

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.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

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

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.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

**Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

TS. Triệu Quý Hùng PGS.TS. Phạm Văn Cường

Hà Nội, 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây xay răng nhọn (*Myrsine semiserrata* Wall.) và cây bần giác (*Oligoceras eberhardtii* Gagnep.)” là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Triệu Quý Hùng, PGS.TS. Phạm Văn Cường và 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 được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả

Nguyễn Thị Bình Yên

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được nhiều sự chỉ dạy, giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, kính trọng nhất của mình tới TS. Triệu Quý Hùng, PGS.TS. Phạm Văn Cường và PGS. TS. Đoàn Thị Mai Hương - những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, cũng như động viên và tạo mọi điều kiện, giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô, các nhà khoa học Viện Hóa sinh biển đã giảng dạy, hướng dẫn tôi hoàn thành các học phần và các chuyên đề trong chương trình đào tạo.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, ban lãnh đạo Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Nguyễn Thùy Linh, TS. Phí Thị Đào, TS. Trịnh Thị Thanh Vân, ThS. Trần Văn Hiệu, ThS. Vũ Văn Nam và các cán bộ nghiên cứu Phòng Tổng hợp hữu cơ – Viện Hóa sinh biển đã luôn ủng hộ, động viên và chia sẻ cho tôi những kinh nghiệm, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Trung tâm ứng dụng các phương pháp phổ - Viện Hóa học đã giúp đỡ tôi thực hiện các phép đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Phòng Hóa sinh ứng dụng – Viện Hóa học và Phòng công nghệ sinh học - Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ tôi thực hiện các phép thử hoạt tính trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Phạm Minh Quân và các cán bộ nghiên cứu Trung tâm Ứng dụng Tin hóa học và Y – Sinh – Dược – Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên đã hỗ trợ tôi thực hiện các tính toán docking phân tử các hợp chất hóa học.

Tôi xin bày tỏ sự cảm ơn sâu sắc đến Ban Lãnh đạo Trường Đại học Hùng Vương, Khoa Khoa học Tự nhiên-Trường Đại học Hùng Vương đã tạo mọi điều kiện về thời gian, kinh phí hỗ trợ cho tôi trong quá trình học tập.

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

Xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC HÌNH	xi
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Giới thiệu về đặc điểm thực vật của chi <i>Myrsine</i> và chi <i>Oligoceras</i>	3
1.1.1. Đặc điểm thực vật của chi <i>Myrsine</i>	3
1.1.2. Đặc điểm thực vật của chi <i>Oligoceras</i>	5
1.2. Tổng quan các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học chi <i>Myrsine</i> và chi <i>Oligoceras</i>	6
1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của chi <i>Myrsine</i>	6
1.2.1.1. Các hợp chất flavonoid từ chi <i>Myrsine</i>	6
1.2.1.2. Các hợp chất triterpene và saponin từ chi <i>Myrsine</i>	8
1.2.1.3. Các dẫn xuất của arbutin từ chi <i>Myrsine</i>	11
1.2.1.4. Các hợp chất megastigmane glycoside từ chi <i>Myrsine</i>	12
1.2.1.5. Các thành phần khác từ chi <i>Myrsine</i>	13
1.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của chi <i>Myrsine</i>	14
1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	14
1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.....	16
1.2.2.3. Hoạt tính kháng viêm	16
1.2.2.4. Hoạt tính chống oxi hóa.....	17
1.2.2.5. Các hoạt tính khác	17
1.2.3. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi <i>Oligoceras</i>	22
1.3. Tổng quan về loài <i>Myrsine semiserrata</i> Wall. và <i>Oligoceras eberhardtii</i> Gagnep.	22
1.3.1. Tổng quan về loài <i>Myrsine semiserrata</i> Wall.	22
1.3.2. Tổng quan về loài <i>Oligoceras eberhardtii</i> Gagnep.	23
1.4. Tổng quan về mô hình nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng phương pháp mô phỏng phân tử	23
1.4.1. Giới thiệu chung.....	23
1.4.2. Tổng quan mô hình sàng lọc ảo tìm kiếm hoạt chất tiềm năng phát triển thuốc	25
1.4.3. Tổng quan phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử (Docking phân tử). ..	27

1.4.4. Tổng quan phương pháp mô phỏng động lực học phân tử.....	29
1.4.5. Thông tin chung về enzyme GSK-3 β	32
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	35
2.1.1. Cây xay răng nhọn (<i>Myrsine semiserrata</i> Wall.).....	35
2.1.2. Cây bản giác (<i>Oligoceras eberhardtii</i> Gagnep.).....	35
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	36
2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất	36
2.2.2. Các phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất.....	36
2.2.2.1. Phổ khối lượng (MS).....	36
2.2.2.2. Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS).....	36
2.2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).....	36
2.2.2.4. Độ quay cực	37
2.2.2.5. Phương pháp xác định đường.....	37
2.2.3. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học	38
2.2.3.1. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư	38
2.2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định	39
2.2.4. Phương pháp docking phân tử.....	40
CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ.....	42
3.1. Phân lập các hợp chất từ cây xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>) và cây bản giác (<i>O. eberhardtii</i>)	42
3.1.1. Phân lập các hợp chất từ cây xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>).....	42
3.1.2. Phân lập các hợp chất từ mẫu cây bản giác (<i>O. eberhardtii</i>).....	45
3.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập.....	48
3.2.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ cây xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>).....	48
3.2.1.1. Hợp chất MS1 : Myrsineoside A (3-O- α -L-arabinopyranosyl juglangenin A) (chất mới).....	48
3.2.1.2. Hợp chất MS2 : Myrsineoside B (3- α -L-arabinopyranosyl castanopsol) (chất mới)	48
3.2.1.3. Hợp chất MS3 : Myrsineoside C (3- β -D-xylopyranosyl castanopsol) (chất mới)	48
3.2.1.4. Hợp chất MS4 : Lupeol acetate	48
3.2.1.5. Hợp chất MS5 : Taraxerone	49
3.2.1.6. Hợp chất MS6 : Kazinol B.....	49
3.2.1.7. Hợp chất MS7 : Kazinol A.....	49

3.2.1.8. Hợp chất MS8 : 4'-O-methyl-8-prenylnaringenin	49
3.2.1.9. Hợp chất MS9 : Cucurbitacin D.....	49
3.2.1.10. Hợp chất MS10 : Cucurbitacin H.....	50
3.2.1.11. Hợp chất MS11 : Eclalbasaponin II.....	50
3.2.1.12. Hợp chất MS12 : Spergulacin	50
3.2.1.13. Hợp chất MS13 : Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside	50
3.2.1.14. Hợp chất MS14 : Quercitrin.....	50
3.2.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ cây bản giác (<i>O. eberhardtii</i>)	50
3.2.2.1. Hợp chất OE1 : Lupeol acetate	50
3.2.2.2. Hợp chất OE2 : 5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone	51
3.2.2.3. Hợp chất OE3 : 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone	51
3.2.2.4. Hợp chất OE4 : Dehydrovomifoliol.....	51
3.2.2.5. Hợp chất OE5 : Protocatechuic acid.....	51
3.2.2.6. Hợp chất OE6 : Chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside.....	51
3.2.2.7. Hợp chất OE7 : 7Z-roseoside	51
3.2.2.8. Hợp chất OE8 : 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone.....	52
3.2.2.9. Hợp chất OE9 : Lup-20(29)-ene.....	52
3.2.2.10. Hợp chất OE10 : 23-deoxojessic acid	52
3.2.2.11. Hợp chất OE11 : Cucurbitacin F	52
3.2.2.12. Hợp chất OE12 : 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one.....	52
3.2.2.13. Hợp chất OE13 : Lupeol.....	53
3.2.2.14. Hợp chất OE14 : 3-(E)-Coumaroyltaraxerol	53
3.2.2.15. Hợp chất OE15 : 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl) flavanone	53
3.2.2.16. Hợp chất OE16 : 6,7,8-trimethoxycoumarine	53
3.2.2.17. Hợp chất OE17 : 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid	53
3.2.2.18. Hợp chất OE18 : Vomifoliol.....	53
3.3. Kết quả thử hoạt tính của các hợp chất phân lập từ loài <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>.....	54
3.3.1. Hoạt tính ức chế gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>.....	54
3.3.2. Sử dụng mô phỏng nguyên tử tìm kiếm các chất ức chế enzyme GSK - 3β tiềm năng phân lập từ <i>O. eberhardtii</i>.....	54

3.3.3. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập từ loài <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>	54
CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ.....	55
4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập.....	55
4.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ cây xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>)	55
4.1.1.1. Hợp chất MS1 : Myrsineoside A (3-O- α -L-arabinopyranosyl juglanguenin A) (chất mới)	55
4.1.1.2. Hợp chất MS2 : Myrsineoside B (3-O- α -L-arabinopyranosyl castanopsol) (chất mới)	63
4.1.1.3. Hợp chất MS3 : Myrsineoside C (3-O- β -D-xylopyranosyl castanopsol) (chất mới)	71
4.1.1.4. Hợp chất MS4 : Lupeol acetate	78
4.1.1.5. Hợp chất MS5 : Taraxerone	80
4.1.1.6. Hợp chất MS6 : Kazinol B.....	81
4.1.1.7. Hợp chất MS7 : Kazinol A.....	83
4.1.1.8. Hợp chất MS8 : 4'-O-methyl-8-prenylnaringenin	84
4.1.1.9. Hợp chất MS9 : Cucurbitacin D.....	85
4.1.1.10. Hợp chất MS10 : Cucurbitacin H.....	87
4.1.1.11. Hợp chất MS11 : Eclalbasaponin II.....	89
4.1.1.12. Hợp chất MS12 : Spergulacin	91
4.1.1.13. Hợp chất MS13 : Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside.....	94
4.1.1.14. Hợp chất MS14 : Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside	95
4.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ cây bần giác <i>O. eberhardtii</i>...	97
4.1.2.1. Hợp chất OE1 : Lupeol acetate	97
4.1.2.2. Hợp chất OE2 : 5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone.....	97
4.1.2.3. Hợp chất OE3 : 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'- trimethoxyflavone	98
4.1.2.4. Hợp chất OE4 : Dehydrovomifoliol.....	100
4.1.2.5. Hợp chất OE5 : Protocatechuic acid.....	101
4.1.2.6. Hợp chất OE6 : Chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside.....	102
4.1.2.7. Hợp chất OE7 : 7Z-roseoside	103
4.1.2.8. Hợp chất OE8 : 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'- trimethoxyflavanone.....	105
4.1.2.9. Hợp chất OE9 : Lup-20(29)-ene.....	106
4.1.2.10. Hợp chất OE10 : 23-deoxojessic acid	107
4.1.2.11. Hợp chất OE11 : Cucurbitacin F	109

4.1.2.12. Hợp chất OE12 : 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one.....	110
4.1.2.13. Hợp chất OE13 : Lupeol.....	113
4.1.2.14. Hợp chất OE14 : 3-(E)-Coumaroyltaraxerol	114
4.1.2.15. Hợp chất OE15 : 4'-O-methyl-8-prenylnaringenin	116
4.1.2.16. Hợp chất OE16 : 6,7,8-trimethoxycoumarin	117
4.1.2.17. Hợp chất OE17 : 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid	118
4.1.2.18. Hợp chất OE18 : Vomifoliol.....	118
4.2. Đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>.....	123
4.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>	123
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 <i>O. eberhardtii</i>	125
4.2.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định các hợp chất phân lập từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>	134
KẾT LUẬN.....	136
KIẾN NGHỊ.....	138
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	139
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	141

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
A-549	Lung cancer cell line	Dòng tế bào ung thư phổi
Api	Apiofuranosyl	Đường apiose
¹³ C NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
C.C	Column chromatography	Sắc ký cột
CDCl ₃	Deuteriochloroform (Chloroform- <i>d</i>)	Chloroform đã deuteri hóa
CD ₃ OD	Tetradeteromethanol (Methanol- <i>d</i> ₄)	Methanol đã deuterium hóa
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane	
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ COSY
CTPT	Molecular formula	Công thức phân tử
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM
DMSO	Dimethylsulfoxide	(CH ₃) ₂ SO
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetate
Glc	Glucopyranosyl	Đường glucose
HepG2	Human liver cell line	Dòng tế bào ung thư gan người
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
¹ H NMR	Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HR-ESI-MS	High resolution electrospray Ionization mass spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện
HSQC	Heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
KB	Human epidermic carcinoma KB	Dòng tế bào ung thư biểu mô
KLPT	Molar mass	Khối lượng phân tử
MCF-7	Human breast cancer cell	Dòng tế bào ung thư vú ở người
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MeOH	Methanol	Methanol
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ NOESY
Rha	Rhamnopyranosyl	Đường Rhamnose
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	(CH ₃) ₄ Si
Xyl	Xylopyranosyl	Đường Xylose

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.2.1.</i> Thành phần flavonoid từ chi <i>Myrsine</i>	7
<i>Bảng 1.2.2.</i> Thành phần saponin từ chi <i>Myrsine</i>	10
<i>Bảng 1.2.3.</i> Thành phần các dẫn xuất của arbutin từ chi <i>Myrsine</i>	12
<i>Bảng 1.2.4.</i> Thành phần megastigmane glycoside từ chi <i>Myrsine</i>	13
<i>Bảng 1.2.5.</i> Thành phần khác từ chi <i>Myrsine</i>	14
<i>Bảng 1.2.6.</i> Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất từ chi <i>Myrsine</i>	18
<i>Bảng 2.1.</i> Giá trị MIC ($\mu\text{g/ml}$) của các chất đối chứng	40
<i>Bảng 4.1.</i> Số liệu phổ NMR của MS1 và hợp chất tham khảo	62
<i>Bảng 4.2.</i> Số liệu phổ NMR của MS2 và hợp chất tham khảo	70
<i>Bảng 4.3.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS3 và hợp chất tham khảo	77
<i>Bảng 4.4.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS4 và chất tham khảo	79
<i>Bảng 4.5.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS5 và hợp chất tham khảo	80
<i>Bảng 4.6.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS6 và hợp chất tham khảo	81
<i>Bảng 4.7.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất MS7 và hợp chất tham khảo.....	84
<i>Bảng 4.8.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất MS8 và hợp chất tham khảo.....	85
<i>Bảng 4.9.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS9 và hợp chất tham khảo	86
<i>Bảng 4.10.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS10 và hợp chất tham khảo	88
<i>Bảng 4.11.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS11 và hợp chất tham khảo	90
<i>Bảng 4.12.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất MS12 và hợp chất tham khảo	93
<i>Bảng 4.13.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất MS13 và hợp chất tham khảo.....	94
<i>Bảng 4.14.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất MS14 và hợp chất tham khảo.....	96
<i>Bảng 4.15.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE2 và hợp chất tham khảo	98
<i>Bảng 4.16.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE3 và hợp chất tham khảo	99
<i>Bảng 4.17.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE4 và hợp chất tham khảo	100
<i>Bảng 4.18.</i> Dữ liệu phổ NMR hợp chất OE5 và hợp chất tham khảo	101
<i>Bảng 4.19.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE6 và hợp chất tham khảo	103
<i>Bảng 4.20.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE7 và chất tham khảo	104
<i>Bảng 4.21.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE8 và hợp chất tham khảo	105
<i>Bảng 4.22.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE9 và hợp chất tham khảo	106
<i>Bảng 4.23.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE10 và hợp chất tham khảo	108
<i>Bảng 4.24.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE11 và hợp chất tham khảo	109
<i>Bảng 4.25.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE12	111
<i>Bảng 4.26.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE13 và hợp chất tham khảo	114
<i>Bảng 4.27.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE14 và chất tham khảo	115

<i>Bảng 4.28.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE16 và hợp chất tham khảo	117
<i>Bảng 4.29.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE17 và chất tham khảo	118
<i>Bảng 4.30.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất OE18 và hợp chất tham khảo	119
<i>Bảng 4.31.</i> Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i>	123
<i>Bảng 4.32.</i> Cấu trúc hóa học của 11 hợp chất ức chế GSK-3 β đã biết	126
<i>Bảng 4.33.</i> Cấu hình liên kết giữa GSK-3 β và 11 chất ức chế đã biết.....	128
<i>Bảng 4.34.</i> Điểm số của các chất ức chế GSK-3 β có sẵn so với giá trị thử nghiệm ^a	129
<i>Bảng 4.35.</i> Kết quả FPL của các chất ức chế GSK-3 β có sẵn so với giá trị thử nghiệm ^a	130
<i>Bảng 4.36.</i> Ái lực liên kết của 18 hợp chất phân lập được từ <i>Oligoceras eberhardtii</i> đến GSK-3 β (Δ GDock kcal. mol ⁻¹)	131
<i>Bảng 4.37.</i> Kết quả tính toán docking của hai hợp chất tiềm năng	132
<i>Bảng 4.38.</i> 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	133
<i>Bảng 4.39.</i> Kết quả mô phỏng FPL của hai hợp chất tiềm năng.....	133
<i>Bảng 4.40.</i> Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập từ <i>M. semiserrata</i> và <i>O. eberhardtii</i> (MIC μ g/ml)	134

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Cấu trúc hóa học các hợp chất flavonoid từ chi <i>Myrsine</i>	6
<i>Hình 1.2.</i> Cấu trúc hóa học của các hợp chất saponin từ chi <i>Myrsine</i>	9
<i>Hình 1.3.</i> Cấu trúc hóa học các dẫn xuất của arbutin từ chi <i>Myrsine</i>	11
<i>Hình 1.4.</i> Cấu trúc các hợp chất megastigmane glycoside từ chi <i>Myrsine</i>	12
<i>Hình 1.5.</i> Cấu trúc các hợp chất khác từ chi <i>Myrsine</i>	13
<i>Hình 1.6.</i> Một số bộ phận loài <i>M. semiserrata</i>	22
<i>Hình 1.7.</i> Một số bộ phận loài <i>O. eberhardtii</i>	23
<i>Hình 1.8.</i> Số lượng thuốc được cấp phép lưu hành trên thị trường theo từng thập kỷ kể từ thời điểm năm 1970	24
<i>Hình 1.9.</i> Quy trình nghiên cứu phát triển thuốc truyền thống	26
<i>Hình 1.10.</i> Minh họa tương tác protein – phối tử.	27
<i>Hình 1.11.</i> Minh họa về mô phỏng tìm kiếm cấu hình liên kết bền vững của hợp chất trong vùng hoạt động của protein.....	28
<i>Hình 1.12.</i> Thống kê số lần từ khóa "Molecular dynamics" được ghi nhận trong các công bố khoa học giai đoạn từ năm 1998 đến năm 2020.....	29
<i>Hình 1.13.</i> Đồ thị so sánh hiệu suất mô phỏng động lực học phân tử sử dụng các thiết bị GPU khác nhau thực hiện bởi hãng Desmond năm 2016	31
<i>Hình 2.1.</i> Cây xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>)	35
<i>Hình 2.2.</i> Cây bản giác (<i>O.eberhardtii</i>)	35
<i>Hình 3.1.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài xay răng nhọn (<i>M. semiserrata</i>)	44
<i>Hình 3.2.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây bản giác (<i>O. eberhardtii</i>).....	47
<i>Hình 4.1.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS1 và hợp chất tham khảo.....	55
<i>Hình 4.2.</i> Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MS1	55
<i>Hình 4.3.</i> Phổ IR của hợp chất MS1	56
<i>Hình 4.4.</i> Phổ ¹ H NMR của hợp chất MS1	56
<i>Hình 4.5.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất MS1	57
<i>Hình 4.6.</i> Phổ DEPT của hợp chất MS1	58
<i>Hình 4.7.</i> Phổ HSQC của hợp chất MS1	59
<i>Hình 4.8.</i> Phổ HMBC của hợp chất MS1	59
<i>Hình 4.9.</i> Phổ COSY của hợp chất MS1	60
<i>Hình 4.10.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất MS1	60
<i>Hình 4.11.</i> Phổ NOESY của hợp chất MS1	62
<i>Hình 4.12.</i> Các tương tác NOESY chính của hợp chất MS1	62
<i>Hình 4.13.</i> Cấu trúc hóa học hợp chất MS2 và hợp chất tham khảo	63
<i>Hình 4.14.</i> Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MS2	64

<i>Hình 4.15.</i> Phổ IR của hợp chất MS2	64
<i>Hình 4.16.</i> Phổ ¹ H NMR của hợp chất MS2	65
<i>Hình 4.17.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất MS2	66
<i>Hình 4.18.</i> Phổ DEPT của hợp chất MS2	66
<i>Hình 4.19.</i> Phổ HSQC của hợp chất MS2	67
<i>Hình 4.20.</i> Phổ HMBC của hợp chất MS2	67
<i>Hình 4.21.</i> Phổ COSY của hợp chất MS2	68
<i>Hình 4.22.</i> Phổ NOESY của hợp chất MS2	69
<i>Hình 4.23.</i> Các tương tác chính HMBC, COSY và NOESY của hợp chất MS2	69
<i>Hình 4.24.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS3	71
<i>Hình 4.25.</i> Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MS3	71
<i>Hình 4.26.</i> Phổ IR của hợp chất MS3	71
<i>Hình 4.27.</i> Phổ ¹ H NMR của hợp chất MS3	72
<i>Hình 4.28.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất MS3	73
<i>Hình 4.29.</i> Phổ DEPT của hợp chất MS3	73
<i>Hình 4.30.</i> Phổ HSQC của hợp chất MS3	74
<i>Hình 4.31.</i> Phổ HMBC của hợp chất MS3	74
<i>Hình 4.32.</i> Phổ COSY của hợp chất MS3	75
<i>Hình 4.33.</i> Phổ NOESY của hợp chất MS3	76
<i>Hình 4.34.</i> Các tương tác chính HMBC, COSY và NOESY của hợp chất MS3	76
<i>Hình 4.35.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất MS4	78
<i>Hình 4.36.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS5	80
<i>Hình 4.37.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS6	81
<i>Hình 4.38.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất MS6	83
<i>Hình 4.39.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS7	83
<i>Hình 4.40.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS8	84
<i>Hình 4.41.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất MS9	85
<i>Hình 4.42.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất MS10	87
<i>Hình 4.43.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất MS11	89
<i>Hình 4.44.</i> Các tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của hợp chất MS11	89
<i>Hình 4.45.</i> Cấu trúc hợp chất MS12	91
<i>Hình 4.46.</i> Các tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của hợp chất MS12	92

<i>Hình 4.47.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất MS13	94
<i>Hình 4.48.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất MS14	95
<i>Hình 4.49.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE1	97
<i>Hình 4.50.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE2	97
<i>Hình 4.51.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE3	98
<i>Hình 4.52.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE4	100
<i>Hình 4.53.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE5	101
<i>Hình 4.54.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE6	102
<i>Hình 4.55.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất OE6	102
<i>Hình 4.56.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE7	103
<i>Hình 4.57.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE8	105
<i>Hình 4.58.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE9	106
<i>Hình 4.60.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE11	109
<i>Hình 4.61.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE12	111
<i>Hình 4.62.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất OE12 ...	112
<i>Hình 4.63.</i> Các tương tác NOESY chính của hợp chất OE12	113
<i>Hình 4.64.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE13	113
<i>Hình 4.65.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE14	114
<i>Hình 4.66.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE15	116
<i>Hình 4.67.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất OE16	117
<i>Hình 4.68.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE17	118
<i>Hình 4.69.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất OE18	118
<i>Hình 4.70.</i> Các hợp chất MS1-MS14 phân lập từ <i>M. semiserrata</i>	121
<i>Hình 4.71.</i> Các hợp chất OE1-OE18 phân lập từ <i>O. eberhardtii</i>	122
<i>Hình 4.72.</i> Hệ số tương quan giữa năng lượng tự do liên kết mô phỏng và năng lượng tự do liên kết thực nghiệm.....	129

Hình 4.73. Mối tương quan giữa công kéo (W) và năng lượng tự do liên kết thực nghiệm131

Hình 4.74. Cấu hình liên kết giữa **OE12** (A), **OE13** (B) với GSK-3 β **Error!**
Bookmark not defined.

MỞ ĐẦU

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]. Cùng với sự phát triển của công nghệ tổng hợp hóa dược tạo ra các biệt dược, các nhà khoa học vẫn đang cố gắng tìm hiểu, khám phá tác dụng chống ung thư và các hoạt tính sinh học khác của các hợp chất có nguồn gốc từ nhiều loài thực vật khác nhau.

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” giữa Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH&CNVN và Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, CNRS, Cộng Hòa Pháp, 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% dòng 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% dòng tế bào ung thư biểu mô KB ở nồng độ 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Đồng thời, 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*.

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 bần 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*

Trên thế giới, chi *Myrsine* là một chi lớn, có khoảng 300 loài, phân bố rộng rãi khắp các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Ấn Độ, Mianma, Trung Quốc, Châu Phi, Châu Mỹ, Madagaska, Apganistan, quần đảo Azores.... Ở Việt Nam, chi này có khoảng 9 loài [7,8]. Chi *Myrsine* có nhiều công dụng đa dạng trong y học dân gian, ví dụ như quả của loài xay răng nhọn (*Myrsine semiserrata*) được dùng để làm thuốc sát trùng, nhuận tràng, đầy hơi, đau bụng kinh, tẩy giun sán, rễ và lá cây mặt cắt (*Myrsine seguinii*) chữa viêm tuyến vú, ngứa lở, mụn nhọt, chữa sỏi, bàng quang, *Myrsine leuconeura* sử dụng trong điều trị nhiễm trùng đường tiết niệu, một số loài dùng để điều trị tiêu chảy, thấp khớp, đau răng, lao phổi, băng huyết, hoặc được sử dụng làm hương thơm trong trà, món khai vị, làm thuốc diệt cỏ, gia vị và chất tạo hương liệu như *Myrsine australis*, *Myrsine Africana*, ... [10-14].


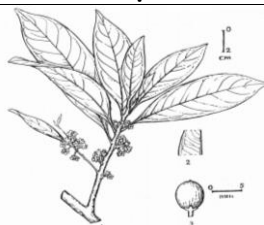
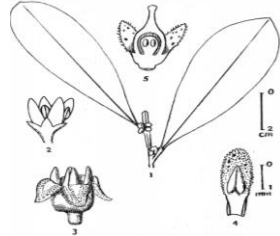
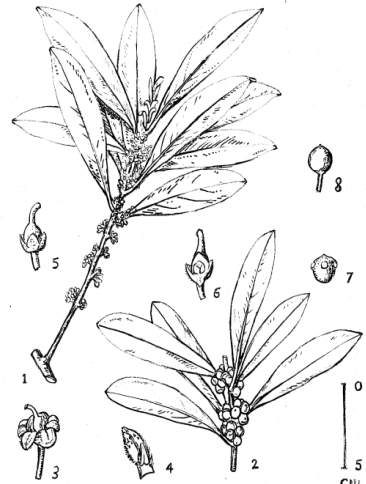
Các loài thuộc chi *Myrsine* chủ yếu là các cây gỗ nhỏ hoặc cây bụi, thẳng, có cành nhỏ, khúc khuỷu. Lá mép nguyên hoặc khía răng cưa, nhẵn, có lúc có điểm tuyến, cuống lá thường men xuống trên cành nhỏ làm cho cành nhỏ có cạnh. Cụm hoa hình tán, hoa mọc tùm ở nách hoặc ngoài nách lá hoặc mọc trên sẹo lá của những cành già có lá đã rụng, gốc cụm hoa có nhiều lá bắc xếp lợp. Hoa mẫu 4-5 cánh, nhỏ (ít khi mẫu 6 cánh), lưỡng tính, đơn tính hoặc tạp tính. Lá đài hợp ngắn ở góc, xếp lợp hoặc xếp van, thường xuất hiện những nhú sần sùi (papillose) ở mặt trong và ở mép, thường có điểm tuyến. Cánh hoa gần rời, ít khi hợp đến ½ chiều dài, xếp lợp trong nụ, có điểm tuyến hoặc gân tuyến. Nhị dính ở giữa cánh hoa trở xuống, mọc đối xứng với cánh hoa, chỉ nhị rõ, ngắn hoặc gần như không có, rời hoặc hợp ở góc; bao phấn hình trứng hoặc hình bầu dục, nhọn, 2 ô, mở dọc. Nhụy ở hoa đực thoái hóa, ở hoa cái có bầu hình cầu, hình trứng hoặc bầu dục, vòi nhụy rất ngắn hoặc gần như không có. Ở hoa lưỡng tính núm nhụy rất đa dạng như dạng châm, bằng, dẹt, hình lược, xẻ đôi hoặc dạng xẻ tua rua, noãn ít, một vòng. Quả hạch, dạng quả mọng, hình cầu hoặc gần hình trứng. Hạt một, lõm ở góc [8].



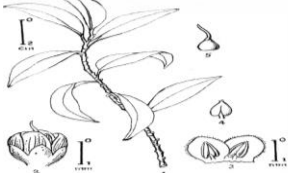
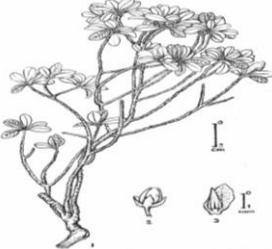
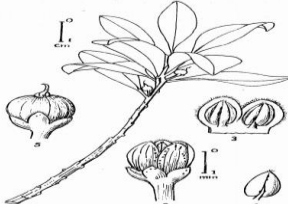
Từ trước đến nay vẫn tồn tại hai chi riêng biệt, mặc dù có những đặc điểm hình thái rất giống nhau là chi Thiết tồn (*Myrsine* L. 1753) và chi Xay có (*Rapanea* Aubl. 1775). Theo C. Chen (1977, 1979) trước kia cũng có nhiều tác giả sáp nhập chi *Rapanea* vào chi *Myrsine* như E. Y. Hosaka (1940), E. Walker (1954, 1959), Lý Huệ Lâm (1963), C. A. Barke và R. C. Bakhuizen Van den Brink (1965). Ngược lại theo quan điểm của Mez (1902) thì nhiều loài của chi *Myrsine* lại được chuyển sang chi *Rapanea*. Nhưng tất cả các tác giả gần đây đã bác bỏ quan điểm trên của Mez. Theo

ngiên cứu mới đây nhất của J. Pipoly & C. Chen (1995, 1996) cũng đã sáp nhập chi *Rapanea* vào *Myrsine*.

Theo các tác giả Phạm Hoàng Hộ [9], Võ Văn Chi [7] và gần đây là Trần Thị Kim Liên [8], một số loài *Myrsine* ở Việt Nam chủ yếu được dân gian sử dụng làm thuốc.

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi *Myrsine* ở Việt Nam

TT	Tên loài	Phân bố
1	 <p><i>M. semiserrata</i> Wall. – Xay răng nhọn</p>	Nepal, India, Mianma, Nam Trung Quốc (Vân Nam, Quý Châu) và miền Bắc Việt Nam. Ở nước ta, có gặp tại Hà Giang (Phố Bàng), Lạng Sơn (Lũng Cầm) và Lào Cai (Sa Pa).
2	 <p><i>M. faberi</i> (Mez) Pipoly & C. Chen. – Xay có</p>	Lào Cai (Sa Pa), Vĩnh Phúc (Tam Đảo). Còn có ở Trung Quốc (Vân Nam, Hải Nam, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu).
3	 <p><i>M. cochinchinensis</i> A. DC. – Xay có Nam bộ</p>	Mới thấy ở Đà Nẵng (Tourane), Lâm Đồng (Di Linh), Bà Rịa-Vũng Tàu (Bà Rịa), Kiên Giang (Phú Quốc).
4	 <p><i>M. seguinii</i> H. Lev. – Mặt cắt</p>	Quảng Ninh (Bãi Cháy), Bắc Cạn, Thái Nguyên, Nghệ An (Cửa Lò), Đà Nẵng (Bà Nà), Khánh Hòa (Nha Trang), Lâm Đồng (Di Linh), Ninh Thuận (Phan Rang). Còn có ở Mianma, Trung Quốc (Hải Nam, Vân Nam, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu), Đài Loan, Nhật Bản, Thái Lan.

TT	Tên loài	Phân bố
5	 <p data-bbox="376 504 869 539"><i>M. linearis</i> (Lour.) Poir. – Xay hẹp</p>	Nghệ An (Nghị Lộc), Quảng Bình, Quảng Trị, Lâm Đồng (Bảo Lộc), Nam bộ. Còn có ở Trung Quốc (Hải Nam, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu).
6	 <p data-bbox="376 810 869 878"><i>M. capitellata</i> Wall. – Xay có dạng đầu</p>	Lào Cai (Sa Pa), Quảng Trị (Ba Mùn), Đà Nẵng (Bà Nà), Khánh Hòa, Lâm Đồng. Còn có ở Ấn Độ, Nepal, Mianma, Trung Quốc, Thái Lan.
7	 <p data-bbox="427 1079 821 1115"><i>M. affinis</i> A. DC. – Xay gần</p>	Lào Cai (Phan Si Pan), Vĩnh Phúc (Tam Đảo). Còn có ở Trung Quốc (Vân Nam, Hải Nam, ...), Indonexia (Java).
8	 <p data-bbox="406 1382 837 1449"><i>M. verruculosa</i> C. Y. Wu & C. Chen. – Xay nhiều mụn</p>	Lào Cai (Phan Si Pan) và Trung Quốc (Vân Nam)
9	 <p data-bbox="367 1673 869 1749"><i>M. cicatricosa</i> C.Y. Wu & C. Chen. - Xay có nhiều sẹo</p>	Lào Cai (Sa Pa). Còn có ở Trung Quốc (Vân Nam).

1.1.2. Đặc điểm thực vật của chi *Oligoceras*

Theo các tài liệu tham khảo chi *Oligoceras* chỉ có một loài duy nhất là cây bản giác (*Oligoceras eberhardtii* Gagnep.) thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) [7].

Chi *Oligoceras* là loại cây gỗ cao 20 m, nhánh kích cộm, lá có phiến to, xoắn tam giác, dài 5 – 10 cm, đáy cắt ngang có 3 gân, không long, mặt dưới mốc mốc, cuống dài có hai tuyến ở đầu. Chùm tụ tán đồng chu, hoa có 5 lá đài, có một tuyến có

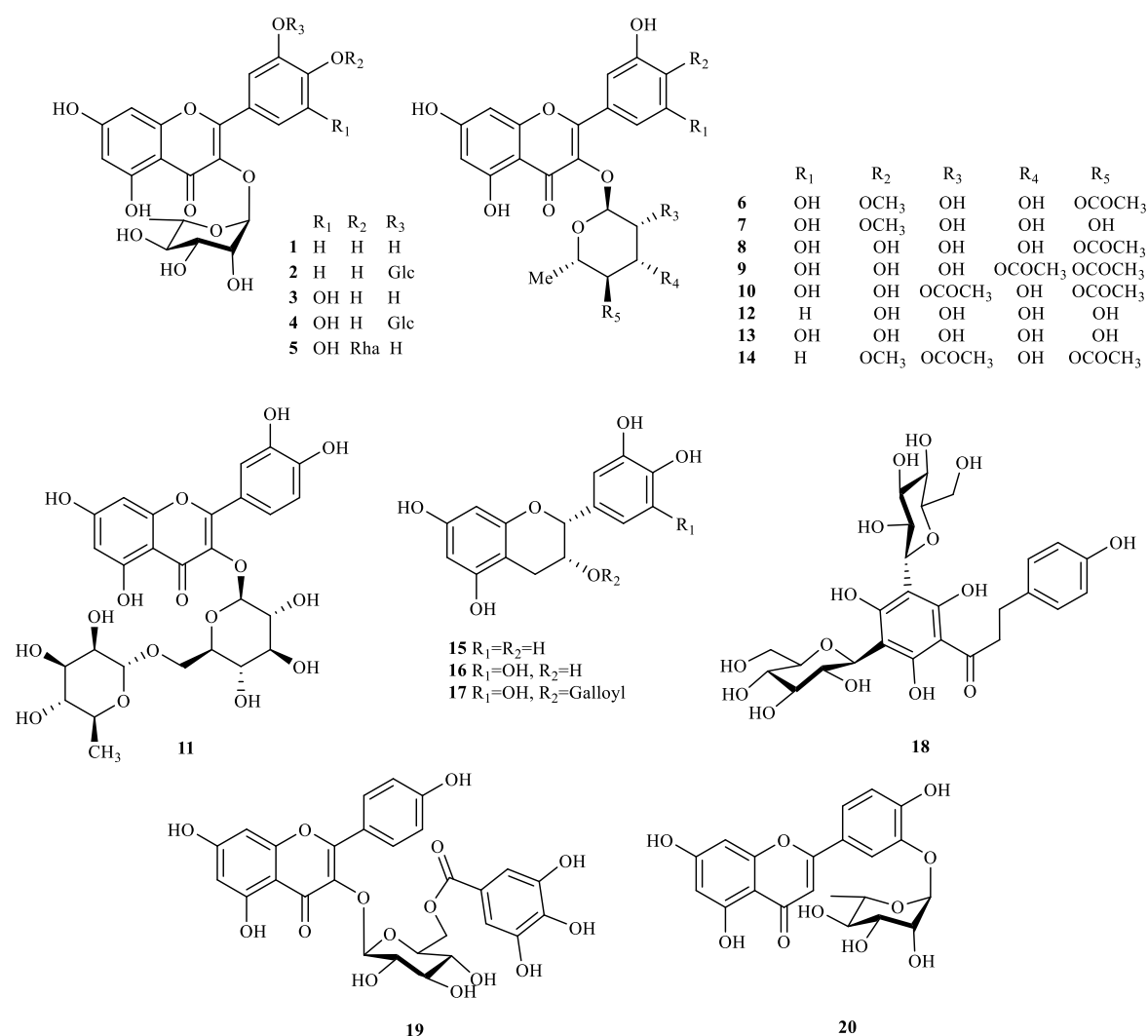
cộng ở lưng, 5 cánh hoa cao 5mm, 5 tiểu nhụy xen với 5 tiểu nhụy lép, quanh noãn sào lép to, hoa cái có noãn sào có 3 vòi nhụy chẻ hai, trái ăn được [7].

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*

Nghiên cứu hóa thực vật của các loài *Myrsine* cho thấy các lớp chất chính được tách ra chủ yếu là flavonoid, phenolic, terpenoid, steroid và saponin, ... Các lớp chất này chính là các thành phần có hoạt tính sinh học quý báu của các loài *Myrsine* này.

1.2.1.1. Các hợp chất flavonoid từ chi *Myrsine*



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học các hợp chất flavonoid từ chi *Myrsine*.

Năm 1997, nhóm tác giả Xi – Ning Zhong và cộng sự thuộc Viện Khoa học Dược phẩm, Trường Đại học Y khoa Hiroshima, Nhật Bản đã phân lập và xác định được cấu trúc của năm hợp chất flavonol glycoside từ dịch chiết methanol lá cây *M. seguinii* [15] gồm: quercitrin (1), quercetin-3-rhamnoside-3'-glucoside (2), myricitrin (3), myricetin-3-rhamnoside-3'-glucoside (4) và myricetin-3,4'-dirhamnoside (5). Hai trong số đó là quercitrin (1) và myricitrin (3) đã được xác định cấu trúc lần đầu tiên

bởi nhóm tác giả Markham (Phòng Hóa học, D.S.I.R Petone, New Zealand) năm 1978 [16]. Hai hợp chất này cũng được phân lập từ dịch chiết methanol của chồi hoặc lá của loài *M. africana* [17].

Bảng 1.2.1. Thành phần flavonoid từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
1	Quercitrin	<i>M. seguinii</i>	Lá	[15-17]
		<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[15]
2	Quercetin-3-rhamnoside-3'-glucoside	<i>M. seguinii</i>	Lá	[15]
3	Myricitrin	<i>M. seguinii</i>	Lá	[15-17]
		<i>M. africana</i>	Chồi, lá	
4	Myricetin-3-rhamnoside-3'-glucoside	<i>M. seguinii</i>	Lá	[15]
5	Myricetin-3,4'-dirhamnoside			
6	Mearnsetin 3-O-(4"-O-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside	<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[17]
7	Mearnsitrin			
8	Myricetin 3-O-(4"-O-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside			
9	Quercetin-3-O-(3",4"-di-O-acetyl)- α -L-rhamnoside			
10	Myricetin 3-O-(2",4"-di-O-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside			
11	Rutin			
12	Quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside	<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[17]
		<i>M. seguinii</i>	Lá	
		<i>M. rubra</i>	Lá, cành	
13	Myricetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside	<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[17]
		<i>M. seguinii</i>	Lá	
		<i>M. rubra</i>	Lá, cành	
14	Mearnsetin 3-(2",4"-diacetyl-rhamnoside)	<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[18, 19]
15	(-)-Epicatechin	<i>M. africana</i>	Chồi, lá	[18, 19]
		<i>M. seguinii</i>	Lá	
		<i>M. rubra</i>	Lá, cành	
16	(-)-Epigallocatechin	<i>M. africana</i>	Lá	[18, 19]
17	(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate			
18	3',5'-di-O- β -glucopyranosyl phloretin			
19	Kaempferol 3-O- β -D-(6"-galloyl) glucopyranoside	<i>M. rubra</i>	Lá, cành	[18]
20	Luteolin 3-O- α -L-rhamnopyranoside			

Từ dịch chiết methanol và ethyl acetate của cây *M. africana* còn phân lập được 12 hợp chất flavonoid và flavonoid glycoside khác như mearnsetin 3-O-(4"-O-

acetyl)- α -L-rhamnopyranoside (**6**), mearnsitrin (**7**), myricetin 3-*O*-(4''-*O*-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside (**8**), quercetin-3-*O*-(3'',4''-di-*O*-acetyl)- α -L-rhamnoside (**9**), myricetin 3-*O*-(2'',4''-di-*O*-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside (**10**), rutin (**11**), quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**12**), và myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**13**) [26], mearnsitrin 3-(2'',4''-diacetyl)-rhamnoside (**14**), (-)-epicatechin (**15**), (-)-epigallocatechin (**16**), (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (**17**), 3',5'-di-*O*- β -glucopyranosyl phloretin (**18**) [18,19]. Hợp chất (**12**), (**13**), (**15**) cũng phân lập được từ cây *M. seguinii* và *M. rubra* [18,19].

Từ dịch chiết ethanol của lá, cành cây *M. rubra* Hildegardo Franca và cộng sự đã tách thêm được kaempferol 3-*O*- β -D-(6''-galloyl) glucopyranoside (**19**) và luteolin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**20**).

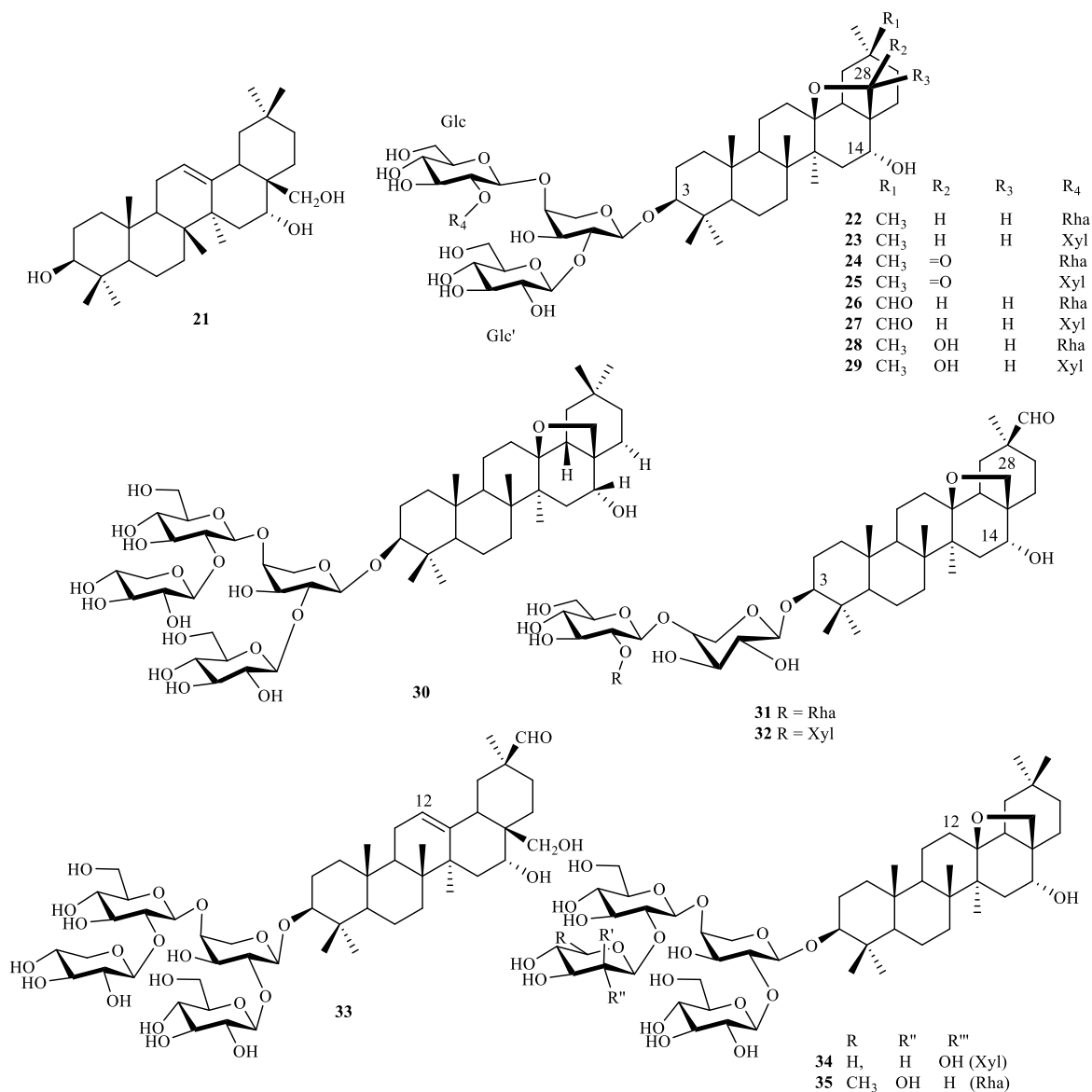
1.2.1.2. Các hợp chất triterpene và saponin từ chi *Myrsine*

Từ cành và lá loài *M. australis* thu được hợp chất lysikokianoside 1 (**30**) và tám saponin khung oleanane [20] gồm: 3 β -*O*-(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane (**22**), 3 β -*O*-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane (**23**), 3 β -*O*-(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxyolean-28,13 β -olide (**24**), 3 β -*O*-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxyolean-28,13 β -olide (**25**), ardisiacrispin A (hoặc saxifragifolin B) (**26**), ardisiacrispin B (**27**), 3 β -*O*-(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α ,28-dihydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane (**28**), và 3 β -*O*-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α ,28-dihydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane (**29**) [21,22].

Aglycone của saponin (**22**) và (**23**) là protoprimulagenin A, khi thủy phân tạo ra primulagenin A (**21**). So sánh dữ liệu phổ ^{13}C NMR của cặp (**24**, **25**) và (**28**, **29**) với dữ liệu của (**22**) hoặc (**23**) cho thấy aglycone của các saponin này có liên quan chặt chẽ với protoprimulagenin A và chỉ khác nhau ở trạng thái oxy hóa của C28. Ở (**24**) và (**25**), C28 bị oxy hóa hoàn toàn thành C=O và là một phần của nhóm γ -lacton (δ_{C} 179 ppm); ở (**28**) và (**29**), C28 chuyển thành dạng hemiacetal (δ_{C} 99 ppm) [23]. Catherine Lavaud và cộng sự cũng đã phân lập được (**26**) và (**27**) từ dịch chiết ethanol của thân cây *M. pellucida* [24]. Tuy nhiên ban đầu thu được saponin (**27**) ở trong hỗn

hợp với saxifragifolin B (**26**) và việc tách các hợp chất này bằng sắc ký silica gel không hiệu quả.

Ngoài ra, từ dịch chiết này các tác giả còn phân lập được bốn hợp chất saponin khác là: 3-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A (**31**); 3-*O*-(β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A (hoặc prumilanin) (**32**), 3-*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin D (**33**).



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất saponin từ chi *Myrsine*.

