngăn chặn hiệu quả hoạt động của enzyme bằng cách can thiệp vào nhận dạng cơ chất và cơ chế xúc tác, cuối cùng ảnh hưởng đến chức năng tế bào và tín hiệu xuôi dòng. Trong nghiên cứu này, cấu hình liên kết giữa hai phối tử và GSK-3 β được phân tích bằng phần mềm PyMOL [48] và được biểu diễn trong hình 4.74. Trong số này, hợp chất **OE12** tạo một liên kết hydro với amino acid Cys199 của GSK-3 β (Bảng 4.37). Các tương tác kỵ nước khác được quan sát thấy do Val70, Ala83 và Leu188 hình thành với **OE12**. Trong khi đó, Asn64, Phe67, Arg141, Lys183 và Asp200 là các amino acid tạo tương tác kỵ nước với **OE13**, liên kết giữa phối tử và protein được củng cố thêm thông qua 4 liên kết hydro với các amino axit Lys183, Gln185, Asn186, Asp 200.

Bảng 4.37. Kết quả tính toán docking của hai hợp chất tiềm năng

TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}	Amino axit tham gia liên kết Hydro	Amino axit tham gia liên kết Van der Waals
1	OE12	-9,4	Lys183, Gln185, Asn186, Asp 200	Asn64, Phe67, Asp200
2	OE13	-9,1	Cys199	Val70, Ala83, Leu188

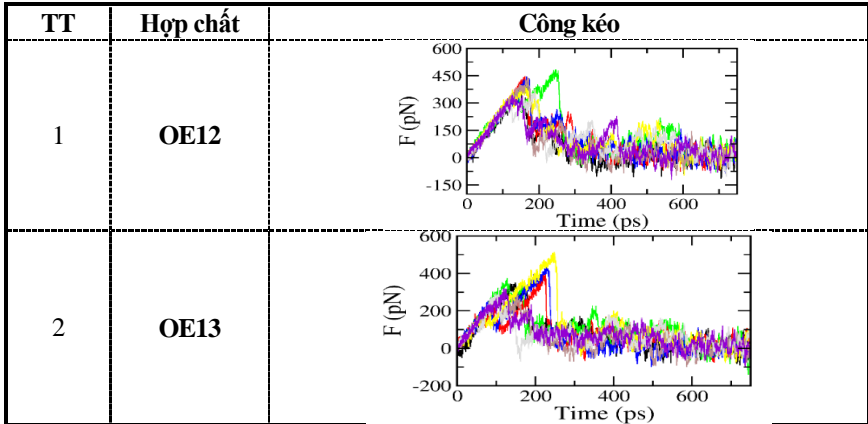


Hình 4.74. Cấu hình liên kết giữa **OE12** (A), **OE13** (B) với GSK-3 β
b) Sử dụng mô phỏng động lực học phân tử tính toán đối với các chất phân lập được từ O. eberhardtii

Thông qua phương pháp hồi quy tuyến tính, năng lượng tự do liên kết dự kiến của phối tử với GSK-3 β có thể được tính như sau:

$$\Delta G_{\text{FPL}}^{\text{Pre}} = 0.035 \times W - 14.628$$

Bảng 4.38. Đồ thị biểu diễn lực kéo gây đứt gãy liên kết của hai chất ức chế tiềm năng trong quá trình di chuyển ra khỏi vùng liên kết với GSK-3 β



Dựa trên bước đánh giá với chất thực nghiệm đã thực hiện trước đó, có thể nhận định rằng mô hình FPL có khả năng tính toán tương đối chính xác ái lực liên kết của phối tử với GSK-3 β . Do đó, năng lượng tự do liên kết phối tử của OE12 và OE13 với GSK-3 β đã được đánh giá bằng phương pháp FPL. Cấu hình liên kết của hai hợp chất ban đầu được tinh chỉnh thông qua mô phỏng MD trong thời gian 20ns. Sau 5 ns mô phỏng MD, phức hệ đã đạt đến trạng thái ổn định (bảng 4.38). Sau đó, cấu hình liên kết cuối cùng của phức hệ được chọn làm dữ liệu đầu vào cho mô phỏng FPL. Đồ thị lực gây đứt gãy liên kết được ghi nhận gần giống với các chất thực nghiệm trước đó, cho thấy tính chính xác của mô hình tính toán. Có thể thấy, lực kéo nhanh chóng tăng đến giá trị cực đại trước khi đột ngột giảm xuống bằng 0. Giá trị trung bình của lực kéo gây đứt gãy liên kết và công kéo được cung cấp trong bảng 4.37. Năng lượng tự do liên kết dự đoán là -9,87 và -10,46 kcal.mol⁻¹. K_i dự đoán của các hợp chất tiềm năng OE13, OE12 lần lượt là 64,43 và 23,95 (bảng 4.37).