Từ dịch chiết methanol của lá cây *M. australis* nhóm tác giả V.R. Hegde cũng phân lập được hai hợp chất saponin là 3-*O*-(β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxyoleanane (**34**) và 3 β -*O*-(β -D-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-

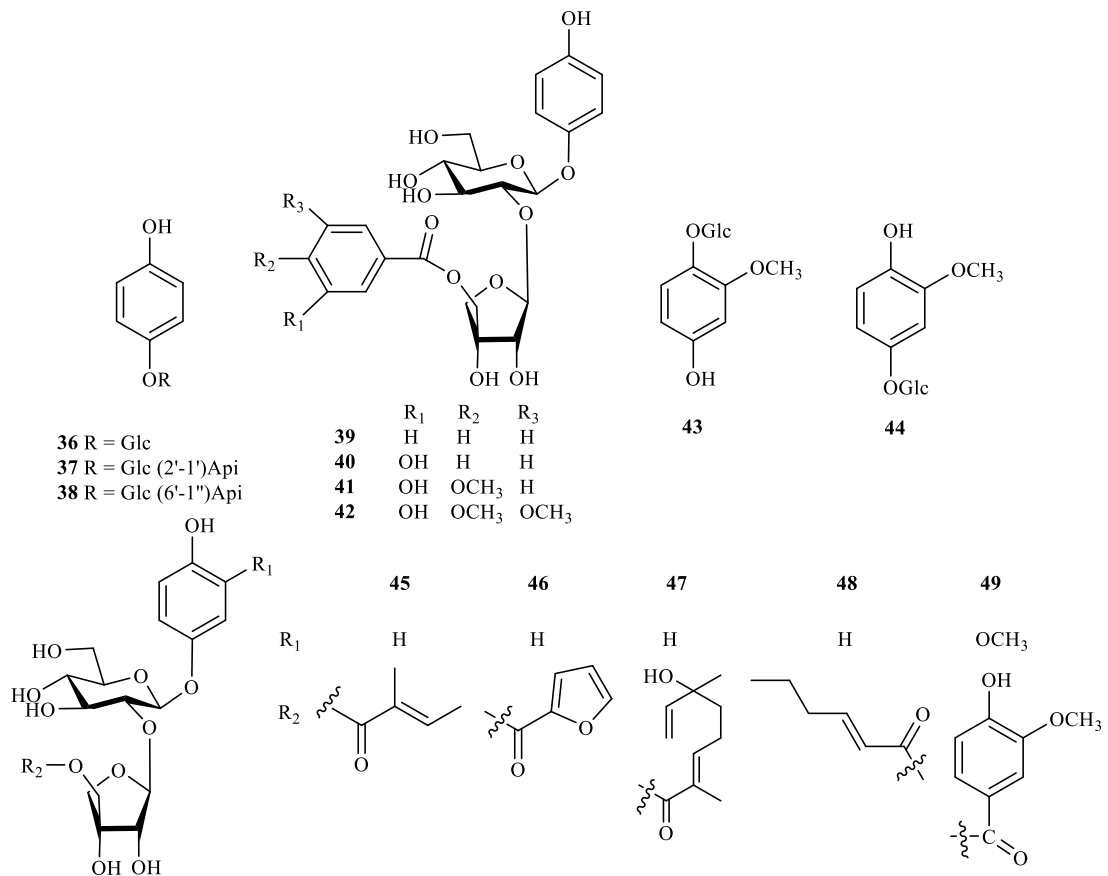
glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxy-13β,28-epoxyoleanane (**35**) [25].

Bảng 1.2.2. Thành phần saponin từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
22	3β-O-(β-D-xylopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxy-13β,28-epoxy oleanane	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[23,25]
23	3β-O-(α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxy-13β,28-epoxy oleanane			
24	3β-O-(β-D-xylopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxyolean-28,13β-olide	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[23]
25	3β-O-(α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxyolean-28,13β-olide			
26	Ardisiacrispin A Saxifragifolin B	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[23, 24]
		<i>M. pellucida</i>	Thân cây	
		<i>M. salicina</i>	Lá	
27	Ardisiacrispin B	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[23, 24]
		<i>M. pellucida</i>	Thân cây	
28	3β-O-(β-D-xylopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α,28-dihydroxy-13β,28-epoxy oleanane	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[23]
29	3β-O-(α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)))-α-L-arabinopyranosyl)-16α,28-dihydroxy-13β,28-epoxy oleanane			
30	Lysikokianoside 1			
31	3-O-(α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl(1→4)-α-L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A	<i>M. pellucida</i>	Thân cây	[24]

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
32	3-O-(β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A (primulanin)			
33	3-O- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin D			
34	3-O-(β -D-xyclopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxyoleanane	<i>M. australis</i>	Cành, lá	[25]
35	3 β -O-(β -D-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxyoleanane			

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



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học các dẫn xuất của arbutin từ chi *Myrsine*

Tiếp theo các nghiên cứu của Xi – ning Zhong và cộng sự, từ dịch chiết lá cây *M. segunii* đã phân lập được bảy hợp chất hydroquinone glycoside [25] gồm có:

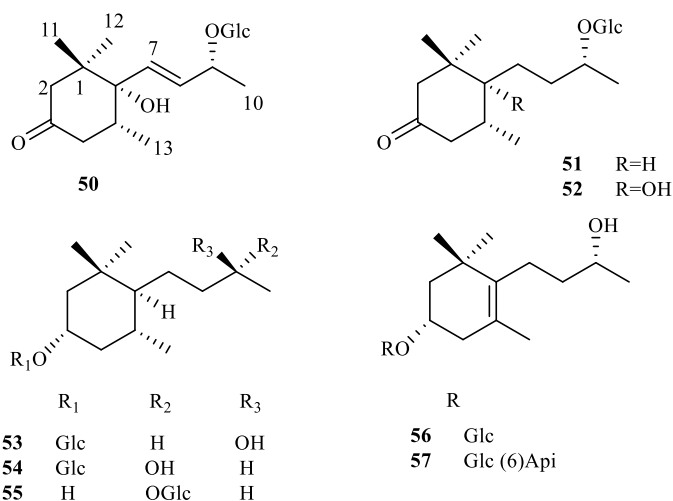
arbutin (**36**), arbutin-2'-*O*- β -apiofuranoside (seguinoside A) (**37**), arbutin-6'-*O*- β -apiofuranoside (seguinoside B) (**38**), các ester benzoyl, *p*-hydroxybenzoyl, 3-methoxy-4-hydroxybenzoyl và 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoyl của nhóm 5''-OH của arbutin 2'-*O*- β -apiofuranoside (tương ứng là seguinosides C-F) (**39-42**).

Bảng 1.2.3. Thành phần các dẫn xuất của arbutin từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
36	Arbutin			
37	Seguinoside A			
38	Seguinoside B			
39	Seguinoside C	<i>M. seguinii</i>	Lá	[26]
40	Seguinoside D			
41	Seguinoside E			
42	Seguinoside F			
43	Tachioside			
44	Isotachioside	<i>M. seguinii</i>	Lá	[27]
45	Seguinoside G			
46	Seguinoside H			
47	Seguinoside I			
48	Seguinoside J			
49	Seguinoside K			

Năm 1999, Xi – ning Zhong và cộng sự tiếp tục phân lập từ dịch chiết lá cây *M. seguinii* thu được hai hợp chất phenolic glycoside là tachioside (**43**) và isotachioside (**44**) cùng với năm hợp chất hydroquinone diglycoside acyl ester là seguinoside G – K (**45 – 49**) [27].

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



Hình 1.4. Cấu trúc các hợp chất megastigmane glycoside từ chi *Myrsine*

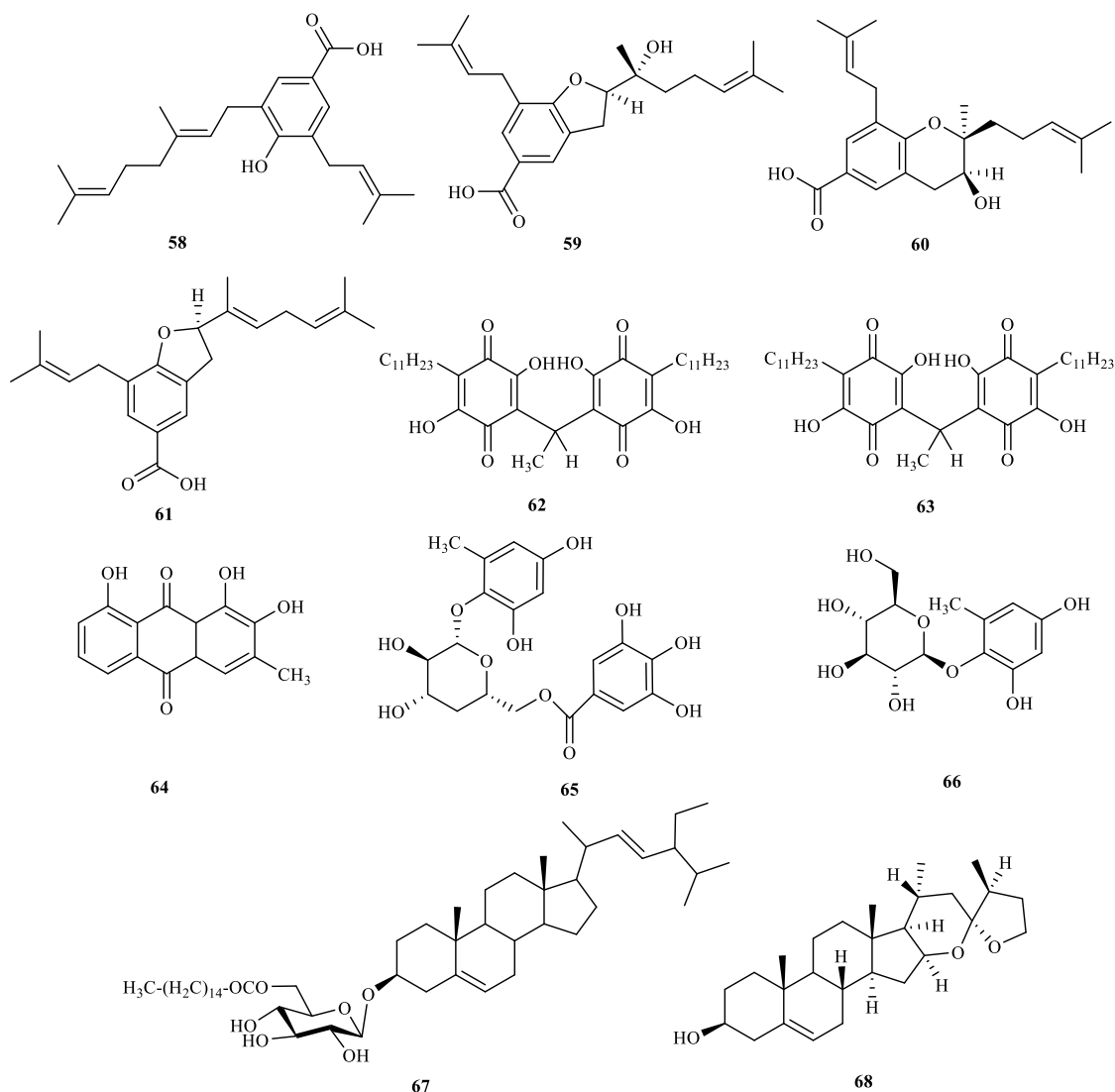
Trong nghiên cứu của Hideaki Otsuka cùng các cộng sự năm 2001, nhóm tác giả đã phân lập được tám megastigmane glycoside (dạng bột vô định hình) từ cặn chiết methanol lá cây *M. seguinii* thu thập ở Okinawa gồm có: ampelopsionoside

(50), myrsinioside A (51), myrsinioside B (52), myrsinioside C (53), alangioside J (54), myrsinioside D (55), linarioside A (56), myrsinioside E (57) [28].

Bảng 1.2.4. Thành phần megastigmane glycoside từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
50	Ampelopsioside	<i>M. seguinii</i>	Lá	[28]
51	Myrsinioside A			
52	Myrsinioside B			
53	Myrsinioside C			
54	Alangioside J			
55	Myrsinioside D			
56	Linarioside A			
57	Myrsinioside E			

1.2.1.5. Các thành phần khác từ chi *Myrsine*



Hình 1.5. Cấu trúc các hợp chất khác từ chi *Myrsine*.

Trong các nghiên cứu của Hirota và các cộng sự, năm 2002, từ cặn chiết methanol của cây *M. seguinii* đã phân lập được myrsinoic acid A (58), myrsinoic acid B (59), myrsinoic acid C (60), myrsinoic acid F (61) [29, 30, 31].

Myrsinoic acid A còn được phân lập từ cặn chiết ethanol của quả cây *M. coriacea* [32].

Năm 2003, nhóm nghiên cứu Lawrence O. Arot Manguro đã phân lập từ phân đoạn cặn chiết ethyl acetate bột quả của *M. africana* được hai dẫn xuất benzoquinone (**62**, **63**) là methylvilangin (**62**) và methylanhydrovilangin (**63**) [33]. Từ cặn chiết ethanol của rễ cây loài *M. africana* còn phân lập được hợp chất (**64**) dạng tinh thể màu cam sáng là một đồng phân vị trí của emodine với sự sắp xếp thay thế khác nhau xung quanh vòng 9,10-anthraquinone có tên là 2-hydroxychrysophanol [16]. Hai hợp chất phenolic gồm myrsinoside A (**65**), myrsinoside B (**66**) [17] và một hợp chất steroid myrsigenin (**67**) [33] được phân lập từ cặn chiết methanol của *M. africana*.

Từ loài *M. australis* phân lập thêm được một steroid là 3-*O*-(6'-*O*-palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl stigmasterol (**68**) [25].

Bảng 1.2.5. Thành phần khác từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	TLTK
58	Myrsinoic acid A	<i>M. coriacea</i>	Quả	[32]
		<i>M. seguinii</i>	Cành, lá	[23, 34, 35]
59	Myrsinoic acid B	<i>M. seguinii</i>	Cành, lá	[32,36]
60	Myrsinoic acid C	<i>M. seguinii</i>	Cành, lá	[32]
61	Myrsinoic acid F			
62	Methylvilangin	<i>M. africana</i>	Quả	[36]
63	Methylanhydrovilangin			
64	2-hydroxychrysophanol	<i>M. africana</i>	Rễ	[30]
65	Myrsinoside A	<i>M. africana</i>	Lá	[27]
66	Myrsinoside B			
67	Myrsigenin	<i>M. africana</i>	Lá	[37]
68	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl stigmasterol	<i>M. australis</i>	Lá, cành	[25]

Các nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học từ *Myrsine* rất phong phú và đa dạng. Trong đó, các hợp chất được công bố nhiều nhất từ các loài thuộc chi *Myrsine* là các hợp chất flavonoid và terpenoid với cấu trúc hóa học khá độc đáo.

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

Có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng cặn chiết thô của các loài thuộc chi *Myrsine* thể hiện nhiều hoạt tính sinh học rất đáng quý. Cụ thể, loài *M. africana* được nghiên cứu nhiều nhất. Năm 1969, trong nghiên cứu của Kupchan và cộng sự đã cho thấy cặn chiết alcohol của cành và lá loài *M. africana* được phát hiện có khả năng ức chế các tế bào ung thư cơ bắp chuột [21]. Cặn chiết methanol và các phân đoạn khác nhau của các bộ phận của *M. africana* có khả năng gây độc tế bào ung thư và ngưng kết máu đối với tế bào hồng cầu nhóm máu AB người [33]. Cặn chiết *n*-hexane của loài này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào có ý nghĩa (66,7%) ở 1000 μ g/ml.

Qua các nghiên cứu đã công bố cho thấy, từ loài *M. africana* phân lập được các hợp chất saponin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào có ý nghĩa. Các saponin này là các glycoside của primulagenin A (**21**) với các đường glucose, rhamnose, galactose và glucuronic acid được Kupchan và cộng sự phân lập được từ cành và lá, các hợp chất này được gọi là *Myrsine* saponin, chúng có hoạt động ức chế ung thư mô tế bào đáng kể [21, 22].

Sự có mặt của các saponin đã quyết định hoạt tính sinh học ở hai loài *Myrsine* (*M. australis* (A. Rich.) Allan và *M. salicina* Hew ex Hook.) thu ở New Zealand. Tám saponin thuộc khung oleanane (**22-29**) được phân lập từ *M. australis* đều thể hiện mức độ hoạt động tương tự gây ức chế toàn bộ các hiệu ứng tế bào ở mức 40,0 µg/đĩa. Tuy nhiên, sự khác biệt về hoạt tính gây độc tế bào đã được quan sát thấy trên dòng tế bào bạch cầu lympho P388 trong đó (**22**) và (**23**) (IC₅₀ 0,85 µg/ml trong mỗi trường hợp) gây độc tế bào mạnh hơn so với **24-29** (IC₅₀ > 6,0 µg/ml) [23].

Hợp chất lysikokianoside 1 (**30**) phân lập được từ loài *M. australis* có tác dụng gây độc tế bào ung thư đối với tế bào buồng trứng chuột đồng (CHO) và tế bào u ác tính ở người (IC₅₀ = 1,0 µg/ml). Hai hợp chất saponin khác phân lập từ cặn chiết methanol của loài này là 3-*O*-(β-D-xyclopyranosyl-(1→2))-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl-(1→2))-α-L-arabinosyl)-16α-hydroxy-13β,28-epoxyoleanane (**34**) và 3β-*O*-(β-D-rhamnopyranosyl-(1→2))-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-(O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-arabinopyranosyl)-16α-hydroxy-13β,28-epoxyoleanane (**35**) thể hiện kết quả ức chế phospholipase D kích thích PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) trong các tế bào bệnh bạch cầu tiền tủy bào (HL-60) ở người cho thấy hợp chất (**34**) và (**35**) có IC₅₀ lần lượt là 3,0 và 2,0 µM ức chế PLD kích thích bằng PMA. Các hợp chất này cũng ức chế PLD kích thích bằng fMLP có giá trị IC₅₀ lần lượt là 8,0 và 24,0 µM.

Trong nghiên cứu của Kishore và cộng sự năm 2018, các hợp chất myricetin 3-*O*-(4"-*O*-acetyl)-α-L-rhamnopyranoside (**8**), quercetin-3-*O*-(3",4"-di-*O*-acetyl)-α-L-rhamnoside (**9**), myricetin 3-*O*-(2",4"-di-*O*-acetyl)-α-L-rhamnopyranoside (**10**), myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside (**13**), myrsinoside A (**67**), myrsinoside B (**68**) từ loài *M. africana* thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư gan [17].

Myrsinoic acid A (**58**) được phân lập từ cao chiết ethanol của quả cây *M. coriacea* [32] thể hiện sự ức chế đối với HB – EGF (yếu tố tăng trưởng giống như yếu tố tăng trưởng biểu bì gắn heparin, liên quan đến bệnh ung thư), methioninase (L-methionine lyase, liên quan đến bệnh ung thư và hôi miệng), acetylcholinesterase (liên quan đến bệnh Alzheimer). Hợp chất 2-hydroxychrysophanol (**66**) tách từ rễ cây

loài *M. africana* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào vừa phải với ba dòng tế bào khối u ở người A-549 (ung thư phổi), KBMRI, HT-29 (ung thư đại trực tràng) [22].

1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các chế phẩm từ hỗn hợp trái cây khô và lá loài *M. africana* trong nước đã cho thấy hiệu quả ức chế 77,0% đối với *Haemonchus*, *Trichostrongylus* và *Oesophagostomum spp.* [38]. Cặn chiết methanol và các phân đoạn khác nhau của các bộ phận của *M. africana* có khả năng diệt côn trùng, kháng nấm, kháng khuẩn. Cặn chiết chloroform (CHCl₃) có hoạt tính diệt côn trùng ở mức độ thấp (20,0%), các phân đoạn trong nước thể hiện khả năng chống lại *Tribolium castaneum* và *Rhizopertha dominica*. Cặn chiết methanol và phân đoạn CHCl₃ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với *Klebsiella pneumoniae* với giá trị MIC lần lượt là 2,45 và 2,10 mg/ml [37]. Ngoài ra, cặn chiết của loài *Myrsine* khác cũng có tính kháng khuẩn như cặn chiết ethanol của loài *M. coriacea* [32]. Tuy nhiên, khi thử hoạt tính kháng khuẩn của myrsinoic acid A được phân lập từ dịch chiết ethanol của quả cây *M. coriacea* này [32] với các chủng *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* và *Candida tropicalis* thấy không có hoạt tính chống lại các vi sinh vật được chọn.

1.2.2.3. Hoạt tính kháng viêm

Năm 2003, nhóm tác giả Hidefumi Makabe đã thử hoạt tính của cặn chiết methanol của loài *M. seguinii* và cho thấy có hoạt tính kháng viêm [29].

Các hợp chất: myrsinoic acid A (**58**), myrsinoic acid B (**59**), myrsinoic acid C (**60**), myrsinoic acid F (**61**) phân lập từ cặn chiết methanol của loài *M. seguinii* đã được thử nghiệm bổ sung vào thành phần thuốc chống viêm tai ở chuột do TPA gây ra. Kết quả cho thấy với liều 1,4 mmol, myrsinoic acid A, B và C đã ngăn chặn tình trạng viêm do TPA gây ra tương ứng lên đến 65z, 83z và 68z. Ở liều 0,56 mmol, myrsinoic acid A, B và C thể hiện giá trị IE nhỏ hơn lần lượt là 22z, 25z và 44z. Những hoạt động kháng viêm này có thể so sánh với hoạt động của indomethacin. Myrsinoic acid F ức chế 77z ở liều 0,56 mmol cho thấy hoạt tính kháng viêm của myrsinoic acid F mạnh nhất trong các hợp chất trên và mạnh hơn indomethacin – là một chất chống viêm thường được sử dụng. Các myrsinoic acid này có khả năng ngăn chặn các phản ứng sinh lý khác nhau liên quan đến sự tăng sinh tế bào [29, 30, 31].

Ngoài ra, trong nghiên cứu của Satomi Ito và các cộng sự cho thấy myrsinoic acid B (**59**) được phân lập từ *Myrsine seguinii* có khả năng ức chế quá trình sản xuất methyl mercaptan (CH₃SH) bởi *Fusobacterium nucleatum* JCM8532. Tiếp đó, năm

2010, Satomi Ito nghiên cứu về khả năng ức chế sản xuất H₂S bởi vi sinh vật đường miệng vì hydrogen sulfide (H₂S) là thành phần chính của chứng hôi miệng sinh lý, trong khi CH₃SH liên quan đến chứng hôi miệng bệnh lý. Trong nghiên cứu này, Satomi Ito đã lấy *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* và *Treponema denticola* ủ với myrsinoic acid B và chất nền như L-cysteine hoặc L-methionine. Nồng độ H₂S hoặc CH₃SH trong không khí được xác định bằng sắc ký khí. Kết quả cho thấy nồng độ của myrsinoic acid B ức chế 50% (IC₅₀) quá trình sản xuất H₂S của *F. nucleatum* là 0,14 µg ml⁻¹ và IC₅₀ của *P. gingivalis* và *T. denticola* lần lượt là 2,71 µg ml⁻¹ và 28,9 µg ml⁻¹ [36].

Sự hiện diện của pyruvate, sản phẩm phụ của quá trình sản xuất H₂S đã được xác định. Giá trị IC₅₀ của myrsinoic acid B trong quá trình ngăn chặn sản xuất pyruvate là 22,9 µg ml⁻¹ đối với *F. nucleatum*, 87,7 µg ml⁻¹ đối với *P. gingivalis* và 165,0 µg ml⁻¹ đối với *T. denticola*. Trong khi đó, giá trị IC₅₀ của ZnCl₂ lần lượt là 186,0; 21,5 và 276,0 µg ml⁻¹. Myrsinoic acid B hiệu quả hơn kẽm clorua trong việc ngăn chặn sự sản xuất pyruvate của *F. nucleatum* và *T. denticola*. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này cũng cho thấy Myrsinoic acid B hiệu quả hơn kẽm clorua trong việc ngăn chặn sự sản xuất α-ketobutyrate là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất CH₃SH. Như vậy, myrsinoic acid B có khả năng ức chế sự sản xuất H₂S, CH₃SH cũng như pyruvate và α-ketobutyrate bởi mầm bệnh nha chu [36].

1.2.2.4. Hoạt tính chống oxi hóa

Trong nghiên cứu của Kishore và cộng sự năm 2018, căn chiết methanol của cây *M. africana* thể hiện hoạt tính chống oxi hóa tốt ở khoảng IC₅₀ = 8,65 ± 0,23 µg/mL. Mười bốn hợp chất flavonoid và flavonoid glycoside được phân lập từ căn chiết methanol và ethyl acetate của (1-14) thể hiện hoạt tính chống oxi hóa mạnh ở các giá trị IC₅₀ trong khoảng từ 1,90 ± 0,021 đến 4,20 ± 0,003 µM, trong đó hợp chất mearnsitrin (7) có khả năng chống oxi hóa mạnh nhất với IC₅₀ = 1,90 ± 0,021 µM [17]. Bên cạnh đó hai hợp chất phenolic cũng được tách từ loài này có hoạt tính chống oxi hóa mạnh với IC₅₀ = 8,65 ± 0,23 µg/mL.

1.2.2.5. Các hoạt tính khác

Cũng trong nghiên cứu của Kishore và cộng sự năm 2018, 14 hợp chất flavonoid và flavonoid glycoside thu được từ căn chiết methanol và ethyl acetate của cây *M. africana* (1-14) đều có hoạt tính ức chế enzyme *tyrosinase*, đặc biệt các hợp chất (11), (12), (13) có khả năng ức chế enzyme *tyrosinase* cao nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,13 ± 0,003; 0,15 ± 0,003; 0,12 ± 0,002 µM. Đây cũng là lần đầu tiên thử hoạt tính ức chế enzyme *tyrosinase* của mearnsitrin (7), mearnsetin 3-*O*-(4"-*O*-acetyl)-α-L-rhamnopyranoside (8), quercetin-3-*O*-(3",4"-di-*O*-acetyl)-α-L-

rhamnoside (9), myricetin 3-*O*-(2'',4''-di-*O*-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside (10), myricetin 3-*O*-(4''-*O*-acetyl)- α -L-rhamnopyranoside (13). Các hợp chất này có giá trị IC₅₀ thấp hơn ($p < 0,01$) so với ascorbic acid (IC₅₀ = 11,2 μ M), trong đó, mearnsitrin cũng thể hiện hoạt tính mạnh nhất [17]. Ngoài ra, hai hợp chất phenolic myrsinoside A (65), myrsinoside B (66) cũng được phân lập từ cặn chiết methanol của *M. africana*, thử hoạt tính ức chế enzyme *tyrosinase* cho kết quả IC₅₀ < 11,2 μ M. Sự có mặt của myrsigenin (67) góp phần quyết định hoạt tính chống co thắt do KCl theo cơ chế chặn kênh calcium của cặn chiết methanol *M. africana* thô.

Bảng 1.2.6. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất từ chi *Myrsine*

STT	Tên hợp chất	Hoạt tính sinh học	Loài	TLTK
1	Quercitrin	Ức chế enzyme <i>tyrosinase</i> Chống oxi hóa tốt	<i>M. seguinii</i> <i>M. africana</i>	[15-17]
2	Quercetin-3-rhamnoside-3'-glucoside		<i>M. seguinii</i>	[15]
3	Myricitrin		<i>M. seguinii</i> <i>M. africana</i>	[15-17]
4	Myricetin-3-rhamnoside-3'-glucoside		<i>M. seguinii</i>	[15]
5	Myricetin-3,4'-dirhamnoside			
6	Mearnsetin 3- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> -acetyl)- α -L-rhamnopyranoside		<i>M. africana</i>	[17]
7	Mearnsitrin			
8	Myricetin 3- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> -acetyl)- α -L-rhamnopyranoside	Ức chế enzyme <i>tyrosinase</i> Chống oxi hóa tốt Ức chế tế bào ung thư gan (HepG2)	<i>M. africana</i>	[17]
9	Quercetin-3- <i>O</i> -(3'',4''-di- <i>O</i> -acetyl)- α -L-rhamnoside			
10	Myricetin 3- <i>O</i> -(2'',4''-di- <i>O</i> -acetyl)- α -L-rhamnopyranoside			
11	Rutin			
12	Quercetin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	Ức chế enzyme <i>tyrosinase</i> Chống oxi hóa tốt Ức chế tế bào ung thư gan (HepG2)	<i>M. africana</i> <i>M. seguinii</i> <i>M. rubra</i>	[17]
13	Myricetin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside		<i>M. africana</i> <i>M. seguinii</i> <i>M. rubra</i>	
14	Mearnsetin 3-(2'',4''-diacetyl)rhamnoside)		<i>M. africana</i>	
15	(-)-epicatechin	-	<i>M. africana</i>	

STT	Tên hợp chất	Hoạt tính sinh học	Loài	TLTK
			<i>M. seguinii</i> <i>M. rubra</i>	
16	(-)-epigallocatechin	-	<i>M. africana</i>	
17	(-)-epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate	-		
18	3',5'-di- <i>O</i> - β -glucopyranosyl phloretin	-		
19	Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-(6"-galloyl) glucopyranoside	-	<i>M. rubra</i>	[18]
20	Luteolin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	-		
22	3 β - <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu	<i>M. australis</i>	[23,25]
23	3 β - <i>O</i> -(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu		
24	3 β - <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxyolean-28,13 β -olide	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu	<i>M. australis</i>	[23]
25	3 β - <i>O</i> -(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxyolean-28,13 β -olide	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu		
26	Ardisiacrispin A Saxifragifolin B	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu	<i>M. australis</i> <i>M. pellucida</i> <i>M. salicina</i>	[23, 24]
27	Ardisiacrispin B	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu	<i>M. australis</i> <i>M. pellucida</i>	
28	3 β - <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -	Ức chế tế bào ung thư bạch cầu	<i>M. australis</i>	[23]

STT	Tên hợp chất	Hoạt tính sinh học	Loài	TLTK
	L-arabinopyranosyl))-16 α ,28-dihydroxy-13 β ,28- epoxy oleanane			
29	3 β -O-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-O- β -glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinopyranosyl)-16 α ,28-dihydroxy-13 β ,28-epoxy oleanane			
30	Lysikokianoside 1	Ức chế tế bào u ác tính, u buồng trứng		
31	3-O-(α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A	-		
32	3-O-(β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin A (primulanin)	-	<i>M. pellucida</i>	[24]
33	3-O- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl) cyclamiretin D	-		
34	3-O-(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2))- α -L-arabinosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxyoleanane	Ức chế phospholipase D trong tế bào ung thư bạch cầu		
35	3 β -O-(β -D-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2))-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-arabinopyranosyl)-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxyoleanane		<i>M. australis</i>	[25]
36	Arbutin	-		
37	Seguinose A	-		
38	Seguinose B	-	<i>M. seguinii</i>	[26]
39	Seguinose C	-		
40	Seguinose D	-		

STT	Tên hợp chất	Hoạt tính sinh học	Loài	TLTK
41	Seguinioside E	-		
42	Seguinioside F	-		
43	Tachioside	-	<i>M. seguinii</i>	[22]
44	Isotachioside	-		
45	Seguinioside G	-		
46	Seguinioside H	-	<i>M. seguinii</i>	[27]
47	Seguinioside I	-		
48	Seguinioside J	-		
49	Seguinioside K	-		
50	Ampelopsisionoside	-		
51	Myrsinioside A	-		
52	Myrsinioside B	-		
53	Myrsinioside C	-	<i>M. seguinii</i>	[28]
54	Alangionoside J	-		
55	Myrsinioside D	-		
56	Linarionoside A	-		
57	Myrsinioside E	-		
58	Myrsinoic acid A	Hoạt tính kháng viêm, ức chế đối với HB – EGF (yếu tố tăng trưởng giống như yếu tố tăng trưởng biểu bì gắn heparin, liên quan đến bệnh ung thư), methioninase (L-methionine lyase, liên quan đến bệnh ung thư và hôi miệng), acetylcholinesterase (liên quan đến bệnh Alzheimer).	<i>M. coriacea</i> <i>M. seguinii</i>	[32]
59	Myrsinoic acid B	Hoạt tính kháng viêm Ức chế sự sản xuất H ₂ S, CH ₃ SH cũng như pyruvate và α -ketobutyrate bởi mầm bệnh nha chu.	<i>M. seguinii</i>	[32,36]
60	Myrsinoic acid C	Hoạt tính kháng viêm	<i>M. seguinii</i>	[32]
61	Myrsinoic acid F			
62	Methylvilangin	-	<i>M. africana</i>	[36]
63	Methylanhydrovilangin	-		

STT	Tên hợp chất	Hoạt tính sinh học	Loài	TLTK
64	2-hydroxychrysophanol	A-549 (ung thư phổi), KBMRI, HT-29 (ung thư đại trực tràng)	<i>M. africana</i>	[30]
65	Myrsinoside A	Ức chế enzyme <i>Tyrosinase</i>	<i>M. africana</i>	[27]
66	Myrsinoside B	Chống oxi hóa tốt Ức chế tế bào ung thư gan (HepG2)		
67	Myrsigenin	Chống co thắt	<i>M. africana</i>	[37]
68	3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl stigmasterol	-	<i>M. australis</i>	[25]

(-) Không thể hiện hoạt tính sinh học

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

Chi *Oligoceras* có một loài duy nhất là *Oligoceras eberhardtii* trên thế giới hiện nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi này.

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

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

Đặc điểm thực vật loài xay răng nhọn (Myrsine semiserrata Wall.)

Theo tác giả Võ Văn Chi, cây xay răng nhọn hay còn gọi là diệp xỉ thiết tồn có tên khoa học là *Myrsine semiserrata* Wall. thuộc họ anh thảo (Primulaceae), là dạng cây bụi hay cây gỗ nhỏ, cao 3 – 7 m, nhánh không lông. Lá hình bầu dục hay thuôn, dài 4 – 9 cm, rộng 1 – 2 cm, nhọn hai đầu, dày cứng, mép có răng ở nửa trên, mặt dưới có tuyến, cuống lá dài 5 – 6 mm. Cụm hoa hình tán, gồm 3 – 7 hoa ở nách lá. Hoa nhỏ, màu đỏ đỏ, các lá đài và cánh hoa hợp ở gốc, 4 nhị dính trước cánh hoa, vòi nhụy dài 2 mm, đầu nhụy to chia 3 thùy. Quả hạch tròn, đường kính 4 – 5 mm, có điểm tuyến, có một hạt.

Cây mọc trong rừng thưa thứ sinh trên núi đá vôi, ở độ cao 1100 – 1700 m, tái sinh thiên nhiên kém. Cây ra hoa vào tháng 4, có quả vào tháng 5 – 7.



Hình 1.6. Một số bộ phận loài *M. semiserrata*

Công dụng: Vỏ và lá của *M. semiserrata* có nhiều tannin, hạt có nhiều dầu béo. Ở Vân Nam, Trung Quốc, quả của cây được dùng làm thuốc sát trùng, chữa sán dây, nhuận tràng, đầy hơi, đau bụng [8].

Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học: Theo tìm hiểu của chúng tôi, trên thế giới và Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này.

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

*Đặc điểm thực vật của loài bản giác *Oligoceras eberhardtii* Gagnep.*

Theo các tài liệu tham khảo chi *Oligoceras* chỉ có một loài duy nhất là cây bản giác (*Oligoceras eberhardtii* Gagnep.) thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) [7].

Cây bản giác hay còn gọi là cây noi có tên khoa học là *Oligoceras eberhardtii* Gagnep., là loại cây gỗ cao 20 m, nhánh kích cộm, lá có phiến to, xoắn tam giác, dài 5 – 10 cm, đáy cắt ngang có 3 gân, không long, mặt dưới mòm mòm, cuống dài có hai tuyến ở đầu. Chùm tụ tán đồng chu, hoa có 5 lá đài, có một tuyến có cọng ở lưng, 5 cánh hoa cao 5mm, 5 tiểu nhụy xen với 5 tiểu nhụy lép, quanh noãn sào lép to, hoa cái có noãn sào có 3 vòi nhụy chẻ hai, trái ăn được [7].



Hình 1.7. Một số bộ phận loài *O. eberhardtii*

Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học: Theo tìm hiểu của chúng tôi, trên thế giới và Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này.

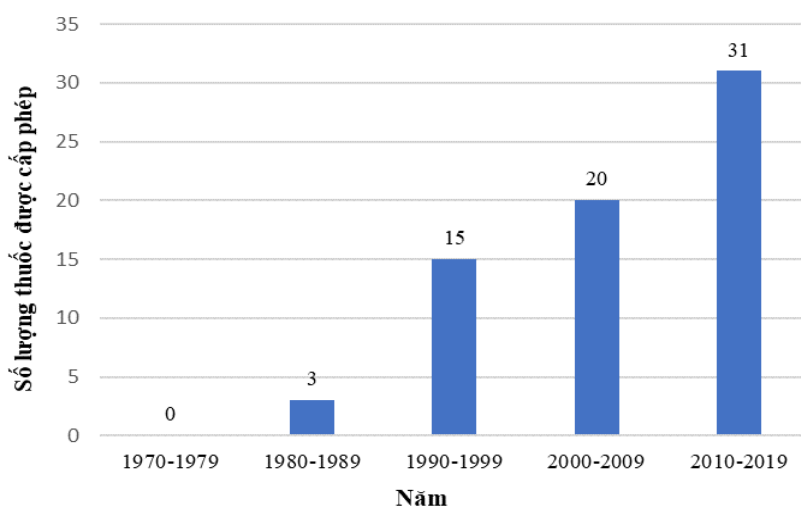
1.4. Tổng quan về mô hình nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng phương pháp mô phỏng phân tử

1.4.1. Giới thiệu chung

Phương pháp ứng dụng công nghệ thông tin trong nghiên cứu hoá - sinh - y học đã được phát triển từ cuối những năm 1950 trên thế giới. Trong những năm 1960, những chương trình máy tính đơn giản đã có thể sử dụng để mô phỏng phổ NMR [39]. Sử dụng mô hình phân tích mối tương quan hoạt tính - cấu trúc Hansch, nhiều máy tính có thể được kết nối để giải quyết những phương trình hồi quy phức tạp [40]. Tuy nhiên, các phân tử thực tế là khá phức tạp để có thể giải quyết các vấn đề liên quan đến cấu trúc không gian vào thời điểm đó. Trong những năm 1970, với sự cải thiện về tốc độ xử lý cộng với giao diện sử dụng thân thiện, công nghệ tin học đã có những đóng góp đáng kể hơn [40]. Khó khăn chính trong thời gian này là chưa có các chương trình máy tính có thể mô tả chính xác các phân tử cùng các tính chất của chúng từ các kết quả lý thuyết. Rào cản này sau đó được tháo gỡ với sự xuất hiện

của các máy tính được trang bị các chương trình đồ họa mạnh đủ để có thể miêu tả các HOMO (Highest occupied molecular orbital), LUMO (Least unoccupied molecular orbital), MUP (molecular electrostatic potential), các vectơ moment lưỡng cực ... chồng lên cấu trúc 3D của phân tử [39,40]. Đầu những năm 1990, các máy tính lớn đa nhân (cluster) đã đủ mạnh để thực hiện các tính toán trên các phân tử thực trong thời gian đủ ngắn, kết quả này cũng góp phần tăng cường sự quan tâm của các nhà hoá học vào sử dụng các ứng dụng của công nghệ thông tin trong nghiên cứu hoá học của các phân tử hữu cơ [41].

Ngày nay trong lĩnh vực hóa dược hiện đại, chúng ta đang chứng kiến sự bùng nổ mạnh mẽ về số lượng các nghiên cứu tìm kiếm và thử nghiệm đánh giá những hợp chất mới có tiềm năng và hoạt tính chọn lọc. Điều này có thể thực hiện được là nhờ vào sự phát triển của các kỹ thuật như hóa học tổ hợp và sàng lọc thông lượng cao (Highthroughput screening – HTS). Tuy nhiên, nhược điểm của các kỹ thuật này là tạo ra một số lượng lớn các kết quả dương giả, do đó, ngay cả khi đã sử dụng kỹ thuật sàng lọc nhanh này, các nhà khoa học vẫn cần phải thực hiện tiếp những bước sàng lọc chi tiết hơn để đánh giá lại các dữ liệu thu được.



Hình 1.8. Số lượng thuốc được cấp phép lưu hành trên thị trường theo từng thập kỷ kể từ thời điểm năm 1970

Trong những năm gần đây thiết kế thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính (Computer aided drug design - CADD) đang nổi lên là một công cụ mạnh để sàng lọc thông lượng cao các cơ sở dữ liệu lớn hợp chất để tìm kiếm hoạt chất có khả năng ức chế hoạt động của một protein chức năng cụ thể. Lĩnh vực này được đề cập lần đầu tiên vào ngày 5 tháng 10 năm 1981 trong một công bố khoa học có tựa đề "Cuộc cách mạng công nghiệp tiếp theo: Thiết kế thuốc bằng máy tính tại Merck" đăng trên tạp chí Fortune [42]. Kể từ đó, sự ưu việt của CADD ngày càng được chứng minh vì phương pháp này giảm đáng kể thời gian và chi phí để phát triển một loại thuốc mới

[43]. Theo số liệu thống kê cho đến năm 2019, hơn 70 loại thuốc đang được thương mại hóa trên thị trường có sự đóng góp của CADD trong quá trình nghiên cứu phát triển, điều này chứng minh vai trò ngày càng quan trọng của mô hình nghiên cứu này trong lĩnh vực dược phẩm.

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

Trong các nghiên cứu hoá học các hợp chất thiên nhiên trước kia, các hoạt chất mới được phân lập chủ yếu là ngẫu nhiên và thông qua việc sàng lọc hoạt tính sinh học đơn giản bao gồm các hoạt tính kháng sinh, độc tế bào, v.v. Hiện nay, tại các nước phát triển, các loại thuốc thế hệ mới được phát hiện và phát triển thông qua các công cụ sàng lọc mạnh về di truyền học và hoá sinh, trong đó, sử dụng các dòng tế bào thay thế quan trọng, các trung gian điều hoà, hay sử dụng sự tương tác *thụ thể – phối tử* (Receptor - Ligand) [44]. Các sàng lọc này sẽ cho phép phát hiện chính xác các hợp chất có chứa hoạt tính mong muốn trong rất nhiều các dịch chiết khác nhau. Quan trọng hơn, các thử nghiệm này cung cấp những thông tin ban đầu về cơ chế hoạt động của hoạt chất trong quá trình phát triển thuốc [40, 44].

Để thực hiện được các sàng lọc trên cần thiết phải có thông tin cấu trúc của những thụ thể đích sinh học (protein/enzyme) có vai trò quan trọng trong hình thành cơ chế của đối tượng bệnh nghiên cứu. Phương pháp sàng lọc trên ngoài sự chính xác và là công cụ để nghiên cứu cơ chế tác động của thuốc, còn là cơ sở quan trọng để phát triển các loại thuốc mới khi bệnh đã kháng thuốc [45,46]. Khi sử dụng thuốc không đúng chỉ định hoặc do các điều kiện môi trường, các tác nhân hoá học có thể dẫn đến tình trạng bệnh kháng thuốc do một sự đột biến nào đó trong cấu trúc của ADN, tức là cấu trúc của protein đích có biến đổi. Nếu chỉ dựa trên các sàng lọc hoá học - hoạt tính sinh học thông thường không thể phát hiện ra các biến đổi này. Tuy nhiên, với việc kết hợp công nghệ sinh học và hoá học thì vấn đề có thể được giải quyết bằng việc nghiên cứu những thay đổi trong cấu trúc ADN, sự sai khác giữa tương quan thụ thể - thuốc và biến đổi cấu trúc các thuốc đang sử dụng làm cho hiệu quả của thuốc trở lại. Lĩnh vực sàng lọc trên đòi hỏi sự kết hợp chặt chẽ của các nhà nghiên cứu trong ba lĩnh vực - Sinh học, Hoá học và Y dược học, trong đó:

- Các nhà sinh học phân tử là những người tiên phong trong việc tìm kiếm và xác định cấu trúc của các đích sinh học.

- Các nhà hoá học thực hiện công việc sàng lọc các cấu trúc thuốc dựa trên sự ức chế các đích sinh học này và sau đó là tổng hợp, bán tổng hợp ra chúng.

- Các bước thử nghiệm hoạt tính sinh học, tiền lâm sàng và lâm sàng là sự kết hợp giữa các nhà hoá học, sinh học, bác sĩ, dược sĩ.

Trong các mô hình sàng lọc hoạt chất hiện đại, mới đây xuất hiện mô hình sàng lọc ảo (Virtual Screening - VS) và đã nhanh chóng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong các dự án nghiên cứu phát triển thuốc. Mô hình trên sử dụng các tiến bộ trong tin học để sàng lọc ảo, mô tả và dự đoán các cấu trúc mới được cho là có hoạt tính mạnh [47,48]. Ưu điểm của phương pháp là giảm thiểu chi phí và thời gian trong quá trình phát hiện và phát triển thuốc. Nó thường được mô tả là một phương pháp gồm nhiều bước theo tuần tự thông qua các tiêu chí sàng lọc khác nhau từ đó thu hẹp dần để lựa chọn các hợp chất có tiềm năng phát triển làm thuốc với những hoạt tính sinh học mong muốn. Hợp chất được nghiên cứu không nhất thiết phải có sẵn và việc thử nghiệm chúng là mô phỏng ảo nên không gây tổn kém về nguyên vật liệu [47,49]. Dựa vào nguyên lý này, bất kỳ hợp chất nào cũng có thể được đánh giá thông qua sàng lọc ảo. Tùy thuộc vào quy mô nghiên cứu, cơ sở dữ liệu hợp chất cho sàng lọc ảo có thể lên tới hàng chục triệu hợp chất và toàn bộ những chất này có thể được phân tích chỉ sàng một lần sàng lọc.

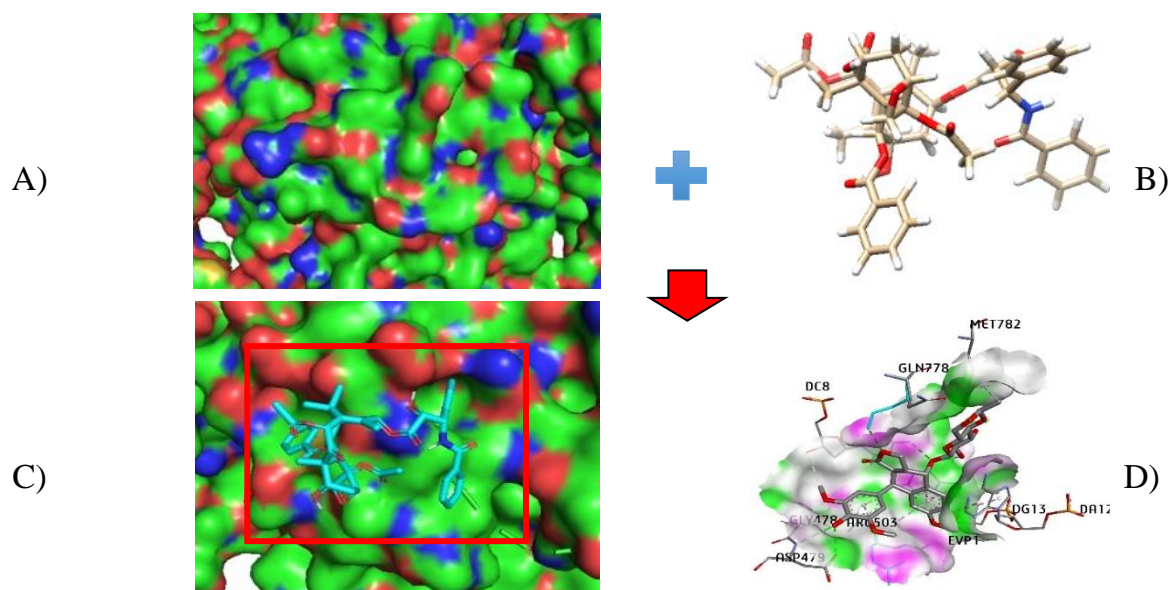


Hình 1.9. Quy trình nghiên cứu phát triển thuốc truyền thống

Với mô hình truyền thống, mỗi loại thuốc mới được đưa ra thị trường thông thường tiêu tốn khoảng 800 triệu euro và cần thời gian 10 – 15 năm cho quá trình nghiên cứu (Hình 1.9). Trong khi đó, với các hệ thống máy tính nối mạng hiện đại (ví dụ tính toán lưới – GRID) thì hàng triệu cấu trúc có thể được sàng lọc ảo chỉ trong thời gian vài tuần.

Các sàng lọc *in silico* sử dụng mô phỏng tương tác giữa thụ thể – phối tử để tìm ra các phối tử (ligand) có cấu trúc được dự đoán liên kết với thụ thể tốt nhất – ở đây là có mức năng lượng liên kết tự do (ΔG) thấp nhất (Hình 1.10) [50]. Cấu trúc các protein ở mô hình không gian ba chiều (3D) đối với mỗi bệnh được nghiên cứu và cung cấp bởi các nhà sinh học, các phối tử là các hợp chất hoá học với cấu trúc đã được xác định và có nguồn trích dẫn rõ ràng.

Công trình nghiên cứu sử dụng phương pháp sàng lọc ảo được ghi nhận công bố quốc tế lần đầu tiên vào năm 1997 [51]. Kể từ đó cho tới nay, việc ứng dụng mô hình này ngày càng trở nên phổ biến và trở thành một xu thế nghiên cứu mới trong ngành dược học, đi kèm đó là số lượng các nghiên cứu công bố liên quan tới lĩnh vực này ngày càng tăng mạnh.



Hình 1.10. Minh họa tương tác protein – phối tử.