Đồ thị lực gây đứt gãy liên kết được ghi nhận gần giống với các chất thực nghiệm trước đó, cho thấy tính chính xác của mô hình tính toán. Có thể thấy, lực kéo nhanh chóng tăng đến giá trị cực đại trước khi đột ngột giảm xuống bằng 0. Giá

trị trung bình của lực kéo gãy đứt gãy liên kết và công kéo được cung cấp trong bảng 4.39. Năng lượng tự do liên kết dự đoán là -9,87 và -10,46 kcal.mol⁻¹. K_i dự đoán của các hợp chất tiềm năng **OE13**, **OE12** lần lượt là 64,43 và 23,95 (bảng 4.39).

Bảng 4.39. Kết quả mô phỏng FPL của hai hợp chất tiềm năng

TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}	ΔF_{Max}	W	$\Delta G_{\text{FPL}}^{\text{Pre}}$	Dự đoán k_i (nM)
1	OE12	-9,4	653,1 ± 23,6	119,1 ± 3,6	-10,46	23,95
2	OE13	-9,1	792,5 ± 31,9	135,9 ± 2,7	-9,87	64,43

^a Đơn vị của năng lượng: kcal. mol⁻¹

Do đó, có thể lập luận rằng hai hợp chất này có khả năng ngăn chặn chức năng của GSK-3 β . Với các giá trị thực nghiệm đã được xác định ở trên với 4 dòng tế bào ung thư cho thấy cả hai hợp chất **OE12**, **OE13** đều có hoạt tính gây độc tế bào, trong đó **OE12** có hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình nhưng mạnh hơn so với **OE13**. Điều này cho thấy các tính toán lí thuyết là hoàn toàn phù hợp với các giá trị thực nghiệm, có thể sử dụng phương pháp docking phân tử và mô phỏng động lực phân tử trong việc khảo sát hoạt tính của các chất phân lập được từ các loài khác.

4.2.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

Sáu hợp chất sạch được phân lập từ *M. semiserrata* (**MS1-MS3**, **MS7**, **MS13**, **MS14**) và mười một hợp chất sạch được phân lập từ *O. eberhardtii* (**OE1-OE3**, **OE6**, **OE8**, **OE9**, **OE11**, **OE12-OE15**) được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 μ g/ml, 128 μ g/ml, 64 μ g/ml, 32 μ g/ml, 16 μ g/ml, 8 μ g/ml, 4 μ g/ml và 2 μ g/ml thử hoạt tính lần lượt với ba chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), ba chủng Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29912, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579) và một chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Kết quả thu được ở bảng 4.39 cho thấy hầu hết các hợp chất phân lập từ loài *O. eberhardtii* đều không thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn và nấm trên, chỉ có duy nhất **OE3** (5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone) có khả năng kháng chủng *Enterococcus faecalis* khá mạnh ở giá trị MIC = 32 μ g/ml.

Đối với các chất phân lập từ *M. Semiserrata* chủ yếu là các hợp chất saponin và flavonoid thể hiện khả năng kháng vi sinh vật kiểm định, cụ thể là có ba hợp chất myrsineoside B (**MS2**), myrsineoside C (**MS3**) và Kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**MS13**) thể hiện khả năng kháng các chủng gram dương, không có biểu hiện kháng với các chủng gram âm. Cụ thể, hợp chất **MS3** biểu hiện kháng mạnh cả 3 khuẩn gram dương so với chất đối kháng ở các giá trị MIC đều là 32 $\mu\text{g/ml}$, **MS13** biểu hiện kháng 01 chủng gram dương là *Enterococcus faecalis* tương đương với chất đối kháng Streptomycin ở giá trị MIC 256 $\mu\text{g/ml}$; **MS2** biểu hiện kháng khá tốt 2 khuẩn gram dương *Enterococcus faecalis* và *Bacillus cereus* so với chất đối kháng ở MIC lần lượt là 128 và 64 $\mu\text{g/ml}$. Như vậy, có thể thấy hai hợp chất mới myrsineoside B (**MS2**) và myrsineoside C (**MS3**) có tiềm năng ứng dụng tốt trong điều trị một số bệnh nhiễm trùng như viêm nội tâm mạc, viêm đường tiết niệu, viêm tuyến tiền liệt.