(A) Bề mặt vùng hoạt động của protein; (B) Cấu trúc ba chiều của phối tử;

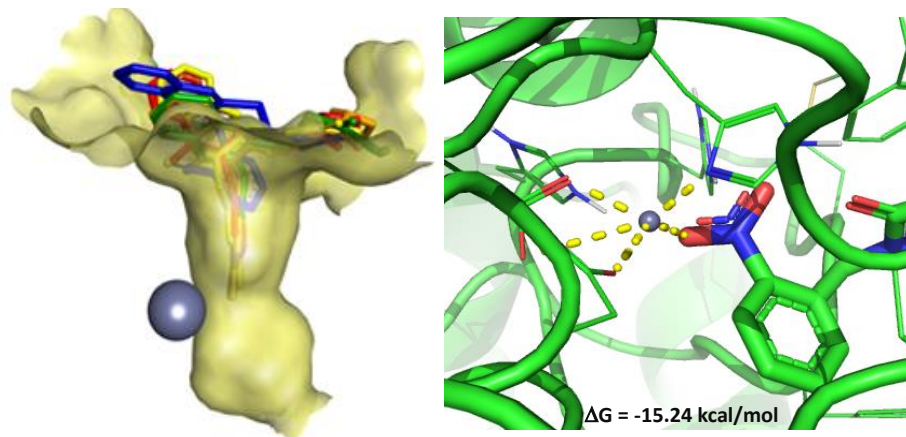
(C) Trạng thái liên kết bề mặt protein – phối tử; (D) Cấu hình tương tác ba chiều protein - phối tử

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

So với sàng lọc thông lượng cao (HTS) thực nghiệm truyền thống, VS là phương pháp tiếp cận khám phá thuốc hợp lý và trực tiếp hơn và có ưu điểm là chi phí thấp và sàng lọc nhanh hiệu quả. VS có thể được phân loại thành các phương pháp sàng lọc dựa trên cấu trúc phối tử và sàng lọc dựa trên cấu trúc đích sinh học mục tiêu. Khi một tập hợp các phối tử có hoạt tính sinh học được biết đến đồng thời có rất ít hoặc không có thông tin cấu trúc cho các đích sinh học mục tiêu, các phương pháp sàng lọc dựa trên cấu trúc phối tử, chẳng hạn như mô hình hóa dược và liên quan định lượng cấu trúc – tác dụng (QSAR) có thể được sử dụng. Đối với việc nghiên cứu phát triển thuốc bằng cách sàng lọc dựa trên cấu trúc đích sinh học mục tiêu, docking phân tử là phương pháp phổ biến nhất được sử dụng rộng rãi kể từ đầu những năm 1980 [52]. Các chương trình dựa trên các thuật toán khác nhau đã được phát triển để thực hiện các nghiên cứu docking phân tử, điều này đã làm cho docking trở thành một công cụ ngày càng quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu dược phẩm. Cho đến nay, nhiều bài đánh giá tổng quan về docking đã được công bố [53-58], và nhiều nghiên cứu so sánh đã được thực hiện để đánh giá hiệu suất tương đối của các phần mềm khác nhau.

Phương pháp docking phân tử được phát triển để mô hình hóa sự tương tác giữa một phân tử nhỏ và một protein ở cấp độ nguyên tử, cho phép chúng ta tìm hiểu và mô tả cơ chế hoạt động của các phân tử nhỏ trong vùng liên kết (vùng hoạt động) của protein đích cũng như làm sáng tỏ các quá trình sinh hóa cơ bản [59]. Quá trình

docking bao gồm hai bước cơ bản: dự đoán cấu hình liên kết của phối tử gồm vị trí và hướng của nó trong các liên kết này (thường được gọi là dock pose) và đánh giá ái lực liên kết (Hình 1.11). Do đó, không những chỉ ra các liên kết có ý nghĩa, docking còn có thể định lượng khả năng liên kết bởi các hàm tính điểm, qua đó phân hạng khả năng liên kết mạnh yếu của các hoạt chất tiềm năng. Biết được vị trí vùng hoạt động của protein trước khi thực hiện docking góp phần làm tăng đáng kể hiệu quả quá trình mô phỏng. Trong đa số các trường hợp, vùng hoạt động đã được xác định trước khi tiến hành docking các phối tử vào nó. Ngoài ra, các nhà khoa học có thể thu được thông tin về các vùng hoạt động bằng cách so sánh protein đích với các protein có cùng chức năng hoặc với các protein kết tinh trong trạng thái liên kết với phối tử khác. Trong trường hợp không biết trước thông tin về vùng hoạt động của protein, ngày nay một số phần mềm và webserver được phát triển để dự đoán những vị trí này, ví dụ: GRID, POCKET, SurfNet, PASS và MMC có thể được sử dụng để dự đoán vùng hoạt động giả định trong protein. Việc thực hiện docking trong điều kiện không có bất kỳ giả định nào về vùng hoạt động được gọi là "docking mù".



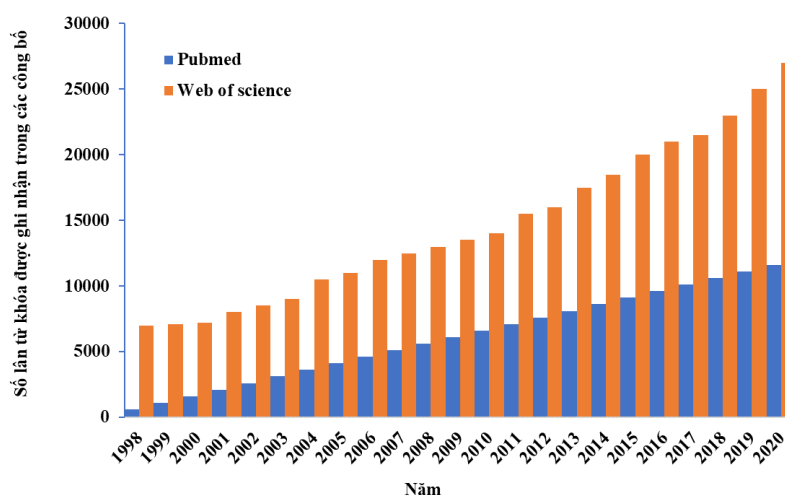
Hình 1.11. Minh họa về mô phỏng tìm kiếm cấu hình liên kết bền vững của hợp chất trong vùng hoạt động của protein

Việc làm sáng tỏ cơ chế liên kết giữa phối tử và thụ thể là có tên gọi là lý thuyết "khóa và chìa" do Fischer đề xuất [60], trong đó phối tử tương tác với với thụ thể một cách phù hợp được ví như khóa và chìa khóa. Các phương pháp docking thời kỳ đầu đều dựa trên lý thuyết này và cả phối tử và thụ thể đều được coi là có cấu trúc "cố định". Sau đó, lý thuyết "điều chỉnh phù hợp" [61,62] do Koshland đề xuất đã phát triển lý thuyết "khóa và chìa" tiến thêm một bước, thuyết này cho rằng vùng hoạt động của protein liên tục được định hình lại bởi các liên kết với các phối tử khi chúng tương tác với nhau. Lý thuyết này cho rằng phối tử và thụ thể phải được coi là có cấu trúc linh động trong quá trình tương tác. Nhờ đó, lý thuyết này có thể mô tả các tương tác một cách chính xác hơn so với các phương pháp trước kia. Do hạn chế về năng lực tính toán của máy tính, phương pháp docking cho đến nay vẫn được thực hiện

theo hình thức coi phối tử có cấu trúc linh động và thụ thể có cấu trúc "cố định" và là phương pháp phổ biến nhất được sử dụng trong các nghiên cứu. Gần đây, nhiều nỗ lực phát triển phương pháp mới đã được thực hiện để xử lý tính linh động cấu trúc của thụ thể, tuy nhiên, việc gắn kết vào thụ thể có cấu trúc linh động, đặc biệt là tính linh động trong cấu trúc khung của các thụ thể, vẫn là một thách thức lớn đối với các phương pháp docking hiện tại. Trong những năm gần đây, Local Move Monte Carlo (LMMC) là một lý thuyết mới đã được phát triển có tiềm năng cao trong giải quyết vấn đề liên quan đến docking với thụ thể cấu trúc linh động.

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

Khái niệm mô phỏng động lực học phân tử (Molecular dynamic – MD) được phát triển lần đầu tiên vào cuối những năm 1970 [63,64]. Tuy nhiên, mô hình nghiên cứu này chỉ bắt đầu thu hút sự chú ý của các nhà khoa học từ những năm 2000 trở lại đây. Hình 1.12 cho thấy thống kê sự phát triển của từ khóa "molecular dynamics" có trong các công bố khoa học từ hai nguồn Pubmed và Web of Science.



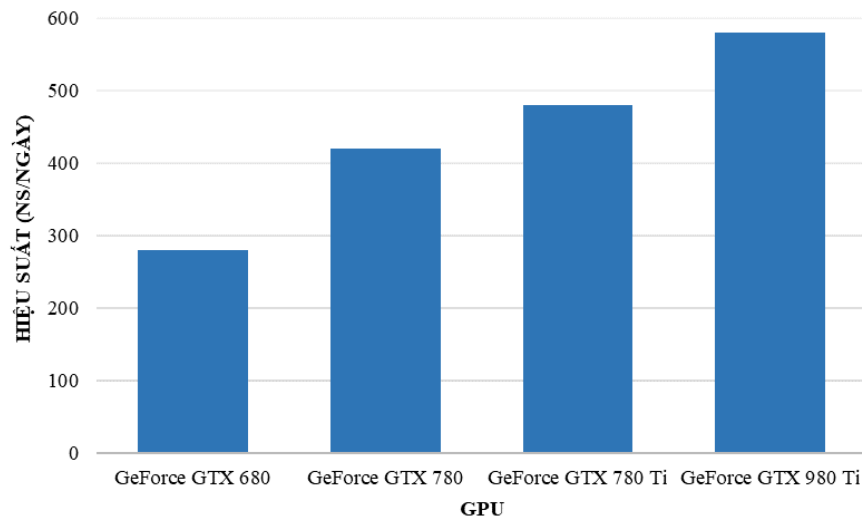
Hình 1.12. Thống kê số lần từ khóa "Molecular dynamics" được ghi nhận trong các công bố khoa học giai đoạn từ năm 1998 đến năm 2020

Qua thời gian, mô hình nghiên cứu này đã phát triển từ việc mô phỏng đơn giản vài trăm nguyên tử đến nay đã có thể thực hiện tính toán các hệ thống sinh học phức tạp như: protein trong các môi trường dung môi khác nhau, các protein nhúng màng, hoặc các phức hợp đại phân tử lớn như nucleosom hoặc ribosome [65-70]. Hiện nay việc mô phỏng các hệ thống có từ 50.000 – 100.000 nguyên tử đã trở nên phổ biến, thậm chí với hệ thống tính toán đủ mạnh có thể thực hiện mô phỏng cho hệ thống lên tới 500.000 nguyên tử. Những cải tiến đáng kể này phần lớn nhờ vào việc sử dụng tính toán hiệu năng cao (HPC) và tính đơn giản của những thuật toán MD cơ bản. Dữ liệu đầu vào cho mô phỏng thường được thu thập từ cấu trúc thử nghiệm hoặc từ các dữ liệu mô hình so sánh. Hệ thống mô phỏng có thể được biểu diễn ở các

mức độ chi tiết khác nhau. Biểu diễn nguyên tử là cách tốt nhất để mô phỏng các hệ thống sát với thực tế, tuy nhiên, gần đây các mô hình siêu nguyên tử (coarse-grain) đang ngày càng trở nên phổ biến trong các bài toán mô phỏng hệ thống lớn hoặc mô phỏng trong thời gian dài [71]. Bên cạnh đó, biểu diễn dung môi cũng là một vấn đề quan trọng trong quá trình thiết lập môi trường cho hệ thống mô phỏng, đã có nhiều cách tiếp cận được thử nghiệm trước đây và các nhà nghiên cứu đã kết luận cách hiệu quả nhất là biểu diễn rõ ràng từng phân tử dung môi mặc dù điều này sẽ khiến tăng kích thước của các hệ thống mô phỏng [72-74]. Cách biểu diễn này giúp xem xét được hầu hết các hiệu ứng solvat hóa của dung môi thực bao gồm cả các hiệu ứng từ gốc entropi như hiệu ứng kỵ nước. Khi hệ thống được xây dựng, các lực tác dụng lên mọi nguyên tử sẽ thu được bằng cách suy ra các phương trình, trường lực, trong đó thế năng được suy ra từ cấu trúc phân tử [75, 76]. Trường lực là những phương trình phức tạp, tuy nhiên chúng tương đối dễ tính toán. Các đặc điểm phân tử có thể được biểu diễn trường lực một cách đơn giản như sau: lò xo cho độ dài và góc của liên kết, hàm tuần hoàn cho chuyển động quay của liên kết và điện thế Lennard – Jones, và định luật Coulomb cho tương tác van der Waals và tĩnh điện. Điều này cho phép thực hiện các phép tính năng lượng và lực một cách nhanh chóng ngay cả đối với các hệ thống lớn. Các mô hình trường lực đang được sử dụng trong mô phỏng mô hình nguyên tử khác nhau về cách chúng được tham số hóa và không phải tất cả các trường lực đều cho phép biểu diễn tất cả các loại nguyên tử [77,78]. Sau khi có được các lực tác động lên các nguyên tử riêng lẻ, định luật chuyển động của Newton cổ điển được sử dụng để tính gia tốc và vận tốc cũng như cập nhật vị trí của nguyên tử. Vì sự tích hợp của chuyển động được thực hiện bằng số học, để tránh mất ổn định, cần sử dụng một bước thời gian ngắn hơn các chuyển động nhanh nhất trong phân tử. Bước thời gian này thông thường có độ dài từ 1 đến 2 fs đối với mô phỏng nguyên tử. Các mô phỏng dài micro giây để đảm bảo độ chính xác cần lặp lại tính toán lên tới 10^9 lần. Đây là một trong những điểm mạnh của mô hình mô phỏng siêu nguyên tử, khi hệ thống được biểu diễn đơn giản hơn đồng nghĩa bước thời gian có thể lớn hơn do đó độ dài về thời gian của các mô phỏng được tăng lên đáng kể.

Thời gian gần đây, những tiến bộ về thuật toán bao gồm tinh chỉnh các phép tính năng lượng, song song hóa hoặc sử dụng các đơn vị xử lý đồ họa (Graphical processing units – GPU), đã cải thiện phần lớn hiệu suất của mô phỏng MD. Hầu hết việc tối ưu hóa GPU dựa trên ngôn ngữ kiến trúc thiết bị tính toán hợp nhất (CUDA) do NVIDIA phát triển. Một trong những lợi ích của CUDA là tính linh hoạt của nó cho phép sử dụng cho tính toán song song ngoài việc thể hiện hiệu quả ở hiệu suất đồ họa, về cơ bản là chuyển đổi GPU thành một cụm. Nhờ vào tính năng đó, hầu hết các

phần mềm MD đã sử dụng hỗ trợ GPU để tăng năng suất và khả năng mở rộng tính toán của chúng. Để dễ hình dung, có thể đề cập một ví dụ nổi bật là: bài toán mô phỏng toàn bộ nguyên tử của capsid hoàn chỉnh của HIV-1, nghiên cứu này đã sử dụng gần 4000 GPU Tesla [80]. Nếu để tính toán bằng CPU, số lượng cần sử dụng cho một nghiên cứu như vậy là khoảng 20.000 CPU, một con số khó có thể đáp ứng được đối với hầu hết các đơn vị nghiên cứu thông thường. Trong khi đó, một máy tính để bàn được trang bị GPU có thể thực hiện mô phỏng khoảng 500 ns/ngày với các hệ thống có từ 20.000 đến 30.000 nguyên tử.



Hình 1.13. Đồ thị so sánh hiệu suất mô phỏng động lực học phân tử sử dụng các thiết bị GPU khác nhau thực hiện bởi hãng Desmond năm 2016 [79]

Các thế hệ máy tính ngày nay tận dụng lợi thế của phương pháp tính song song và ép xung để tăng tốc quá trình tính toán mô phỏng. Các phần mềm code phổ biến (AMBER [81], CHARMM [82], GROMACS [83] hoặc NAMD [84]) đã được phát triển trong thời gian dài để tương thích với giao thức truyền thông điệp (Messaging passing interface – MPI) và có những phiên bản riêng cho việc sử dụng GPU. Khi nhiều nhân vật lý có thể được sử dụng đồng thời, MPI có thể giảm đáng kể thời gian tính toán. Hiện nay, mô hình tính toán sử dụng GPU hoặc kết hợp với MPI được xác định là các mô hình tiêu chuẩn sử dụng cho nghiên cứu MD.

Nhìn chung, nhờ sự phát triển của máy tính điện tử, phương pháp MD đã trở nên phổ biến trong nhiều ngành khoa học không chỉ giới hạn riêng trong vật lý. Phương pháp MD được dùng để tính toán động lượng ở mức độ nguyên tử. Trong vật lý sinh học, MD thường được dùng nghiên cứu chuyển động của các phân tử ADN, protein, và tương tác giữa chúng hoặc các phân tử khác. Tuy vậy, MD không phải không có những hạn chế: Mô phỏng động lực học phân tử không áp dụng được cho các hiện tượng lượng tử; việc áp dụng MD đòi hỏi phải lựa chọn các bộ tham số và trường lực, đây cũng là một hạn chế của MD.

1.4.5. Thông tin chung về enzyme GSK-3 β

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) là một protein kinase serine/threonine đa chức năng điều chỉnh quá trình phosphoryl hóa các mục tiêu tế bào khác nhau bao gồm chuyển hóa (điều hòa glucose), tín hiệu tế bào, vận chuyển tế bào, apoptosis, tăng sinh và giao tiếp nội bào. Phosphoryl hóa là một bước điều hòa quan trọng nhằm khởi tạo, tăng cường hoặc ức chế chức năng của cơ chất mục tiêu. Kể từ khi phân lập GSK-3 từ cơ xương thỏ vào năm 1980 [85], vai trò và sự tham gia của nó vào quá trình chuyển hóa glucose đã được nghiên cứu rộng rãi. Tuy nhiên, GSK-3 chỉ được coi là mục tiêu điều trị bệnh tiểu đường sau khi phát hiện ra sự tham gia của nó vào việc truyền tín hiệu insulin vào giữa những năm 1990 [86].

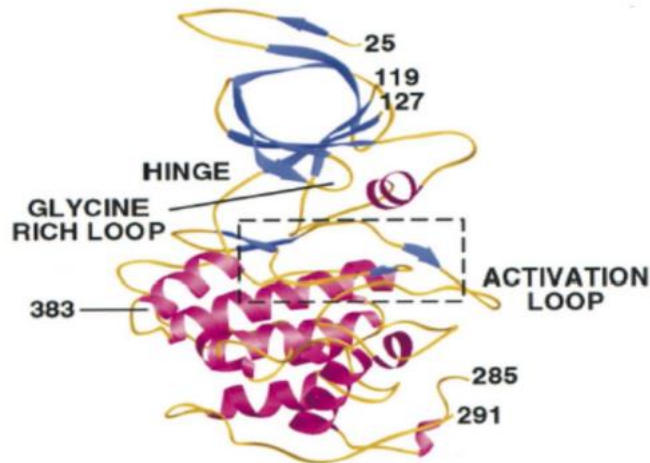
Chức năng chính của GSK-3 là điều hòa hoạt động của glycogen synthase (GS), một loại enzyme làm trung gian chuyển đổi glucose thành glycogen [87,88]. Trong điều kiện cơ bản, GS được duy trì ở dạng không hoạt động do sự phosphoryl hóa bởi GSK-3. Trong điều kiện lượng glucose và insulin sẵn có cao, hoạt động GSK-3 bị ức chế thông qua hoạt động của insulin thông qua con đường PI3 kinase (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase)/PKB (protein kinase B). Hành động này dẫn đến việc kích hoạt GS và hình thành glycogen [89-91]. Biểu hiện tăng cao và hoạt động quá mức của GSK-3 có liên quan đến tình trạng kháng insulin ở bệnh tiểu đường loại 2. Do đó, chất ức chế GSK-3 đã được phát triển để điều trị bệnh tiểu đường loại 2 [91]. Mức GSK-3 tăng cao trong rối loạn lưỡng cực (BD) đã được ghi nhận trong cả nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng. [92-95] Cụ thể, mức GSK-3 α và GSK-3 β cao hơn đã được tìm thấy trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của BD hơn so với những đối tượng đối chứng lành mạnh [94]. Sau khi điều trị cho bệnh nhân BD bằng lithium, valproate hoặc thuốc chống loạn thần không điển hình, người ta đã quan sát thấy sự gia tăng đáng kể về quá trình phosphoryl hóa serine ức chế của GSK-3 ở PBMC. Tuy nhiên, tổng cấp độ của GSK-3 vẫn không thay đổi [94]. Phát hiện này cho thấy tỷ lệ GSK-3 hoạt động/không hoạt động có tác dụng điều tiết ở BD lớn hơn so với tổng mức GSK-3.

GSK-3 β cũng liên quan đến một số bệnh thoái hóa thần kinh [96] bao gồm bệnh Parkinson (PD) [97], bệnh Alzheimer (AD) [98], và bệnh Huntington (HD) [99]. Một đánh giá gần đây của Li và cộng sự tóm tắt sự liên quan của GSK-3 trong PD và giả thuyết rằng việc ức chế hoạt động GSK-3 β có thể bảo vệ các tế bào thần kinh dopaminergic. Tương tự, những phát hiện gần đây của Llorens-Maritin và cộng sự đã nhấn mạnh vai trò của GSK-3 β trong sinh bệnh học AD, bao gồm vai trò chủ yếu trong quá trình phosphoryl hóa protein tau. Hơn nữa, Lim và cộng sự đã quan sát thấy mức độ GSK-3 được phosphoryl hóa cao hơn trong các mẫu não HD của con người

sau khi chết có liên quan đến sự gián đoạn chuyển hóa năng lượng ở hai mô hình chuột biến đổi gen [99]. Hoạt động điều tiết của GSK-3 có liên quan đến hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) [100], sốt rét [101], viêm [102], apoptosis, tăng trưởng tế bào thần kinh và các con đường Wnt/ β -catenin chính tắc [103]. GSK-3 dường như cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của bệnh ung thư. Ở một số loại khối u, GSK-3 thực hiện chức năng ức chế khối u, trong khi ở các loại khối u khác, GSK-3 có liên quan đến sự tiến triển của khối u bằng cách ổn định phức hợp beta-catenin [104]. Rõ ràng, GSK-3 là một chất điều chỉnh quan trọng của các chức năng trao đổi chất và truyền tín hiệu có liên quan đến nhiều lĩnh vực bệnh tật, thúc đẩy những nỗ lực sâu rộng trong việc phát triển chất ức chế và gần đây hơn là phát triển đầu dò hình ảnh.

Cấu trúc và chức năng của GSK-3

Hầu như tất cả các sinh vật nhân chuẩn, từ ruồi đến người, đều chứa các dạng GSK-3 tương đồng với mức độ tương đồng cao. Ở động vật có vú, có hai dạng đồng phân của GSK-3, bao gồm GSK-3 α và GSK-3 β , được mã hóa bởi các gen riêng biệt. GSK-3 α (51 KDa) có trọng lượng phân tử cao hơn một chút so với GSK-3 β (47 KDa). Chiều dài tăng thêm của GSK-3 α là do sự hiện diện của 63 gốc amino acid bổ sung ở đầu N. Mặc dù cả hai dạng đồng phân này có cấu trúc khá giống nhau nhưng chúng khác nhau về chức năng. Ví dụ, những con chuột bị mất chọn lọc exon 2 của GSK-3 β sẽ chết phôi do apoptosis tế bào gan lan rộng bất chấp sự hiện diện của GSK-3 α [105].



Hình 1.14. Các vùng khác nhau của GSK-3 β [103]

Một phân tích chi tiết về cấu trúc và chức năng của GSK-3 β được báo cáo bởi ter Haar và cộng sự [106] được mô tả trong hình 1.14. Có hai miền GSK-3 β chính: miền chuỗi β có ở đầu N giữa các gốc amino acid 25-138 (hình 1.14) và miền xoắn ốc có ở đầu C giữa các gốc axit amin 139-343. Vị trí liên kết ATP hiện diện ở giao diện của hai miền được tiếp giáp bởi vùng vòng và bản lề giàu glycine. Hoạt tính xúc tác của GSK-3 β được điều hòa bởi quá trình phosphoryl hóa ở hai vị trí khác nhau,

bao gồm Ser 9 và Tyr 216. Quá trình phosphoryl hóa vị trí Ser 9 làm bất hoạt GSK-3 β , trong khi sự phosphoryl hóa ở Tyr 216 trong vòng kích hoạt làm tăng hoạt tính xúc tác của nó [110]. Đối với GSK-3 α , sự phosphoryl hóa ở Ser 21 khiến nó không hoạt động [107].

Trước khi quá trình phosphoryl hóa có thể được xúc tác bởi GSK-3, cả hai miền chuỗi β và chuỗi xoắn ốc α phải sắp xếp theo một cấu hình có hoạt tính xúc tác để liên kết hiệu quả với cơ chất. GSK-3 β phosphoryl hóa các chất nền khác nhau với hiệu quả và cơ chế khác nhau. Trong một số trường hợp nhất định, GSK-3 β trực tiếp phosphoryl hóa cơ chất, trong khi trong các trường hợp khác, cần phải môi cơ chất bằng một kinase khác trước khi phosphoryl hóa mục tiêu. Do đó, chức năng và cơ chế hoạt động của GSK-3 β tùy thuộc vào cơ chất. Thông thường, quá trình phosphoryl hóa thông qua cơ chế môi hiệu quả hơn từ 100 đến 1000 lần so với quá trình phosphoryl hóa không có môi [108]. Ngoài ra, hoạt động của GSK-3 β được điều chỉnh bởi hai cơ chế khác nhau, bao gồm quá trình phosphoryl hóa Ser 9 và hình thành phức hợp protein GSK-3 β . Bijur và Jope [109] đã đề xuất một cơ chế thay thế điều chỉnh GSK-3 β thông qua việc phân chia ngăn dưới tế bào. Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng GSK-3 β là một protein tế bào và chủ yếu tồn tại ở dạng hoạt động, nhưng cũng có thể hiện diện trong nhân [110] và ty thể. Bijur và Jope lưu ý rằng tín hiệu apoptotic cảm ứng làm tăng dạng hoạt động của GSK-3 β trong nhân và ty thể lên nhiều lần, nhưng không ảnh hưởng đến mức độ tế bào chất. Điều thú vị là, sự ức chế GSK-3 β của lithium làm giảm dạng hoạt động của GSK-3 β ở cả ba nhóm [109].

Như vậy, chức năng của GSK-3 rất cần thiết cho sự phát triển của các bệnh khác nhau bao gồm ung thư, tiểu đường, bệnh Alzheimer, ... Dạng đồng phân GSK-3 β đã được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong con đường tín hiệu Wnt, ức chế GSK-3 β có thể dẫn đến giảm sự tăng sinh tế bào ung thư, gây ra quá trình chết theo chương trình phụ thuộc p53 và kích thích sự chết tế bào do TRAIL gây ra.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

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

Mẫu cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*) (Hình 2.1) (toàn bộ phần trên mặt đất) được thu hái tại Sa Pa, Lào Cai vào tháng 12 năm 2004. Tên khoa học của mẫu được xác định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản (mã số VN-1432) được lưu trữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.1. Cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

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

Mẫu cây bần giác (*O. eberhardtii*) (Hình 2.2) (toàn bộ phần trên mặt đất) được thu hái tại Vĩnh Linh, Quảng Trị vào tháng 6 năm 2004. Tên khoa học của mẫu được xác định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản (mã số VN-1316) được lưu trữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.2. Cây bần giác (*O. eberhardtii*)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

- *Sắc ký lớp mỏng (TLC)*

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), RP-18 F_{254S} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

- *Sắc ký lớp mỏng điều chế*

Sắc ký lớp mỏng điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 365 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10%, hơi nóng để phát hiện vết chất; ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ và tinh chế lại bằng cách kết tinh trong dung môi thích hợp.

- *Sắc ký cột (C.C)*

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (230-400 mesh). Silica gel pha đảo RP-18 (150 μm, Fuji silysia Chemical Ltd.). Nhựa Diaion HP-20 (Mitsubishi Chem. Ind. Co., Ltd.).

- *Sắc ký rây phân tử (Sephadex)*

Sắc ký cột với pha tĩnh là Sephadex LH-20 được rửa giải bằng hỗn hợp dung môi methanol hoặc methanol/dichloromethane (9/1, 8/2, ...).

2.2.2. Các phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

Phương pháp chung để xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất là sự kết hợp xác định giữa các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại bao gồm:

2.2.2.1. Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối lượng đo trên hệ Agilent 1260 HPLC-MS với nguồn ion hóa (Electrospray ionization source-ESI hoặc Atmospheric pressure chemical ionization-APCI) của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Phổ phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy Agilent 6530 Accutate Mas QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ NMR đo trên máy: Bruker Advance Neo 600 MHz FT-NMR của Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là TMS (Tetramethyl Silan).

Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm:

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ^1H NMR, ^{13}C NMR và DEPT.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY và NOESY.
- Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi: DMSO- d_6 , CD_3OD , CDCl_3 .

Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, trên nguyên tắc là dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo và không che khuất các tín hiệu phân tích.

2.2.2.4. Độ quay cực

Độ quay cực $[\alpha]_D$ được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.5. Phương pháp xác định đường

Việc xác định cấu hình đường và vị trí gắn của đường là phần vô cùng quan trọng trong quá trình xây dựng cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được. Trình tự xác định đường được thực hiện như sau:

- Nhận dạng đường đơn thông qua giá trị độ chuyển dịch hóa học cacbon và proton, cấu hình α/β của nhóm OH-hemiacetal được xác định thông qua hằng số tương tác của proton anome (J_{1-2}) cũng như xác định lập thể các vị trí trong từng phân tử đường bằng dạng tín hiệu và hằng số tương tác J của các proton trong từng phân tử đường.

- So sánh độ chuyển dịch hóa học δ_C của các đường thu được với các tài liệu tham khảo về chi và loài.

- Kiểm tra lại cấu trúc hóa học của từng phân tử đường đơn bằng phổ HSQC kết hợp với phổ ^1H - ^1H COSY để nối mạch cacbon cũng như gán chính xác các giá trị độ dịch chuyển hóa học của từng vị trí. Xác định vị trí gắn của đường đơn hay chuỗi đường thông qua phổ tương tác 2 chiều HMBC.

Tuy nhiên, với việc sử dụng phổ NMR, chúng ta chưa khẳng định được cấu hình D/L của từng phân tử đường.

- + Xác định đường D và L: Trước hết thủy phân để tạo đường đơn, sau đó tinh chế bằng các phương pháp sắc ký kết hợp để thu được các đường đơn. Tiến hành kiểm tra trên sắc ký TLC với các đường chuẩn; so sánh độ quay cực riêng với các dữ liệu đã công bố. Từ đó xác định được cấu hình D/L của đường.

- + Các bước tiến hành cụ thể như sau: Mỗi hợp chất (**MS1**, **MS2** và **MS3**, 5 mg) được hòa tan trong 5 mL hỗn hợp dung dịch HCl 1N (dioxane/ H_2O : 1/1, 2,5 mL) và đun nóng đến 95°C trong 5 giờ. Dịch lọc từ dịch thủy phân được trung hòa bằng nhựa trao đổi ion DOWEX HCR-S, sau đó được cô đặc dưới áp suất giảm và được tiến hành so sánh bằng silica gel TLC [Kieselgel 60 (Merck Art 5554), i-PrOH/axetone/ H_2O (5/3/1)] so với các mẫu xác thực (R_f 0,3 đối với arabinose và R_f 0,5 đối với xylose) và so sánh độ quay cực riêng với đường chuẩn đã công bố

[111,112] cho thấy đường thu được là L-arabinose với $[\alpha]_D +102$ (c, 0,1, H₂O), D-xylose với $[\alpha]_D +18,8$ (c, 0,15, H₂O).

2.2.3. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

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

Nguyên lí:

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) được mô tả lần đầu tiên bởi tác giả Tim Mosman, 1983. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể [113, 114]. Sản phẩm formazan được hòa tan bằng DMSO và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm. Giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (*nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào*).

Chuẩn bị thí nghiệm:

Các dòng tế bào có nguồn gốc từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ (ATCC) gồm: ung thư biểu mô biểu mô KB (CCL -17TM), ung thư gan HepG2 (HB - 8065TM), ung thư phổi A549 (CCL-185TM) và ung thư vú MCF-7 (HTB - 22TM).

Dòng tế bào được lưu giữ trong nitơ lỏng, hoạt hóa và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng như DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7-10% FBS (Fetal Bovine Serum) và một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37⁰C, vô trùng tuyệt đối). Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Mẫu thử được hòa tan bằng dung môi DMSO với nồng độ ban đầu là 20 µg/ml. Tiến hành pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp lần lượt là 2560, 640, 160, 40 và 10 µg/ml. Nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm tương ứng là 128, 32, 8, 2 và 0,5 µg/ml. Chất tham chiếu Ellipticine pha trong DMSO với nồng độ 0,01mM.

Tiến hành thí nghiệm: [113, 114]

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp đó, pha tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm (khoảng 1-3x10⁴ tế bào/ml tùy theo từng dòng tế bào).

Lấy vào mỗi giếng 10 µl chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190 µl dung dịch tế bào. Đối chứng dương của thí nghiệm là môi trường có chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy.

Đĩa thí nghiệm được ủ ở điều kiện tiêu chuẩn.

Sau 72 giờ mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10 µl MTT (5 mg/ml) trong 4h. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formaran được hòa tan bằng 100 µl DMSO 100%.

Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Biotek. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xử lý kết quả thực nghiệm:

Giá trị IC₅₀ được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ ỨC CHẾ TẾ BÀO} = \frac{(\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}})}{(\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{chứng (-)}})} \times 100\%$$

$$\text{IC}_{50} = \text{High}_{\text{Conc}} - \frac{(\text{High}_{\text{Inh}\%} - 50) \times (\text{High}_{\text{Conc}} - \text{Low}_{\text{Conc}})}{\text{High}_{\text{Inh}\%} - \text{Low}_{\text{Inh}\%}}$$

(Trong đó, High_{Conc}/Low_{Conc}: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; High_{Inh%}/Low_{Inh%}: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Đánh giá hoạt tính:

Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), với dịch chiết thô có giá trị IC₅₀ ≤ 20 µg/ml được coi là có hoạt tính tốt, dịch chiết có giá trị 21 µg/ml < IC₅₀ < 200 µg/ml có hoạt tính trung bình và 201 µg/ml < IC₅₀ < 500 µg/ml có hoạt tính yếu, IC₅₀ > 500 µg/ml không có hoạt tính. Đối với chất sạch có IC₅₀ ≤ 4 µg/ml (10µM) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào tốt.

Dịch chiết EtOAc của quả cây xay răng nhọn và dịch chiết EtOAc của quả cây bần giác được thử sơ bộ hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào KB. Các phép thử này được tiến hành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Cộng hòa Pháp.

Các chất sạch phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii* được thử hoạt tính gây độc tế bào trên bốn dòng tế bào ung thư trên. Phép thử được thực hiện tại phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Các chất sạch phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii* được thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định tại phòng Công nghệ sinh học, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Andrews JM. [115]. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng VSVKĐ nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC được cung cấp bởi viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia:

- Ba chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076)

- Ba chủng Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC299212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579)

- Một chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231

Các chất sạch được phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii* được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml và 2 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=3.

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2×10^5 CFU/ml

Tiến hành thử: lấy 5,12 µl dung dịch mẫu thử có nồng độ 10mg/ml vào hàng đầu tiên có chứa 100µl môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm $\frac{1}{2}$ nồng độ vào các hàng có chứa 50µl cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/ml, thêm 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2×10^5 CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, xác định sơ bộ giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Chất đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cyclohexamide cho nấm.

Bảng 2.1. Giá trị MIC (µg/ml) của các chất đối chứng

Chất đối chứng	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
MIC(µg/ml)							
Streptomycin	256	128	128	32	256	128	-
Cyclohexamide							32

Các chất có giá trị MIC nhỏ hơn so với giá trị MIC của chất đối chứng tương ứng với các chủng vi sinh vật được coi là có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định với các chủng vi sinh vật đó [116].

2.2.4. Phương pháp docking phân tử

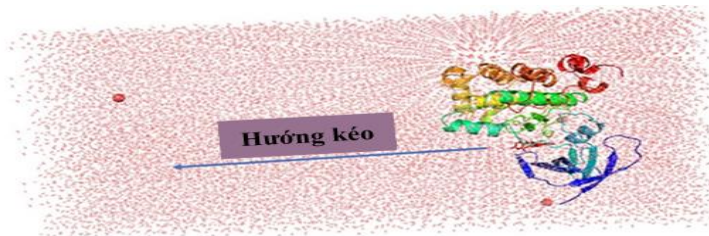
Chuẩn bị thụ thể và phối tử: Cấu trúc 3D của 18 phối tử (**OE1–OE18**) là 18 hợp chất sạch phân lập được từ loài *Oligoceras eberhardtii*. Các cấu trúc ba chiều được tạo bằng MarvinSketch phiên bản 19.27.0 và PyMOL phiên bản 1.3r1 [117]. Việc giảm thiểu năng lượng của phối tử được thực hiện bằng Gabedit phiên bản 2.5.0 [118]. Tọa độ cấu trúc ba chiều của GSK-3β được lấy từ Ngân hàng Dữ liệu Protein (PDB) với ID PDB: 1Q41 [119]. Indirubin-3'-monoxime, một chất ức chế được công nhận rộng rãi, đã được chọn làm phối tử tham chiếu.

Nghiên cứu lắp ghép phân tử (docking phân tử): Phiên bản Ligand-Ranking cải tiến của AutoDock Vina (mVina) [62] đã được sử dụng để xác định cấu hình liên kết và ái lực gắn kết của các hợp chất được nghiên cứu với GSK-3β. Cả GSK-3β và các hợp chất được nghiên cứu đều được tham số hóa bằng AutoDockTools [120]. Tâm của lưới lắp ghép được đặt ở tọa độ 39,60×6,30×36,30. Kích thước lưới được chọn là 29×22×21 Å³, đủ lớn để bao quanh toàn bộ vị trí liên kết của protein. Giá trị

mặc định của mVina là 8, theo đánh giá trước đó [63]. Năng lượng chênh lệch lớn nhất giữa các chế độ lắp ghép khác nhau là 7 kcal mol^{-1} , đây là giá trị mặc định.

Nghiên cứu động lực phân tử: Gói GROMACS được sử dụng để mô phỏng hoạt động của phức chất ức chế và GSK-3 β trong dung dịch [88]. Đặc biệt, GSK-3 β /các ion trung hòa, phân tử nước và chất ức chế được tham số hóa lần lượt thông qua Amber99SB-iLDN [121], mô hình nước TIP3P [122] và trường lực Amber chung [123]. Trong số này, thông tin về các hợp chất có được thông qua tính toán hóa học lượng tử sử dụng chức năng lai kép B3LYP, bộ cơ sở 6-31G (d, p) và dung môi tiềm ẩn ($\epsilon=78,4$). Ngoài ra, điện tích nguyên tử của các phối tử được tính toán bằng phương pháp thế tĩnh điện hạn chế [122]. Phức chất bao gồm chất ức chế và GSK-3 β được đưa vào hộp điều kiện biên tuần hoàn có kích thước $937,53 \text{ nm}^3$. Hệ thống này bao gồm tổng cộng 92 000 nguyên tử. Hơn nữa, phức hợp hòa tan được giảm thiểu và cân bằng thông qua phương pháp giảm dần độ dốc nhất, mô phỏng NVT và NPT. Đặc biệt, các nguyên tử C α được cố định vị trí thông qua một điện thế nhỏ phù hợp. Cấu hình cuối cùng thu được từ mô phỏng NPT được sử dụng làm cấu trúc khởi đầu cho mô phỏng MD, được chạy trong thời gian 20 ns. Trong thời gian đó, các nguyên tử C α của GSK-3 β cũng bị hạn chế thông qua một điện thế nhỏ. Các mô phỏng được tiến hành tám lần để đảm bảo lấy mẫu kỹ lưỡng trong quá trình mô phỏng.

Mô phỏng động lực phân tử định hướng: Hình dạng cuối cùng của các phức từ các mô phỏng MD thuận tiện sẽ được sử dụng làm cấu trúc ban đầu của mô phỏng động lực phân tử định hướng. Các hợp chất được nghiên cứu đã được huy động ra khỏi vị trí gắn kết GSK-3 β . Trong quá trình này, các nguyên tử GSK-3 β C α được cố định vị trí bằng lực điều hòa yếu $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ trong ba chiều. Một ngoại lực điều hòa tác dụng lên tâm khối của chất ức chế GSK-3 β dọc theo trục Z (Hình 2.3). Lực phá vỡ và công của ngoại lực được tính toán như mô tả trước đây [124]. Trong đó, hằng số lò xo đúc hẫng được chọn là $k = 600 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ và vận tốc kéo $v = 0,005 \text{ nm ps}^{-1}$. Các thông số kéo được chọn tham khảo các công trình trước đây [40, 42, 43].



Hình 2.3. Cấu hình ban đầu của mô phỏng FPL của GSK-3 β + indirubin-3'-monoxime

Công cụ phân tích: Sơ đồ tương tác phối tử được tạo bằng phiên bản PyMOL miễn phí [41].

Phương pháp docking phân tử được thực hiện tại Trung tâm Ứng dụng Tin hóa học và Y – Sinh – Dược – Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên.

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*)

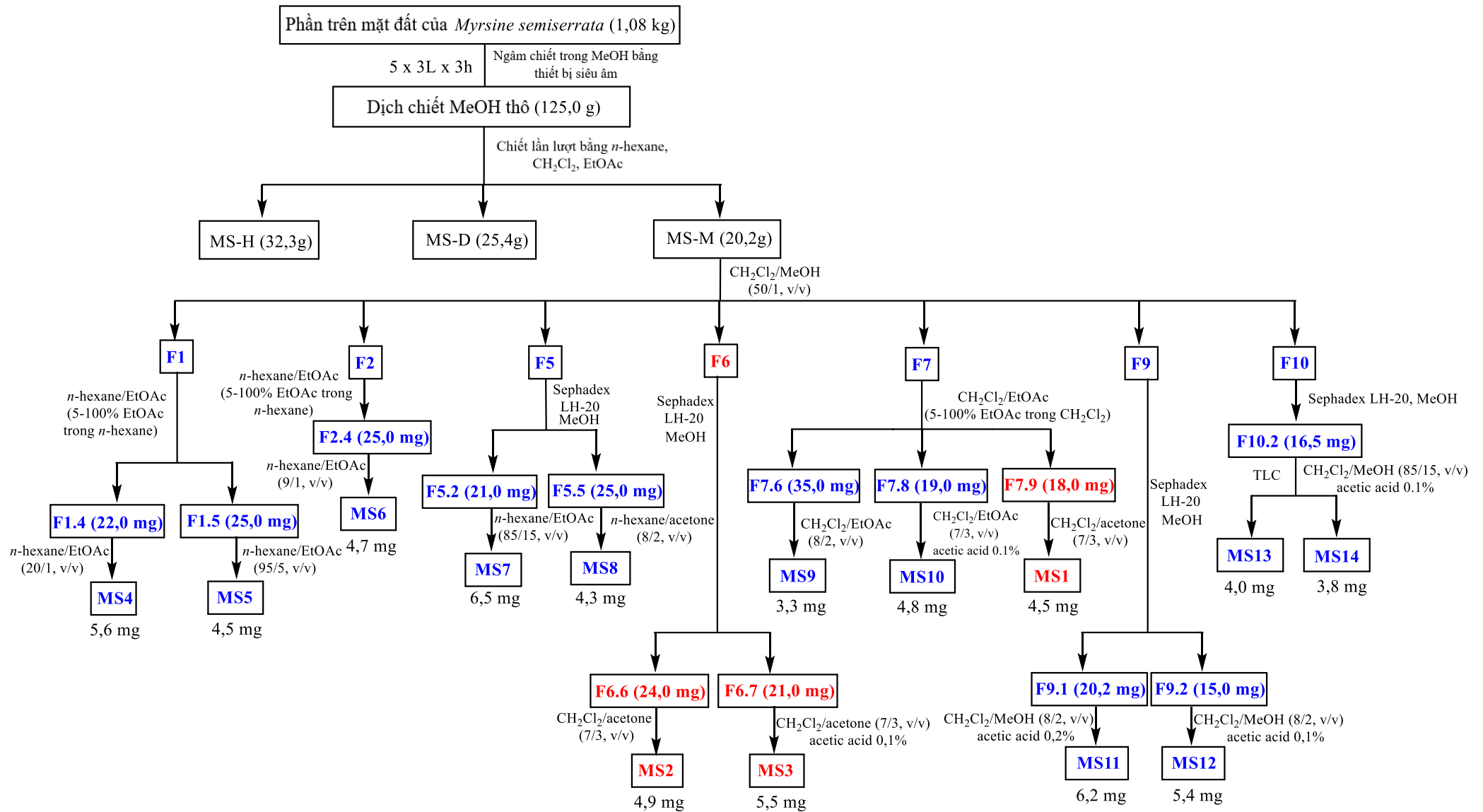
3.1.1. Phân lập các hợp chất từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

Phần trên mặt đất của cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*) sau khi thu hái được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ thu được 1,08 kg. Sau đó chiết mẫu bằng methanol (3L x 5 lần) sử dụng thiết bị chiết siêu âm (50°C, mỗi lần 3 giờ) cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được cao chiết methanol thô màu đen (125,0 g). Cao chiết methanol được phân bố trong 100ml nước, tiến hành chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi *n*-hexane, dichloromethane và ethyl acetate (1L x 3 lần) rồi cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được các cao chiết: cao chiết *n*-hexane (MS-H; 32,3 g), cao chiết dichloromethane (MS-D; 25,4 g) và cao chiết ethyl acetate (MS-E; 20,2 g) và cặn nước.

Từ cao ethyl acetate (MS-E, 20,2 g) được phân tách trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi gradient CH₂Cl₂/MeOH với độ phân cực tăng dần (D/M 50:1 – 0:1, v/v) thu được 10 phân đoạn kí hiệu F1-F10. Từ phân đoạn F1 (1,1 g) tiến hành phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n* – hexane/ EtOAc (5-100% EtOAc trong *n*-hexane) (v/v) thu được 5 phân đoạn F1.1 – F1.5. Phân đoạn F1.4 (22,0 mg) được tinh chế lại trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ EtOAc theo tỉ lệ 20/1 (v/v) thu được chất sạch **MS4** (5,6 mg). Tinh chế lại F1.5 (25,0 mg) trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ EtOAc 95/5 (v/v), thu được chất sạch **MS5** (4,50 mg). Từ phân đoạn F2 (1,85 g) tiến hành phân tách trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ EtOAc (5-100% EtOAc trong *n*-hexane) (v/v) thu được 4 phân đoạn F2.1 – F2.4. Tinh chế lại F2.4 (25,0 mg) trên cột sắc ký pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/EtOAc theo tỉ lệ 9/1 (v/v) thu được chất sạch **MS6** (4,7 mg).

Tiến hành sắc ký cột với phân đoạn F5 (2,34 g) trên cột Sephadex LH-20 với methanol thu được 5 phân đoạn kí hiệu F5.1 – F5.5. Từ phân đoạn F5.2 (21,0 mg) được tinh chế trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc 85/15 (v/v) thu được chất sạch **MS7** (6,5 mg). Tiếp tục phân tách F5.5 trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/acetone 8/2 (v/v) thu được chất sạch **MS8** (4,3 mg). Từ phân đoạn F6 (1,29 g) thu được 7 phân đoạn kí hiệu F6.1 – F6.7 khi phân tách tiếp trên cột Sephadex LH-20 với methanol. Tinh chế lại F6.6 (24,0 mg) trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/acetone 7/3 (v/v) thu được **MS2** (4,90 mg). Hợp chất **MS3** (5,5 mg) thu được khi tinh chế lại F6.7 (21,0 mg) trên cột silica gel pha thường rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂/acetone 7/3 (v/v) nhỏ thêm vài 1 giọt CH₃COOH 0.1%. Phân đoạn F7 (1,25 g) được chạy qua cột

sắc kí thường thu được 8 phân đoạn nhỏ F7.1 – F7.8 khi rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (5-100% EtOAc trong CH_2Cl_2). Phân tách lại F7.6 (35,0 mg) trên bản mỏng điều chế TLC sử dụng dung môi rửa giải dichloromethane/ethyl acetate 7/3 (v/v) (thêm vài giọt CH_3COOH 0.1%) thu được chất sạch **MS9** (3,30 mg). Tương tự như phân đoạn F7.6, phân đoạn F7.8 (19,0 mg) cũng được phân tách trên bản mỏng điều chế TLC, rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 7/3 (v/v) (thêm vài giọt CH_3COOH 0,1%) thu được **MS10** (4,8 mg). Từ phân đoạn F7.9 (18,0 mg) chạy qua cột sắc ký pha thường với hệ rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ 7/3 (v/v) thu được chất sạch **MS1** (4,5 mg). Từ phân đoạn F9 (1,78 g) chạy cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol thu được 5 phân đoạn nhỏ F9.1 – F9.5. Tinh chế phân đoạn F9.1 (20,2 mg) trên cột silicagel pha thường, sử dụng hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8/2 (v/v) (nhỏ 1-2 giọt CH_3COOH 0,2%) được chất sạch **MS11** (6,2 mg). Hợp chất **MS12** (5,4 mg) thu được khi tinh chế lại F9.2 (15,0 mg) trên cột silica gel pha thường với hệ rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8/2 (v/v) (nhỏ 1 giọt CH_3COOH 0,1%). Phân đoạn F10 (3,35 g) tiếp tục được phân tách trên cột sephadex LH-20 bằng methanol thành 6 phân đoạn F10.1 – F10.6. Phân đoạn F10.2 (16,5 mg) được tinh chế trên bản mỏng điều chế TLC với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85/15 (v/v) có nhỏ thêm 1 giọt CH_3COOH 0,1% thu được **MS13** (4,0 mg) và **MS14** (3,8 mg).



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 giác (*O. eberhardtii*)

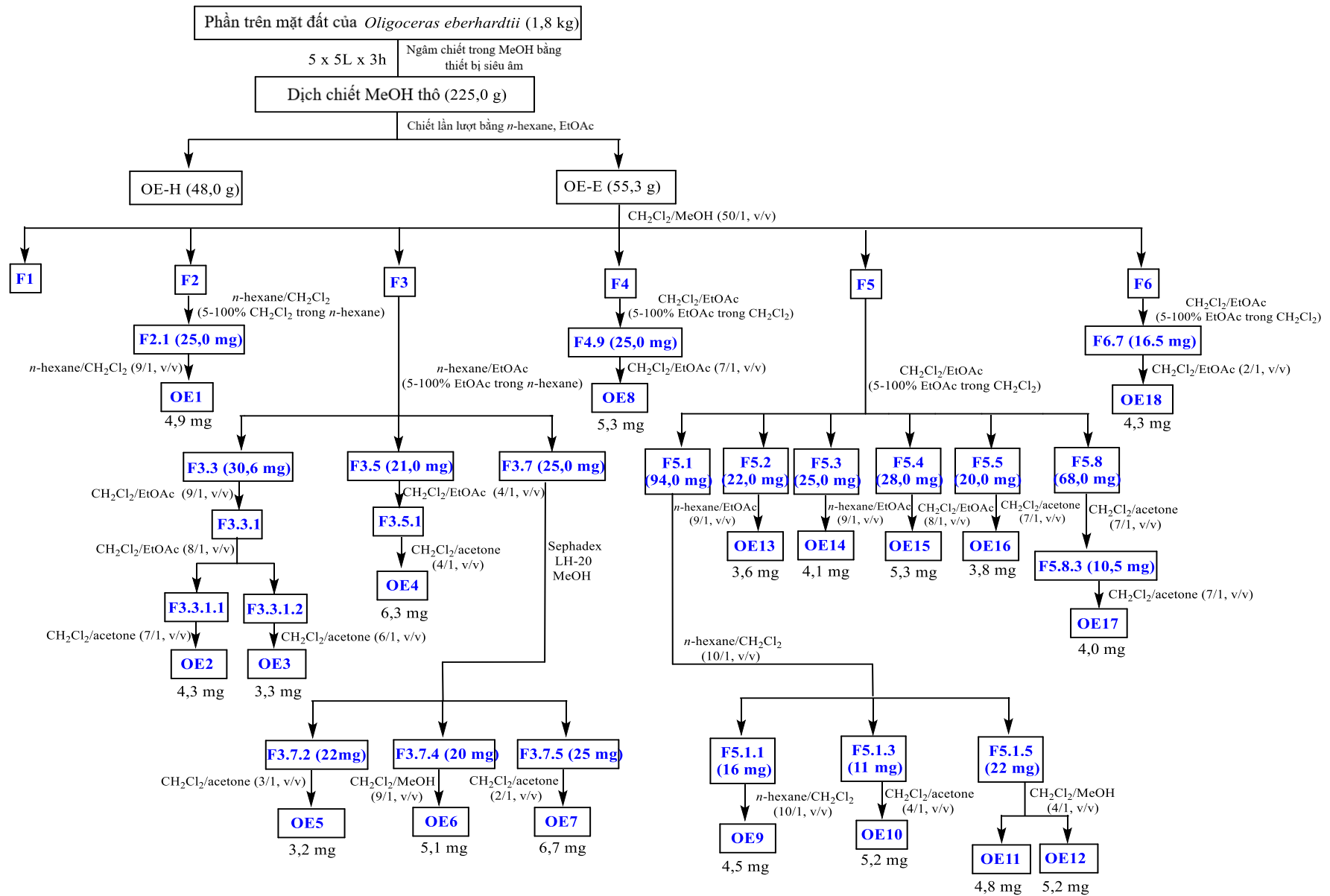
Phần trên mặt đất của cây bản giác (*O. eberhardtii*) sau khi thu hái được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ thu được 1,8 kg. Sau đó tiến hành chiết mẫu bằng methanol (5 lần x 5L) sử dụng thiết bị chiết siêu âm (50°C, mỗi lần 3 giờ) để thu cao chiết methanol (225,0 g). Cao chiết methanol được phân bố trong 100ml nước, sau đó chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi *n*-hexane và EtOAc (1L x 3 lần) rồi cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được cặn *n*-hexane (OE – H, 48,0 g), cặn chiết ethyl acetate (OE-E, 55,3 g) và dịch nước.

Từ cặn ethyl acetate (OE-E, 55,3 g) được phân tách trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi gradient CH₂Cl₂/MeOH với độ phân cực tăng dần (D/M 50:1 – 0:1, v/v) thu được 6 phân đoạn kí hiệu F1-F6. Từ phân đoạn F2 (1,13 g) tiến hành phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/CH₂Cl₂ (5-100% CH₂Cl₂ trong *n*-hexane) (v/v) thu được 5 phân đoạn F2.1 – F2.5. Tiến hành sắc ký cột với phân đoạn F2.1 (25,0 mg) sử dụng dung môi rửa giải gradient *n*-hexane/CH₂Cl₂ 9/1 (v/v) thu được chất sạch **OE1** (4,9 mg). Từ phân đoạn F3 (2,05 g) được phân tách qua cột silica gel rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂/EtOAc (5-100% EtOAc trong CH₂Cl₂) thu được 7 phân đoạn nhỏ kí hiệu F3.1 – F3.7. Tiếp tục tinh chế F3.3 (30,6 mg) trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/EtOAc 9/1 (v/v) thu được hai phân đoạn F3.3.1 và F3.3.2. Phân đoạn F3.3.1 tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/EtOAc 8/1 (v/v) thu được hai phân đoạn nhỏ F3.3.1.1 và F3.3.1.2. Tinh chế F3.3.1.1 trên cột silica gel thường rửa giải bằng CH₂Cl₂/acetone 7/1 (v/v) thu được hợp chất **OE2** (4,3 mg). Hợp chất **OE3** (3,3 mg) thu được khi tinh chế lại F3.3.1.2 qua cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/acetone 6/1 (v/v). Phân đoạn F3.5 được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/EtOAc 4/1 (v/v) thu được hai phân đoạn F3.5.1 và F3.5.2. Tinh chế lại F3.5.1 qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/acetone 4/1 (v/v) thu được hợp chất sạch **OE4** (6,3 mg). Phân đoạn F3.7 (25,0 mg) được chạy lại trên cột Sephadex LH-20 với methanol thu được 5 phân đoạn F3.7.1 – F3.7.5. Tinh chế lại F3.7.2 bằng sắc ký bản mỏng TLC với hệ dung môi CH₂Cl₂/acetone 3/1 (v/v) thu được hợp chất **OE5** (3,20 mg). Phân tách phân đoạn F3.7.4 bằng sắc ký cột thường rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH 9/1 (v/v) thu được chất sạch **OE6** (5,1 mg). Phân đoạn F3.7.5 tiếp tục được chạy qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/acetone 2/1 (v/v) thu được hợp chất **OE7** (6,7 mg).

Từ phân đoạn F4 (1,05 g) tiến hành phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/EtOAc (5-100% EtOAc trong CH₂Cl₂) thu được 9

phân đoạn nhỏ kí hiệu F4.1 – F4.9. Tinh chế lại F4.9 trên sắc kí bản mỏng TLC sử dụng hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 7/1 (v/v) thu được hợp chất sạch **OE8** (5,3 mg). Từ phân đoạn F5 (3,45 g) chạy sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (5-100% EtOAc trong CH_2Cl_2) thu được 8 phân đoạn nhỏ kí hiệu F5.1 – F5.8. Chạy sắc ký trên cột silica gel thường rửa giải bằng $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 95/5 (v/v) với phân đoạn F5.1 (94,0 mg) thu được 5 phân đoạn F5.1.1 – F5.1.5. Tinh chế F5.1.1 (16,0 mg) trên cột sắc ký thường sử dụng hệ dung môi *n*-hexane/ CH_2Cl_2 10/1 (v/v) thu được hợp chất **OE9** (4,5 mg). Từ F5.1.3 chạy cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ 4/1 (v/v) thu được hợp chất **OE10** (5,2 mg). Hai hợp chất **OE11** (4,8 mg) và **OE12** (5,2 mg) tách ra từ phân đoạn F5.1.5 trên cột silica gel pha thường rửa giải bằng $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4/1 (v/v). Phân đoạn F5.2 tiến hành phân tách trên cột thường sử dụng hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc 9/1 (v/v) được chất sạch **OE13** (3,6 mg). Các phân đoạn F5.3, F5.4, F5.5 đều chạy cột lần lượt với các hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc 9/1 (v/v), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 8/1 (v/v), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ 7/1 (v/v) thu được các chất sạch lần lượt là **OE14** (4,1 mg), **OE15** (5,3 mg) và **OE16** (3,8 mg). Từ phân đoạn F5.8 tiếp tục tách trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ 7/1 (v/v) thu được 8 phân đoạn kí hiệu F5.8.1 – F5.8.8. Từ phân đoạn F5.8.3 tách được chất sạch **OE17** (5,2 mg) khi tinh chế trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ 7/1 (v/v).

Từ phân đoạn F6 tiến hành phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (5-100% EtOAc trong CH_2Cl_2) thu được 7 phân đoạn nhỏ kí hiệu F6.1 – F6.7. Tinh chế lại F6.7 trên sắc kí bản mỏng TLC sử dụng hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 2/1 (v/v) thu được hợp chất sạch **OE18** (4,3 mg).



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

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

Chất bột màu trắng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: +17,9 (c 0,24, MeOH);

Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3441, 2947, 2868, 1638, 1558, 1462, 1391, 1070 và 767 cm^{-1} .

Phổ HR-ESI-MS m/z 611,3718 $[\text{M}+\text{K}]^+$; (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_6\text{K}$, $M = 611,3708$).

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.1.

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

Chất bột màu trắng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: +43,0 (c 0,77, MeOH);

Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3421, 2947, 2874, 1654, 1463, 1380, 1363, 1259, 1168, 1141, 1083, 1062, 992, 787 và 659 cm^{-1} .

Phổ HR-ESI-MS m/z 597,4125 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$, $M = 597,4125$).

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.2.

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

Chất bột màu trắng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: - 61,6 (c 0,15, MeOH);

Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3424, 2948, 1654, 1463, 1379, 1362, 1165, 1080, 992, 787 và 659 cm^{-1} .

Phổ HR-ESI-MS m/z 597,4125 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$, $M = 597,4125$).

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.3.

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

Chất bột màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$

KLPT: 468

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.4.

3.2.1.5. Hợp chất **MS5**: *Taraxerone*

Chất bột màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$

KLPT: 424

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.5.

3.2.1.6. Hợp chất **MS6**: *Kazinol B*

Chất bột màu vàng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -18$ (*c* 0,21 CHCl_3)

CTPT: $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_4$

KLPT: 392

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.6.

3.2.1.7. Hợp chất **MS7**: *Kazinol A*

Chất bột màu vàng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -10,7$ (CHCl_3 , *c* 0,13)

CTPT: $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$

KLPT: 394

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.7.

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

Chất bột màu vàng;

Góc quay cực riêng $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -30$, (*c* 1,05, CHCl_3)

CTPT: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$

KLPT: 354

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.8.

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

Chất bột màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$

KLPT: 516

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.9.

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

Chất bột màu trắng;

CTPT: $C_{30}H_{46}O_8$

KLPT: 534

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.10.

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

Chất bột màu trắng;

CTPT: $C_{36}H_{58}O_9$

KLPT: 634

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.11.

3.2.1.12. Hợp chất **MS12**: *Spergulacin*

Chất bột màu trắng;

CTPT: $C_{41}H_{68}O_{12}$

KLPT: 752

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.12.

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

Chất bột màu vàng;

CTPT: $C_{21}H_{20}O_{10}$

KLPT: 432

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.13.

3.2.1.14. Hợp chất **MS14**: *Quercitrin*

Chất bột màu vàng;

CTPT: $C_{21}H_{20}O_{11}$

KLPT: 448

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.14.

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

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

Chất bột màu trắng;

CTPT: $C_{32}H_{52}O_2$

KLPT: 468

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.4.

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

Chất bột màu vàng nhạt;

CTPT: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$

KLPT: 360

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.15.

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

Chất bột màu vàng đậm;

CTPT: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_9$

KLPT: 376

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.16

3.2.2.4. *Hợp chất OE4: Dehydrovomifoliol*

Chất dầu màu vàng;

CTPT: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$

KLPT: 222

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.17.

3.2.2.5. *Hợp chất OE5: Protocatechuic acid*

Chất rắn, màu trắng;

CTPT: $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$

KLPT: 154

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.18.

3.2.2.6. *Hợp chất OE6: Chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside*

Chất bột, màu vàng;

CTPT: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

KLPT: 462

Số liệu phổ ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) và ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) xem bảng 4.19.

3.2.2.7. *Hợp chất OE7: 7Z-roseoside*

Chất dầu, không màu;

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24} +108,8$ (c 0,94 MeOH).

CTPT: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8$

KLPT: 386

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.20.

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

Chất bột màu vàng;

CTPT: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$

KLPT: 362

Số liệu phổ ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) và ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) xem bảng 4.21.

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$

KLPT: 410

Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) xem bảng 4.22

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4$

KLPT: 486

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.23.

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7$

KLPT: 518

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.24.

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_9$

KLPT: 632

Góc quay cực riêng $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$: +22,6 (c 0,01, CH_3OH)

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem bảng 4.25.

3.2.2.13. Hợp chất **OE13**: *Lupeol*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $C_{30}H_{50}O$

KLPT: 426

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: +26,4 (c 0,7, CH_3Cl)

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.26.

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $C_{39}H_{56}O_3$

KLPT: 572

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: +26,4 (c 0,7, CH_3Cl)

Số liệu phổ 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem

bảng 4.27.

3.2.2.15. Hợp chất **OE15**: *5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl) flavanone*

Chất bột, màu vàng;

CTPT: $C_{21}H_{22}O_5$

KLPT: 354

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: -30 (c 1,05, $CHCl_3$)

Số liệu phổ 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem

bảng 4.8.

3.2.2.16. Hợp chất **OE16**: *6,7,8-trimethoxycoumarine*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $C_{12}H_{12}O_5$

KLPT: 236

Số liệu phổ 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem

bảng 4.28.

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

Chất bột, màu trắng;

CTPT: $C_8H_8O_4$

KLPT: 168

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)

xem bảng 4.29.

3.2.2.18. Hợp chất **OE18**: *Vomifoliol*

Chất bột, màu trắng;

CTPT: C₁₃H₂₀O₃

KLPT: 224

Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24}$: +231 (c 0,97, CHCl₃)

Số liệu phổ ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) và ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) xem bảng 4.30.

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 ung thư của các hợp chất phân lập từ *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

Các phép thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư 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 nguyên tử tìm kiếm các chất ức chế enzyme GSK - 3 β 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 loài *M. semiserrata* và *O. eberhardtii*

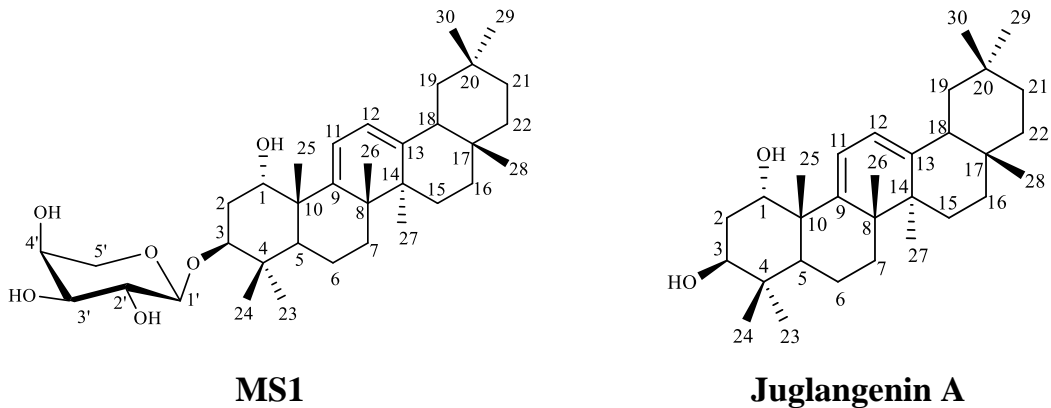
Các hợp chất phân lập **MS1-MS14** và **OE1-OE18** đã được đánh giá khả năng kháng các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ như mô tả ở mục 2.2.3.2. Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 4.40.

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập

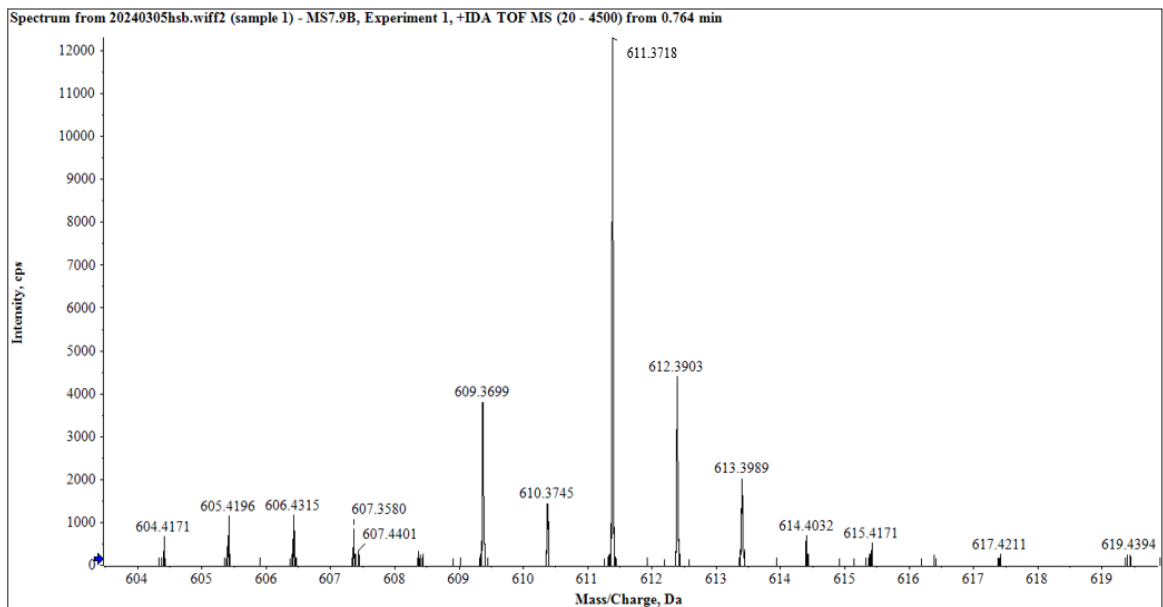
4.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ cây xay răng nhọn (*M. semiserrata*)

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



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

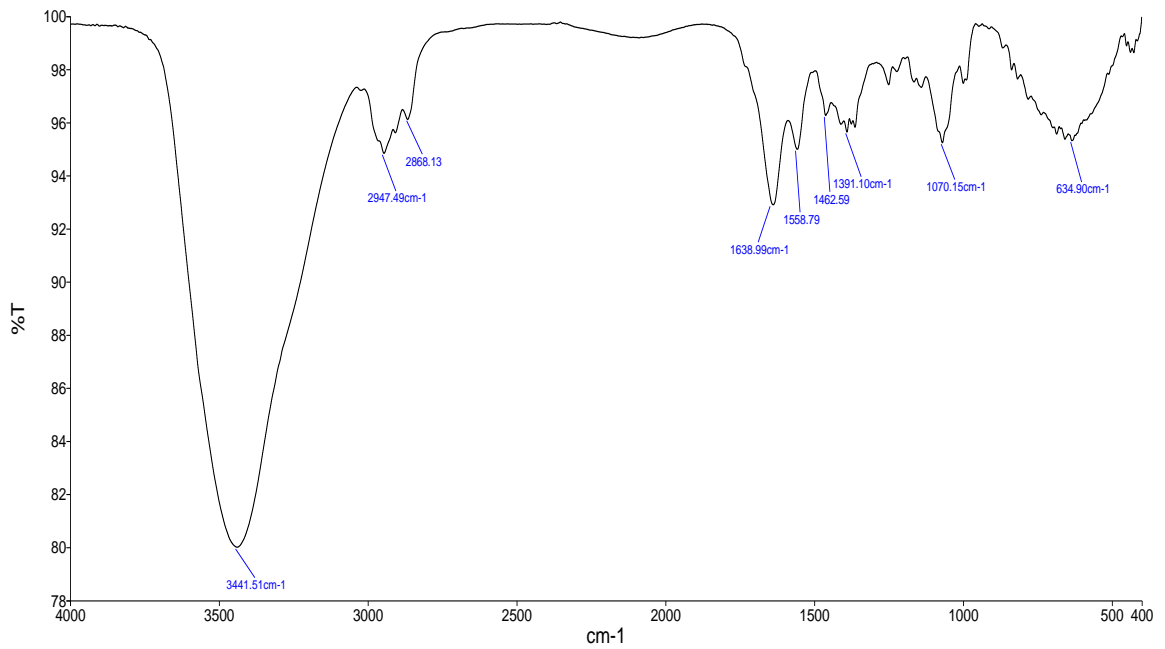
Hợp chất **MS1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, góc quay cực riêng là $[\alpha]_D^{24} +17,9$ (c 0,24, MeOH).



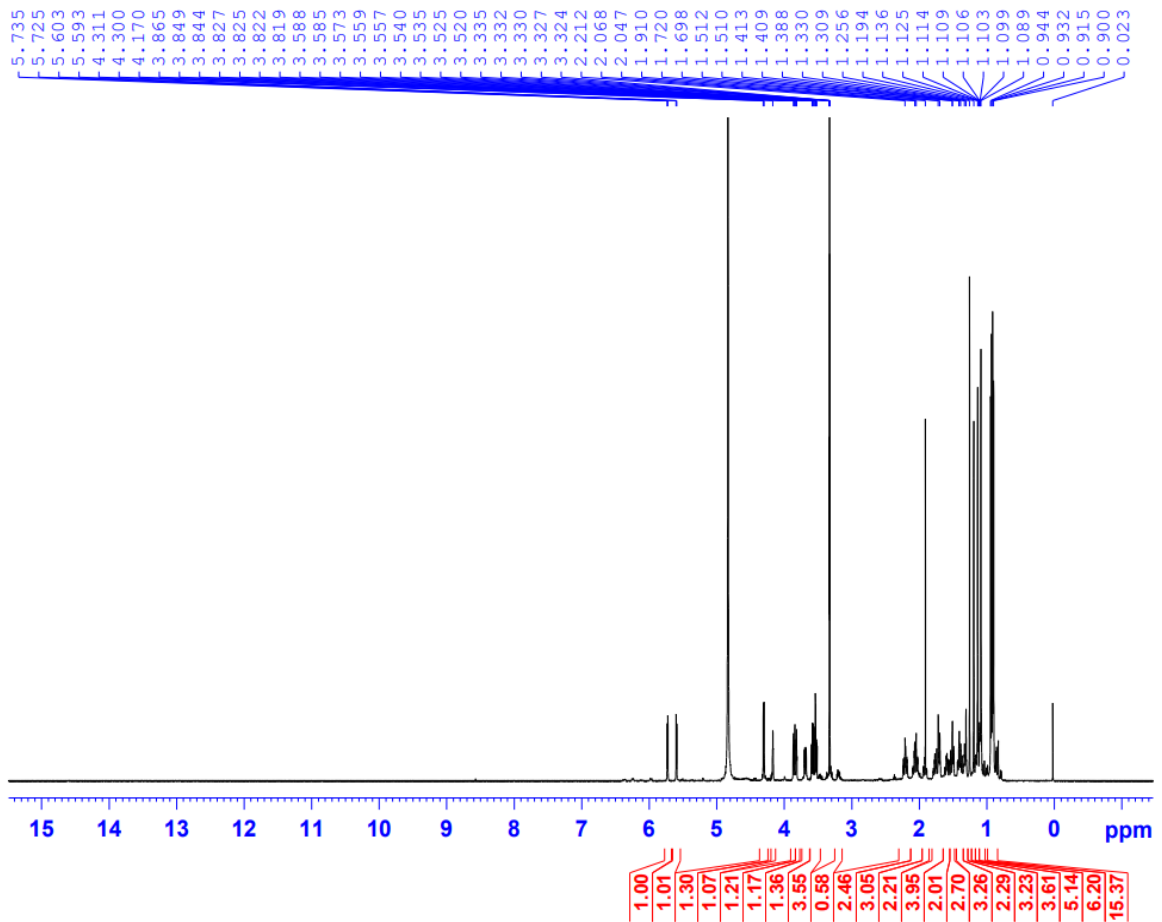
Hình 4.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **MS1**

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 $C_{35}H_{56}O_6K^+$ 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} .



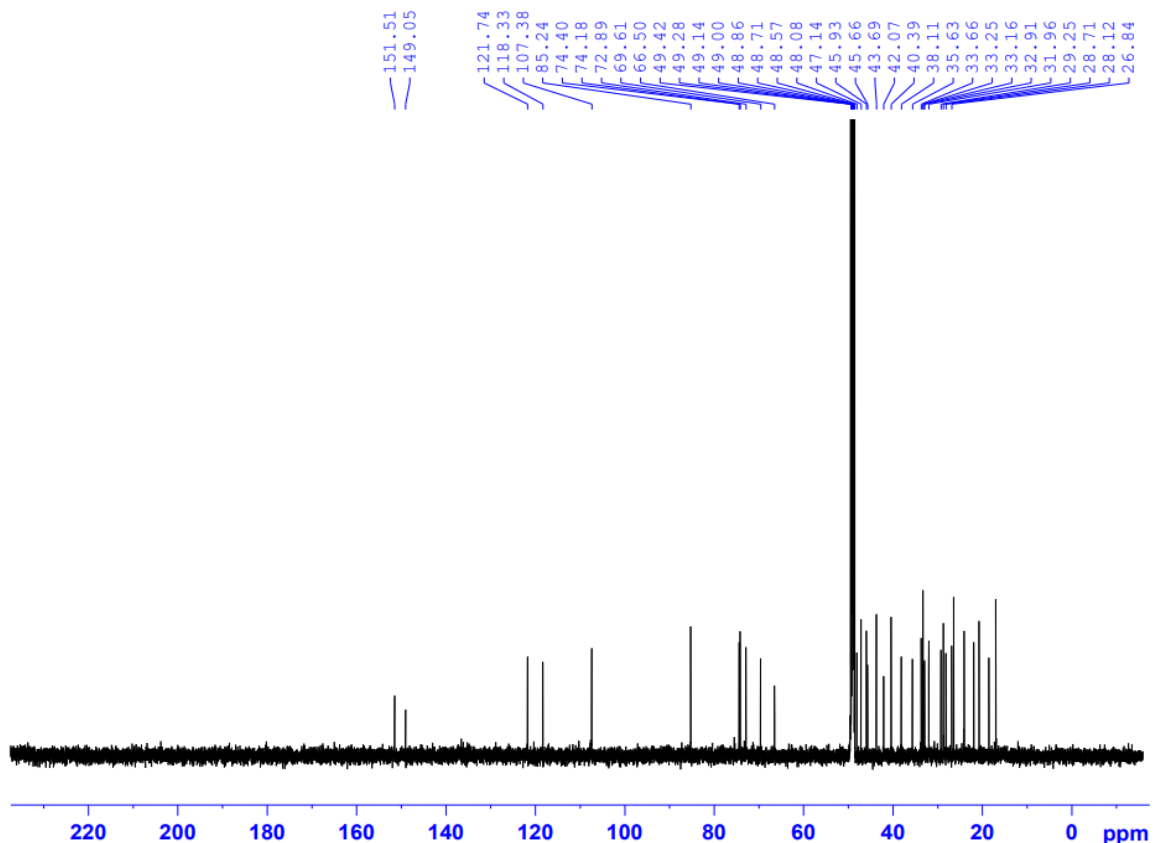
Hình 4.3. Phổ IR của hợp chất **MS1**



Hình 4.4. Phổ ^1H NMR của hợp chất **MS1**

Trên phổ ^1H 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). 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}C NMR cho phép xác định sự hiện diện của một hệ diene liên hợp.

Ngoài ra, phổ ^1H 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 oxymethine tại δ_{H} 3,52 (1H, m, H-3'), 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} 3,54 (1H, dd, $J = 3,0; 12,2$ Hz, H_a-5'), 3,86 (1H, dd, $J = 2,5; 12,2$ Hz, H_b-5').

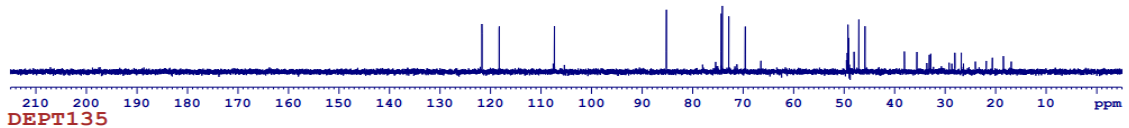


Hình 4.5. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **MS1**

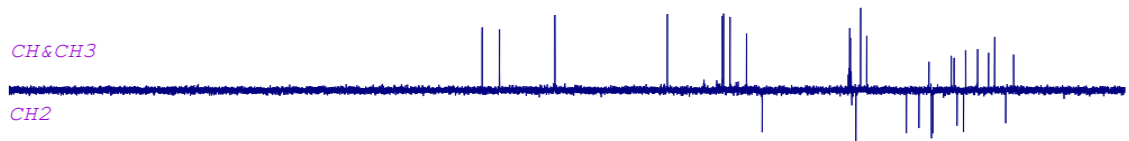
Phân tích phổ ^{13}C NMR và DEPT với sự hỗ trợ của tương tác HSQC của **MS1** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 35 nguyên tử carbon trong đó 30 nguyên tử carbon được gán cho phần aglycone và các tín hiệu cho thành phần đường được tạo thành từ

một đơn vị đường có 5 carbon. Cụ thể là có tín hiệu của tám 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), tám 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), một nhóm oxymethylene tại δ_C 66,5 (C-5'), sáu nhóm oxymethine 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'), hai nhóm methine sp^2 tại δ_C 118,3 (C-11), 121,7 (C-12), hai nhóm methine sp^3 tại δ_C 45,9 (C-5), 47,1 (C-18) và tám carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 31,9 (C-20); 33,3 (C-17), 40,4 (C-4); 42,1 (C-14); 43,7 (C-8); 45,7 (C-10), 149,1 (C-13); 151,5 (C-9). 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 [125, 126].

DEPT90

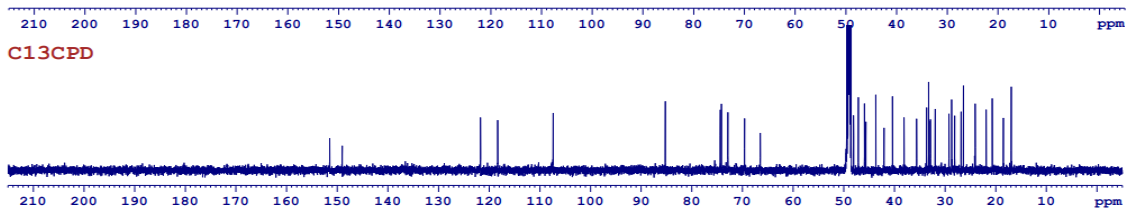


DEPT135



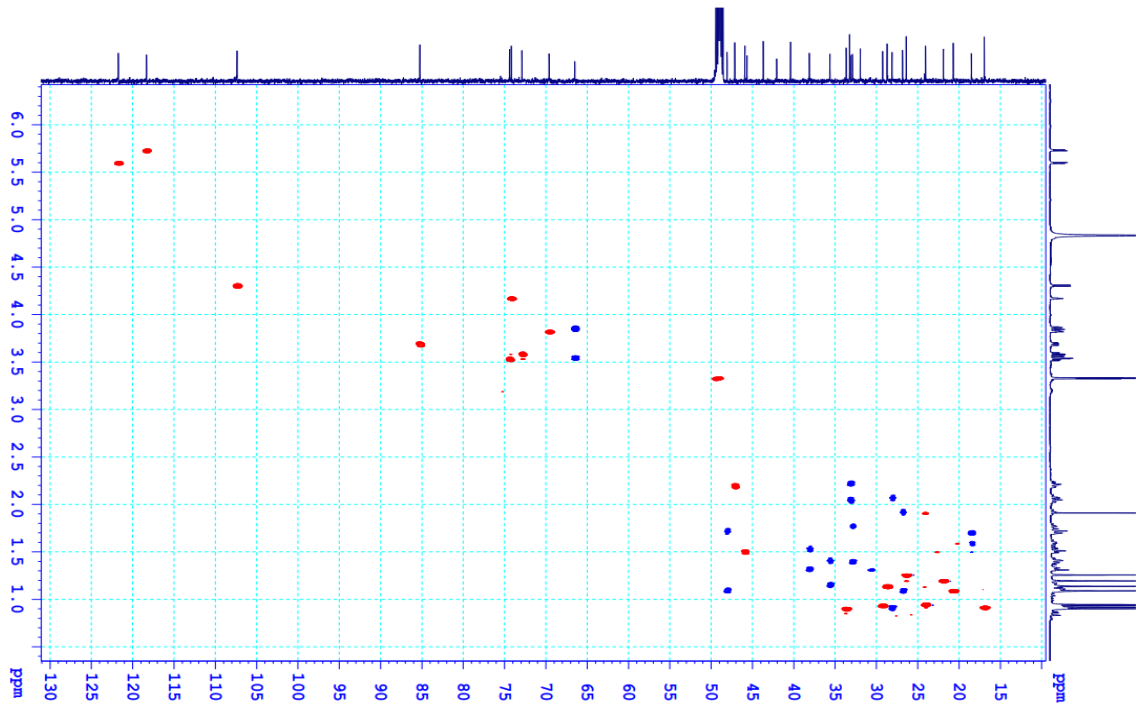
CH&CH3

CH2



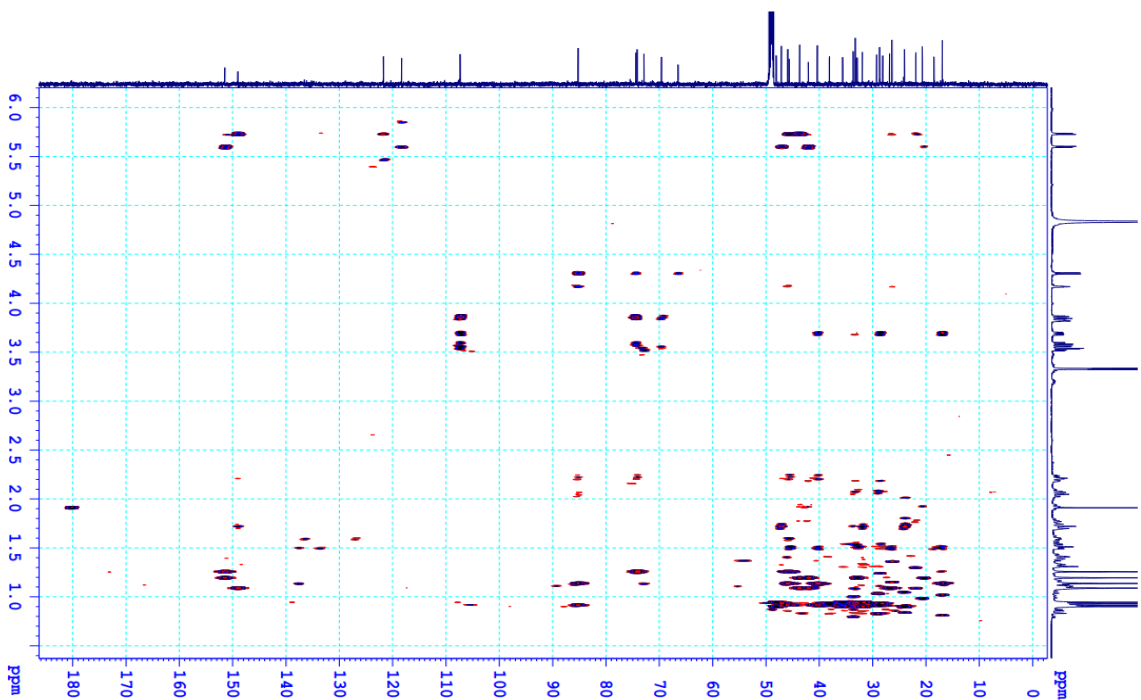
C13CPD

Hình 4.6. Phổ DEPT của hợp chất MS1

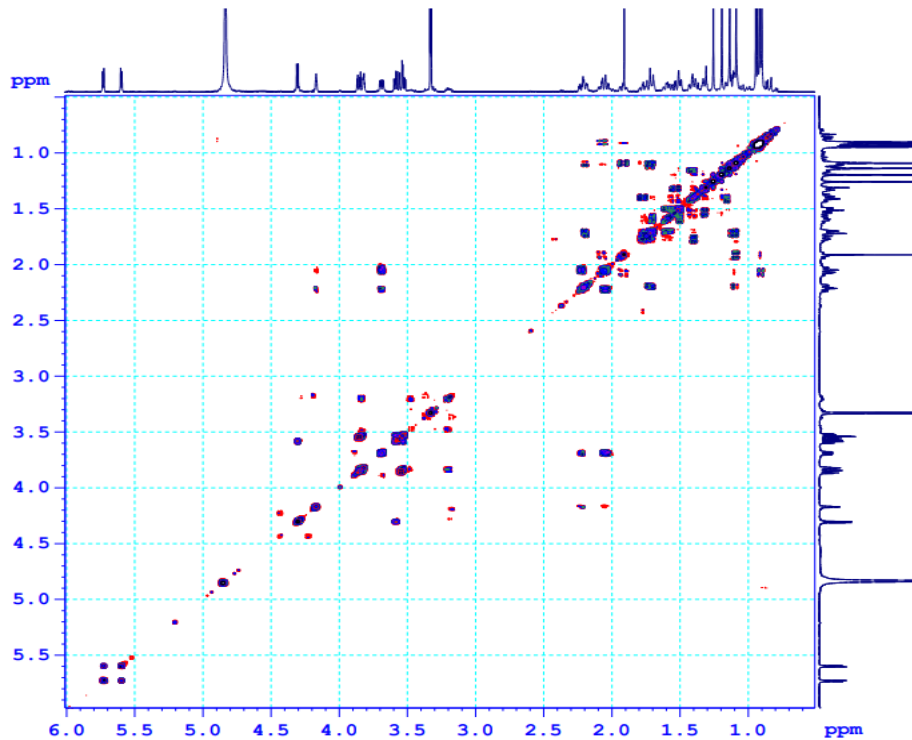


Hình 4.7. Phổ HSQC của hợp chất **MS1**

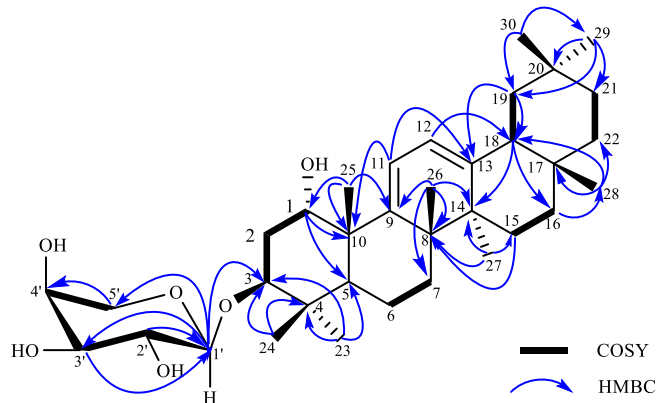
Trên phổ COSY của **MS1** quan sát thấy sự hiện diện của bảy hệ tương tác spin – spin của các proton cạnh nhau được đánh dấu bằng các đường đậm trong hình 4.10 bao gồm: H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/CH₂-5', H-1/CH₂-2/H-3, H-5/CH₂-6/CH₂-7, H-11/H-12, CH₂-15/CH₂-16, H-18/CH₂-19 và CH₂-21/CH₂-22. Từ các dữ liệu phổ 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 juglangenin A [127].



Hình 4.8. Phổ HMBC của hợp chất **MS1**



Hình 4.9. Phổ COSY của hợp chất **MS1**



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

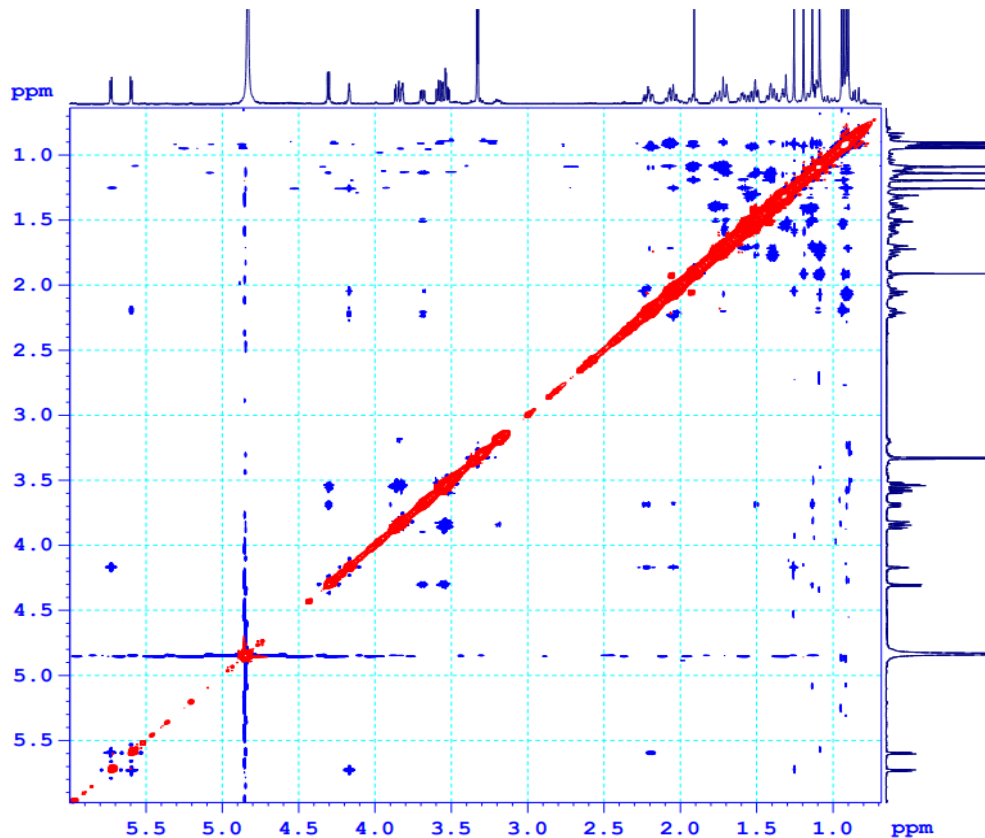
Vị trí của đơn vị đường được xác định dựa trên phổ HMBC giữa tương tác H-1' của phân tử đường (δ_{H} 4,31) với C-3 (δ_{C} 85,3) của phần oleanane aglycon, điều này cho phép ta xác định vị trí của gốc đường được đính tại C-3 (Hình 4.10).

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 proton của nhóm 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 proton của nhóm 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 proton của nhóm 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

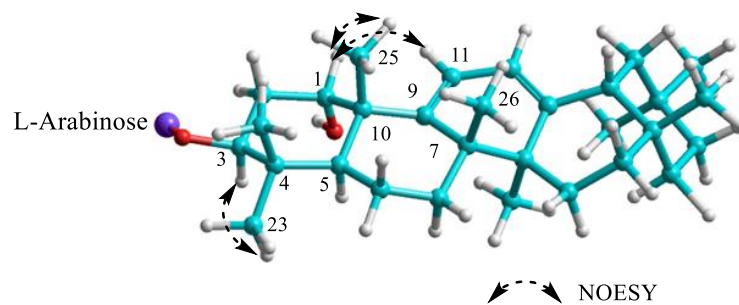
(δ_C 47,1) và C-22 (δ_C 38,1) cho phép ta xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đính trực tiếp lần lượt tại C-10, C-8, C-14 và C-17 của phần oleanane aglycon (Hình 4.10).

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) đến C-13 (δ_C 149,1); C-10 (δ_C 45,7) cho phép xác định khung olean-9(11),12-diene của **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 juglanguenin A [127] 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 juglanguenin A, ngoại trừ sự xuất hiện của một đơn vị đường trong **MS1** thay vì nhóm OH ở C-3 trong juglanguenin A.



Hình 4.11. Phổ NOESY của hợp chất MS1



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

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 riêng $[\alpha]^{24}_D = +10,2$ (c 0,15, H₂O) phù hợp với giá trị góc quay cực riêng của đường L-arabinose trên các tài liệu đã công bố trước đó [125,126] và so sánh hệ số R_f trên bản mỏng TLC của đường L-arabinose chuẩn (giá trị R_f = 0,53). 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 juglanguenin A, đây là hợp chất mới và được đặt tên riêng là myrsineoside A.

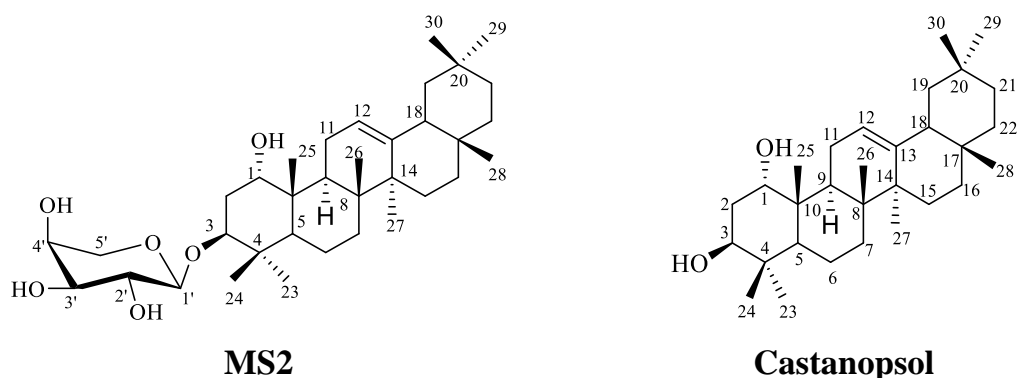
Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của MS1 và hợp chất tham khảo

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)

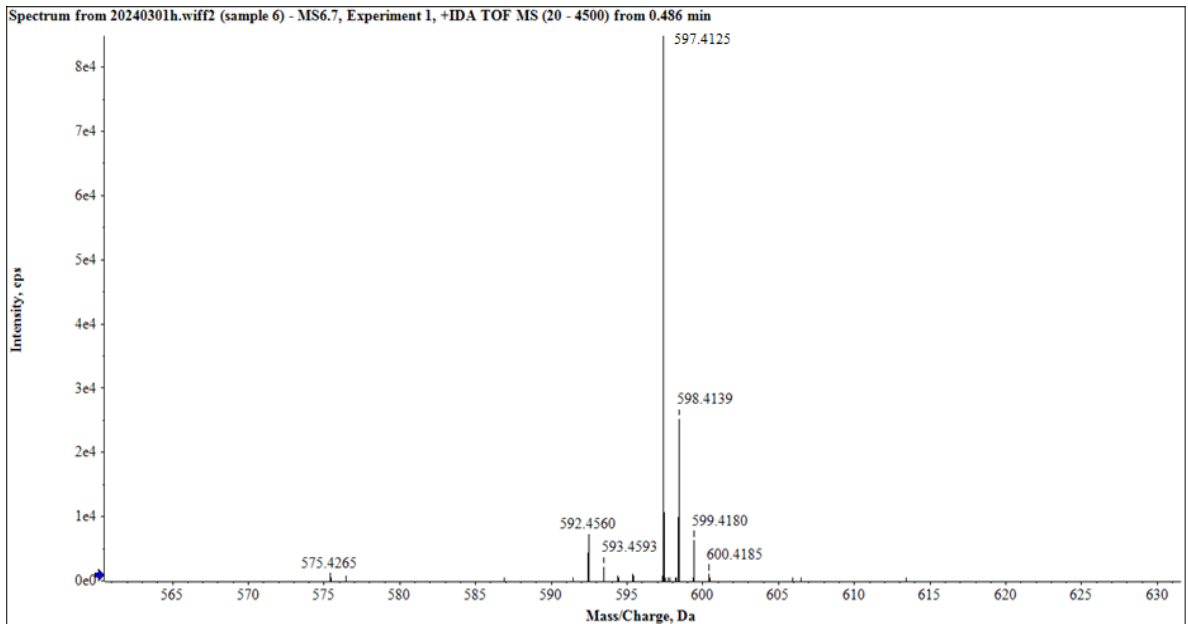
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d100 MHz, [#]δ_C: Số liệu của juglangerin A đo trong CDCl₃ [125]

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

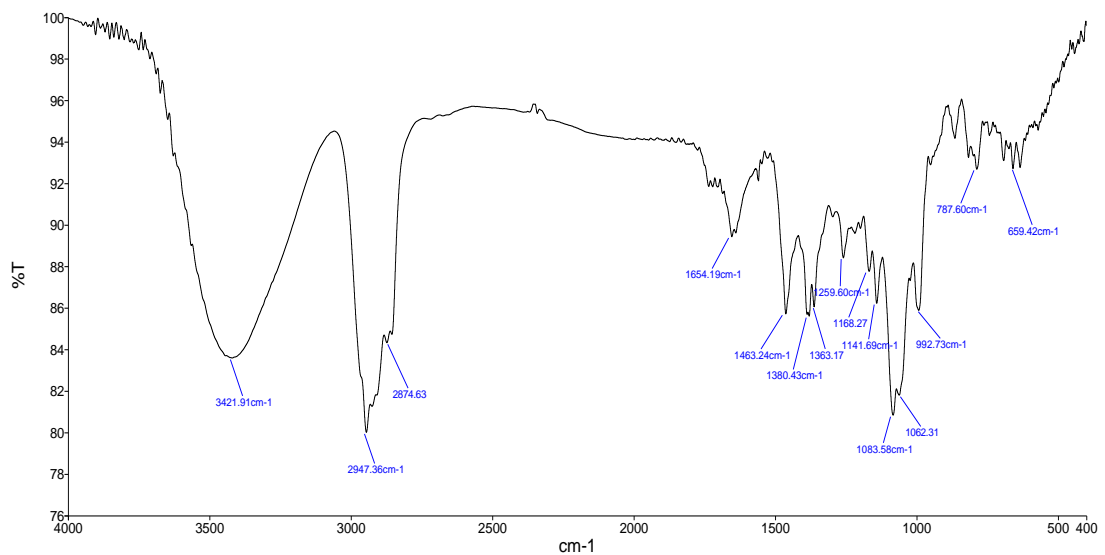


Hình 4.13. Cấu trúc hóa học hợp chất MS2 và hợp chất tham khảo

Hợp chất MS2 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng với góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24} +43,0$ (*c* 0,77, MeOH).