Bảng 4.39. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii* (MIC $\mu\text{g/ml}$)

T T	Hợp chất	Gram dương			Gram âm			Nấm men
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC299212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
1	OE3	32	-	-	-	-	-	-
2	MS2	128	-	64	-	-	-	-
3	MS3	32	32	32	-	-	-	-
4	MS13	256	-	256	-	-	-	256
5	Streptomycin*	256	128	128	32	256	128	-
6	Cyclohexamide*							32

(*): chất đối chứng, (-): MIC của các chất > 256 $\mu\text{g/ml}$

Các chất **OE1**, **OE2**, **OE6**, **OE8**, **OE9**, **OE12** – **OE15**, **MS1**, **MS7**, **MS14** đều có giá trị MIC lớn hơn 256 $\mu\text{g/ml}$.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký kết hợp và các phương pháp phổ hiện đại, có sự so sánh với số liệu phổ các hợp chất tương tự trong tài liệu tham khảo, từ hai loài

Myrsine semiserrata và *Oligoceras eberhardtii* NCS đã phân lập và xác định được cấu trúc của 32 hợp chất và đánh giá một số hoạt tính sinh học của các hợp chất này. Cụ thể:

- **Về thành phần hoá học:**

1. Từ loài *M. semiserrata* đã phân lập và xác định cấu trúc 14 hợp chất (**MS1-MS14**) trong đó có 3 hợp chất mới và 11 hợp chất đã biết. Ba hợp chất mới được đặt tên là: 3-*O*- α -L- arabinopyranosyl juglangenin A (**MS1**), 3-*O*- β -D- xylopyranosyl castanopsol (**MS3**), 3- α -L-arabinopyranosyl castanopsol (**MS2**) và 11 hợp chất đã biết gồm: Lupeol acetate (**MS4**), taraxerone (**MS5**), kazinol B (**MS6**), kazinol A (**MS7**), 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin (**MS8**), cucurbitacin D (**MS9**), cucurbitacin H (**MS10**), eclalbasaponin II (**MS11**), spergulacin (**MS12**), kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**MS13**), quercitrin (**MS14**).

2. Từ loài *O. eberhardtii* đã phân lập và xác định cấu trúc 18 hợp chất đã biết gồm: lupeol acetate (**OE1**), 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone (**OE2**), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone (**OE3**), dehydro vomifoliol (**OE4**), protocatechuic acid (**OE5**), chrysoeriol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**OE6**), 7Z-roseoside (**OE7**), 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone (**OE8**), lup-20(29)-ene (**OE9**), 23-deoxojessic acid (**OE10**), cucurbitacin F (**OE11**), 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one (**OE12**), lupeol (**OE13**), 3-(*E*)-coumaroyltaraxerol (**OE14**), 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin (**OE15**), 6,7,8-trimethoxycoumarin (**OE16**), 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (**OE17**), vomifoliol (**OE18**).

- **Về hoạt tính sinh học:**

3. Đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* (**MS1-MS14**) và *O. eberhardtii* (**OE1-OE18**) trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A549), ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7), ung thư biểu mô (KB). Kết quả cho thấy hợp chất **MS9** phân lập từ *M. semiserrata* đều thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với dòng ung thư biểu mô KB, ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF7 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 2,05 ± 0,05; 2,32 ± 0,07; 5,45 ± 0,15 μ M. **MS10** thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với KB (IC₅₀ = 6,76 ± 0,15) và mức trung bình đối với HepG2 và MCF7 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 11,21 ± 0,34, 37,56 ± 1,22 μ M. Hai hợp chất mới **MS2**, **MS3** cũng thể hiện khả năng gây độc tế bào ở mức trung bình đối với

dòng tế bào ung thư phổi A549 lần lượt ở các giá trị IC_{50} tương ứng là $43,57 \pm 1,41$ và $23,39 \pm 2,02 \mu M$. Hợp chất **OE12** phân lập từ *O.eberhardtii* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình với ba dòng ung thư biểu mô KB, ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549 với các giá trị IC_{50} tương ứng là $41,32 \pm 2,13$, $36,42 \pm 1,84$ và $38,34 \pm 1,28 \mu M$.