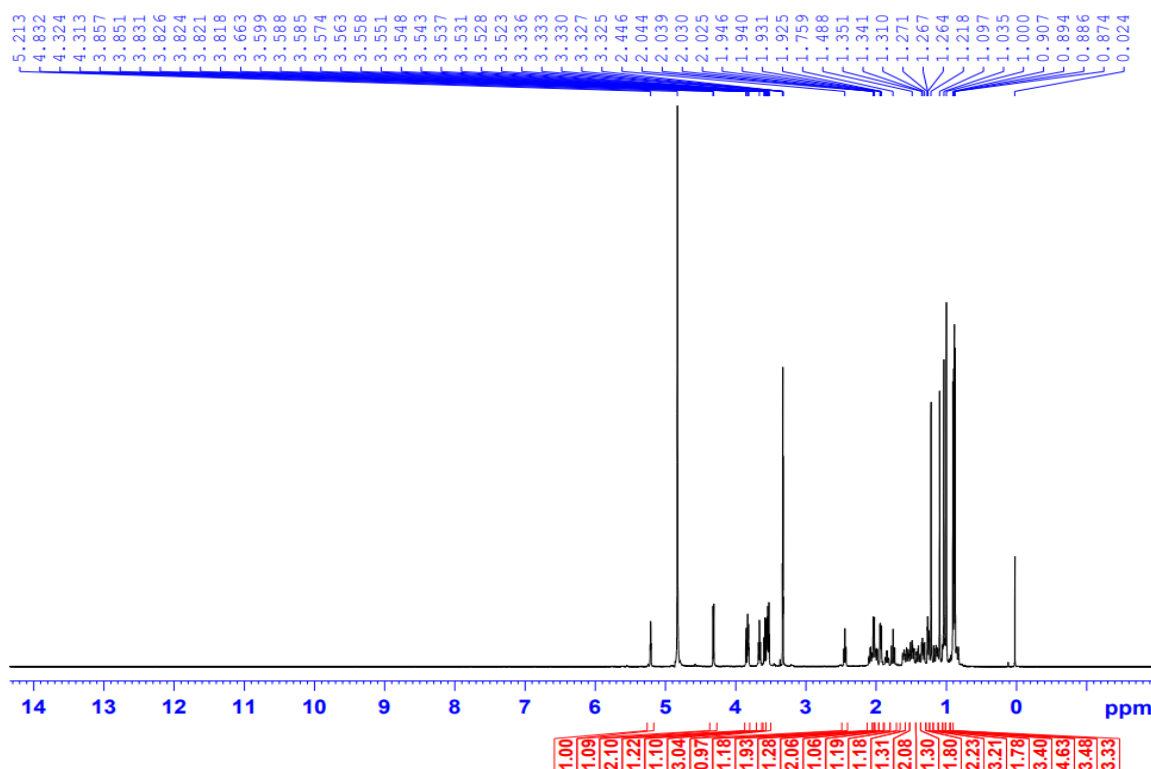


Hình 4.14. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **MS2**



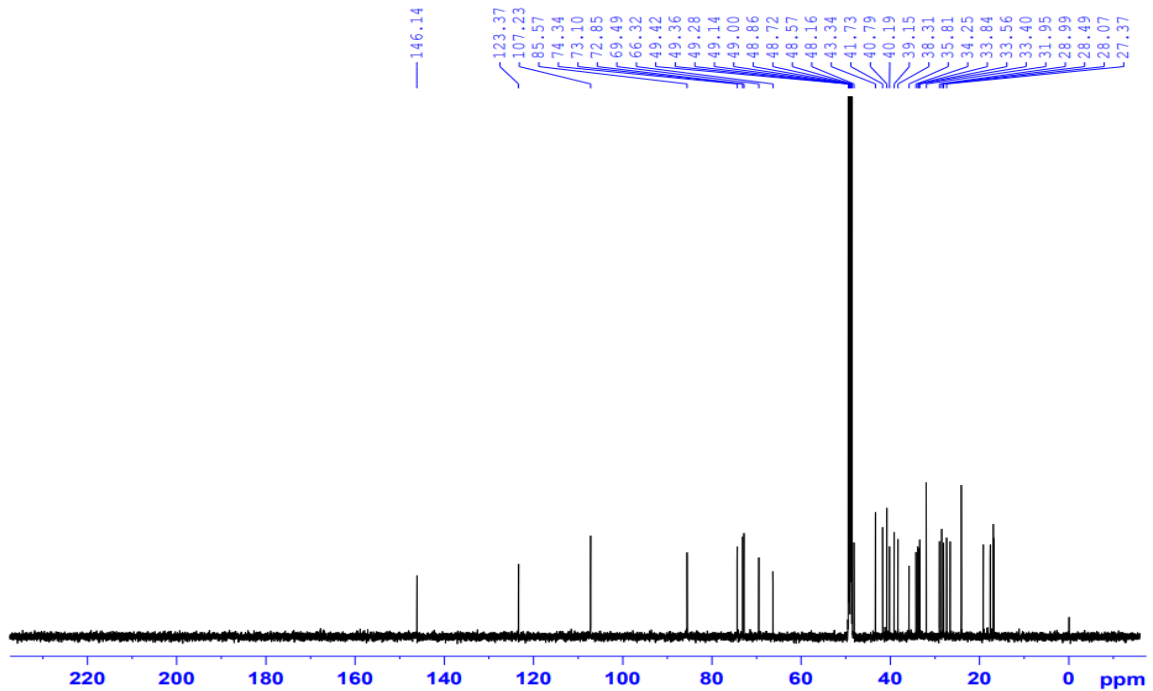
Hình 4.15. Phổ IR của hợp chất **MS2**

Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 597,4125 $[M+Na]^+$, (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{35}H_{58}O_6Na^+$, m/z 597,4125) cho phép xác định được công thức phân tử của **MS2** là $C_{35}H_{58}O_6$ (với độ bất bão hòa $\Delta = 7$). Trên phổ hồng ngoại của **MS2** cho thấy tín hiệu của liên kết đôi (1654 cm^{-1}) và nhóm hydroxyl (3421 cm^{-1}).



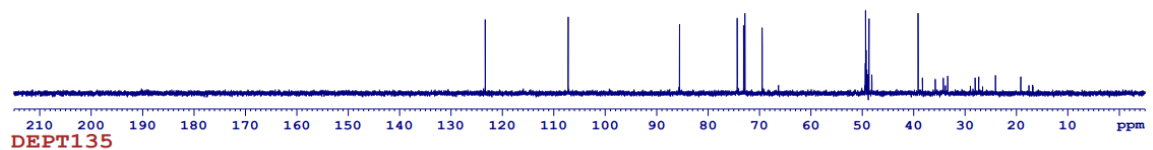
Hình 4.16. Phổ ^1H NMR của hợp chất MS2

Giống với hợp chất MS1, trên phổ ^1H NMR của MS2 cũng xuất hiện các tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,87 (3H, s, H-28), 0,88 (3H, s, H-24), 0,89 (3H, s, H-30), 0,91 (3H, s, H-29), 1,00 (3H, s, H-25), 1,04 (3H, s, H-26), 1,10 (3H, s, H-23) và 1,22 (3H, s, H-27). Tín hiệu của một proton olefin xuất hiện tại δ_{H} 5,21 (1H, t, $J = 3,6$ Hz, H-12). Tín hiệu của hai proton oxymethine của MS2 được xác định tại δ_{H} 3,56 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, H-1) và 3,67 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H-3) và có sự xuất hiện tín hiệu chồng chéo ở vùng aliphatic (δ_{H} 3,53 – 3,85 ppm). Ngoài ra, còn có sự xuất hiện tín hiệu của một proton anomer tại δ_{H} 4,32 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-1'), cùng 5 tín hiệu khác của một gốc đường tại δ_{H} 3,53 (1H, m, H-3'), δ_{H} 3,54 (1H, dd, $J = 3,0; 12,0$ 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 3,85 (1H, dd, $J = 3,6; 12,0$ Hz, H_b -5'). Từ các dữ liệu trên cùng với các giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1',2'} = 6,6$ Hz, $J_{2',3'} = 8,4$ Hz) tương tự như gốc đường trong MS1 cho phép dự đoán trong MS2 có mặt một gốc đường α -arabinose. Khác với chất MS1, trên phổ MS2 thấy mất đi tín hiệu của 1 một proton olefin, điều này cũng được khẳng định trên phổ ^{13}C NMR của MS2.



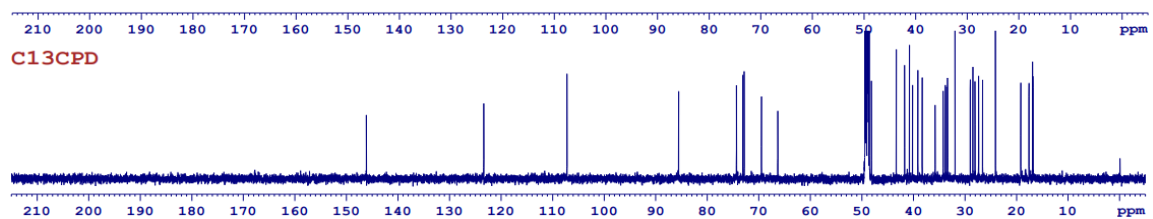
Hình 4.17. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất MS2

DEPT90



CH&CH3

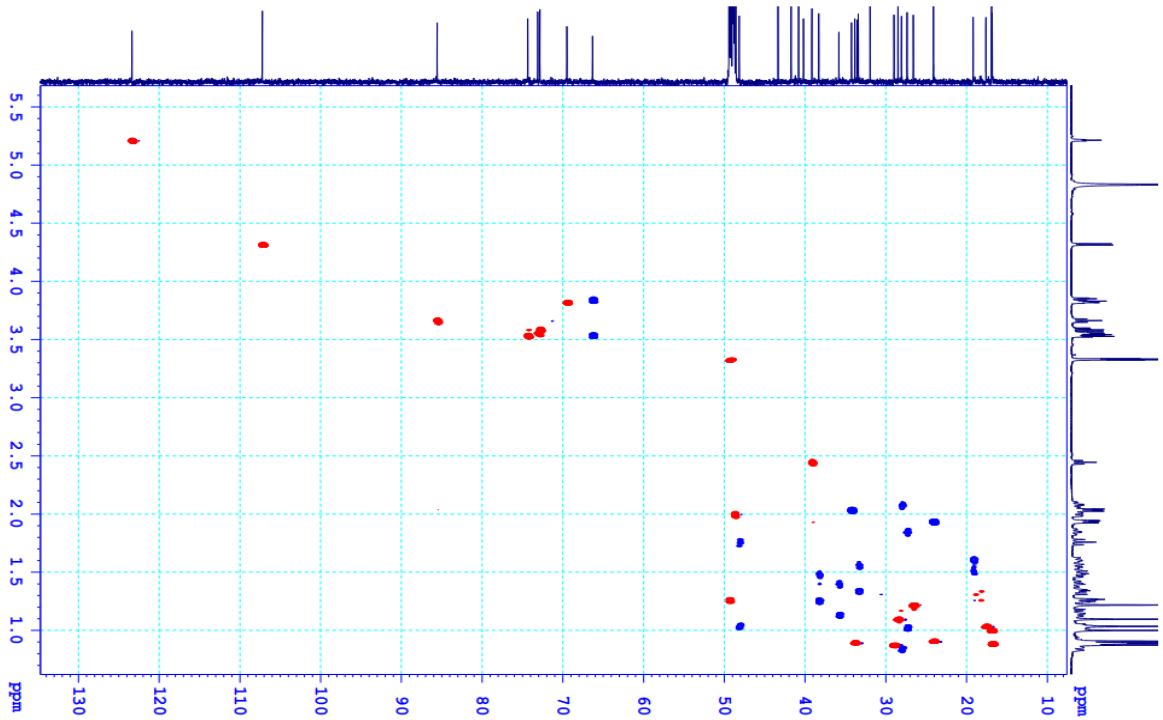
CH2



Hình 4.18. Phổ DEPT của hợp chất MS2

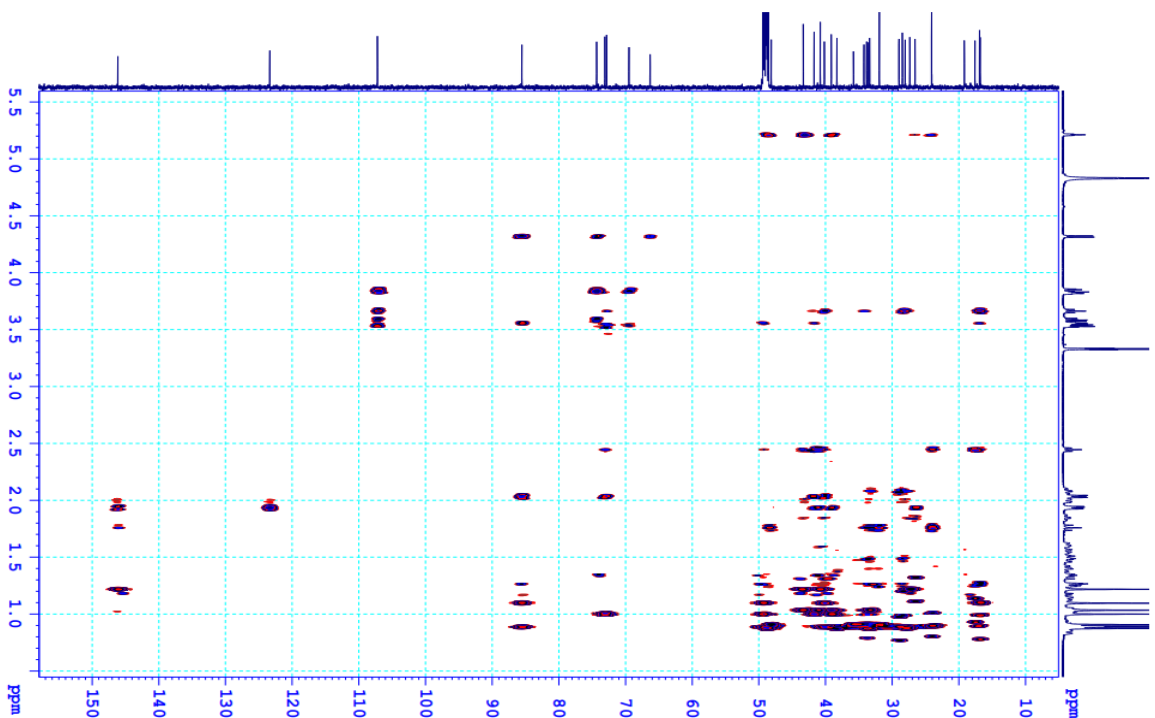
Phân tích phổ ^{13}C NMR và DEPT với sự hỗ trợ của tương tác HSQC của MS2 cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 35 nguyên tử carbon, trong đó 30 tín hiệu được gán cho phần aglycone và 5 tín hiệu cho thành phần đường được tạo thành từ một gốc đường pentose bao gồm tín hiệu của tám nhóm methyl, chín nhóm methylene, một nhóm oxymethylene tại δ_{C} 66,3 (C-5'), một nhóm methine sp^2 , chín nhóm methine sp^3 , và bảy tín hiệu carbon không liên kết trực tiếp với hydro. So sánh với các dữ liệu phổ của MS1 và MS2 cho thấy sự gần giống nhau ở hầu hết các vị trí. Điểm khác nhau duy nhất của hai hợp chất này là tại các vị trí C-9 và C-11. Trên phổ NMR của

MS2 thấy mất đi tín hiệu của một nhóm methine sp^2 và một carbon không liên kết trực tiếp với hydro, thay vào đó là một nhóm methylene và một nhóm methine sp^3 chứng tỏ **MS2** không có liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11.

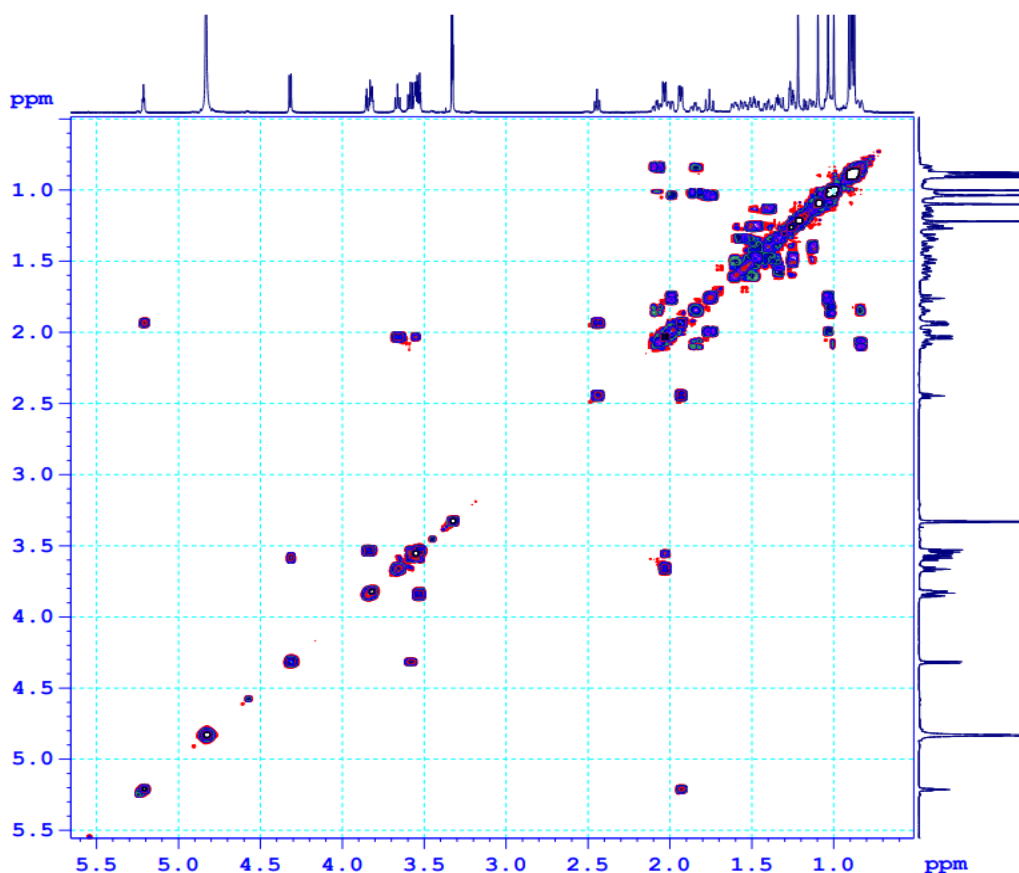


Hình 4.19. Phổ HSQC của hợp chất **MS2**

Các liên kết trực tiếp giữa các proton và carbon của **MS2** được xác định dựa trên việc phân tích phổ HSQC.



Hình 4.20. Phổ HMBC của hợp chất **MS2**

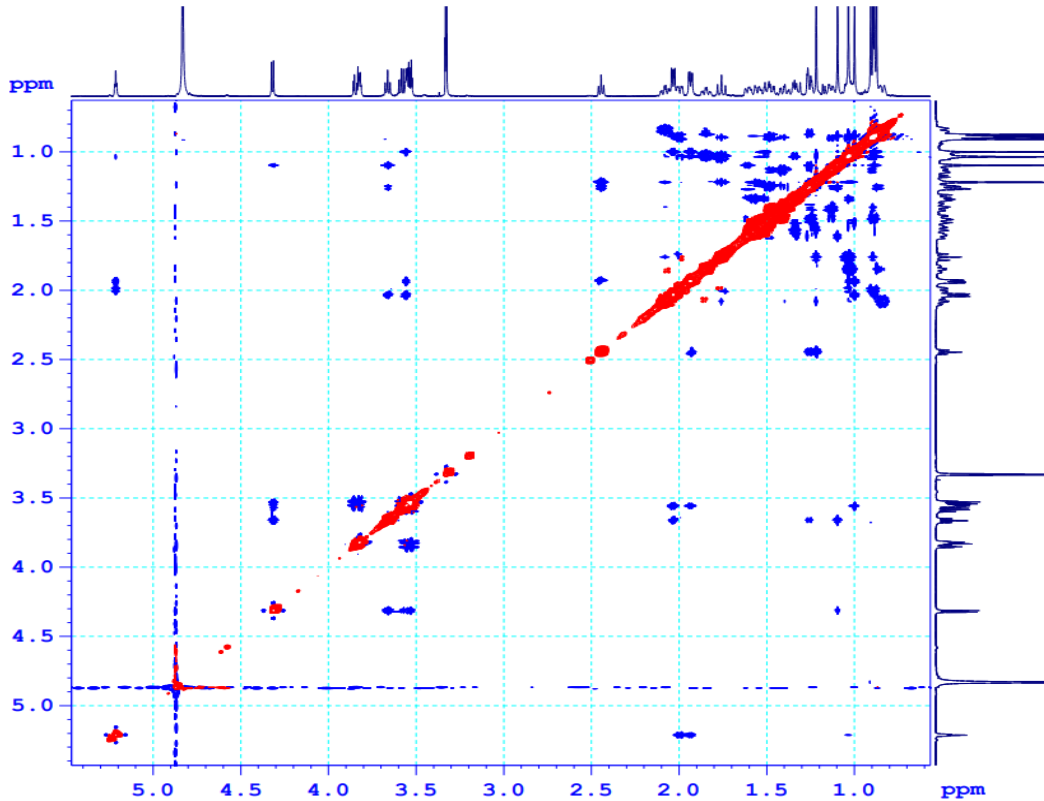


Hình 4.21. Phổ COSY của hợp chất **MS2**

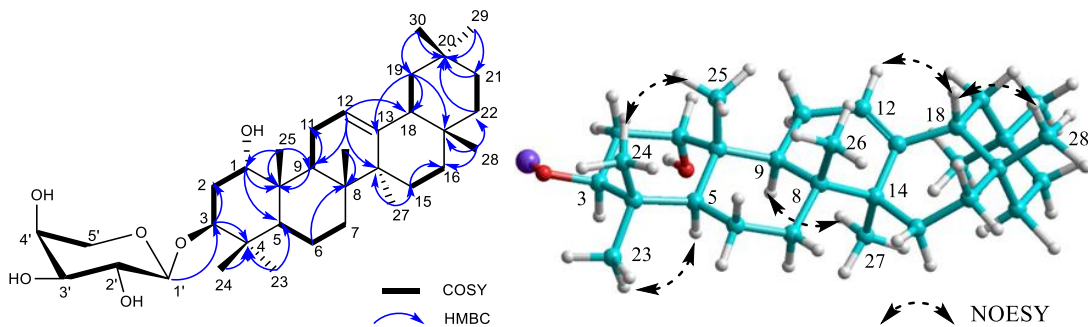
Trên phổ COSY của **MS2** quan sát thấy sự hiện diện của bảy hệ tương tác spin – spin của các proton cạnh nhau được đánh dấu bằng các đường đậm trong hình 4.23 (H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/CH₂-5', H-1/CH₂-2/H-3, H-5/CH₂-6/CH₂-7, H-9/CH₂-11/H-12, CH₂-15/CH₂-16, H-18/CH₂-19 và CH₂-21/CH₂-22). Từ các dữ liệu phổ NMR thu được của **MS2** và các phân tích trên gợi ý hợp chất **MS2** là một triterpenoid có khung oleanane tương tự như castanopsol [128]. Vị trí của gốc đường được xác định dựa trên phổ HMBC giữa tương tác H-1' của gốc đường (δ_{H} 4,32, $J = 6,6$ Hz) với C-3 (δ_{C} 85,6) của phần oleanane aglycon, điều này cho phép xác định vị trí của gốc đường được đính trực tiếp tại vị trí C-3 (Hình 4.23).

Bên cạnh đó trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa Me-23 (δ_{H} 1,10) và Me-24 (δ_{H} 0,88) với C-3 (δ_{C} 85,6), C-4 (δ_{C} 40,2) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này được liên kết với C-4. Tương tác HMBC giữa Me-25 (δ_{H} 1,00) với C-1 (δ_{C} 73,1), C-10 (δ_{C} 41,7), và C-9 (δ_{C} 39,2); giữa Me-26 (δ_{H} 1,04) với C-7 (δ_{C} 33,4), C-8 (δ_{C} 40,8), C-9 (δ_{C} 39,2) và C-14 (δ_{C} 43,3); giữa Me-27 (δ_{H} 1,22) với C-13 (δ_{C} 146,1); giữa Me-28 (δ_{H} 0,87) với C-16 (δ_{C} 28,1), C-17 (δ_{C} 33,6) và C-18 (δ_{C} 48,6) 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 4.23). Tương tác giữa Me-29 (δ_{H} 0,91) và Me-30 (δ_{H} 0,89) với C-19 (δ_{C} 48,2), C-20 (δ_{C} 31,9), C-21 (δ_{C} 35,8) và sự tương tác lẫn nhau của

chúng 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 giữa H-11 (δ_H 1,94), H-12 (δ_H 5,21), Me-25 (δ_H 1,00), Me-26 (δ_H 1,04) đến C-9 (δ_C 39,2), và từ H-11 (δ_H 1,94) và Me-27 (δ_H 1,22) đến C-13 (δ_C 146,1) cho thấy khung olean-12-ene của **MS2** tương tự như **MS1**.



Hình 4.22. Phổ NOESY của hợp chất **MS2**



Hình 4.23. Các tương tác chính HMBC, COSY và NOESY của hợp chất **MS2**

Bằng việc quan sát tương tác trên phổ NOESY của H-3 (δ_H 3,67) và H-5 (δ_H 1,26)/H-23 (δ_H 1,10), cấu hình của proton ở vị trí C-3 và C-5 của **MS2** cũng được xác định là cấu hình α giống với **MS1**. Bên cạnh đó phổ NOESY xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H-1 (δ_H 3,56) và H-25 (δ_H 1,00), giữa H-24 (δ_H 0,88) và H-25 (δ_H 1,00), từ đó kết luận cấu hình β cho H-1.

Phân tích các tương tác trên phổ NOESY của **MS2** cho thấy tương tác giữa H_{α} -3 và H-1' tương tự như **MS1** gợi ý cho ta cấu hình α của proton tại vị trí C-1'. Ngoài ra, sự tương tác giữa Me-27 (δ_H 1,22)/H-9 (δ_H 2,45) và sự tương tác giữa H-18

(δ_H 2,0)/Me-28 (δ_H 0,87) và H-12 (δ_H 5,21) cho thấy proton ở C-9 có cấu hình α , proton ở C-18 có cấu hình β . Từ những thông tin trên cho thấy cấu trúc phần aglycon của hợp chất **MS2** tương tự như castanopsol.

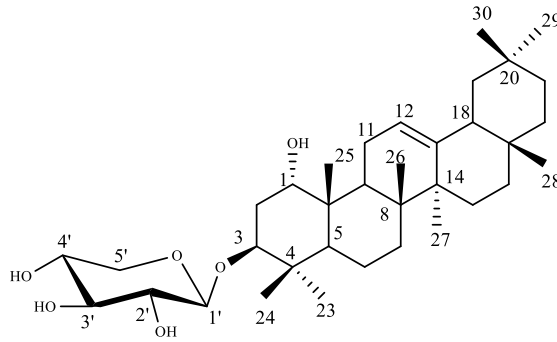
Tiến hành thủy phân hợp chất **MS2** trong môi trường acid HCl để thu được đường đơn. Nhóm đường trong **MS2** được xác định là L-arabinose với góc quay cực riêng $[\alpha]^{24}_D = +102$ (c 0,1, H₂O) và hệ số $R_f = 0,53$ phù hợp với giá trị độ quay cực riêng của đường L-arabinose đã công bố trước đó và so sánh hệ số R_f trên bản mỏng TLC của đường L-arabinose chuẩn. Từ tất cả những phân tích dữ liệu phổ trên cho phép xác định được hợp chất **MS2** là 3-O- α -L-arabinopyranosyl castanopsol, đây là hợp chất mới và được đặt tên riêng là myrsineoside B.

Bảng 4.2. Số liệu phổ NMR của **MS2** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	74,2	73,1	3,56 (m)	19	48,1	48,2	1,02 (m) 1,76 (t, 13,2)
2	33,2	34,3	2,04 (dd, 3,0; 8,4)	20	31,9	31,9	-
3	85,3	85,6	3,67 (t, 8,4)	21	35,6	35,8	1,13 (m) 1,42 (td, 3,6, 13,2)
4	40,4	40,2	-	22	38,1	38,3	1,26 (m) 1,46 (m)
5	45,9	49,4	1,26 (m)	23	28,7	28,5	1,10 (s)
6	18,5	19,2	1,51 (m) 1,61 (m)	24	16,9	16,8	0,88 (s)
7	32,9	33,4	1,34 (m) 1,57 (m)	25	26,4	16,9	1,00 (s)
8	43,7	40,8	-	26	21,9	17,6	1,04 (s)
9	151,5	39,2	2,45 (t, 8,4)	27	20,7	26,6	1,22 (s)
10	45,7	41,7	-	28	29,3	28,9	0,87 (s)
11	118,3	24,1	1,94 (dd, 3,6; 9,0)	29	24,1	24,1	0,91 (s)
12	121,7	123,4	5,21 (t, 3,6)	30	33,7	33,8	0,89 (s)
13	149,1	146,1	-	Ara			
14	42,1	43,3	-	1'	107,4	107,2	4,32 (d, 6,6)
15	26,8	27,4	1,00 (m) 1,85 (m)	2'	72,9	72,9	3,58 (dd, 6,6; 8,4)
16	28,1	28,1	0,83 (m) 2,08 (m)	3'	74,4	74,3	3,53 (m)
17	33,3	33,6	-	4'	69,6	69,5	3,82 (m)
18	47,1	48,6	2,00 (dd, 4,2,13,8)	5'	66,5	66,3	3,54 (dd, 3,0; 12,0) 3,85 (dd, 3,6; 12,0)

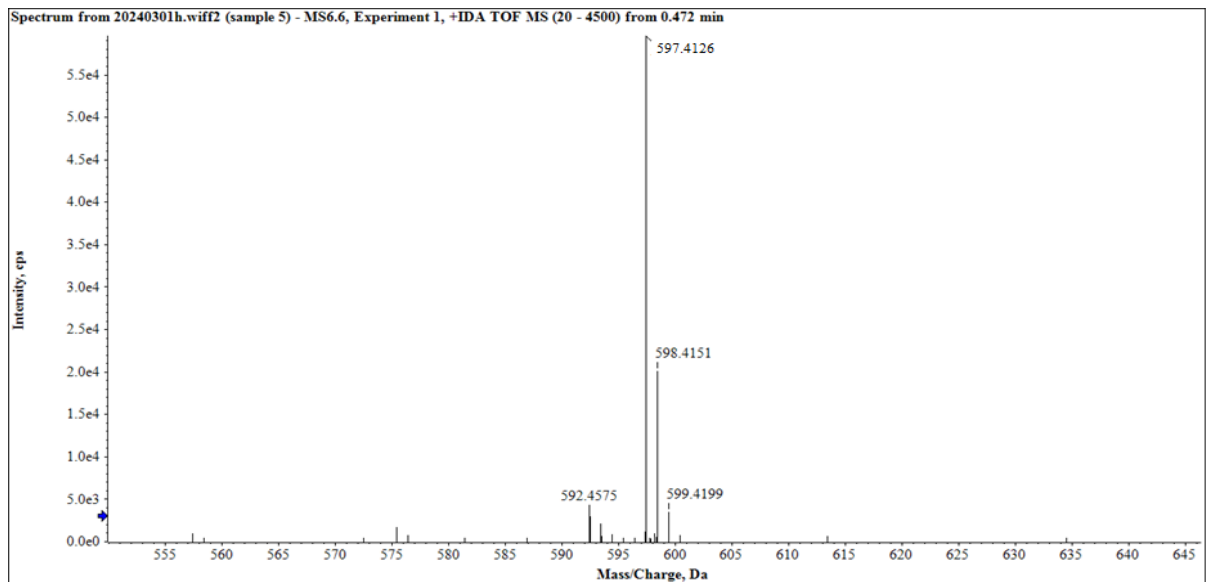
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, # δ_C của **MS1** đo trong CD₃OD

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

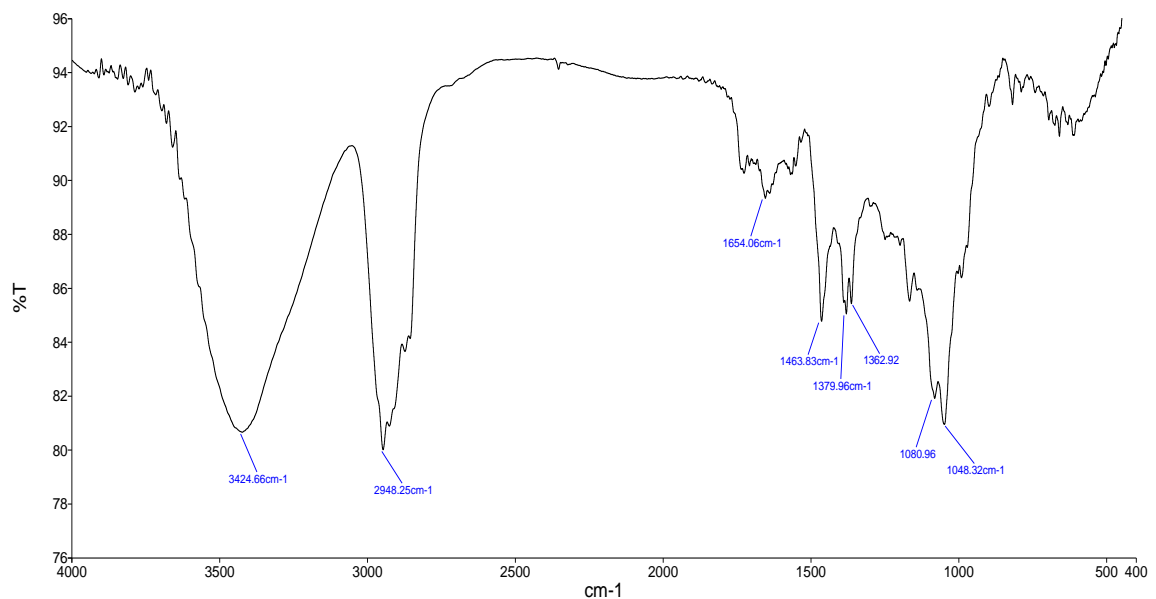


Hình 4.24. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS3**

Hợp chất **MS3** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, góc quay cực riêng là $[\alpha]_D^{24} : -61,6$ (c 0,15, MeOH).

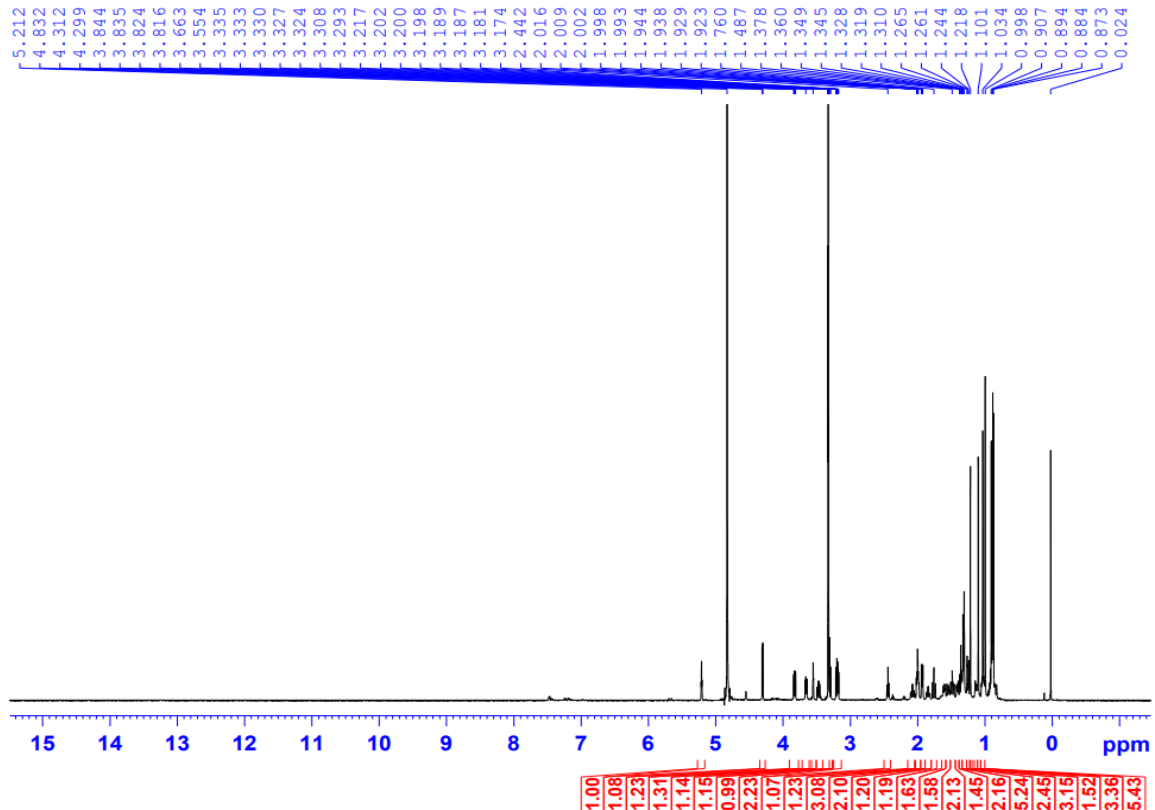


Hình 4.25. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **MS3**



Hình 4.26. Phổ IR của hợp chất **MS3**

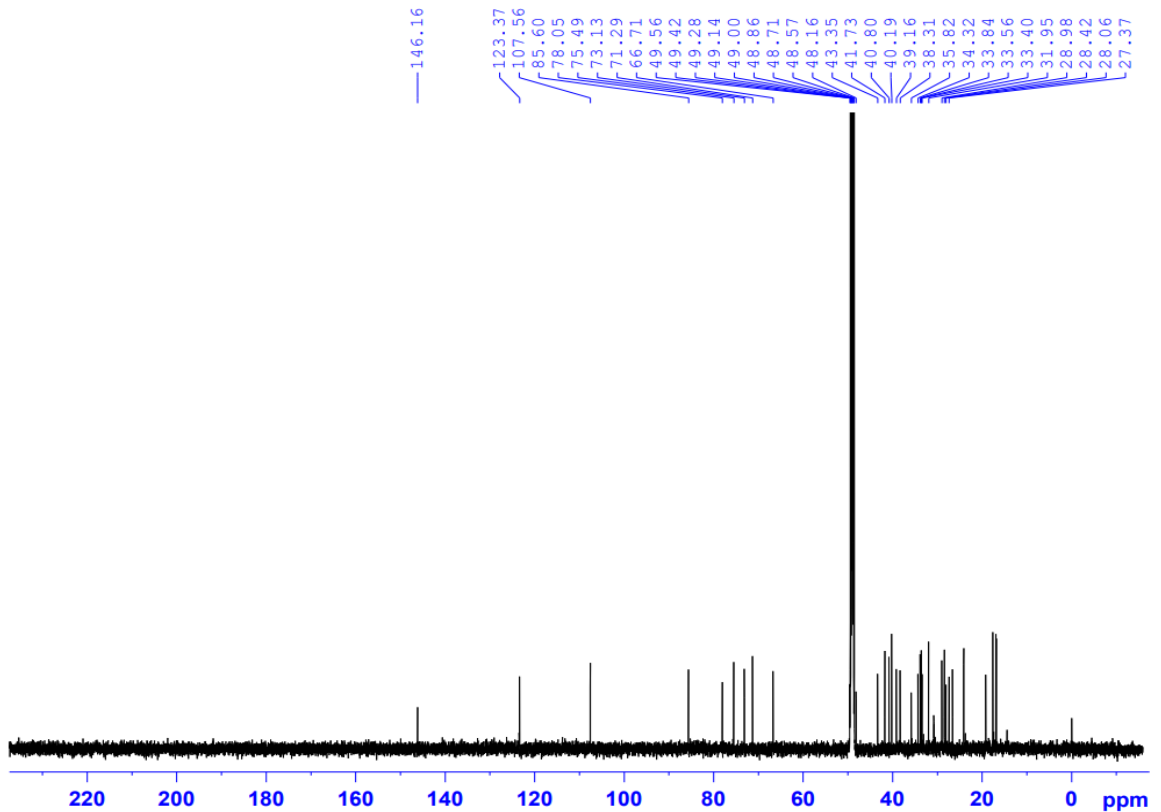
Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 597,4126 $[M+Na]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{35}H_{58}O_6Na^+$, m/z 597,4125 cho phép xác định được công thức phân tử của **MS3** là $C_{35}H_{58}O_6$ với độ bất bão hòa $\Delta = 7$). Trên phổ hồng ngoại của **MS3** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu liên kết đôi trong vùng (1654 cm^{-1}) và nhóm hydroxyl (3424 cm^{-1}).



Hình 4.27. Phổ ^1H NMR của hợp chất **MS3**

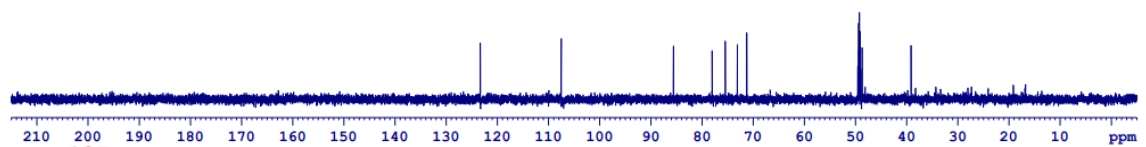
Tương tự như hợp chất **MS2**, trên phổ ^1H NMR của **MS3** xuất hiện các tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,87 (3H, s, H-28), 0,88 (3H, s, H-24), 0,89 (3H, s, H-30), 0,91 (3H, s, H-29), 1,00 (3H, s, H-25), 1,03 (3H, s, H-26), 1,10 (3H, s, H-23) và 1,22 (3H, s, H-27) và tín hiệu của một proton olefin tại δ_{H} 5,21 (1H, t, $J = 3,6\text{ Hz}$, H-12).

Tín hiệu của hai proton oxymethine được xác định tại δ_{H} 3,55 (1H, t, $J = 2,4\text{ Hz}$, H-1) và 3,66 (1H, dd, $J = 5,4; 10,8\text{ Hz}$, H-3) và có sự xuất hiện tín hiệu chồng chéo ở vùng aliphatic (δ_{H} 3,18 – 3,83 ppm). Ngoài ra, còn có sự xuất hiện tín hiệu của một proton anomer tại δ_{H} 4,31 (1H, d, $J = 7,8\text{ Hz}$, H-1') cùng 5 tín hiệu khác của một gốc đường tại δ_{H} 3,18 (1H, m, H-2'), δ_{H} 3,20 (1H, dd, $J = 1,2; 6,6\text{ Hz}$, H_a-5'), δ_{H} 3,31 (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-3'), δ_{H} 3,47 (1H, m, H-4'), và 3,83 (1H, dd, $J = 5,4; 12,0\text{ Hz}$, H_b-5'). Từ các dữ liệu trên cùng với giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1',2'} = 7,8\text{ Hz}$, $J_{3',4'} = 9,0\text{ Hz}$) có thể dự đoán sự có mặt của một đơn vị đường β -xylopyranose [129].

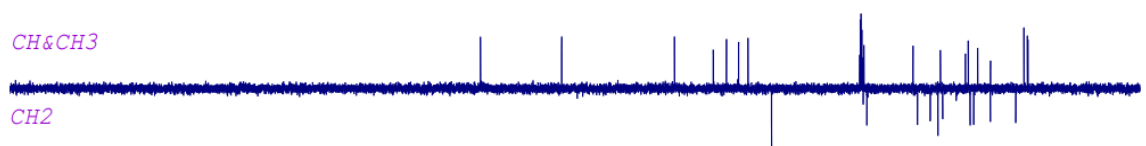


Hình 4.28. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất MS3

DEPT90

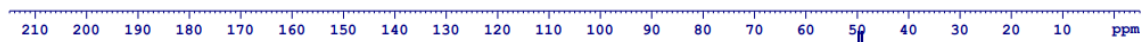


DEPT135

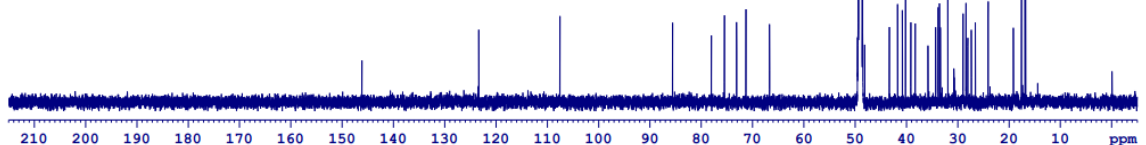


CH&CH3

CH2



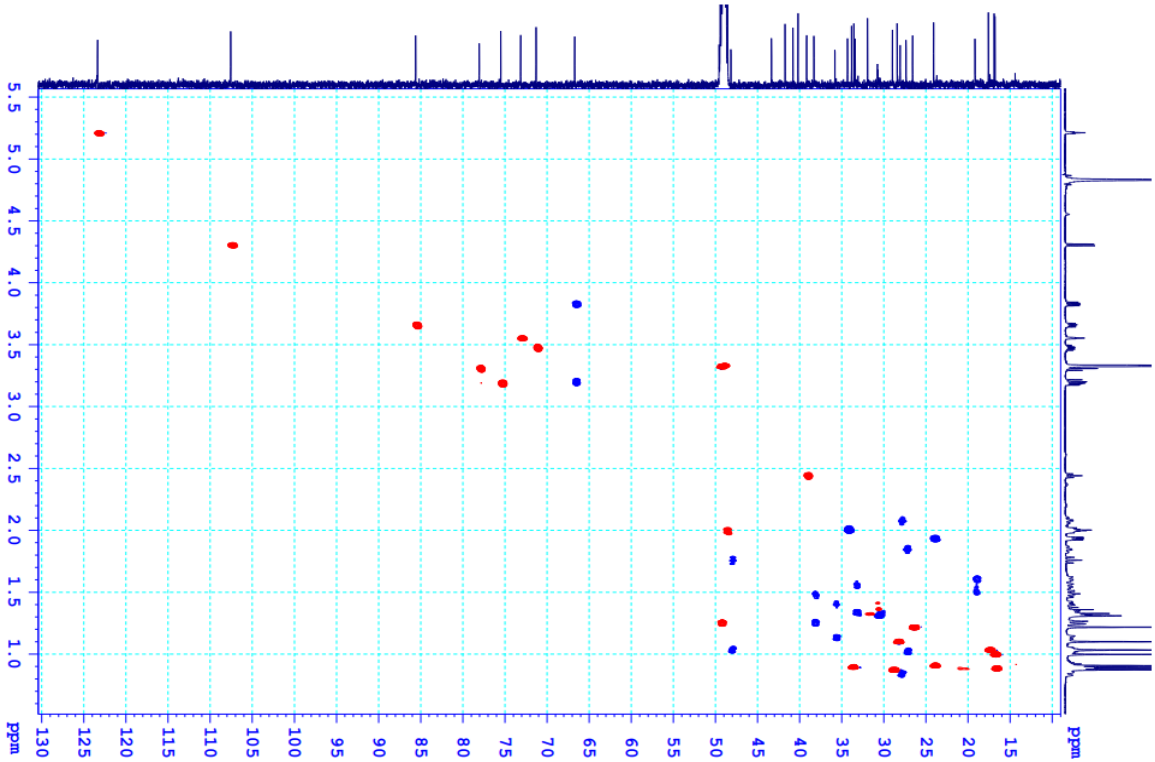
C13CPD



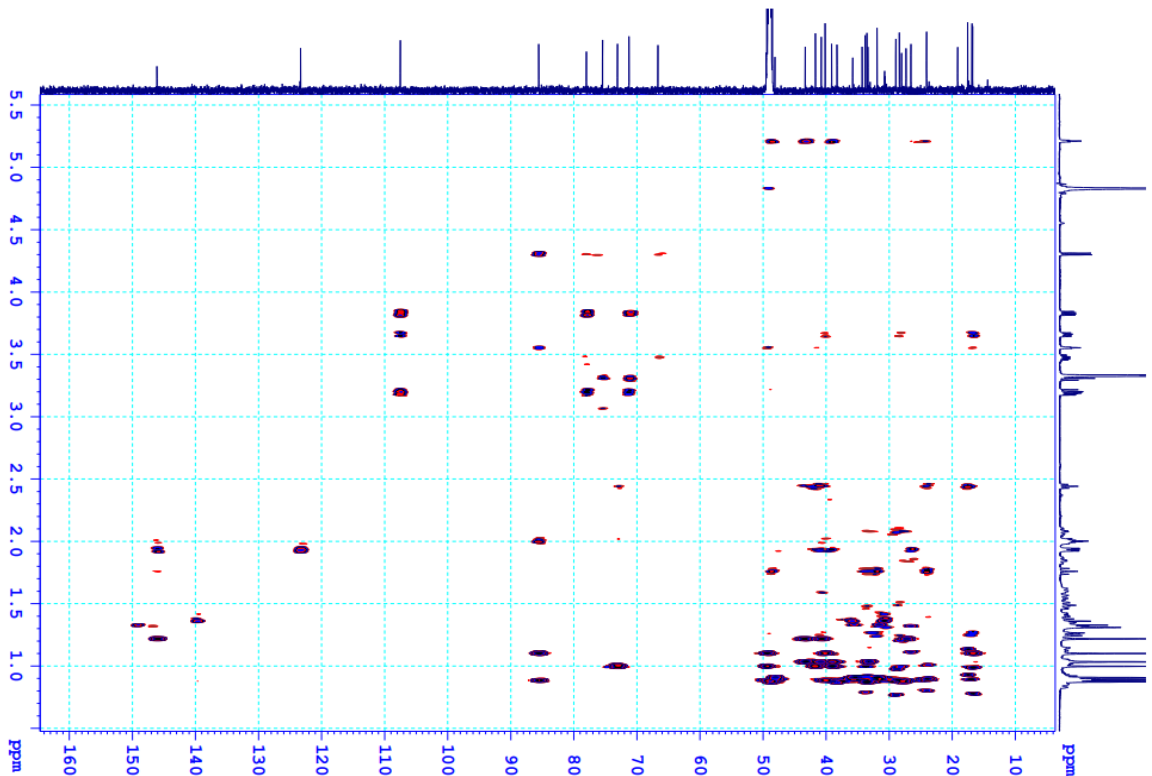
Hình 4.29. Phổ DEPT của hợp chất MS3

Phân tích phổ ^{13}C NMR và DEPT với sự hỗ trợ của tương tác HSQC cho thấy 35 tín hiệu carbon trong đó 30 tín hiệu được gán cho phần aglycone (gồm tám tín hiệu của nhóm methyl, mười tín hiệu nhóm methylene với một nhóm methylene đính trực

tiếp với oxo tại δ_C 66,7 (C-5'), mười nhóm methine cộng hưởng trong vùng từ 39,2 đến 123,4 ppm, và bảy tín hiệu carbon không liên kết hydro) và năm tín hiệu của một đơn vị đường. So sánh với các dữ liệu phổ của **MS2** cho thấy sự giống nhau ở hầu hết các vị trí, ngoại trừ các tín hiệu của vùng đường giữa hai hợp chất **MS2** và **MS3**.

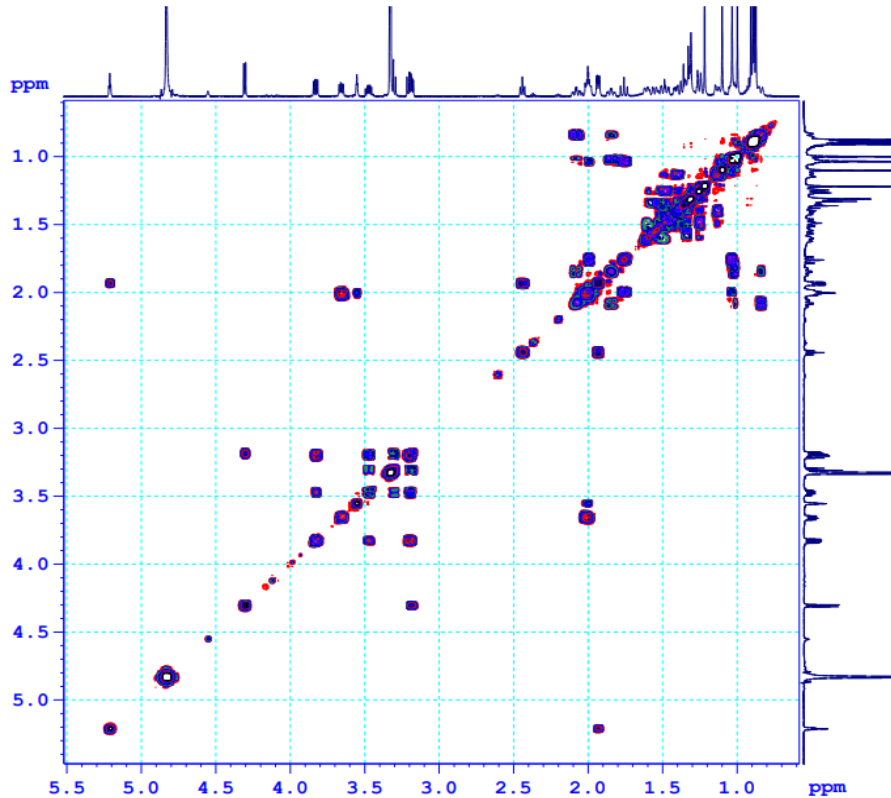


Hình 4.30. Phổ HSQC của hợp chất **MS3**



Hình 4.31. Phổ HMBC của hợp chất **MS3**

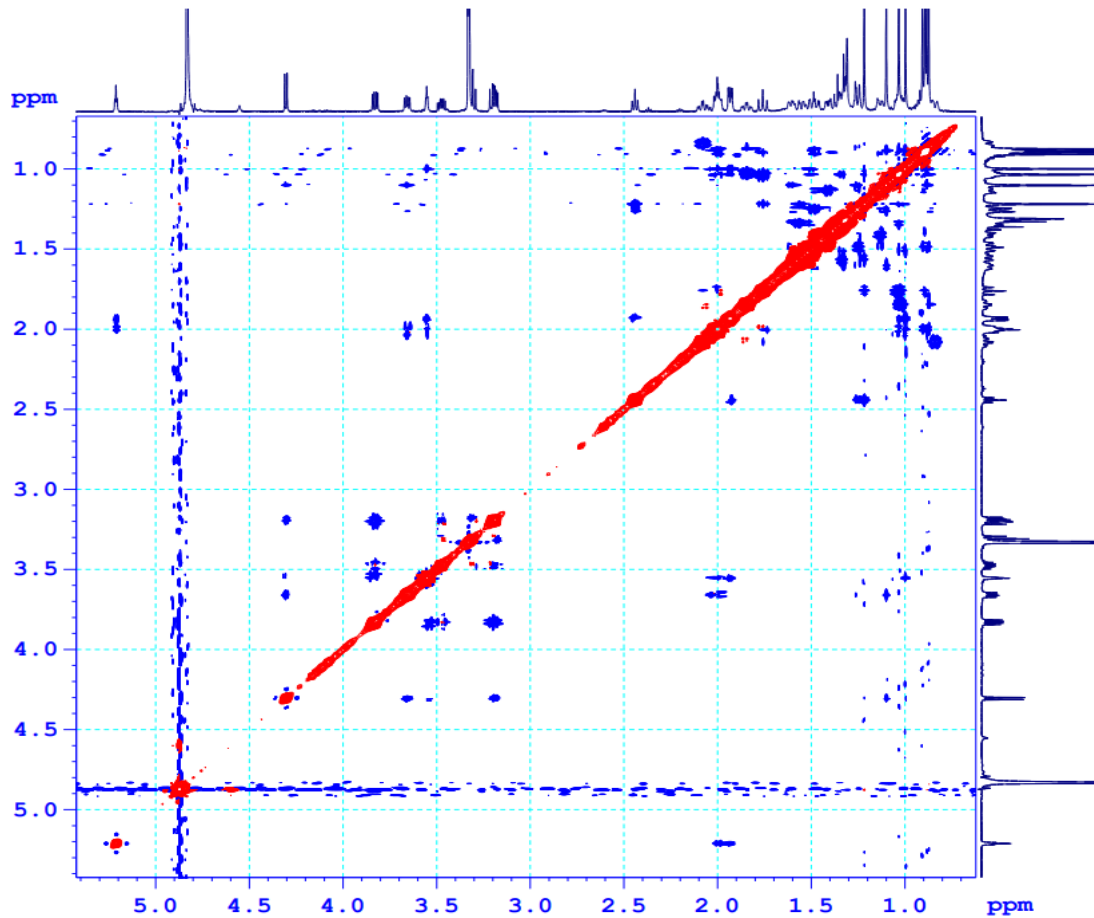
Trên phổ COSY của **MS3** cũng quan sát thấy sự hiện diện của bảy hệ tương tác spin – spin của các proton cạnh nhau được đánh dấu bằng các đường đậm trong hình 4.34 (H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/CH₂-5', H-1/CH₂-2/H-3, H-5/CH₂-6/CH₂-7, H-9/CH₂-11/H-12, CH₂-15/CH₂-16, H-18/CH₂-19 và CH₂-21/CH₂-22) tương tự như **MS2**. Từ các dữ liệu phổ NMR thu được của **MS3** và các phân tích trên gợi ý hợp chất **MS3** là một triterpenoid có khung oleanane, là đồng phân của **MS2**.



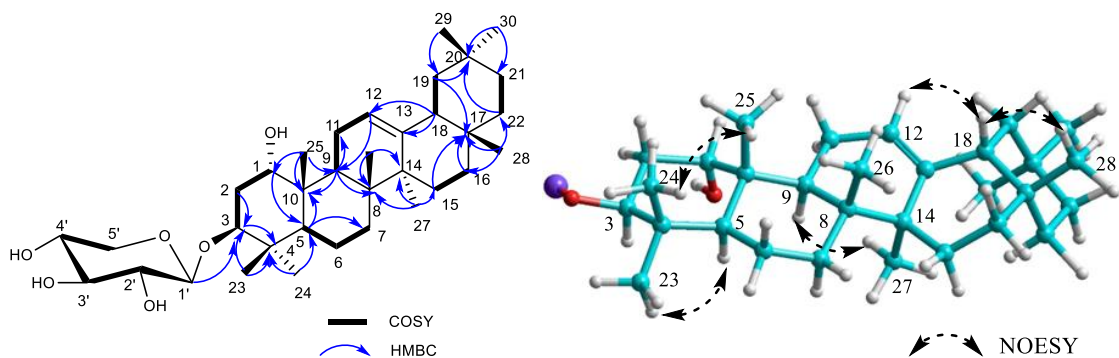
Hình 4.32. Phổ COSY của hợp chất **MS3**

Vị trí của gốc đường được xác định liên kết với phần aglycon tại C-3 dựa trên tương tác HMBC của H-1' (δ_{H} 4,31, $J = 7,8$ Hz) với C-3 (δ_{C} 85,6) (Hình 4.34). Bên cạnh đó trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa Me-23 (δ_{H} 1,10) và Me-24 (δ_{H} 0,88) với C-3 (δ_{C} 85,6), C-4 (δ_{C} 40,2) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này liên kết với C-4. Tương tác HMBC giữa Me-25 (δ_{H} 0,99) với C-1 (δ_{C} 73,1), C-10 (δ_{C} 41,7), và C-9 (δ_{C} 39,2); giữa Me-26 (δ_{H} 1,03) với C-7 (δ_{C} 33,4), C-8 (δ_{C} 40,8), C-9 (δ_{C} 39,2), C-10 (δ_{C} 41,7), và C-14 (δ_{C} 43,4); giữa Me-27 (δ_{H} 1,22) với C-8 (δ_{C} 40,8), C-14 (δ_{C} 43,4) và C-15 (δ_{C} 27,4); giữa Me-28 (δ_{H} 0,87) với C-16 (δ_{C} 28,1), C-17 (δ_{C} 33,6), C-18 (δ_{C} 48,6) và C-22 (δ_{C} 38,3) cũng được quan sát thấy cho phép xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đánh lần lượt tại C-10, C-8, C-14 và C-17 của khung oleanane (Hình 4.34). Tương tác giữa Me-29 (δ_{H} 0,91) và Me-30 (δ_{H} 0,89) với C-19 (δ_{C} 48,2), C-20 (δ_{C} 31,9) và sự tương tác lẫn nhau của chúng cho phép xác định vị trí của hai nhóm methyl này liên kết với C-20. Ngoài ra, trên phổ HMBC còn quan sát được

tương tác giữa H-11 (δ_H 1,93), H-12 (δ_H 5,21), Me-25 (δ_H 0,99), Me-26 (δ_H 1,03) với C-9 (δ_C 39,2), và H-11 (δ_H 1,93)/Me-27 (δ_H 1,22) với C-8 (δ_C 40,8), C-13 (δ_C 146,2) cho thấy cấu trúc khung olean-12-ene của **MS3**.



Hình 4.33. Phổ NOESY của hợp chất **MS3**



Hình 4.34. Các tương tác chính HMBC, COSY và NOESY của hợp chất **MS3**

Cấu hình α của proton ở vị trí C-3 và C-5 được xác định bằng tương tác trên phổ NOESY của H-3 (δ_H 3,66) và H-5 (δ_H 1,26)/Me-23 (δ_H 1,10). Bên cạnh đó phổ NOESY xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H-1 (δ_H 3,0) và H-11 (δ_H 1,93)/Me-25 (δ_H 0,99), giữa Me-24 (δ_H 0,88) và Me-25 (δ_H 0,99), từ đó kết luận cấu hình β cho H-1. Thêm nữa, sự phân tách của H-1 (t, $J = 2,4$ Hz) và H-3 (dd, $J = 5,4; 10,8$ Hz) càng khẳng định rõ nhóm hydroxy ở C-1 và nhóm *O*-glycoside ở C-3 có cấu hình tương

ứng là α và β . Phân tích các tương tác trên phổ NOESY của **MS3** cho thấy tương tác giữa H $_{\alpha}$ -3 và H-1' gợi ý cấu hình α của proton tại vị trí C-1'. Ngoài ra, sự tương tác giữa Me-27 (δ_H 1,22)/H-9 (δ_H 2,44) và H-18 (δ_H 2,00)/Me-28 (δ_H 0,87) và H-12 (δ_H 5,21) cho thấy proton ở C-9 và C-18 lần lượt có cấu hình α và β . Từ những thông tin trên cho thấy cấu trúc hợp chất **MS3** tương tự như **MS2**, chỉ khác đơn vị đường trong **MS3** là xylose.

Bảng 4.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS3** và hợp chất tham khảo

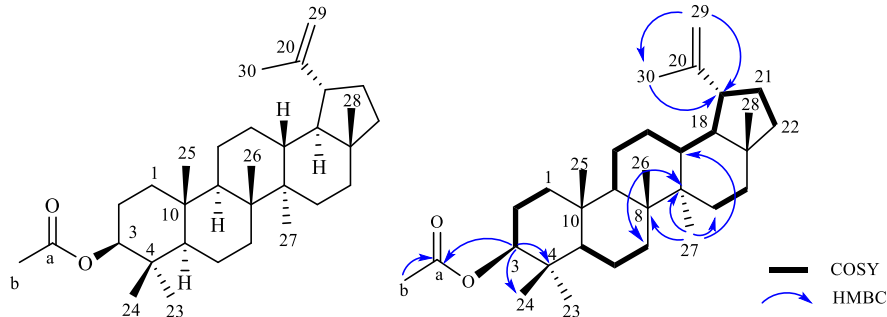
C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	73,1	73,1	3,55 (t, 2,4)	19	48,2	48,2	1,03 (m) 1,76 (t, 13,2)
2	34,3	34,3	2,00 (m)	20	31,9	31,9	-
3	85,6	85,6	3,66 (dd, 5,4; 10,8)	21	35,8	35,8	1,14 (m), 1,41 (m)
4	40,2	40,2	-	22	38,3	38,3	1,26 (m), 1,47 (m)
5	49,4	49,4	1,26 (m)	23	28,5	28,4	1,10 (s)
6	19,2	19,2	1,51 (m) 1,60 (m)	24	16,8	16,8	0,88 (s)
7	33,4	33,4	1,33 (m) 1,56 (m)	25	16,9	16,9	0,99 (s)
8	40,8	40,8	-	26	17,6	17,6	1,03 (s)
9	39,2	39,2	2,44 (t, 9,0)	27	26,6	26,6	1,22 (s)
10	41,7	41,7	-	28	28,9	28,9	0,87 (s)
11	24,1	24,1	1,93 (dd, 3,6; 9,0)	29	24,1	24,1	0,91 (s)
12	123,4	123,4	5,21 (t, 3,6)	30	33,8	33,8	0,89 (s)
13	146,1	146,2	-		Ara	Xyl	
14	43,3	43,4	-	1'	107,2	107,6	4,31 (d, 7,8)
15	27,4	27,4	1,03 (m) 1,84 (m)	2'	72,9	75,5	3,18 (m)
16	28,1	28,1	0,84 (m) 2,08 (m)	3'	74,3	78,1	3,31 (t, 9,0)
17	33,6	33,6	-	4'	69,5	71,3	3,47 (m)
18	48,6	48,6	2,00 (m)	5'	66,3	66,7	3,83 (dd, 5,4; 12,0) 3,20 (dd, 5,4; 12,0)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, # δ_C của **MS2** đo trong CD₃OD

Tiến hành thủy phân hợp chất **MS3** trong môi trường acid HCl để thu được đường đơn. Nhóm đường trong **MS3** được xác định là D-xylose với góc quay cực riêng $[\alpha]^{24}_D = +18,8$ (c 0,15, H₂O) và $R_f = 0,66$ phù hợp với giá trị góc quay cực riêng của đường D-xylose đã công bố trước đó và so sánh hệ số R_f trên bản mỏng TLC của đường D-xylose chuẩn [129]. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của **MS3** với hợp chất

MS2 cho thấy sự tương đồng ở hầu hết các vị trí ngoại trừ đường đơn liên kết với oxy tại vị trí C-3 trong hợp chất **MS3** khác với đường trong **MS2**. Từ tất cả những phân tích dữ liệu phổ trên cho phép xác định được hợp chất **MS3** là 3-*O*- β -D-xylopyranosyl castanopsol, đây là hợp chất mới và được đặt tên riêng là myrsineoside C.

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



Hình 4.35. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **MS4**

Hợp chất **MS4** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ^1H NMR của hợp chất xuất hiện tín hiệu của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,79 (3H, s, H-28), 0,84 (3H, s, H-23), 0,85 (3H, s, H-25), 0,86 (3H, s, H-24), 0,94 (3H, s, H-27), 1,03 (3H, s, H-26), 1,68 (3H, s, H-30), 2,04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), cùng tín hiệu của một nhóm methylene sp^2 tại δ_{H} 4,68 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, $\text{H}_a\text{-29}$) và δ_{H} 4,57 (1H, $J = 2,4$ Hz, $\text{H}_b\text{-29}$) đặc trưng cho liên kết đôi ngoại vòng. Bên cạnh đó còn xuất hiện tín hiệu của một proton oxymethine tại δ_{H} 4,49 (1H, m, H-3).

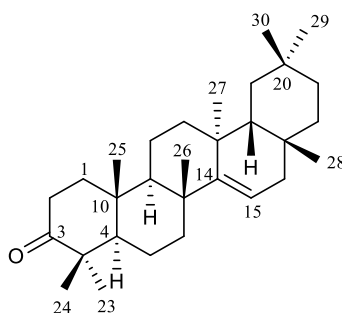
Phổ ^{13}C NMR và phổ DEPT của hợp chất **MS4** cho thấy tín hiệu của 32 nguyên tử carbon (gồm tám nhóm methyl trong đó có một nhóm methyl liên kết với nhóm carboxyl (δ_{C} 171,0), mười nhóm methylene, bảy nhóm methine và sáu carbon không liên kết hydro) đặc trưng cho một hợp chất triterpenoid có khung lupane. Độ chuyển dịch hóa học của C-3 (δ_{C} 81,0) gợi ý sự liên kết của carbon C-3 với nguyên tử oxy. Với những phân tích này gợi ý **MS4** là một hợp chất triterpenoid khung lupane. Trên phổ COSY của **MS4** xuất hiện bốn hệ tương tác spin-spin của các proton liền kề bao gồm: H-1/H-2/H-3, H-5/H-6/H-7, H-9/H-11/H-12/H-13/H-18/H-19/H-21/H-22, H-15/H-16 được biểu diễn trên hình 4.35. Trên phổ HMBC của **MS4**, tương tác giữa Me-23 (δ_{H} 0,84) và Me-24 (δ_{H} 0,86) với C-4 (δ_{C} 37,8), C-5 (δ_{C} 55,4) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này gắn vào C-4. Tương tác HMBC giữa Me-25 (δ_{H} 0,85) với C-5 (δ_{C} 55,4), C-10 (δ_{C} 37,1) và C-9 (δ_{C} 50,4); giữa Me-26 (δ_{H} 1,03) với C-7 (δ_{C} 34,3) và C-8 (δ_{C} 40,9); giữa Me-27 (δ_{H} 0,94) với C-8 (δ_{C} 40,9), C-13 (δ_{C} 38,1) và C-15 (δ_{C} 38,4); giữa Me-28 (δ_{H} 0,79) với C-16 (δ_{C} 27,5), C-17 (δ_{C} 43,0) và C-18 (δ_{C} 48,3) cho phép ta xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đánh trực tiếp lần lượt tại C-10, C-8, C-

14 và C-17 của khung lupane. Tương tác giữa H-29 (δ_{H} 4,68; 4,57) và Me-30 (δ_{H} 1,68) với C-19 (δ_{C} 48,0), C-20 (δ_{C} 150,9) và sự tương tác lẫn nhau của chúng cho phép xác định vị trí của nhóm methyl và nhóm methylene sp^2 được gắn tại C-20. Từ tất cả phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [130] thì cấu trúc của hợp chất **MS4** được xác định là lupeol acetate, hợp chất này đã được công bố trước đây từ loài *C. bonducella*.

Bảng 4.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS4** và chất tham khảo

C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J =$ Hz)	C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J =$ Hz)
1	38,4	40,0	1,19 (m) 1,36 (m)	17	43,1	43,0	
2	23,7	23,7	1,66 (m)	18	48,1	48,0	
3	81,0	81,0	4,49 (m)	19	48,3	48,3	2,38 (m)
4	37,8	37,8		20	152,1	150,9	
5	55,4	55,4		21	30,1	29,9	1,92 (m) 1,35 (m)
6	18,2	18,2	1,39 (m) 1,41 (m)	22	40,0	38,4	0,99 (m) 1,62 (m)
7	34,3	34,3	1,39 (m)	23	28,0	27,9	0,84 (s)
8	40,9	40,9		24	16,5	16,5	0,86 (s)
9	50,5	50,4	1,29 (m)	25	16,2	16,2	0,85 (s)
10	37,1	37,1		26	16,0	16,0	1,03 (s)
11	21,0	20,9	1,21 (m) 1,40 (m)	27	14,5	14,5	0,94 (s)
12	25,1	25,1		28	18,1	18,2	0,79 (s)
13	38,1	38,1		29	109,5	109,4	4,68 (d, 2,4) 4,57 (d, 2,4)
14	42,9	42,9		30	19,3	19,3	1,68 (s)
15	27,5	27,5	1,67 (m) 1,06 (m)	a (C=O)	170,8	171,0	
16	35,7	35,6	1,46 (m) 1,35 (m)	b (CH ₃ - CO-)	21,3	21,3	2,04 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, #chất lupeol acetate đo trong CDCl₃ [130].

4.1.1.5. Hợp chất **MS5**: TaraxeroneHình 4.36. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS5**

Hợp chất **MS5** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ^1H NMR của **MS5** xuất hiện các tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,83 (3H, s, H-28), 0,91 (3H, s, H-29), 0,92 (3H, s, H-27), 0,96 (3H, s, H-30), 1,07 (3H, s, H-24), 1,08 (3H, s, H-23), 1,09 (3H, s, H-25), 1,14 (3H, s, H-26), cùng tín hiệu của một proton olefin tại δ_{H} 5,57 (1H, dd, $J = 3,0; 8,4$ Hz, H-15), và các tín hiệu proton khác ở vùng aliphatic.

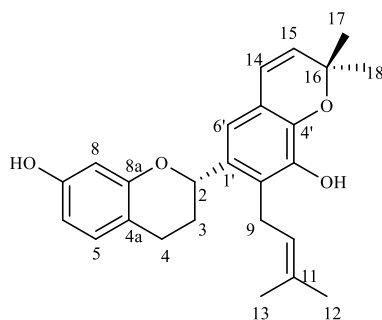
Bảng 4.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS5** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	38,3	38,4	1,89 (m) 1,61 (m)	16	36,6	36,7	2,09 (m) 1,85 (m)
2	34,1	34,1	2,57 (m) 2,35 (m)	17	37,5	37,6	-
3	217,5	217,5	-	18	48,8	48,8	-
4	47,6	47,6	-	19	40,6	40,6	-
5	55,7	55,8	1,91 (dd, 3,0; 15,0)	20	28,7	28,8	-
6	19,9	19,9	1,69 (m) 1,59 (m)	21	33,5	33,6	-
7	35,1	35,1	1,67 (m) 1,58 (m)	22	33,1	33,1	-
8	38,8	38,9	-	23	26,1	26,1	1,08 (s)
9	48,7	48,7	1,68 (m)	24	21,3	21,5	1,07 (s)
10	35,7	35,8	-	25	14,8	14,8	1,09 (s)
11	17,4	17,4	1,66 (m) 1,57 (m)	26	29,8	29,9	1,14 (s)
12	37,6	37,7	1,66 (m) 1,56 (m)	27	25,5	25,6	0,92 (s)
13	37,7	37,8	-	28	29,9	29,8	0,83 (s)
14	157,6	157,6	-	29	33,3	33,4	0,91 (s)
15	117,1	117,2	5,57 (dd, 3,0; 8,4)	30	21,4	21,4	0,96 (s)

^a125 MHz, ^b150MHz, ^c600 MHz, # δ_{C} của hợp chất taraxerone đo trong CDCl_3 [131]

Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **MS5** thu được tín hiệu của 30 nguyên tử carbon phù hợp với một triterpenoid gồm tám nhóm methyl, mười nhóm methylene, bốn nhóm methine (trong đó có một nhóm methine sp^2) và tám carbon không liên kết trực tiếp với hydro (trong đó có một nhóm carbonyl tại $\delta_{\text{C}} 217,5$ (C-3) và một carbon bậc bốn sp^2 tại $\delta_{\text{C}} 157,6$). Phân tích phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất **MS5**, kết hợp với việc so sánh các dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất taraxerone [131] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **MS5** là taraxerone.

4.1.1.6. Hợp chất **MS6**: Kazinol B



Hình 4.37. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS6**

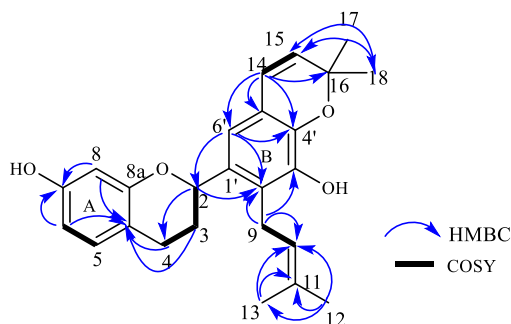
Hợp chất **MS6** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu vàng, góc quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -18$ (c 0,21 CHCl_3). Phổ ^1H NMR của hợp chất **MS6** cho thấy sự xuất hiện các tín hiệu proton của một vòng thơm hệ tương tác spin – spin ABX tại $\delta_{\text{H}} 6,38$ (1H, br. d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 6,39 (1H, s, H-8), 6,95 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), một proton vòng thơm singlet tại $\delta_{\text{H}} 6,73$ (1H, s, H-6')], hai nhóm methine sp^2 tại $\delta_{\text{H}} 6,31$ (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-14), 5,58 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-15), một nhóm oxymethine sp^3 tại $\delta_{\text{H}} 5,09$ (1H, dd, $J = 1,8; 9,6$ Hz, H-2), một nhóm prenyl có chứa liên kết đôi dạng ($-\text{CH}=\text{C}<$) tại $[\delta_{\text{H}} 5,14$ (1H, t, $J = 7,2$ Hz, H-10), 3,43 (2H, m), 1,72 (3H, s, H-12), 1,68 (3H, s, H-13)], hai nhóm methyl singlet tại $\delta_{\text{H}} 1,44$ (3H, s), 1,47 (3H, s) và các tương tác proton còn lại ở vùng aliphatic $\delta_{\text{H}} 2,02 - 2,74$. Phân tích phổ 1D-NMR của hợp chất **MS6** kết hợp với phổ HSQC cho thấy hợp chất **MS6** có 25 carbon, bao gồm: bốn nhóm methyl tại $\delta_{\text{C}} 17,9$ (C-13), 25,7 (C-12), 28,1 (C-17), 28,3 (C-18); ba nhóm methylene sp^3 tại $\delta_{\text{C}} 24,8$ (C-3), 29,8 (C-4), 25,3 (C-9); một nhóm methine sp^3 tại $\delta_{\text{C}} 74,7$ (C-2); bảy nhóm methine sp^2 tại $\delta_{\text{C}} 130,2$ (C-5), 107,8 (C-6), 103,6 (C-8), 122,2 (C-10), 114,9 (C-14), 129,9 (C-15), 122,8 (C-6'); và 10 carbon không liên kết với hydro tại $\delta_{\text{C}} 114,3$ (C-4a), 154,7 (C-7), 156,4 (C-8a), 132,1 (C-11), 77,4 (C-16), 131,6 (C-1'), 125,7 (C-2'), 142,1 (C-3'), 138,6 (C-4'), 118,9 (C-5'), 122,8 (C-6'). Độ chuyển dịch hóa học của C-2, C-7, C-3', C-4' chứng tỏ các carbon này được liên kết với nguyên tử oxy. Từ các phân tích trên cho thấy **MS6** là một hợp chất flavan.

Bảng 4.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS6** và hợp chất tham khảo

C	# δ_C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	75,1	74,7	5,09 (dd, 1,8; 9,6)
3	25,1	24,8	2,02 (m) 2,12 (m)
4	30,2	29,8	2,89 (m) 2,74 (m)
4a	114,7	114,3	-
5	130,3	130,2	6,95 (d, 8,4)
6	108,2	107,8	6,38 (br. d, 8,4)
7	155,2	154,7	-
8	104,0	103,6	6,39 (s)
8a	156,8	156,4	-
9	25,7	25,3	3,43 (m)
10	123,2	122,2	5,14 (t, 7,2)
11	132,5	132,1	-
12	26,1	25,7	1,72 (s)
13	18,3	17,9	1,68 (s)
14	115,4	114,9	6,31 (d, 9,6)
15	130,6	129,9	5,58 (d, 9,6)
16	77,4	77,4	-
17	28,5	28,1	1,44 (s)
18	28,7	28,3	1,47 (s)
1'	132,0	131,6	-
2'	126,1	125,7	-
3'	142,6	142,2	-
4'	139,0	138,6	-
5'	119,3	118,9	-
6'	122,6	122,8	6,73 (s)

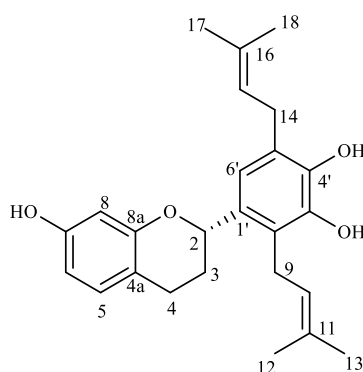
^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, # δ_C của kazinol B đo trong CDCl₃ [132]

Trên phổ COSY của **MS6** thể hiện sự có mặt của bốn hệ tương tác spin-spin, bao gồm: H-2/H-3/H-4, H-5/H-6, H-9/H-10, H-14/H-15. Trên phổ HMBC của hợp chất **MS6**, vị trí của nhóm isoprenyl được gắn ở C-2' trên cơ sở có tương tác HMBC giữa H-9 (δ_H 3,44) và H-10 (δ_H 5,14) với C-2' (δ_C 125,7). Trên phổ HMBC cũng cho thấy tương tác của Me-17 (δ_H 1,44) và Me-18 (δ_H 1,47) với C-15 (δ_C 129,9), C-16 (δ_C 77,4) chứng tỏ Me-17 và Me-18 gắn trực tiếp với C-16. Vị trí của các carbon C-5, C-6, C-8 được khẳng định thông qua các tương tác HMBC từ H-5 tới C-4/C-4a/C-7, H-6 tới C-4a/C-7, H-8 tới C-6/C-7/C-8a. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **MS6** thu được với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất kazinol B [132] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **MS6** là kazinol B.



Hình 4.38. Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất **MS6**

4.1.1.7. Hợp chất **MS7**: Kazinol A



Hình 4.39. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS7**

Hợp chất **MS7** thu được dưới dạng chất bột màu vàng, góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{25} -10,7$ (CHCl_3 , c 0,13). Tương tự như hợp chất **MS6**, trên phổ $^1\text{H NMR}$ của **MS7** cũng cho thấy sự xuất hiện các tín hiệu proton của vòng thơm hệ tương tác spin – spin ABX tại δ_{H} 6,38 (1H, dd, $J = 2,4; 8,4$ Hz, H-6), 6,39 (1H, dd, $J = 2,4$ Hz, H-8), 6,94 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), một proton vòng thơm singlet tại δ_{H} 6,82 (1H, s, H-6'), một nhóm oxymethine sp^3 tại δ_{H} 5,09 (1H, dd, $J = 1,8; 10,8$ Hz, H-2), hai nhóm prenyl có chứa liên kết đôi dạng ($-\text{CH}=\text{C}<$) tại [δ_{H} 5,18 (1H, t, $J = 7,2$ Hz, H-10) và δ_{H} 5,34 (1H, t, $J = 7,2$ Hz, H-15)] và các tương tác proton còn lại ở vùng aliphatic δ_{H} 2,06 – 2,89.

Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất **MS7** cho thấy hợp chất **MS7** có 25 carbon, bao gồm: bốn nhóm methyl tại δ_{C} 25,8 (C-12), 17,9 (C-13), 17,9 (C-17), 25,7 (C-18); bốn nhóm methylene sp^3 tại δ_{C} 25,1 (C-3), 29,7 (C-4), 25,2 (C-9), 29,4 (C-14); một nhóm methine sp^3 tại δ_{C} 75,3 (C-2); sáu nhóm methine sp^2 tại δ_{C} 130,2 (C-5), 107,8 (C-6), 103,6 (C-8), 122,5 (C-10), 122,1 (C-15), 119,0 (C-6') và chín carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 114,3 (C-4a), 154,8 (C-7), 156,3 (C-8a), 131,2 (C-1'), 125,0 (C-2'), 142,4 (C-3'), 141,9 (C-4'), 123,4 (C-5'), 133,5 (C-11), 134,5 (C-16). Độ chuyển dịch hóa học của C-2, C-7, C-3', C-4' chứng tỏ các carbon này được liên kết với nguyên tử oxy. Từ các phân tích trên cho thấy **MS7** cũng là một flavan tương tự như **MS6**. So sánh các dữ liệu phổ của

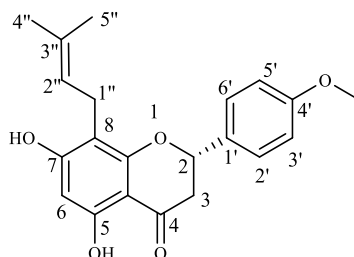
hợp chất **MS7** thu được với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất kazinol A [133] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **MS7** là kazinol A.

Bảng 4.7. Số liệu phổ NMR hợp chất **MS7** và hợp chất tham khảo

C	$^*\delta_C^c$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	75,6	75,3	5,09 (dd, 1,8; 10,8)
3	25,3	25,1	2,12 (m), 2,06 (m)
4	29,9	29,7	2,89 (m), 2,76 (m)
4a	114,5	114,3	-
5	130,4	130,2	6,94 (d, 8,4)
6	108,1	107,8	6,38 (dd, 2,4; 8,4)
7	155,0	154,8	
8	103,9	103,6	6,39 (d, 2,4)
8a	156,6	156,3	-
9	25,5	25,2	3,43 (d, 6,6)
10	122,7	122,5	5,18 (t, 6,6)
11	133,8	133,5	-
12	26,0	25,8	1,77 (s)
13	18,1	17,9	1,77 (s)
14	29,6	29,4	3,35 (d, 7,2)
15	122,3	122,1	5,34 (t, 7,2)
16	134,8	134,5	-
17	18,2	17,9	1,71 (s)
18	25,9	25,7	1,76 (s)
1'	131,4	131,2	-
2'	125,2	124,4	-
3'	142,6	142,4	-
4'	142,2	141,2	-
5'	123,7	123,4	-
6'	119,2	119,0	6,82 (s)
3', 4'-OH	-	-	5,50 (s)
7-OH	-	-	4,83 (s)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, ^{*} δ_C của kazinol A đo trong CDCl₃ [133]

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



Hình 4.40. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS8**

Hợp chất **MS8** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu vàng, góc quay cực $[\alpha]_D^{25} -30$, (c 1,05, CHCl₃). Phổ ¹H NMR xuất hiện tín hiệu proton của một vòng thơm hệ tương tác spin-spin A₂B₂ tại δ_H 7,38 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2' và H-6'), 6,96 (2H, d, $J = 8,4$

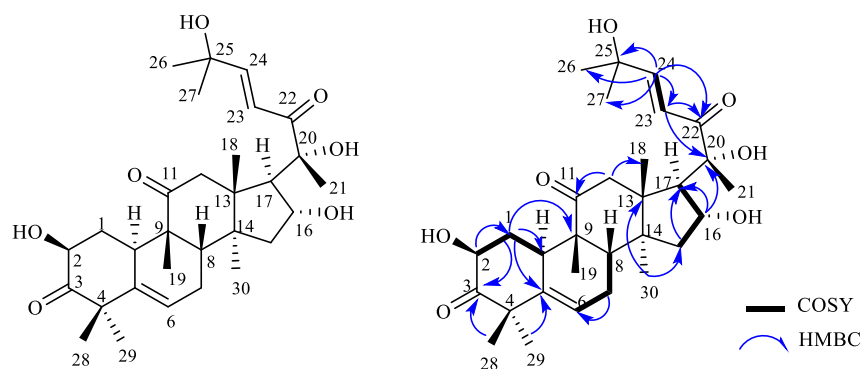
Hz, H-3' và H-5'), một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,84 (3H, s, 4'-OMe), một nhóm isoprenyl tại δ_{H} 3,32 (2H, d, $J=7,2$ Hz, H-2''). Từ các phân tích trên gọi ý **MS8** là một flavanone. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **MS8** thu được với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất 4'-*O*-methyl-8-prenylaringenin [134] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **MS8** là 4'-*O*-methyl-8-prenylaringenin.

Bảng 4.8. Số liệu phổ NMR hợp chất **MS8** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	78,7	78,8	5,38 (dd, 13,2; 3,0)
3	43,0	43,2	3,09 (dd, 17,4; 13,2) 2,82 (dd, 17,4; 3,0)
4	196,5	196,4	-
4a	103,1	103,3	-
5	162,1	163,7	-
6	96,7	96,9	6,02 (s)
7	163,7	162,3	-
8	106,4	106,2	-
8a	159,8	159,9	-
1'	130,6	130,8	-
2'/6'	127,5	127,5	7,38 (d, 8,4)
3'/5'	114,1	114,2	6,96 (d, 8,4)
4'	159,8	159,8	-
1''	21,7	21,8	3,32 (d, 7,2)
2''	121,6	121,6	5,21 (t, 7,2)
3''	134,6	134,9	-
4'-OMe	55,3	55,4	3,84 (s)
CH ₃ -4''	25,6	25,8	1,73 (s)
CH ₃ -5''	17,8	17,8	1,73 (s)
5-OH	-	-	11,99 (s)
7-OH	-	-	6,16 (s)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, ^d60 MHz, * δ_{C} của 4'-*O*-methyl-8-prenylaringenin đo trong CDCl₃ [134]

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



Hình 4.41. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất **MS9**

Bảng 4.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS9** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	36,0	37,1	1,22 (m) 2,11 (m)	16	71,5	71,7	4,52 (m)
2	71,6	72,8	4,58 (dd, 6,0; 13,2)	17	57,3	59,5	2,65 (d, 7,8)
3	213,0	213,9	-	18	20,0	20,7	0,93 (s)
4	50,2	51,8	-	19	20,1	20,2	1,07 (s)
5	140,4	142,0	-	20	78,1	79,9	-
6	120,2	121,3	5,84 (dd, 2,4; 3,6)	21	23,9	25,4	1,43 (s)
7	23,8	24,8	2,06 (m) 2,43 (m)	22	202,5	204,9	
8	42,3	44,1	2,00 (d, 7,8)	23	118,9	121,3	6,87 (d, 15,6)
9	48,3	49,9		24	155,9	155,4	7,01 (d, 15,6)
10	33,7	34,8	3,02 (d, 13,2)	25	71,1	71,5	-
11	212,2	215,6	-	26	29,5	29,8	1,35 (s)
12	48,6	49,8	2,64 (d, 14,4) 3,45 (d, 14,4)	27	29,3	29,2	1,34 (s)
13	50,8	51,8	-	28	21,2	21,9	1,31 (s)
14	48,3	50,4	-	29	28,8	29,2	1,32 (s)
15	45,5	46,6	1,45 (m) 1,88 (dd, 9,0; 13,2)	30	19,2	19,5	1,42 (s)

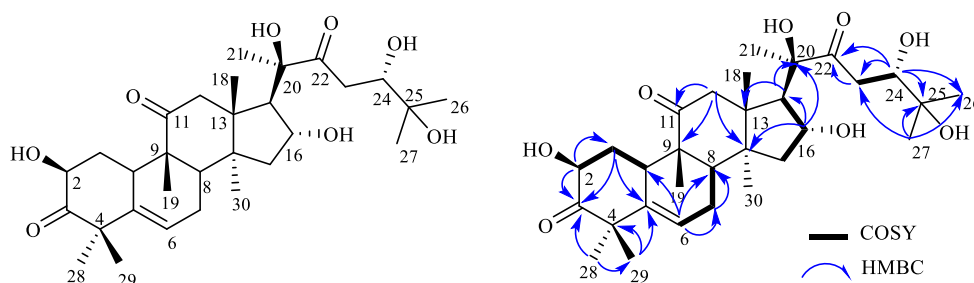
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^dCDCl₃, # δ_C của cucurbitacine D đo trong CDCl₃ [135]

Hợp chất **MS9** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Trên phổ ¹H NMR của hợp chất xuất hiện các tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_H 0,93 (3H, s, H-18), 1,07 (3H, s, H-19), 1,31 (3H, s, H-28), 1,32 (3H, s, H-29), 1,34 (3H, s, H-27), 1,35 (3H, s, H-26), 1,42 (3H, s, H-30), 1,43 (3H, s, H-21), và hai proton carbinol tại δ_H 4,52 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-16) và δ_H 4,58 (1H, dd, $J = 6,0; 13,2$ Hz, H-2). Ngoài ra, phổ ¹H NMR còn có một tín hiệu doublet doublet của proton olefin tại δ_H 5,84 (1H, dd, $J = 2,4; 3,6$ Hz, H-6) và hai proton tương tác *trans* tại δ_H 6,87 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-23) và δ_H 7,01 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-24). Bên cạnh đó còn quan sát thấy các proton aliphatic tại δ_H 1,22 – 3,45.

Phổ ¹³C NMR kết hợp phổ DEPT của hợp chất **MS9** cho thấy tín hiệu của 30 nguyên tử carbon bao gồm bảy nhóm methyl δ_C 20,2 (C-19), 25,4 (C-21), 29,8 (C-26), 29,2 (C-27), 21,9 (C-28), 29,2 (C-29), 19,5 (C-30), bốn nhóm methylene *sp*³ tại δ_C 37,1 (C-1), 24,8 (C-7), 49,8 (C-12), 46,6 (C-15), bốn carbon carbinol tại δ_C 72,8 (C-2), 71,7 (C-16), 79,9 (C-20) và 71,5 (C-25); ba nhóm methine *sp*³ tại δ_C 44,1 (C-8), 34,8 (C-10), 59,5 (C-17); ba nhóm methine *sp*² tại δ_C 121,3 (C-6), 121,3 (C-23), 155,4 (C-24); sáu carbon không liên kết với hydro tại δ_C 51,8 (C-4), 142,0 (C-5), 49,9

(C-9), 51,8 (C-13), 50,4 (C-14), 71,5 (C-25) và ba nhóm carbonyl ở δ_C 204,9 (C-22), 215,6 (C-11) và 213,9 (C-3), cho thấy chất **MS9** là một triterpene thuộc nhóm cucurbitacin. Trên phổ COSY của **MS9** xuất hiện bốn hệ tương tác spin-spin của các proton liền kề bao gồm H-2/H-1/H-10, H-6/H-7/H-8, H-15/H-16/H-17, H-23/H-24 được biểu diễn trên hình 4.41. Trên phổ HMBC của **MS9** thấy có tương tác giữa proton nhóm methyl tại δ_H 1,31 (Me-28) và 1,32 (Me-29) với C-3 (δ_C 213,9), C-4 (δ_C 51,8), C-5 (δ_C 142,0) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này liên kết với C-4. Tương tác HMBC giữa Me-18 (δ_H 0,93) với C-12 (δ_C 49,8), C-13 (δ_C 51,8), C-17 (δ_C 59,5), ; giữa Me-19 (δ_H 1,07) với C-8 (δ_C 44,2), C-9 (δ_C 49,9), C-10 (δ_C 34,9), C-11 (δ_C 215,6); giữa Me-21 (δ_H 1,43) với C-17 (δ_C 59,5), C-20 (δ_C 79,9), C-22 (δ_C 204,9); giữa Me-30 (δ_H 0,79) với C-13 (δ_C 51,8), C-15 (δ_C 46,6) cho phép xác định vị trí của bốn nhóm methyl liên kết lần lượt với C-13, C-8, C-20 và C-14 của khung cucurbitane. Tương tác giữa Me-26 (δ_H 1,35) và Me-27 (δ_H 1,34) với C-25 (δ_C 71,5) và sự tương tác lẫn nhau của chúng cho phép xác định vị trí của hai nhóm methyl này liên kết với C-25. Tương tác của proton nhóm methyl (H-28) tại δ_H 1,31 và H-1 tại δ_H (1,22; 2,11) với C=O (δ_C 213,9) cho phép gắn kết nhóm carbonyl liên kết với C-2 và C-4. Tương tự tương tác của C-11 (δ_C 215,6) với H-19 (δ_H 1,07) và H-12 (δ_H 2,64; 3,45) cho phép gắn kết nhóm carbonyl với C-12 và C-9. Thêm nữa, các tương tác của H-23 (δ_H 6,87), H-24 (δ_H 7,01) với C-22 (δ_C 204,9); H-23 với C-20 (δ_C 79,9) chứng tỏ rằng nhóm carbonyl tại C-22 gắn kết với C-20 và C-23. Ngoài ra, H-23 và H-24 tương tác với C-25 (δ_C 71,5) đồng thời có sự tương tác giữa hai nhóm methine sp^2 tại vị trí 23, 24 với nhau cho thấy liên kết đôi C(23)=C(24) gắn kết với C-22 và C-25. Dựa trên các phân tích phổ NMR kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [135] xác định được cấu trúc của hợp chất **MS9** là cucurbitacin D.