4. Đã nghiên cứu hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định các hợp chất phân lập từ hai loài *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*. Kết quả cho thấy các hợp chất phân lập từ loài *O. eberhardtii* đều không thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn và nấm thử nghiệm. Các hợp chất **OE3**, **MS2**, **MS3**, **MS13** thể hiện tác dụng kháng vi sinh vật kiểm định tương đối tốt trong đó **MS3** biểu hiện kháng mạnh với 3 khuẩn gram dương *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076 với các giá trị MIC tương ứng đều là 32 $\mu g/ml$.

5. Đã sử dụng mô phỏng docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử đối với các chất ức chế GSK-3 β tiềm năng phân lập từ *O. eberhardtii*, kết quả xác định được hai hợp chất **OE12**, **OE13** có khả năng ngăn chặn chức năng hoạt động của GSK-3 β phù hợp với các giá trị thực nghiệm.

KIẾN NGHỊ

Hợp chất **MS9** phân lập từ *M. semiserrata* thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với dòng ung thư biểu mô KB, ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF7, **MS10** thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với dòng ung thư biểu mô có thể tiếp tục tiến hành nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào để định hướng về khả năng ứng dụng của hợp chất này.

Qua việc sử dụng tính toán mô phỏng đã xác nhận được 2 hợp chất **OE12**, **OE13** có khả năng ức chế GSK-3 β trong điều trị ung thư phù hợp với thực nghiệm, do đó có thể dùng phương pháp này để thực hiện tìm kiếm các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* có khả năng ức chế GSK-3 β .

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Lần đầu tiên thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii* được nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới.

1. Về thành phần hóa học

Từ loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii* đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 32 hợp chất, trong đó có 3 hợp chất mới từ loài *M. semiserrata* gồm myrsineoside A, myrsineoside B, myrsineoside C và 18 hợp chất lần đầu được phân lập từ chi *Oligoceras*.

2. Về tác dụng sinh học

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* đối với 4 dòng tế bào ung thư KB, HepG2, A549 và MCF7 của 2 loài *Myrsine semiserrata* và *Oligoceras eberhardtii* đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy hợp chất cucurbitacin D phân lập từ *M. semiserrata* thể hiện khả năng gây độc tế bào tốt nhất đối với dòng ung thư biểu mô KB, ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF7 với giá trị IC_{50} lần lượt $2,05 \pm 0,05$; $2,32 \pm 0,07$; $5,45 \pm 0,15$ μ M. Hai hợp chất mới myrsineoside B, myrsineoside C phân lập từ *M. semiserrata* và 3β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one phân lập từ *O. eberhardtii* cũng thể hiện khả năng gây độc tế bào ở mức trung bình đối với dòng tế bào ung thư phổi A549 với các giá trị IC_{50} lần lượt $43,57 \pm 1,41$; $23,39 \pm 2,02$ và $38,34 \pm 1,28$ μ M.

Lần đầu tiên sử dụng mô phỏng docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử đối với các chất ức chế GSK-3 β tiềm năng phân lập từ *O. eberhardtii*, kết quả xác định được hai hợp chất **OE12** (3β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one) và **OE13** (lupeol) có khả năng ngăn chặn chức năng hoạt động của GSK-3 β phù hợp với các giá trị thực nghiệm.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Thi Binh Yen**, Nguyen Thuy Linh, Vu Van Nam, Trieu Quy Hung, Doan Thi Mai Huong, Pham Van Cuong, 2024, Searching for potential GSK-3 β inhibitors from *Oligoceras eberhardtii* Gagnep. Using atomistic simulations, *Vietnam Journal of Science and Technology* (Accepted).
2. **Thi Binh Yen Nguyen**, Thuy Linh Nguyen, Van Nam Vu, Quy Hung Trieu, Thi Mai Huong Doan, Van Cuong Pham, 2024, A new cytotoxic saponin from the ethyl acetate extract of *Myrsine semiserrata* Wall., *Vietnam Journal of Chemistry*, 2024, 1 (DOI: 10.1002/vjch.202400143)
3. **Nguyen Thi Binh Yen**, Trieu Quy Hung, Pham Van Cuong, Doan Thi Mai Huong, Nguyen Thuy Linh, Tran Van Hieu, Nguyen Manh Hung, Flavonoids from the aerial parts of *Oligoceras eberhardtii* Gagnep. and their cytotoxic evaluation, *Vietnam Journal of Chemistry and Applications*, 3B(71)/9-2024, 72-78.