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



Hình 4.42. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **MS10**

Hợp chất **MS10** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Các dữ liệu và thông tin phổ 1D, 2D-NMR của **MS10** đều cho thấy các tín hiệu và tương tác tương tự như **MS9** chỉ khác là liên kết đôi C(23)=C(24) trong **MS9** đã bị hidrate hóa trở thành

MS10. Trên phổ ^1H NMR của hợp chất quan sát được các tín hiệu proton tương tự với hợp chất **MS9** chỉ khác là không thấy xuất hiện hai proton olefin tại C-23 và C-24. Trên phổ ^{13}C NMR của **MS10** xuất hiện thêm một nhóm methylene sp^3 tại δ_{C} 40,9 (C-23) và một nhóm oxymethine tại δ_{C} 75,8 (C-24) thay vì hai nhóm methine sp^2 tại δ_{C} 121,3 (C-23), 155,4 (C-24) của **MS9**.

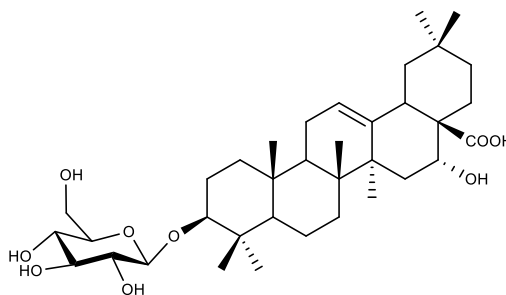
Bảng 4.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS10** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	35,6	37,1	1,23 (m) 2,11 (m)	16	71,5	71,7	4,54 (t, 7,2)
2	71,5	72,8	4,59 (dd, 6,0; 12,6)	17	55,8	58,4	2,65 (d, 7,8)
3	212,9	213,9	-	18	19,8	24,8	1,44 (s)
4	50,2	51,9	-	19	20,0	20,2	1,07 (s)
5	140,3	142,1	-	20	79,3	81,0	
6	120,2	121,2	5,84 (dd, 2,4; 3,6)	21	23,4	20,5	0,97 (s)
7	23,8	24,8	2,05 (m) 2,41 (m)	22	213,9	216,6	-
8	42,3	44,1	2,01 (d, 7,8)	23	39,3	40,9	3,02 (m) 2,80 (dd, 1,8; 16,8)
9	48,3	49,8	-	24	74,3	75,8	3,91 (dd, 1,8; 9,6)
10	33,6	34,9	3,01 (d, 9,6)	25	72,1	73,1	
11	212,2	215,6		26	24,5	24,4	1,18 (s)
12	48,5	49,9	2,65 (d, 15,0) 3,48 (d, 15,0)	27	25,6	26,5	1,23 (s)
13	50,7	51,8	-	28	21,2	21,9	1,31 (s)
14	48,3	49,3	-	29	29,3	29,8	1,32 (s)
15	45,2	46,5	1,45 (m) 1,88 (dd, 9,0; 13,2)	30	18,9	19,5	1,41 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^dCDCl₃, [#] δ_{C} của cucurbitacin H đo trong CDCl₃ [136]

Cấu trúc của mạch nhánh được xác định bởi phổ ^1H - ^1H COSY, qua tương tác giữa proton methylene δ_{H} 3,02 (1H, m, H_a-23), 2,80 (1H, dd, $J = 1,8; 16,8$ Hz, H_b-23) với proton carbinol ở δ_{H} 3,91 (1H, dd, $J = 1,8; 9,6$ Hz, H-24) và hai methyl singlet tại δ_{H} 1,18 và 1,23 (3H, s, Me-26 và Me-27). Phổ HMBC cũng cho thấy tương tác của H-23 với C-22 (δ_{C} 216,6), C-24 (δ_{C} 75,8); H-24 với C-22 (δ_{C} 216,6), C-23 (δ_{C} 40,9), C-25 (δ_{C} 73,1), C-26 (δ_{C} 24,4). Phân tích kỹ hơn phổ ^1H - ^1H COSY và HMBC, đã xác định được các chuỗi liên kết -C10-C1-C2; -C6-C7-C8, -C15-C16-C17 và -C23-C24-C25-C27 trong cấu trúc phân tử. Cùng với việc phân tích phổ và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **MS10** được xác định là cucurbitacin H [136].

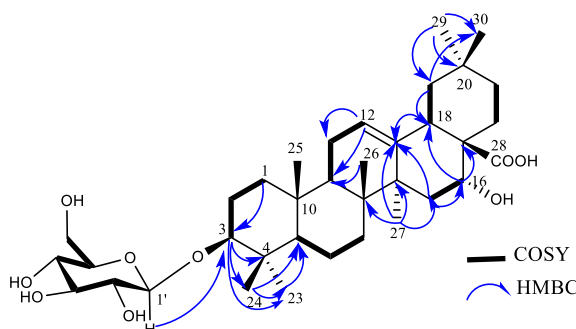
4.1.1.11. Hợp chất **MS11**: Eclalbasaponin II



Hình 4.43. Cấu trúc hóa học của hợp chất **MS11**

Hợp chất **MS11** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Trên phổ ^1H NMR của **MS11** cho thấy sự có mặt của bảy nhóm methyl singlet tại δ_{H} 0,79 (3H, s, H-26), 0,85 (3H, s, H-24), 0,88 (3H, s, H-29), 0,96 (3H, s, H-25), 0,97 (3H, s, H-30), 1,06 (3H, s, H-23), 1,37 (3H, s, H-27); hai nhóm oxymethine tại δ_{H} 3,18 (1H, m, H-3) và 4,46 (1H, br. s, H-16); một proton olefin tại δ_{H} 5,29 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-12) và một proton anomer của một gốc đường glucopyranosyl tại δ_{H} 4,32 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1').

Phổ ^{13}C NMR và DEPT của **MS11** cho các tín hiệu của 36 nguyên tử carbon trong số đó có 30 carbon của một triterpenoid dạng khung oleanane và sáu carbon của đường glucopyranosyl. Triterpenoid saponenin có bảy nhóm methyl lần lượt tại δ_{C} 16,1 (C-25), 17,0 (C-24), 17,8 (C-26), 24,9 (C-30), 27,3 (C-27), 28,6 (C-23) và 33,4 (C-29), chín nhóm methylene tại δ_{C} 39,9 (C-1), 27,1 (C-2), 19,3 (C-6), 34,3 (C-7), 24,5 (C-11), 36,2 (C-15), 47,7 (C-19), 36,6 (C-21), 32,7 (C-22), ba nhóm methine sp^3 tại δ_{C} 57,2 (C-5), 48,2 (C-9), 42,2 (C-18), một nhóm methine sp^2 tại δ_{C} 123,4 (C-12), hai nhóm oxymethine tại δ_{C} 90,8 (C-3) và 75,3 (C-16), bảy carbon không liên kết hydro tại δ_{C} 40,2 (C-4), 40,7 (C-8), 37,9 (C-10), 145,1 (C-13), 42,6 (C-14), 49,7 (C-17), 31,4 (C-20), và một nhóm carbonyl tại δ_{C} 181,3 (C-28).



Hình 4.44. Các tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của hợp chất **MS11**

Sáu carbon của đường glucopyranosyl xuất hiện tại δ_{C} 106,7 (C-1'), 75,7 (C-2'), 78,3 (C-3'), 71,7 (C-4'), 77,7 (C-5'), 62,8 (C-6'). Cấu hình β của nhóm D-glucopyranosyl được xác định dựa trên hằng số tương tác ($J_{1'2'} = 7,8$ Hz) của proton anomer. Sự phù hợp của các dữ kiện phổ NMR thuộc khung oleanane của **MS11** với các dữ kiện phổ

của eclalbasaponin II cho thấy **MS11** có một đơn vị đường glucopyranosyl duy nhất. Vị trí của gốc đường liên kết với C-3 được khẳng định dựa vào tương tác HMBC của H-1' (δ_H 4,32) với C-3 (δ_C 90,8). Cấu trúc phần aglycon và phần đường của **MS11** được khẳng định trên phổ COSY với bảy hệ tương tác spin – spin của các proton cạnh nhau bao gồm: H-1/H-2/H-3, H-5/H-6/H-7, H-9/H-11/H-12, H-15/H-16, H-18/H-19, H-21/H-22, H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'. Trên phổ HMBC có các tương tác giữa proton nhóm methyl tại δ_H 1,06 (Me-23) và 0,85 (Me-24) với C-3 (δ_C 90,8), C-4 (δ_C 40,2), C-5 (δ_C 57,2) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này liên kết với C-4.

Bảng 4.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất MS11 và hợp chất tham khảo

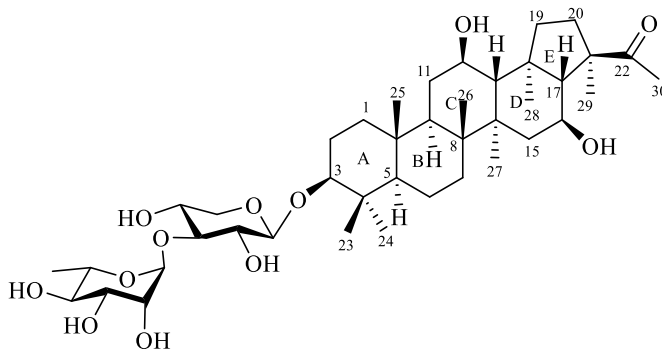
C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	39,9	39,9	1,65 (m) 1,02 (m)	19	47,7	47,7	1,03 (dd, 9,6; 13,8) 2,28 (t, 13,8)
2	27,1	27,1	1,92 (m) 1,69 (br. dd, 3,0; 12,0)	20	31,4	31,4	-
3	90,8	90,8	3,18 (m)	21	36,6	36,6	1,92 (m) 1,15 (m)
4	40,2	40,2	-	22	32,6	32,7	1,93 (m) 1,78 (m)
5	57,2	57,2	0,78 (m)	23	28,6	28,6	1,06 (s)
6	19,3	19,3	1,56 (m) 1,38 (m)	24	17,0	17,0	0,85 (s)
7	34,3	34,3	1,33 (m) 1,55 (m)	25	16,1	16,1	0,96 (s)
8	40,7	40,7	-	26	17,8	17,8	0,79 (s)
9	48,2	48,2	1,66 (m)	27	27,3	27,3	1,37 (s)
10	37,9	37,9	-	28	181,5	181,3	
11	24,5	24,5	1,89 (m)	29	33,4	33,4	0,88 (s)
12	123,5	123,4	5,29 (t, 9,0)	30	24,9	24,9	0,97 (s)
13	145,1	145,1	-	1'	106,7	106,7	4,32 (d, 7,8)
14	42,7	42,6	-	2'	75,7	75,7	3,19 (m)
15	36,3	36,2	1,34 (m) 1,88 (dd, 4,2; 15,0)	3'	78,3	78,3	3,33 (m)
16	75,3	75,3	4,46 (br s)	4'	71,7	71,7	3,29 (m)
17	49,8	49,7	-	5'	77,7	77,7	3,28 (m)
18	42,1	42,1	3,01 (dd, 4,2; 14,4)	6'	62,9	62,8	3,66 (dd, 5,4; 12,0) 3,85 (dd, 2,4; 12,0)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, [#] δ_C của eclalbasaponin II đo trong CD₃OD [137]

Các tương tác HMBC giữa H-25 (δ_H 0,96) với C-5 (δ_C 57,2), C-9 (δ_C 48,2), C-10 (δ_C 37,9); H-26 (δ_H 0,79) với C-7 (δ_C 34,3), C-9 (δ_C 48,2), C-14 (δ_C 42,6) và H-27 (δ_H 1,37) với C-8 (δ_C 40,7), C-13 (δ_C 145,1), C-14 (δ_C 42,6), C-15 (δ_C 36,2) gợi ý các

nhóm methyl này liên kết lần lượt với C-10, C-8 và C-14. Các proton của hai nhóm methyl còn lại Me-29 (δ_H 0,88), Me-30 (δ_H 0,97) cũng tương tác với C-20 (δ_C 31,4), C-21 (δ_C 36,6) trên phổ HMBC chứng tỏ chúng được gắn kết với C-20. Ngoài ra, sự tương tác của H-12 (δ_H 5,29), H-26 (δ_H 0,79) với C-11 (δ_C 24,5); H-15 (δ_H 1,34; 1,88), H-18 (δ_H 3,01) với C-13 (δ_C 145,1); H-16 (δ_H 4,46) với C-17 (δ_C 49,7) và C-18 (δ_C 42,1); H-19 (δ_H 1,03; 2,28) với C-18 (δ_C 42,1) cho thấy sự gắn kết của các vòng trong khung oleanane. Trên cơ sở các phân tích độ chuyển dịch hóa học và hằng số tương tác hóa lập thể của C-3 và C-16 phù hợp với cấu trúc của chất eclalbasaponin II. Từ tất cả các lập luận trên, cùng với việc so sánh phổ của **MS11** với chất tham khảo cho phép xác định **MS11** là eclalbasaponin II đã được phân lập lần đầu tiên từ cây *Eclipta alba* của Nhật Bản và có trong cây cỏ mực *Eclipta prostrata* L. trồng ở miền Nam Việt Nam [137].

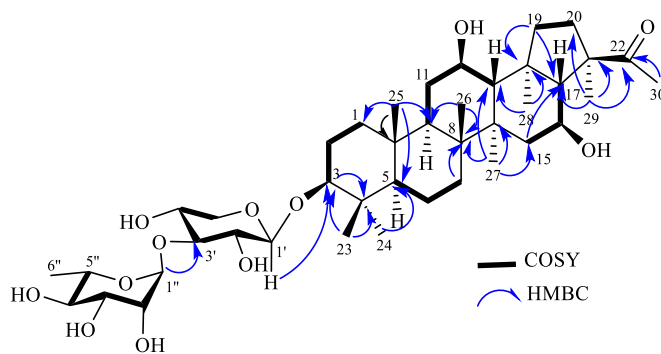
4.1.1.12. Hợp chất **MS12**: Spergulacin



Hình 4.45. Cấu trúc hợp chất **MS12**

Hợp chất **MS12** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ 1H NMR của **MS12** cho thấy sự có mặt của chín nhóm methyl singlet tại δ_H 1,06 (3H, s, H-23), 1,06 (3H, s, H-24), 0,86 (3H, s, H-25), 1,09 (3H, s, H-26), 1,04 (3H, s, H-27), 0,93 (3H, s, H-28), 1,41 (3H, s, H-29), 2,23 (3H, s, H-30), 1,26 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6"). Hợp chất này có tín hiệu của 41 carbon trên phổ ^{13}C NMR, trong đó 11 nguyên tử carbon có thể gán cho hai đơn vị đường gồm một đơn vị đường pentose và một đơn vị đường hexose; 30 carbon còn lại đặc trưng cho khung triterpenoid với sự xuất hiện của tám nhóm methyl tại δ_C 28,4 (C-23), 17,8 (C-24), 16,8 (C-25), 17,4 (C-26), 19,2 (C-27), 16,4 (C-28), 20,9 (C-29), 26,2 (C-30) cùng với tám nhóm methylene sp^3 tại 39,8 (C-1), 27,2 (C-2), 19,4 (C-6), 34,4 (C-7), 32,9 (C-11), 45,7 (C-15), 45,5 (C-19), 38,2 (C-20); bốn nhóm methine sp^3 tại δ_C 56,8 (C-5), 50,0 (C-9), 56,0 (C-13), 63,5 (C-17); ba nhóm oxymethine tại δ_C 90,0 (C-3), 69,9 (C-12), 66,7 (C-16); một nhóm carbonyl tại δ_C 218,6 (C-22) và sáu carbon không liên kết với hydro tại δ_C 40,3 (C-4), 46,5 (C-8), 37,8 (C-10), 42,6 (C-14), 47,7 (C-18), 54,5 (C-21). Cấu trúc của **MS12** được làm sáng tỏ nhờ sự phân tích các phổ NMR 2D. Khung triterpenoid của **MS12**

và các đơn vị đường được xác nhận qua tương tác ^1H - ^1H COSY với sự xuất hiện của bảy hệ tương tác spin-spin của các proton cạnh nhau gồm H-3/H-2/H-1, H-5/H-6/H-7, H-9/H-11/H-12/H-13, H-15/H-16/H-17, H-19/H-20, H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5', H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6''. Trên phổ HMBC thấy có sự tương tác của H-23 (δ_{H} 1,06), H-24 (δ_{H} 1,06) với C-3 (δ_{C} 90,6), C-4 (δ_{C} 40,3), C-5 (δ_{C} 56,8); H-3 (δ_{H} 3,15), H-5 (δ_{H} 0,79) với C-4 (δ_{C} 40,3), C-25 (δ_{C} 16,8); và H-25 (δ_{H} 0,86) với C-1 (δ_{C} 39,8), C-9 (δ_{C} 50,0), C-10 (δ_{C} 37,8) đã xác định được vị trí của các nguyên tử trong vòng A và vòng B. Các vòng này được mở rộng khi quan sát thấy các tương tác giữa C-9 với H-26 và H(β)-11; giữa C-11 với H-13; giữa C-14 với H-13, H-26, H-27 và H-28. Hơn nữa, trên HMBC còn thấy tương tác của C-15 và C-13 với H-17 cho thấy sự hiện diện rõ ràng của các vòng cyclohexanyl A-D. Vòng cyclopentanyl của vòng E được xác định từ sự tương tác của H-17 với C-21, C-22, H(β)-19/C-21, H-17/C-18, H(β)-19/C-18, H(α)-20/C-29, H(β)-20/C-18, H-29/C-17, C-20, C-21. Nhóm ketomethyl được gắn ở C-21 do có tương tác HMBC giữa C-22 với H-29, H-17, H(α)-20; và C-21 với H-30.



Hình 4.46. Các tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của hợp chất **MS12**

Các tín hiệu proton H-12 (δ_{H} 3,89) và H-16 (δ_{H} 3,77) cùng với các tín hiệu carbon tương ứng gợi ý có các nhóm -OH gắn vào C-12 và C-16. Thêm nữa, quan sát thấy sự tương tác HMBC của H-11 (δ_{H} 1,84, 1,40) và H-13 (δ_{H} 1,51) với C-12 (δ_{C} 69,9) trong khi C-16 (δ_{C} 66,7) tương tác với H-17 (δ_{H} 1,83) và H(α)-15 (δ_{H} 2,08, 1,45) càng xác định chắc chắn vị trí của các nhóm hydroxy này.

Với các dữ liệu phổ [δ_{C} 107,1 (C-1')/ δ_{H} 4,32 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), δ_{C} 75,5 (C-2')/ δ_{H} 3,33 (1H, m, H-2'), δ_{C} 83,8 (C-3')/ δ_{H} 3,45 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'), δ_{C} 69,9 (C-4')/ δ_{H} 3,53 (1H, m, H-4'), δ_{C} 66,5 (C-5')/ δ_{H} 3,88 (1H, m, H_a-5'), 3,24 (1H, dd, $J = 9,6; 11,4$ Hz, H_b-5')] cho thấy đơn vị đường thứ nhất liên kết trực tiếp với phần aglycon là đường xylose. Tín hiệu của proton anomer xuất hiện dưới dạng doublet ở δ_{H} 4,32 (d, $J = 7,8$ Hz) với hằng số tương tác $J_{1'2'} = 7,8$ Hz xác nhận cấu hình của nhóm *O*-glycoside ở C-1' là β [138]. Vị trí của đường gắn với phần aglycone được xác định ở C-3 (δ_{C} 90,6) dựa vào tương tác HMBC của H-1' với C-3. Điều thú vị là độ dịch chuyển hóa học của C-3' (δ_{C} 83,8) của xylose xuất hiện ở trường thấp hơn

đáng kể so với độ dịch chuyển của methyl β -D-xylose chuẩn (δ_C 77,7) [138] biểu thị sự có mặt của một nhóm thế ở vị trí này (nhóm thế chính là đơn vị đường thứ hai).

Bảng 4.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất **MS12** và hợp chất tham khảo

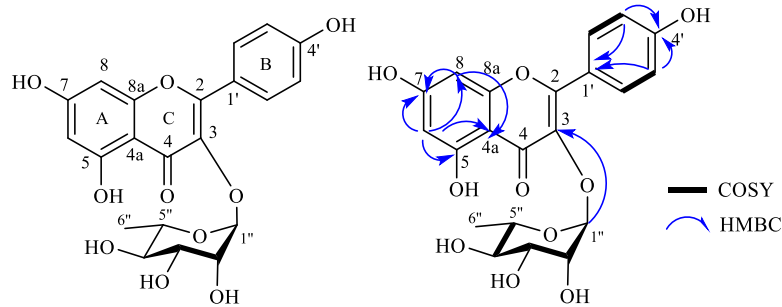
C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	38,2	39,8	1,72 (m) 0,99 (m)	22	213,6	218,6	-
2	25,8	27,2	1,83 (m) 1,71 (m)	23	27,4	28,4	1,06 (s)
3	87,8	90,6	3,15 (dd, 4,2, 12,0)	24	16,0	17,8	1,06 (s)
4	38,8	40,3	-	25	15,5	16,8	0,86 (s)
5	54,8	56,8	0,79 (d, 11,4)	26	16,5	17,4	1,09 (s)
6	17,8	19,4	1,59 (m) 1,45 (m)	27	18,4	19,2	1,04 (s)
7	32,8	34,4	1,49 (m) 1,31 (m)	28	17,1	16,4	0,93 (s)
8	44,7	46,5	-	29	20,1	20,9	1,41 (s)
9	48,1	50,0	-	30	25,7	26,2	2,23 (s)
10	36,1	37,8	-	1'	105,6	107,1	4,32 (d, 7,8)
11	31,8	32,9	1,84 (m) 1,40 (m)	2'	73,8	75,5	3,33 (m)
12	67,3	69,9	3,89 (m)	3'	81,0	83,8	3,45 (d, 8,4)
13	54,5	56,0	1,51 (d, 10,8)	4'	68,2	69,9	3,53 (m)
14	40,9	42,6	-	5'	65,3	66,5	3,88 (m) 3,24 (dd, 9,6; 11,4)
15	44,3	45,7	2,08 (m) 1,45 (m)	1''	100,5	102,6	5,15 (d, 1,8)
16	64,0	66,7	3,77 (m)	2''	70,5	72,3	3,71 (dd, 3,6; 9,6)
17	62,8	63,5	1,83 (m)	3''	70,6	72,3	3,95 (m)
18	45,9	47,7	-	4''	72,1	73,9	3,41 (d, 9,6)
19	44,6	45,5	1,58 (m) 1,36 (m)	5''	68,0	70,0	3,99 (m)
20	36,7	38,2	1,92 (m) 1,71 (m)	6''	17,8	17,9	1,26 (d, 6,0)
21	52,2	54,5	-				

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^dDMSO-*d*₆, # δ_C của spergulacin đo trong DMSO-*d*₆[138]

Tín hiệu proton anomer H-1'' của đơn vị đường thứ hai được quan sát thấy dưới dạng doublet tại δ_H 5,15 ($J = 1,8 \text{ Hz}$) đồng thời xuất hiện tín hiệu của một nhóm methyl có độ chuyển dịch δ_H 1,26 (3H, d, $J = 6,0 \text{ Hz}$, H-6'') cho phép xác nhận đường thứ 2 chính là α -L-rhamnose. Trên phổ HMBC của **MS12** có sự tương tác của H-1'' và C-3' cho thấy liên kết glycoside 1''-3' của đường rhamnose và đường xylose. Từ

các sự phân tích trên có thể khẳng định **MS12** là một saponin. So sánh phổ của **MS12** với chất tham khảo cho phép xác định **MS12** là spergulacin [138].

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



Hình 4.47. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **MS13**

Bảng 4.13. Số liệu phổ NMR hợp chất **MS13** và hợp chất tham khảo

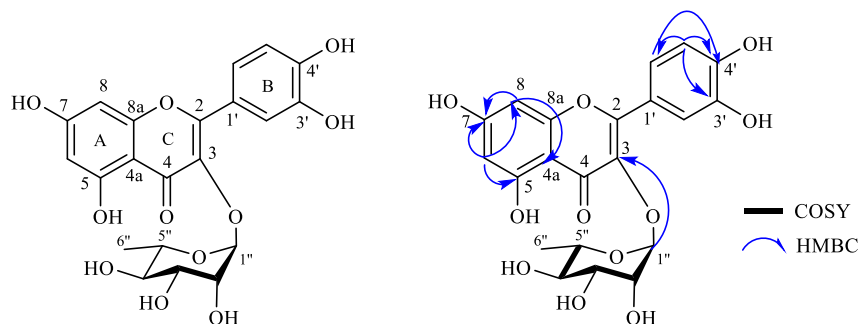
C	* $\delta_C^{d,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	159,3	158,9	-
3	136,2	136,0	-
4	179,6	179,3	-
4a	158,6	158,8	-
5	163,2	163,0	-
6	100,0	100,8	6,14 (d, 1,8)
7	166,2	169,0	-
8	94,8	95,5	6,30 (s)
8a	105,9	105,1	-
1'	122,7	122,7	-
2'/6'	131,9	131,8	7,76 (d, 8,7)
3'/5'	116,6	116,6	6,93 (d, 8,7)
4'	161,6	161,6	-
1''	103,5	103,5	5,36 (d, 1,2)
2''	72,2	72,2	-
3''	72,0	71,9	4,21 (dd, 1,8; 3,0)
4''	73,2	73,2	3,32 (m)
5''	71,9	71,9	3,34 (m)
6''	17,7	17,6	0,92 (d, 6,0)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d125 MHz, * δ_C của kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside đo trong CD₃OD [139]

MS13 thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ ¹H NMR xuất hiện tín hiệu của hai proton tại δ_H 6,14 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6) và 6,30 (1H, s, H-8). Một vòng thơm hệ tương tác spin-spin A₂B₂ (vòng B) được quan sát tại δ_H 7,76 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2' và H-6'), 6,93 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-3' và H-5'). Ngoài ra, số liệu phổ ¹H NMR tại δ_H 5,36 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-1'') cho thấy sự có mặt của 1 proton anomer và một tín hiệu doublet ở δ_H 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6'') biểu thị cho nhóm methyl

đều đặc trưng của đơn vị đường α -L-rhamnose. Phổ ^{13}C NMR kết hợp với phổ DEPT của hợp chất **MS13** cho thấy có 15 nhóm nguyên tử carbon bao gồm sáu nguyên tử carbon thơm không liên kết hydro tại δ_{C} 105,0 – 169,0 ppm và một nhóm carbonyl tại δ_{C} 179,3 (C-4), hai carbon methine thơm ở δ_{C} 100,8 (C-6) và 95,5 (C-8) của vòng A, bốn carbon methine của vòng B tại δ_{C} 131,8 (C-2'/C-6') và 116,5 (C-3'/C-5'). Từ các phân tích trên gọi ý **MS13** là một flavonol, có khung kaempferol [139]. Điều này cũng được khẳng định dựa trên tương tác HMBC của H-6 (δ_{H} 6,14) với C-8 (δ_{C} 95,5), C-4a (δ_{C} 158,8), C-5 (δ_{C} 163,0) và C-7 (δ_{C} 169,0); H-8 (δ_{H} 6,30) với C-6 (δ_{C} 100,8), C-4a (δ_{C} 158,8), C-5 (δ_{C} 163,0) và C-7 (δ_{C} 169,0); H-3' (δ_{H} 6,93) và H-5' (δ_{H} 6,93) với C-1' (δ_{C} 122,7) và C-4' (δ_{C} 161,6). Trên phổ COSY của **MS13** xuất hiện ba hệ tương tác spin-spin ^1H - ^1H của H-2'/H-3', H-5'/H-6', H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6''. Phổ HMBC còn xuất hiện tương tác giữa proton anomer H-1'' của đường với C-3 chứng tỏ đường rhamnose gắn với khung kaempferol ở vị trí C-3. Từ các phân tích và lập luận trên cùng với việc so sánh phổ của **MS13** với chất tham khảo cho phép xác định **MS13** là kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside hay kaempferin hoặc afzelin [139].

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



Hình 4.48. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **MS14**

MS14 thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Các dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR của **MS14** cho thấy các tín hiệu tương tự như **MS13**. Trên phổ ^1H NMR của **MS14** cũng xuất hiện tín hiệu của hai proton thơm tại δ_{H} 6,20 (1H, s, H-6) và 6,70 (1H, s, H-8); một proton anomer tại δ_{H} 5,37 (1H, s, H-1'') và một tín hiệu doublet của nhóm methyl ở δ_{H} 0,96 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6'') cho thấy sự có mặt của một đơn vị đường α -L-rhamnose, điểm khác biệt duy nhất là một vòng thơm hệ tương tác spin-spin ABX (vòng B) tại δ_{H} 7,36 (1H, s, H-2'), 6,93 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), và 7,33 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6') của **MS14** so với **MS13**. Trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất **MS14** cũng cho thấy 15 nhóm nguyên tử carbon ở trường thấp, bao gồm bảy nguyên tử carbon thơm không liên kết hydro tại δ_{C} 105,9 – 166,3 ppm (xuất hiện thêm một carbon bậc 4 tại δ_{C} 146,4 (C-3')) và một nhóm carbonyl tại δ_{C} 179,3 (C-4), hai carbon methine thơm ở δ_{C} 100,0 (C-6) và 94,9 (C-8) của vòng A,

ba carbon methine của vòng B tại δ_C 116,4 (C-2'), 116,9 (C-5') và 122,8 (C-6'). Như vậy **MS14** là cũng là một flavonol, nhưng có khung quercetin [140]. Cấu trúc của **MS14** được khẳng định thêm bởi tương tác ^1H - ^1H COSY của các hệ H-2'/H-3', H5'/H-6', H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6''. Điều này cũng được khẳng định dựa trên tương tác HMBC của H-6 (δ_H 6,20) với C-8 (δ_C 94,9), C-4a (δ_C 158,5) và C-7 (δ_C 166,3); H-2' (δ_H 7,36) với C-3' (δ_C 146,4), C-4' (δ_C 149,8) và C-6' (δ_C 122,8); H-5' (δ_H 6,93) với C-3' (δ_C 146,4) và C-6' (δ_C 122,8); H-6' (δ_H 7,33) với C-4' (δ_C 149,8) và C-5' (δ_C 116,9).

Mặt khác, sự xuất hiện tương tác HMBC giữa H-1'' của đường với C-3 chứng tỏ đường rhamnose gắn với khung quercetin ở vị trí C-3. Từ các phân tích và lập luận trên cùng với việc so sánh phổ của **MS14** với chất tham khảo cho phép xác định **MS14** là quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside hay quercitrin [140].

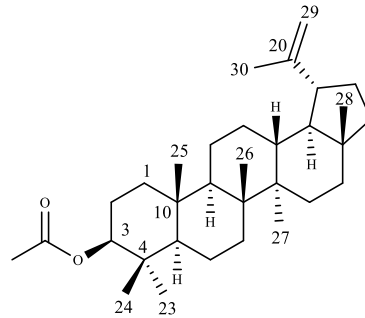
Bảng 4.14. Số liệu phổ NMR hợp chất **MS14** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{d,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	158,5	158,5	-
3	136,2	136,0	-
4	179,7	179,3	-
4a	158,4	158,5	-
5	159,3	159,3	
6	100,0	100,0	6,20 (s)
7	166,3	166,3	-
8	94,9	94,9	6,30 (s)
8a	105,9	105,7	-
1'	123,0	122,9	-
2'	116,4	116,4	7,36 (s)
3'	146,4	146,4	-
4'	149,8	149,8	-
5'	117,0	116,9	6,93 (d, 8,4)
6'	122,9	122,8	7,33 (d, 8,4)
1''	103,5	103,5	5,37 (s)
2''	72,0	72,1	4,24 (m)
3''	72,1	72,0	3,77 (dd, 2,4; 9,0)
4''	73,3	73,2	3,36 (d, 9,0)
5''	71,9	71,9	3,44 (m)
6''	17,6	17,6	0,96 (d, 6,0)

^a 150 MHz, ^b 600 MHz, ^c CD₃OD, ^d 125 MHz, * δ_C của quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside đo trong CD₃OD [140]

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

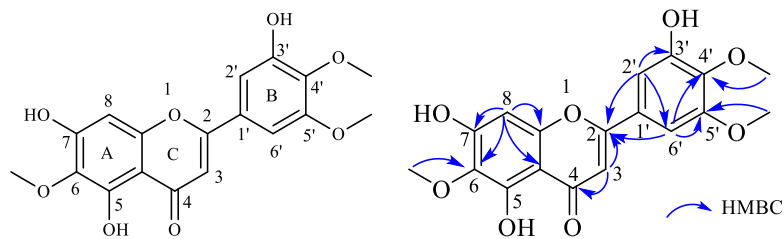
4.1.2.1. Hợp chất **OE1**: Lupeol acetate



Hình 4.49. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE1**

Hợp chất **OE1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, các thông số vật lí và các dữ liệu phổ thu được giống với hợp chất **MS4** (phần phụ lục phổ). Vì vậy, có thể kết luận hợp chất **OE1** là lupeol acetate.

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



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

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'). Phổ ^{13}C 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 sp^2 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.

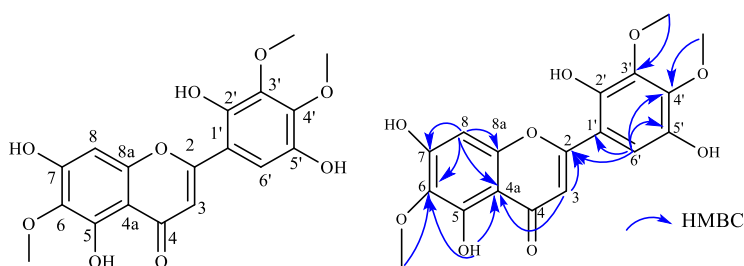
Bảng 4.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE2** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{d,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
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 [141]

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 [141] 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



Hình 4.51. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE3**

Hợp chất **OE3** phân lập được dưới dạng chất bột màu vàng đậm. Phổ ¹H NMR cho thấy tín hiệu singlet của ba nhóm methoxy tại δ_H 3,75 (3H, s, 6-OCH₃), 3,78 (3H, s, 3'-OCH₃), 3,87 (3H, s, 4'-OCH₃), hai nhóm methine thơm tại δ_H 7,12 (3H, s, H-6'), 6,50 (3H, s, H-8), một nhóm methine olefin tại δ_H 7,04 (3H, s, H-3) và bốn nhóm hydroxy tại δ_H 13,03 (s, OH-5), 10,72 (brs, OH-7), 9,49 (brs, OH-2'), 9,18 (brs, OH-

5') (Bảng 4.16). Trên phổ ^{13}C NMR của **OE3** xuất hiện tín hiệu của 18 nguyên tử carbon, bao gồm ba nhóm methoxy tại δ_{C} 59,9 (6-OMe), 60,9 (3'-OMe), 60,2 (4'-OMe), hai nhóm methine thơm tại δ_{C} 108,8 (C-6') và 93,9 (C-8), một nhóm methin olefin tại δ_{C} 108,0 (C-3). Các dữ liệu phổ trên gợi ý **OE3** là dẫn xuất của flavone. Phân tích dữ liệu ^1H và ^{13}C NMR của **OE3** (Bảng 4.16) cho thấy hợp chất này có cấu trúc tương tự với **OE2**, ngoại trừ sự xuất hiện của nhóm -OH ở vị trí C-2', cùng với sự hoán đổi vị trí nhóm -OH và -OCH₃ ở hai vị trí C-3' và C-5' trong **OE3** [142].

Bảng 4.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE3** và hợp chất tham khảo

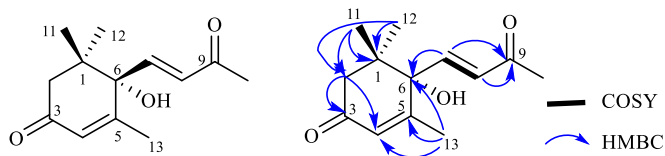
C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{d},\text{c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a},\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b},\text{c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	161,2	161,0	-
3	108,1	108,0	7,04 (s)
4	182,2	182,2	-
4a	152,5	152,4	-
5	152,7	152,7	-
6	131,3	131,3	-
7	157,4	157,3	-
8	94,0	93,9	6,50 (s)
8a	104,1	104,0	-
1'	112,1	112,1	-
2'	143,3	143,2	-
3'	141,8	141,8	-
4'	144,7	144,6	-
5'	143,6	143,5	-
6'	108,9	108,8	7,12 (s)
5-OH	-	-	13,03 (s)
7-OH	-	-	10,72 (br. s)
2'-OH	-	-	9,49 (br. s)
5'-OH	-	-	9,18 (br. s)
6-OCH ₃	60,0	59,9	3,75 (s)
3'-OCH ₃	61,0	60,9	3,78 (s)
4'-OCH ₃	60,3	60,2	3,87 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cDMSO-*d*₆, ^d125 MHz, ^e δ_{C} của 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone trong DMSO-*d*₆ [142]

Phổ COSY của **OE3** cho thấy không có tương tác nào chứng tỏ **OE3** không có các proton cạnh nhau (Hình 4.51). Quan sát trên phổ HMBC cho thấy các tương tác giữa H-8 và C-4a/C-7/C-8a, giữa H-3 với C-2/C-1'/C-4a; giữa H-6' với C1'/C-2/C-4'/C-5'; giữa 5-OH với C-5/C-4a; giữa 6-OCH₃ với C-6, giữa 3'-OCH₃ với C-3', giữa 4'-OCH₃ với C-4' cho phép xác định vị trí của các nhóm methoxy liên kết lần lượt với C-6, C-3', C-4' và bốn nhóm hydroxy liên kết với C-5, C-7, C-2', C-5' tương ứng.

Từ những dữ kiện trên kết hợp so sánh với các công bố trước đó của các hợp chất tương tự có thể xác định được cấu trúc của **OE3** là 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone [142].

4.1.2.4. Hợp chất **OE4**: Dehydrovomifoliol



Hình 4.52. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE4**

Bảng 4.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE4** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	42,6	42,6	-
2	50,4	50,5	2,61 (d, 16,8) 2,31 (d, 16,8)
3	199,9	200,4	-
4	127,7	128,0	5,96 (t, 1,2)
5	164,2	164,6	-
6	79,8	79,9	-
7	148,0	148,3	7,00 (d, 15,6)
8	131,4	131,7	6,44 (d, 15,6)
9	200,1	200,7	-
10	27,6	27,6	2,31 (s)
11	23,5	23,5	1,08 (s)
12	24,7	24,7	1,04 (s)
13	19,1	19,1	1,92 (d, 1,2)

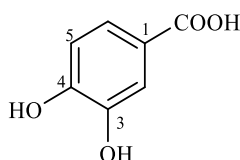
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, * δ_C của dehydrovomifoliol đo trong CD₃OD [143]

Hợp chất **OE4** thu được dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ ¹H NMR của **OE4** xuất hiện tín hiệu singlet của bốn nhóm methyl tại δ_H 1,04 (3H, s, H-12), 1,08 (3H, s, H-11), 1,92 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, H-13), 2,31 (3H, s, H-10), tín hiệu của ba nhóm methine sp^2 tại [δ_H 5,96 (1H, t, $J = 1,2$ Hz, H-4), 6,44 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-8), 7,00 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-7)].

Ngoài ra, trên phổ ¹H NMR của **OE4** còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của một nhóm methylene sp^3 tại δ_H 2,31 (1H, d, $J = 16,8$ Hz, H_a-2), 2,61 (1H, d, $J = 16,8$ Hz, H_b-2) ở trường thấp gợi ý nhóm methylene này gắn trực tiếp với một nhóm carbonyl. Phổ ¹³C NMR và DEPT xuất hiện hai tín hiệu đặc trưng của hai nhóm ketone tại δ_C 200,4 (C-3) và 200,7 (C-9), ba nhóm methine sp^2 tại δ_C 128,0 (C-4), 131,7 (C-8), 148,3 (C-7), một nhóm carbon bậc 4 sp^2 tại 164,6 (C-5), hai nhóm carbon bậc 4 sp^3 tại δ_C 42,6 (C-1), 79,9 (C-6), bốn nhóm methyl tại δ_C 27,6 (C-10), 23,5 (C-

11), 24,7 (C-12), 19,1 (C-13) và một tín hiệu của nhóm methylene tại δ_C 50,5 (C-2). Độ chuyển dịch hóa học của C-6 cho thấy carbon C-6 có liên kết với nguyên tử oxy. Trên COSY xuất hiện mối tương quan giữa H-7/H-8, đồng thời hằng số tương tác $J_{7,8} = 15,6$ Hz lớn cho phép xác định liên kết đôi -CH=CH- kiểu *trans*. Bên cạnh đó, trên phổ HMBC quan sát được sự tương tác của H-11, H-12 với C-1/C-2/C-6 xác định được hai nhóm methyl này gắn trực tiếp tại C-1; tương tác của H-13 với C-4/C-5/C-6 cho thấy nhóm Me-13 gắn ở C-5. Ngoài ra, còn thấy tương tác HMBC của H-7, H-8 với C-6/C-9; H-2 với C-1/C-3/C-4. Qua những phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ ^{13}C NMR của **OE4** với các số liệu đã công bố trong tài liệu tham khảo (Bảng 4.17) [143] có thể kết luận cấu trúc của hợp chất **OE4** là dehydrovomifoliol.

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



Hình 4.53. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE5**

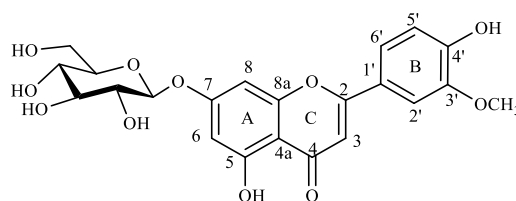
Hợp chất **OE5** phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ^1H NMR của **OE5** xuất hiện tín hiệu proton của vòng thơm hệ tương tác spin – spin ABX tại δ_H 6,81 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), 7,43 (1H, dd, $J = 2,4; 8,4$ Hz, H-2), 7,46 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6). Phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của một nhóm carboxylic tại δ_C 170,9 (COOH), 3 carbon methine sp^2 tại δ_C 115,7 (C-2), 117,7 (C-5), 123,9 (C-6) và ba carbon không liên kết với hydro tại δ_C 123,8 (C-1), 145,9 (C-3) và 151,3 (C-4). Qua những phân tích trên phổ NMR của hợp chất **OE5**, kết hợp với các tài liệu đã công bố trước đó về hợp chất protocatechuic acid [144], cho thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí, cho phép ta xác định được **OE5** là protocatechuic acid.

Bảng 4.18. Dữ liệu phổ NMR hợp chất **OE5** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	123,0	123,8	
2	115,8	115,7	7,46 (d, 2,4)
3	146,0	145,9	
4	151,5	151,3	
5	117,7	117,7	6,81 (d, 8,4)
6	123,9	123,9	7,43 (dd, 2,4; 8,4)
COOH	170,3	170,8	

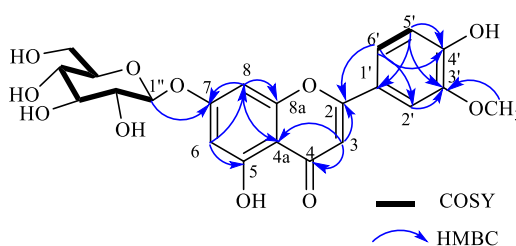
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, # δ_C của protocatechuic acid đo trong CD₃OD [144]

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



Hình 4.54. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE6**

Hợp chất **OE6** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Các phổ NMR của **OE6** đặc trưng cho một hợp chất có khung flavonoid. Trên phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu của năm proton thơm, trong đó có một hệ vòng thơm kiểu ABX được xác định bởi các tín hiệu tại δ_{H} 6,94 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 7,58 (1H, br. s, H-2') và 7,59 (1H, d, $J = 2,4; 8,4$ Hz, H-6'); hai proton vòng thơm thế ở vị trí meta với nhau tại δ_{H} 6,45 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6), 6,87 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8); một proton methine sp^2 tại δ_{H} 6,98 (1H, s, H-3); một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,89 (3H, s, 3'-OCH₃). Bên cạnh đó phổ ^1H NMR cũng xác định sự có mặt của một gốc đường với tín hiệu proton anomer tại δ_{H} 5,06 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'').



Hình 4.55. Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất **OE6**

Các tín hiệu trên phổ ^{13}C NMR và DEPT cho thấy **OE6** có 22 nguyên tử carbon, trong đó có sáu nhóm methine sp^2 , tám carbon không liên kết hydro sp^2 , một nhóm carbonyl và sáu nguyên tử carbon đặc trưng cho một gốc đường, gợi ý rằng hợp chất **OE6** là một hợp chất flavone glycoside. Ngoài ra, phổ ^{13}C NMR của hợp chất **OE6** xuất hiện hai tín hiệu tại δ_{C} 95,0 và 99,5 rất đặc trưng cho hai vị trí C-8, C-6 của vòng A khi hai vị trí C-5 và C-7 đều bị thế. Thêm vào đó, sự xuất hiện của một gốc đường glucose cũng được xác định với các tín hiệu đặc trưng tại δ_{C} 100,1 (C-1'')/ δ_{H} 5,06 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), δ_{C} 73,1 (C-2'')/ δ_{H} 3,28 (1H, m), δ_{C} 76,4 (C-3'')/ δ_{H} 3,35 (1H, s), δ_{C} 69,6 (C-4'')/ δ_{H} 3,18 (1H, m), δ_{C} 77,2 (C-5'')/ δ_{H} 3,44 (1H, m), δ_{C} 60,6 (C-6''). Hằng số tương tác lớn ($J_{1,2} = 7,8$ Hz) gợi ý phân tử đường có cấu hình β . Trên phổ HMBC xuất hiện các tương tác giữa H-3 với C-4/C-4a/C-1', H-6 với C-5/C-8; H-8 với C-4a/C-8a/C-6; H-5' với C-4'/C-3'/C-1'; H-6' với C-4'/C-2'/C-2'; H-2' với C-3'/C-1'/C-2 khẳng định vị trí của các carbon C-3, C-6, C-8, C-5', C-6', C-2' tương ứng. Ngoài ra, còn xuất hiện tương tác HMBC giữa H-1'' và C-7, cho thấy phân tử đường có vị trí C-1'' gắn với khung chrysoeriol ở vị trí C-7. Thêm nữa, cũng quan sát được

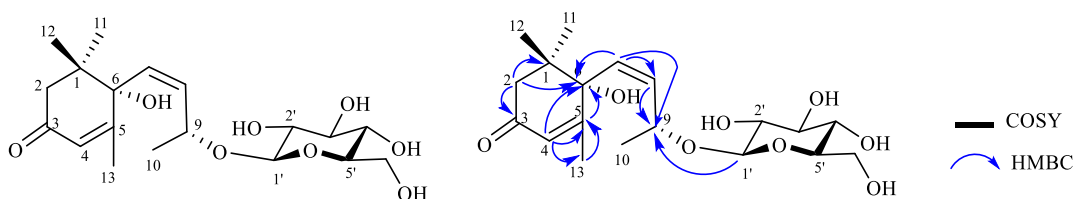
mối tương quan giữa H-5'/H-6' và H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6'' trên phổ COSY. Từ các dữ kiện trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [145] đã công bố về chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside cho thấy có sự phù hợp ở tất cả các vị trí (Bảng 4.19). Như vậy có thể khẳng định **OE6** là chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside [145].

Bảng 4.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE6** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_C^{d,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	164,3	164,2	-
3	103,1	103,3	6,98 (s)
4	182,0	181,9	-
5	161,1	161,1	-
6	99,5	99,5	6,45 (d, 2,4)
7	162,9	162,9	-
8	95,0	95,0	6,87 (d, 2,4)
4a	105,3	105,3	-
8a	156,9	156,9	-
1'	121,9	121,1	-
2'	110,3	110,3	7,58 (br. s)
3'	148,3	148,1	-
4'	150,7	151,2	-
5'	116,0	115,8	6,94 (d, 8,4)
6'	120,7	120,5	7,59 (dd, 2,4; 8,4)
3'-OCH ₃	55,9	55,9	3,89 (s)
1''	100,0	100,0	5,06 (d, 7,8)
2''	73,1	73,1	3,28 (m)
3''	76,5	76,4	3,35 (m)
4''	69,6	69,6	3,18 (m)
5''	77,3	77,2	3,44 (m)
6''	60,6	60,6	3,45 (m) 3,72 (m)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cDMSO-d₆, ^d100 MHz, # δ_C của chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside đo trong DMSO-d₆ [145]

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



Hình 4.56. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE7**

Hợp chất **OE7** thu được dưới dạng chất dầu không màu, có góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{24} +108,8$ (c 0,94 MeOH). Các phổ 1D-NMR của **OE7** đặc trưng cho một hợp chất megastigmane glycoside. Trên phổ ^1H NMR xuất hiện các tín hiệu của ba proton olefin tại δ_{H} 5,87 (1H, 10,2, H-7), 5,88 (1H, dd, $J=10,2$; 1,8 Hz, H-8), 5,89 (1H, s, H-4).

Bảng 4.20. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE7** và chất tham khảo

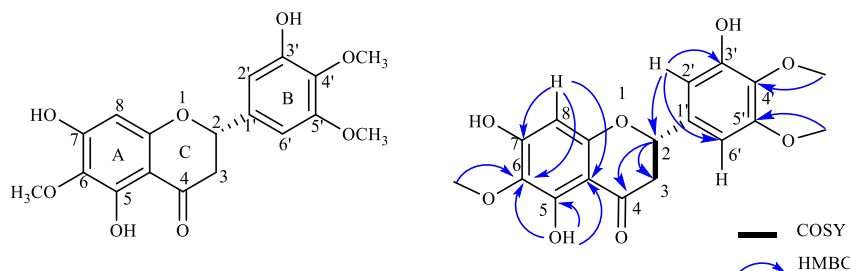
C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{c,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	42,5	42,4	-
2	50,7	50,7	2,53 (d, 16,8) 2,16 (d, 16,8)
3	201,4	201,2	-
4	127,2	127,2	5,89 (s)
5	167,4	167,3	-
6	80,1	79,9	-
7	131,6	131,5	5,87 (d, 10,2)
8	135,3	135,3	5,88 (dd, 10,2; 1,8)
9	77,4	77,3	4,43 (m)
10	21,3	21,2	1,30 (d, 6,6)
11	23,5	23,4	1,06 (s)
12	24,8	24,7	1,05 (s)
13	19,7	19,5	1,94 (s)
1'	102,7	102,7	4,36 (d, 7,8)
2'	75,3	75,3	-
3'	78,0	78,0	-
4'	71,6	71,6	-
5'	78,1	78,1	-
6'	62,8	62,8	3,87 (dd, 2,4; 12,0) 3,63 (dd, 6,0; 12,0)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d100 MHz, ^{*} δ_{C} của 7Z-roeoside [146]

Bên cạnh đó phổ ^1H -NMR cũng xác định sự có mặt của bốn nhóm methyl tại δ_{H} 1,05 (3H, s, H-12), 1,06 (3H, s, H-11), 1,30 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-10), 1,94 (3H, s, H-13) và của một gốc đường với tín hiệu proton anomer tại δ_{H} 4,36 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1') cùng các tín hiệu khác đặc trưng cho gốc đường tại 3,25-3,88. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C NMR và DEPT đã gợi ý rằng hợp chất **OE7** có khung cyclohexenone. Điều này được khẳng định bởi các tín hiệu tại δ_{C} 201,2 (C-3), 167,3 (C-5), 127,2 (C-4), 79,9 (C-6), 50,7 (C-2), 42,4 (C-1), hai tín hiệu tại δ_{C} 131,5 và 135,3 rất đặc trưng cho hai vị trí C-7, C-8 của nối đôi olefin. Ngoài ra sự xuất hiện của một gốc đường glucose cũng được xác định với các tín hiệu đặc trưng tại δ_{C} 102,7 (C-1')/ δ_{H} 4,36 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), 75,2 (C-2'), 78,0 (C-3'), 71,6 (C-4'), 78,1 (C-5'), 62,8 (C-6'). Hằng số tương tác lớn ($J_{1,2} = 7,8$ Hz) gợi ý phân tử đường có dạng β -glucoside. Các tương tác HMBC giữa H-2 với C-1/C-3/C-6/C-11/C-12, giữa H-4 với C-5/C-6/C-13, giữa H-7 với C-6/C-8/C-9, giữa H-8 với C-6/C-7/C-9, giữa H-9 với C-7/C-8/C-10, giữa H-10 với C-8/C-9 và H-13 với

C-4/C-5/C-6 được quan sát rõ, đồng thời trên phổ COSY cũng nhìn thấy mối tương quan giữa H-7/H-8/H-9. So sánh số liệu phổ ^{13}C NMR của **OE7** với hợp chất (6*S*,7*Z*,9*R*)-6,9-dihydroxymegastigma-4,7-dien-3-one-9-*O*- β -D-glucoside [146] và so sánh góc quay cực riêng thấy có sự phù hợp ở tất cả các vị trí (Bảng 3.20). Từ đó có thể kết luận hợp chất **OE7** là (6*S*,7*Z*,9*R*)-6,9-dihydroxymegastigma-4,7-dien-3-one-9-*O*- β -D-glucoside hay còn có tên khác là 7*Z*-roeoside.

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



Hình 4.57. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE8**

Bảng 4.21. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE8** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
2	78,6	79,1	5,29 (dd, 3,0; 12,6)
3	42,8	43,4	2,80 (dd, 3,0; 17,4) 3,04 (dd, 12,6; 17,4)
4	196,7	196,6	-
5	154,6	154,4	-
6	128,7	128,5	-
7	158,8	158,5	-
8	94,8	94,7	6,13 (s)
4a	157,5	157,5	-
8a	103,2	103,1	-
1'	134,6	134,4	-
2'	106,2	106,2	6,68 (d, 1,8)
3'	149,9	149,6	-
4'	136,0	135,8	-
5'	152,8	152,7	-
6'	102,2	102,1	6,56 (d, 1,8)
6-OCH ₃	60,4	61,0	3,94 (s)
4'-OCH ₃	60,4	60,9	3,91 (s)
5'-OCH ₃	55,4	56,0	3,89 (s)
5-OH	-	-	12,16 (br. s)

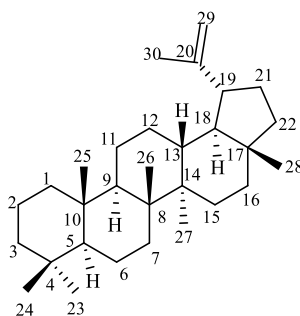
^a150MHz, ^b600MHz, ^cCDCl₃, * δ_{C} của 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone đo trong CDCl₃ [147]

Hợp chất **OE8** phân lập được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu của ba proton đặc trưng cho vòng thơm, trong đó có hai proton doublet ở vị

trí *meta* với nhau tại δ_H 6,68 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-2'), 6,56 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6'), một proton singlet tại δ_H 6,13 (1H, s, H-8); một nhóm methylene sp^3 tại δ_H 2,80 (1H, dd, $J = 3,0; 17,4$ Hz, H_a-3), 3,04 (1H, dd, $J = 12,6; 17,4$ Hz, H_b-3); một proton methine sp^2 tại δ_H 5,29 (1H, dd, $J = 3,0; 12,6$ Hz, H-2) và ba nhóm methoxy tại δ_H 3,91 (3H, s, 4'-OCH₃), 3,94 (3H, s, 6-OCH₃), 3,89 (3H, s, 5'-OCH₃). Phổ ¹³C NMR xuất hiện tín hiệu của 18 nguyên tử carbon bao gồm một nhóm carbonyl, bốn nhóm methine sp^2 , ba nhóm methoxy, và mười carbon không liên kết với hydro. Kết hợp với phổ ¹H NMR có thể nhận định đây là một hợp chất có khung flavone. Trên phổ HMBC của hợp chất **OE8** xuất hiện các tương tác giữa H-8 với C-4a/C-6/C-7/C-8a; giữa H-2' với C-1'/C-3'/C-6'/C-2; giữa H-6' với C-1'/C-5'/C-2'/C-2; giữa H-3 với C-4/C-2/C-4a/C-1' giúp khẳng định lần lượt các vị trí của C-8, C-2', C-6' và C-3. Ngoài ra vị trí của các nhóm methoxy tại C-6, C-4', C-5' được khẳng định thông qua các tương tác HMBC từ các proton của các nhóm OCH₃-6 tới C-6, OCH₃-4' tới C-4' và OCH₃-5' tới C-5'. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **OE8** với các dữ liệu phổ của hợp chất 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone [147] thấy có sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy có thể kết luận hợp chất **OE8** chính là 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone.

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

Hợp chất **OE9** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ¹H NMR của **OE9** xuất hiện các tín hiệu singlet của bảy nhóm methyl đặc trưng cho hợp chất triterpenoid khung lupane có độ dịch chuyển lần lượt tại δ_H 0,79 (3H, s, H-23), 0,84 (3H, s, H-24), 0,82 (3H, s, H-25), 0,95 (3H, s, H-26), 0,72 (3H, s, H-27), 0,96 (3H, s, H-28), 1,75 (3H, s, H-30).



Hình 4.58. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE9**

Bên cạnh đó phổ ¹H NMR còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của hai proton methylene sp^2 tại δ_H 4,78 (2H, br. s, H-29) và các tín hiệu proton còn lại ở vùng aliphatic δ_H 1,11-1,85.

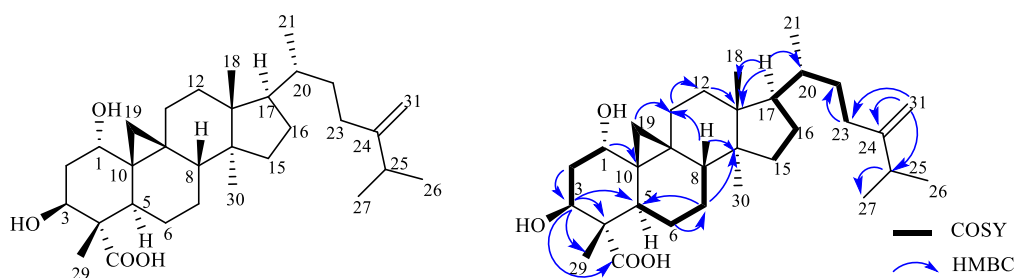
Bảng 4.22. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE9** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	* $\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	33,6	33,7	1,21 (m) 1,38 (m)	16	42,1	42,1	1,33 (m) 1,11 (ddd, 4,8; 14,4; 4,2)
2	20,9	20,9	1,30 (m) 1,52 (m)	17	44,8	44,8	-
3	42,0	41,9	1,59 (m) 1,02 (d, 9,6)	18	49,5	49,5	1,34 (m)
4	37,4	37,4	-	19	46,5	46,5	2,67 (dd, 9,6; 16,2)
5	56,1	56,1	0,69 (d, 1,8)	20	148,8	148,8	-
6	18,7	18,7	1,35 (m) 1,55 (m)	21	29,7	29,7	-
7	33,2	33,3	1,21 (m) 1,45 (m)	22	40,3	40,4	0,76 (m)
8	42,0	42,0	-	23	21,6	21,6	0,79 (s)
9	55,0	54,9	1,39 (m)	24	33,4	33,4	0,84 (s)
10	41,9	41,9	-	25	15,8	15,9	0,82 (s)
11	21,6	21,7	1,64 (m) 1,46 (m)	26	16,7	16,8	0,95 (s)
12	23,9	24,0	1,39 (m) 1,45 (m)	27	16,0	16,1	0,72 (s)
13	50,4	50,4	1,24 (m)	28	16,7	16,7	0,96 (s)
14	42,1	42,1	-	29	110,1	110,1	4,78 (br. s)
15	27,4	27,4	1,79 (m) 1,85 (m)	30	24,9	25,0	1,75 (s)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, * δ_C của lup-20(29)-ene đo trong CDCl₃ [148]

Phổ ¹³C NMR xuất hiện tín hiệu của 30 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm methylene sp² và 1 carbon sp² không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 148,8 (C-20) và 110,1 (C-29). Điều này hoàn toàn phù hợp với các nhận định đưa ra khi phổ ¹H NMR thu được tín hiệu của hai proton olefin. Như vậy, kết hợp giữa các tín hiệu thu được trên phổ ¹H NMR, phổ ¹³C NMR có thể nhận định 30 nguyên tử carbon thuộc khung lupane giống **OE1**. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **OE9** với dữ liệu đã công bố của hợp chất lup-20(29)-ene [148] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí, từ đó có thể kết luận hợp chất **OE9** có cấu trúc là lup-20(29)-ene.

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



Hình 4.59. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE10**

Bảng 4.23. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE10** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{d,e}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	* $\delta_C^{d,e}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	72,5	73,6	3,56 (br. s)	17	52,5	53,6	1,67 (m)
2	38,8	38,3	2,43 (m) 2,59 (m)	18	18,3	18,8	1,02 (s)
3	70,7	71,5	4,55 (dd, 4,2; 12,0)	19	29,7	31,1	0,51 (d, 4,2) 0,72 (d, 4,2)
4	55,6	55,8	-	20	36,5	37,3	1,81 (m)
5	37,7	37,8	1,87 (m)	21	18,5	18,8	0,95 (d, 6,0)
6	23,4	24,0	1,35 (m) 1,01 (m)	22	35,3	36,2	1,17 (m) 1,62 (m)
7	28,3	29,2	1,94 (m) 1,32 (m)	23	31,6	32,3	2,16 (m) 1,96 (m)
8	48,1	50,1	1,55 (dd, 4,2; 12,0)	24	156,7	157,8	-
9	20,8	22,1	-	25	34,0	34,9	2,27 (m)
10	30,3	30,2	-	26	22,0	22,4	1,05 (d, 6,6)
11	26,6	26,7	2,44 (m) 1,28 (m)	27	21,9	22,3	1,06 (d, 6,6)
12	33,2	34,1	1,70 (m)	28	179,9	181,0	-
13	45,6	46,4	-	29	9,7	9,2	1,09 (s)
14	49,1	49,9	-	30	19,4	19,9	1,01 (s)
15	35,9	36,9	1,35 (m)	31	106,6	106,8	4,74 (br. s), 4,68 (d, 1,2)
16	25,8	26,6	1,25 (m) 1,30 (m)				

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^dpyridine-d₅, ^e100MHz, * δ_C của 23-deoxojessic acid

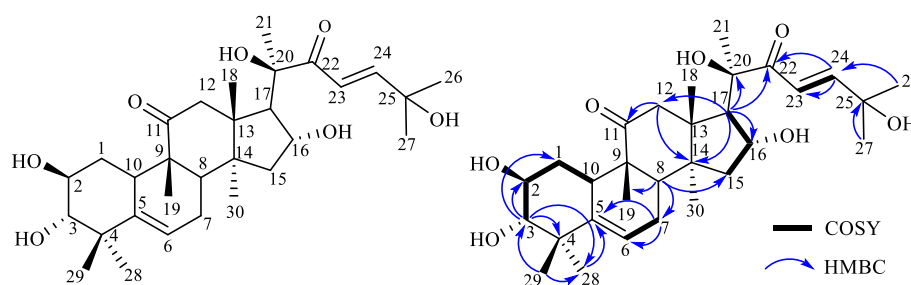
đo trong pyridine-d₅ [149]

Hợp chất **OE10** phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ¹H NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hợp chất triterpenoid với các tín hiệu của 6 nhóm methyl tại δ_H 0,95 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-21), 1,01 (3H, s, H-30), 1,02 (3H, s, H-18), 1,05 (3H, d, $J = 4,2$ Hz, H-26), 1,06 (3H, d, $J = 4,2$ Hz, H-27), 1,09 (3H, s, H-29). Phổ ¹³C NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của nhóm carboxylic tại δ_C 181,0 (C-28) và một liên kết đôi ngoại vòng tại δ_C 157,8 (C-24) và 106,8 (C-31). Độ chuyển dịch hóa học của C-19 (δ_H 0,51 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H_a-19), 0,72 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H_b-19), δ_C 31,1) đặc trưng cho tín hiệu của một vòng cyclopropyl. Trên phổ COSY quan sát thấy các hệ tương tác sau: H-1/H-2/H-3, H-5/H-6/H-7/H-8, H-11/H12, H-15/H-16/H-17/H-20/H-22/H-23. Ngoài ra, trên phổ HMBC có các tương tác chính giữa H-26/H-27 cùng tương tác đến C-25, giữa H-21 đến C-20/C-17, giữa H-19 tương

tác với C-1/C-10/C-9/C-11/C-5/C-8, giữa H-29 tương tác với C-28/ C-3/C-4/C-5, giữa H-30 với C-8/C-13/C-14/C-15, giữa H-18 tương tác với C-12/C-13/C-14/C-17, giữa H-31 với C-23/C-24/C-25, giữa H-8 với C-7/C-9/C-10/C-14/C-15, giữa H-5 với C-3/C-4/C-6/C-10, giữa H-11 với C-9/C-10/C-12, giữa H-17 với C-18/C-13/C-20 cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **OE10** như hình vẽ (Hình 4.59).

Qua phân tích dữ liệu phổ 1D, 2D NMR của **OE10**, kết hợp so sánh tài liệu tham khảo đã công bố trước đó [149] cho phép xác định hợp chất **OE10** là 23-deoxojessic acid.

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



Hình 4.60. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE11**

Hợp chất **OE11** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phân tích các dữ kiện phổ 1D, 2D NMR cho thấy cấu trúc **OE11** thuộc nhóm chất cucurbitacin. Phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu singlet của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,92 (3H, s, H-30), 0,98 (3H, s, H-28), 1,09 (3H, s, H-18), 1,19 (3H, s, H-29), 1,21 (3H, s, H-26), 1,34 (3H, s, H-27), 1,32 (3H, s, H-19), 1,40 (3H, s, H-21), và ba nhóm oxymethine ở δ_{H} 4,48 (1H, m, H-16), δ_{H} 3,55 (1H, m, H-2) và δ_{H} 2,87 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3). Ngoài ra, phổ ^1H NMR còn có một tín hiệu doublet của proton olefin ở δ_{H} 5,76 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6) và hai tín hiệu proton olefin ở dạng *trans* tại δ_{H} 6,85 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-23) và δ_{H} 6,99 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-24). Bên cạnh đó còn xuất hiện các tín hiệu proton methine và methylene ở trường cao trong khoảng δ_{H} 1,05 – 2,08 ppm, trong khi các tín hiệu gần nhóm carbonyl chuyển dịch sang trường thấp hơn, cụ thể δ_{H} 2,58 (1H, t, $J = 4,8$ Hz, H_a-12) và 2,54 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H_b-12) và δ_{H} 2,50 (1H, d, $J = 13,2$ Hz, H-10).

Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **OE11** cho thấy tín hiệu của 30 nguyên tử carbon gồm tám nhóm methyl (δ_{C} 19,8 đến 29,2), năm carbon carbinol ở δ_{C} 71,8 (C-2), 81,9 (C-3), 71,6 (C-16), 79,9 (C-20) và 71,5 (C-25) và hai carbon carbonyl ở δ_{C} 204,9 (C-22), 216,1 (C-11), đặc trưng của triterpenoid khung cucurbitane.

Bảng 4.24. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE11** và hợp chất tham khảo

C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{e,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_{\text{C}}^{\text{e,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
---	------------------------------------	----------------------------------	--	---	------------------------------------	----------------------------------	--

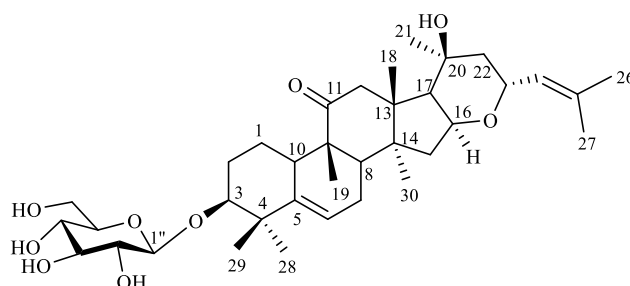
1	34,8	34,8	1,81 (m) 1,05 (m)	16	71,6	71,6	4,48 (m)
2	71,7	71,8	3,55 (m)	17	59,4	59,4	2,61 (d, 7,2)
3	81,9	81,9	2,87 (d, 9,6)	18	20,6	20,5	1,09 (s)
4	43,3	43,4	-	19	19,8	19,8	1,32 (s)
5	142,7	142,7	-	20	79,9	79,9	-
6	121,2	119,9	5,76 (d, 6,0)	21	25,4	25,4	1,40 (s)
7	24,7	24,8	2,42 (dd, 7,8; 19,2) 2,00 (dd, 5,4; 19,2)	22	204,9	204,9	-
8	44,3	44,4	1,95 (d, 7,8)	23	120,0	121,3	6,85 (d, 15,6)
9	49,7	49,7	-	24	155,3	155,3	6,99 (d, 15,6)
10	34,9	34,9	2,50 (d, 13,2)	25	71,5	71,5	-
11	216,0	216,1	-	26	29,2	29,2	1,21 (s)
12	49,9	49,8	2,58 (t, 4,8) 2,54 (t, 4,8)	27	25,4	25,3	1,34 (s)
13	49,4	49,7	-	28	22,3	22,3	0,98 (s)
14	51,9	51,9	-	29	25,4	25,4	1,19 (s)
15	46,6	46,6	1,39 (m) 1,83 (m)	30	20,7	20,6	0,92 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d50 MHz, [#]δ_C của cucurbitacine F đo trong CD₃OD [150]

Trên phổ COSY của **OE11** xuất hiện 4 hệ tương tác spin-spin của các proton liền kề bao gồm H-3/H-2/H-1/H-10, H-6/H-7/H-8, H-15/H-16/H-17, H-23/H-24 được biểu diễn trên hình 4.60. Trên phổ HMBC của **OE11**, tương tác giữa Me-28 (δ_H 0,98) và Me-29 (δ_H 1,19) với C-3 (δ_C 81,9), C-4 (δ_C 43,4), C-5 (δ_C 142,7) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này gắn vào C-4. Tương tác HMBC giữa Me-18 (δ_H 1,09) với C-8 (δ_C 44,4), C-12 (δ_C 49,8), C-13 (δ_C 49,7), C-17 (δ_C 59,4); giữa Me-19 (δ_H 1,32) với C-8 (δ_C 44,4), C-9 (δ_C 49,7), C-10 (δ_C 34,9), C-11 (δ_C 216,1); giữa Me-21 (δ_H 1,40) với C-17 (δ_C 59,4), C-20 (δ_C 79,9); giữa Me-30 (δ_H 0,92) với C-13 (δ_C 49,7), C-14 (δ_C 51,9), C-15 (δ_C 46,6), C-17 (δ_C 59,4) cho phép xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đính trực tiếp lần lượt tại C-13, C-9, C-20 và C-14 của khung cucurbitane. Tương tác giữa Me-26 (δ_H 1,21) và Me-27 (δ_H 1,34) với C-23 (δ_C 121,3), C-24 (δ_C 155,3), C-25 (δ_C 71,5) và sự tương tác lẫn nhau của chúng cho phép xác định vị trí của hai nhóm methyl này được gắn tại C-25. Từ tất cả phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [150] thì cấu trúc của hợp chất **OE11** được xác định là cucurbitacin F.

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

diene-11-one



Hình 4.61. Cấu trúc hóa học của hợp chất OE12

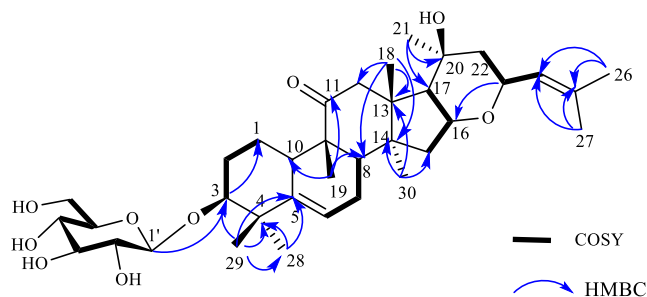
Bảng 4.25. Số liệu phổ NMR của hợp chất OE12

C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	22,4	1,33 (m); 1,6 (d, 3,0)	19	20,5	1,09(s)
2	28,8	1,77 (m) 2,03 (m)	20	72,5	-
3	87,9	3,44 (br. s)	21	29,0	1,29 (s)
4	42,7	-	22	49,8	1,43 (m)
5	142,1	-	23	74,5	4,59 (m)
6	119,6	5,64 (d, 6,0)	24	126,5	5,15 (d, 8,4)
7	24,9	1,93 (m); 2,40 (m)	25	136,9	-
8	44,2	1,98 (m)	26	25,8	1,74 (s)
9	50,9	-	27	18,4	1,72 (s)
10	36,5	2,37 (m)	28	28,6	1,07 (s)
11	216,6	-	29	25,9	1,26 (s)
12	49,5	2,36 (m); 3,14 (m)	30	21,6	1,27 (s)
13	48,7	-	1'	106,6	4,30 (d, 7,8)
14	48,6	-	2'	75,6	3,18 (d, 4,8)
15	41,7	1,41 (m), 1,87 (m)	3'	78,3	3,32 (m)
16	77,6	4,43 (m)	4'	71,7	3,29 (m)
17	56,4	1,99 (m)	5'	77,6	3,22 (m)
18	20,1	0,94 (s)	6'	62,9	3,67 (dd, 6,0; 12,0) 3,84 (dd, 2,4; 12,0)

^a150MHz, ^b600MHz, ^cCD₃OD [151]

Hợp chất OE12 phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ¹H NMR xuất hiện các pic đặc trưng cho khung cucurbitane với các tín hiệu của tám nhóm methyl từ δ_H 0,94 đến 1,74, cụ thể là δ_H 0,94 (3H, s, H-18), 1,07 (3H, s, H-28), 1,09 (3H, s, H-19), 1,26 (3H, s, H-29), 1,27 (3H, s, H-30), 1,29 (3H, s, H-21), 1,72 (3H, s, H-27) và 1,74 (3H, s, H-26). Ngoài ra, phổ ¹H NMR còn có hai tín hiệu doublet của hai proton olefin tại δ_H 5,64 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6) và δ_H 5,15 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-24). Bên cạnh đó còn xuất hiện các tín hiệu proton methine và methylene trong khoảng δ_H 1,33 – 2,40 ppm. Các nhóm oxymethine δ_H 3,44 (s, H-3), 4,43 (ddd, $J =$

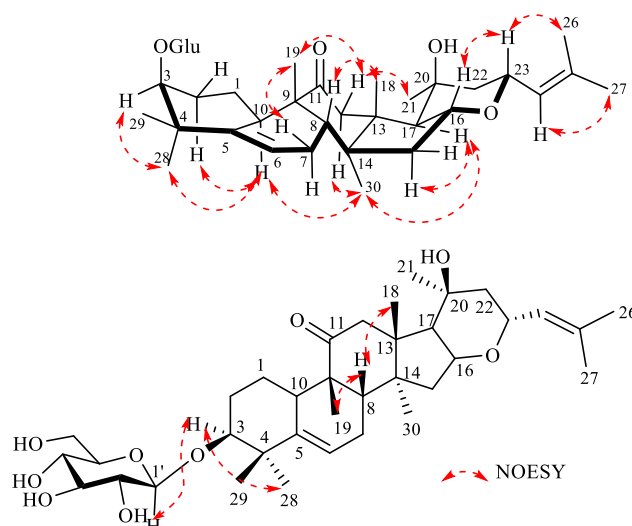
3,6; 10,2; 3,6 Hz, H-16), 4,59 (m, H-23) cũng được quan sát trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **OE12**. Trên phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất **OE12** cho thấy tín hiệu của 36 nguyên tử carbon gồm 30 nguyên tử carbon đặc trưng của triterpenoid thuộc nhóm cucurbitacin và 6 nguyên tử carbon thuộc một đơn vị đường hexose. Proton anomer của hợp chất **OE12** tại δ_{H} 4,30 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1') có hằng số tương tác $J = 7,8$ Hz cho phép xác định cấu hình β của liên kết glycoside.



Hình 4.62. Các tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất **OE12**

Trên phổ COSY của **OE12** xuất hiện năm hệ tương tác spin-spin của các proton liền kề bao gồm H-3/H-2/H-1/H-10, H-6/H-7/H-8, H-15/H-16/H-17, H-22/H-23/H-24, H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6' được biểu diễn trên hình 4.62. Trên phổ HMBC của **OE12**, tương tác giữa Me-28 (δ_{H} 1,07) và Me-29 (δ_{H} 1,26) với C-3 (δ_{C} 87,9), C-4 (δ_{C} 42,7), C-5 (δ_{C} 142,1) chỉ ra rằng hai nhóm methyl này gắn vào C-4. Tương tác HMBC giữa Me-18 (δ_{H} 0,94) với C-8 (δ_{C} 44,2), C-12 (δ_{C} 49,5), C-13 (δ_{C} 48,7), C-17 (δ_{C} 56,4); giữa Me-19 (δ_{H} 1,09) với C-8 (δ_{C} 44,4), C-9 (δ_{C} 50,9), C-10 (δ_{C} 36,5), C-11 (δ_{C} 216,6); giữa Me-21 (δ_{H} 1,29) với C-17 (δ_{C} 56,4), C-20 (δ_{C} 72,5); giữa Me-30 (δ_{H} 1,27) với C-13 (δ_{C} 48,7), C-14 (δ_{C} 48,6), C-15 (δ_{C} 41,7) cho phép xác định vị trí của bốn nhóm methyl được đính trực tiếp lần lượt tại C-13, C-9, C-20 và C-14 của khung cucurbitane. Tương tác giữa Me-26 (δ_{H} 1,74) và Me-27 (δ_{H} 1,72) với C-24 (δ_{C} 126,5), C-25 (δ_{C} 136,9) và sự tương tác lẫn nhau của chúng cho phép xác định vị trí của hai nhóm methyl này được gắn tại C-25. Tương tác HMBC giữa proton H-23 với C-16 và độ chuyển dịch hóa học của chúng khẳng định cho liên kết C₁₆-O-C₂₃ (Hình 4.62). Ngoài ra, tương tác HMBC của H-3 với C-1', C-5 và H-1' với C-3, C-2', C-3' cho thấy đơn vị đường gắn với phần aglycon ở vị trí C-3.

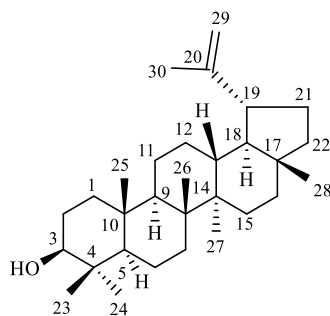
Cấu hình α của proton ở vị trí C-3 được xác định bằng tương tác trên phổ NOESY của H-3 (δ_{H} 3,69) và H-28 (δ_{H} 1,07). Bên cạnh đó phổ NOESY xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H _{α} -3 và H-1' gợi ý cấu hình α của proton tại vị trí C-1', tương tác giữa H-8 và H-18/H-19 cho phép xác định cấu hình β của proton ở C-8. Thêm nữa, trên phổ NOESY cũng quan sát thấy tín hiệu tương tác giữa H-17/H-30 gợi ý cấu hình α của proton tại vị trí C-17, các tương tác giữa H-16 và H-26/H-23, H-24/H-27 cho phép xác định cấu hình β của H-16, H-23.



Hình 4.63. Các tương tác NOESY chính của hợp chất **OE12**

Từ tất cả những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo [151] cho phép xác định được hợp chất **OE12** là 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one.

4.1.2.13. Hợp chất **OE13**: Lupeol



Hình 4.64. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE13**

Hợp chất **OE13** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D, 2D cho thấy **OE13** có cấu trúc tương tự với **OE9** chỉ khác duy nhất một điểm là xuất hiện nhóm -OH ở vị trí C-3 trong khung lupane. Trên phổ ^1H NMR cũng cho thấy các tín hiệu đặc trưng của các proton singlet của 7 nhóm methyl tại δ_{H} 0,76 (3H, s, H-24), 0,95 (3H, s, H-23), 1,03 (3H, s, H-25), 0,94 (3H, s, H-26), 0,83 (3H, s, H-27), 0,79 (3H, s, H-28), 1,68 (3H, s, H-30), hai proton methylene sp^2 tại δ_{H} 4,69 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H_{a} -29), 4,57 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H_{b} -29) tương tự như **OE9**.

Phổ ^{13}C NMR cũng cho thấy **OE13** có 30 nguyên tử carbon, trong đó có hai carbon là của liên kết olefin tại δ_{C} 150,9 (C-20) và 109,3 (C-29), bảy nhóm methyl, mười nhóm methylene sp^3 , năm nhóm methine sp^3 , năm carbon không liên kết hydro. Trên phổ ^{13}C NMR của **OE13** có tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_{C} 79,0 (C-3) là điểm khác duy nhất với **OE9**. Như vậy, kết hợp giữa các tín hiệu thu được trên phổ ^1H NMR, phổ ^{13}C NMR có thể nhận định 30 nguyên tử carbon thuộc khung lupane

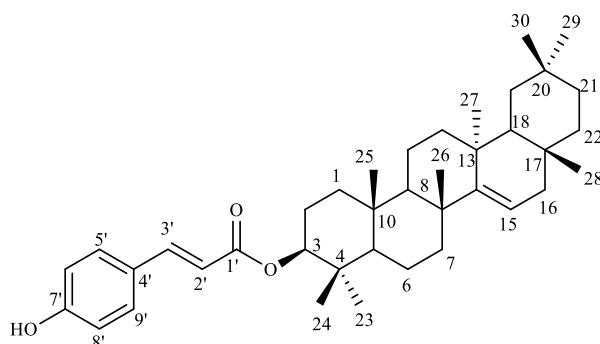
giống **OE9**. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **OE13** với dữ liệu đã công bố của hợp chất lupeol [152] cho phép xác định hợp chất **OE13** chính là lupeol.

Bảng 4.26. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE13** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	* $\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	38,7	38,7	1,66 (m)	16	35,6	35,6	1,47 (m) 1,38 (m)
2	27,4	27,4	1,56 (m) 1,64 (m)	17	43,0	43,0	-
3	79,0	79,0	3,20 (dd, 11,4, 4,8)	18	48,3	48,3	1,36 (m)
4	38,8	38,8	-	19	48,0	48,0	2,39 (m)
5	52,3	55,3	0,67 (m)	20	151,0	150,9	
6	18,3	18,3	1,50 (m) 1,4 (m)	21	30,0	29,9	1,92 (m) 1,32 (m)
7	34,3	34,3	1,38 (m)	22	40,0	40,0	1,38 (m) 1,18 (m)
8	40,8	40,8	-	23	27,4	28,0	0,95 (s)
9	50,4	50,5	1,26 (m)	24	15,4	15,4	0,76 (s)
10	37,2	37,2	-	25	15,9	16,0	1,03 (s)
11	20,9	20,9	1,41 (m) 1,21 (m)	26	16,1	16,1	0,94 (s)
12	25,1	25,2	1,67 (m) 1,05 (m)	27	14,5	14,5	0,83 (s)
13	38,0	38,1	0,91 (m)	28	18,0	18,0	0,79 (s)
14	42,8	42,8	-	29	109,3	109,3	4,69 (d, 2,4) 4,57 (d, 2,4)
15	28,0	27,5	0,99 (m) 1,62 (m)	30	19,3	19,3	1,68 (s)

^a150 MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, * δ_C của lupeol đo trong CDCl₃ [152]

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



Hình 4.65. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE14**

Hợp chất **OE14** thu được dạng bột màu trắng. Cấu trúc của **OE14** được xác định tương tự taraxerol chỉ khác ở vị trí C-3 được thay thế bởi nhóm *trans*-coumaroyl khi phân tích các dữ kiện phổ. Các tín hiệu đặc trưng cho 1 hợp chất triterpenoid thu

được trên phổ ^1H NMR của hợp chất **OE14** tương tự với các tín hiệu proton thu được từ **MS5**.

Bảng 4.27. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE14** và chất tham khảo

C	# $\delta_{\text{C}^{\text{a,c}}}$	$\delta_{\text{C}^{\text{a,c}}}$	$\delta_{\text{H}^{\text{b,c}}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)	C	# $\delta_{\text{C}^{\text{a,c}}}$	$\delta_{\text{C}^{\text{a,c}}}$	$\delta_{\text{H}^{\text{b,c}}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	37,4	37,4	1,08 (m)	21	33,1	33,1	1,23 (m) 1,33 (m)
2	23,5	23,6	1,64 (m) 1,69 (m)	22	35,1	35,1	1,00 (m) 1,36 (m)
3	81,0	80,9	4,59 (dd, 11,4; 5,4)	23	28,0	28,0	0,90 (s)
4	37,9	37,9	-	24	16,8	16,8	0,96 (s)
5	55,7	55,7	0,91 (m)	25	15,5	15,5	0,98 (s)
6	18,7	18,7	1,49 (m) 1,62 (m)	26	25,9	25,9	1,11 (s)
7	41,2	41,2	1,38 (m) 2,04 (dt, 12,6; 3,0)	27	21,3	21,3	0,92 (s)
8	39,0	39,0	-	28	29,7	29,8	0,83 (s)
9	49,2	49,2	1,47 (m)	29	33,3	33,3	0,96 (s)
10	37,9	37,9	-	30	29,9	29,9	0,91 (s)
11	17,5	17,5	1,49 (m) 1,62 (m)	1'	167,3	167,2	-
12	33,7	33,7	1,52 (m) 1,61 (m)	2'	116,3	116,4	6,31 (d, 16,2)
13	37,5	37,5	-	3'	143,9	143,9	7,61 (d, 16,2)
14	158,0	158,0	-	4'	127,4	127,4	-
15	116,9	116,9	5,54 (dd, 8,4; 3,0)	5'	129,9	129,9	7,44 (d, 8,4)
16	37,7	37,7	1,61 (m) 1,92 (dd, 3,0; 14,4)	6'	115,8	115,8	6,84 (d, 8,4)
17	35,8	35,8	-	7'	157,5	157,5	-
18	48,8	48,8	0,94 (m)	8'	115,8	115,8	6,84 d (8,4)
19	36,7	36,7	0,96 (m) 1,29 (m)	9'	129,9	129,9	7,44 d (8,4)
20	28,8	28,8	-				

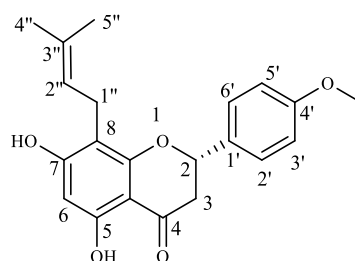
^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃, * δ_{C} của hợp chất 3-(E)-coumaroyltaraxerol đo trong CDCl₃[153]

Cụ thể, trên phổ ^1H NMR của **OE14** xuất hiện các tín hiệu của tám nhóm methyl tại δ_{H} 0,83 (3H, s, H-28), 0,96 (3H, s, H-29), 0,92 (3H, s, H-27), 0,91 (3H, s, H-30), 0,96 (3H, s, H-24), 0,90 (3H, s, H-23), 0,98 (3H, s, H-25), 1,11 (3H, s, H-26), cùng tín hiệu của một proton olefin tại δ_{H} 5,54 (1H, dd, $J = 3,6; 8,4$ Hz, H-15) và một

tín hiệu proton oxymethine tại δ_H 4,59 (1H, dd, $J = 5,4; 11,4$ Hz, H-3). Bên cạnh đó, trên phổ 1H NMR còn xuất hiện một hệ vòng thơm dạng A_2B_2 với các tín hiệu proton tại δ_H 6,84 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6'/H-8') và 7,44 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'/H-9'). Thêm nữa là 2 proton olefin khác với độ chuyển dịch δ_H 6,31 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-2') và 7,61 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-3') có hằng số tương tác $J = 16,2$ Hz cho thấy liên kết đôi này có cấu hình *trans*.

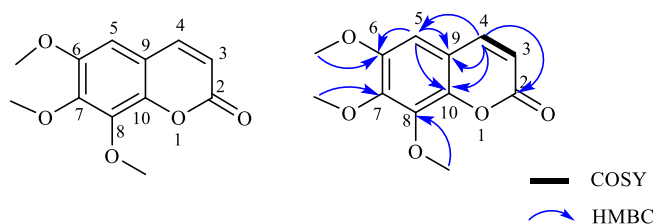
Trên phổ carbon thu được các tín hiệu của 39 carbon trong đó 30 carbon hoàn toàn phù hợp với một triterpenoid gồm tám nhóm methyl tại δ_C 28,0 (C-23), 16,8 (C-24), 18,5 (C-25), 25,9 (C-26), 21,3 (C-27), 29,8 (C-28), 33,3 (C-29), 29,9 (C-30), 9 nhóm methylen tại δ_C 37,4 (C-1), 23,6 (C-2), 18,7 (C-6), 41,2 (C-7), 17,5 (C-11), 33,7 (C-12), 36,7 (C-19), 33,1 (C-21), 35,1 (C-22), 3 nhóm methine sp^3 tại δ_C 55,7 (C-5), 49,2 (C-9), 48,8 (C-18); một nhóm methine sp^2 tại δ_C 116,9 (C-15); một nhóm oxymethine tại δ_C 80,9 (C-3) và tám carbon không liên kết hydro tại δ_C 37,9 (C-4), 39,0 (C-8), 37,9 (C-10), 37,5 (C-13), 158,0 (C-14), 35,8 (C-17), 28,8 (C-20). Chín nguyên tử carbon còn lại ứng với nhánh *trans* – coumaroyl trong đó có bốn nhóm methine thơm tại δ_C 129,9 (C-5'/C-9'), 115,8 (C-6'/C-8'), hai nhóm methine olefin tại δ_C 116,4 (C-2'), 143,9 (C-3'), một nhóm carbonyl tại δ_C 167,2 (C-1') và hai carbon không liên kết hydro tại δ_C 127,4 (C-4'), 157,5 (C-7'). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **OE14** thu được với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất 3-(*E*)-coumaroyltaraxerol [153] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **OE14** là 3-(*E*)-coumaroyltaraxerol.

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



Hình 4.66. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE15**

Hợp chất **OE15** thu được dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Phân tích các phổ cộng hưởng từ và so sánh số liệu phổ của **OE15** với hợp chất **MS8** cho thấy **OE15** giống hệt **MS8**, kết hợp với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí (bảng 4.8). Như vậy có thể kết luận được **OE15** là 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin.

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

Hình 4.67. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của hợp chất **OE16**

Bảng 4.28. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE16** và hợp chất tham khảo

C	^a δ _C ^{a,c}	δ _C ^{a,c}	δ _H ^{b,c} (dạng tín hiệu, J = Hz)
2	160,5	160,5	-
3	115,2	115,3	6,33 (d, 11,4)
4	143,4	143,4	7,59 (d, 11,4)
5	103,6	103,7	6,66 (s)
6	150,1	150,1	-
7	143,1	143,1	-
8	143,1	143,1	-
9	114,3	114,3	-
10	145,9	146,0	-
6-OCH ₃	56,3	56,3	3,89 (s)
8-OCH ₃	61,5	61,5	3,99 (s)
7-OCH ₃	61,8	61,8	4,04 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCDCl₃ *δ_C của hợp chất 6,7,8-trimethoxycoumarin

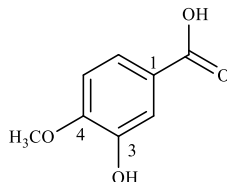
đo trong CDCl₃[154]

Hợp chất **OE16** phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ¹H NMR và ¹³C NMR của **OE16** có sự hiện diện của ba nhóm methoxy tại [δ_H 3,89 (3H, s, 6-OCH₃), δ_C 56,3 (6-OCH₃)], [δ_H 3,99 (3H, s, 8-OCH₃), δ_C 61,5 (8-OCH₃)], [δ_H 4,04 (3H, s, 7-OCH₃), δ_C 61,8 (7-OCH₃)]. Ngoài ra, còn quan sát được một nhóm methine thơm duy nhất tại [δ_H 6,67 (1H, s, H-5), δ_C 103,8 (C-5)] và hai nhóm methine olefin tại [δ_H 6,33 (1H, d, J = 11,4 Hz, H-3), δ_C 115,3 (C-3)] và [δ_H 7,59 (1H, d, J = 11,4 Hz, H-4), δ_C 143,4 (C-4)] của một liên kết đôi dạng -CH=CH-.

Trên phổ ¹³C NMR xuất hiện nhóm carboxyl có độ chuyển dịch hóa học δ_C 160,5 (C-2). Từ các phân tích trên cho thấy **OE16** là một dẫn xuất coumarine. Trên phổ tương tác HMBC quan sát được tương tác của H-5 (δ_H 6,66) với C-6 (δ_C 150,2), C-9 (δ_C 114,4), C-10 (δ_C 146,0); H-3 (δ_H 6,33) với C-2 (δ_C 160,5) và C-9 (δ_C 114,4); H-4 với C-5 (δ_C 103,7), C-9 (δ_C 114,4), C-10 (δ_C 146,0), C-2 (δ_C 160,5) đã khẳng định khung coumarine của hợp chất **OE16**. Vị trí của các nhóm methoxy được gán ở các carbon C-6, C-7, C-8 dựa trên các tương tác HMBC của các proton nhóm methoxy CH₃O-6, CH₃O-7, CH₃O-8 với các carbon C-6, C-7, C-8 tương ứng. Kết hợp so sánh

với các tài liệu tham khảo đã công bố [154] có thể kết luận được **OE16** là 6,7,8-trimethoxycoumarin hay dimethylfraxetin.

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



Hình 4.68. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE17**

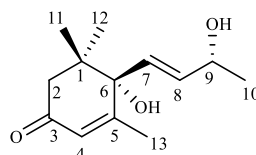
Bảng 4.29. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE17** và chất tham khảo

C	* $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	123,1	123,1	-
2	115,8	115,8	7,56 (d, 1,8)
3	148,6	148,7	-
4	152,6	152,7	-
5	113,8	113,8	6,85 (d, 8,4)
6	125,3	125,3	7,58 (dd, 1,8; 8,4)
-COOH	170,0	170,4	
4-OCH ₃	56,4	56,4	3,91 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD * δ_C của hợp chất 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid đo trong CD₃OD [155]

Hợp chất **OE17** phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ¹H NMR xuất hiện tín hiệu của một vòng thơm kiểu ABX tại δ_H 7,56 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-2), 6,85 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), 7,58 (1H, dd, $J = 1,8; 8,4$ Hz, H-6). Ngoài ra, còn có tín hiệu của một nhóm methoxy tại δ_H 3,91 (3H, s, 4-OCH₃) trên phổ cộng hưởng từ proton ¹H NMR. Mặt khác, trên phổ ¹³C NMR quan sát được một vòng thơm tại các vị trí δ_C 123,1 (C-1), 115,8 (C-2), 148,7 (C-3), 152,7 (C-4), 113,8 (C-5) và 125,3 (C-6) đều của các nguyên tử carbon sp^2 , đồng thời có tín hiệu của một nhóm carbonyl tại δ_C 170,4 gắn ở vị trí C-1. Kết hợp với việc so sánh dữ liệu phổ của **OE17** với tài liệu đã được công bố [155] cho phép kết luận **OE17** là 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid.

4.1.2.18. Hợp chất **OE18**: Vomifoliol



Hình 4.69. Cấu trúc hóa học của hợp chất **OE18**

Hợp chất **OE18** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ ¹H-NMR xuất hiện các tín hiệu singlet của ba nhóm methyl singlet tại δ_H 1,06 (3H, s, H-12),

1,04 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-10), δ_{H} 1,04 (3H, s, H-11), một nhóm methyl doublet tại δ_{H} 1,27 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-10), một nhóm methylene tại δ_{H} 2,49 (1H, d, $J = 16,8$ Hz, H_a-2), 2,17 (1H, d, $J = 16,8$ Hz, H_b-2) và bốn nhóm methine (một nhóm methine sp^3 tại δ_{H} 4,32 (1H, m, H-9), một nhóm methine sp^2 tại δ_{H} 5,89 (1H, s) và hai nhóm methine sp^2 thuộc về một liên kết đôi có cấu hình *trans* tại δ_{H} 5,80 (1H, dd, $J = 14,0$; 5,0 Hz, H-8), 5,81 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-7). Trên phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của 13 carbon bao gồm 1 nhóm carbonyl tại δ_{C} 201,2, bốn nhóm methyl tại δ_{C} 19,5 (C-12), 23,4 (C-13), 23,8 (C-10), 24,5 (C-11), một nhóm methylene tại δ_{C} 50,7 (C-2), ba nhóm methine sp^2 tại δ_{C} 127,1 (C-4), 129,9 (C-7), 136,9 (C-8); hai nhóm oxymethine tại δ_{C} 79,9 (C-6), 68,6 (C-9) và hai carbon không liên kết hydro tại δ_{C} 42,4 (C-1), 161,5 (C-5). Cấu trúc của vòng cyclohexenone được khẳng định khi quan sát trên phổ HMBC thấy có sự tương tác của H_a-3, H_b-3 với C-3, C-4, C-6, C-1. Vị trí của nhánh ở C-6 được xác nhận lại bởi sự tương tác của H-7 với C-6 quan sát được trên HMBC. Trên phổ tương tác COSY xuất hiện tín hiệu tương tác của proton H-7 với H-8, H-8 với H-9. So sánh số liệu phổ ^{13}C NMR của **OE18** với các số liệu đã được công bố (bảng 4.30) [156] cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **OE18** là vomifoliol.

Bảng 4.30. Số liệu phổ NMR của hợp chất **OE18** và hợp chất tham khảo

C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{d,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ (dạng tín hiệu, $J = \text{Hz}$)
1	42,3	42,4	-
2	49,9	50,7	2,48 (d, 16,8) 2,16 (d, 16,8)
3	200,9	201,2	-
4	125,9	127,1	5,89 (s)
5	161,5	161,5	-
6	79,9	79,9	-
7	130,0	129,9	5,81 (d, 14,0)
8	136,9	136,9	5,80 (dd, 14,0; 5,0)
9	68,7	68,6	4,32 (m)
10	23,8	23,8	1,27 (d, 6,6)
11	24,7	24,5	1,04 (s)
12	20,0	19,5	1,06 (s)
13	23,5	23,5	1,94 (s)

^a150MHz, ^b600 MHz, ^cCD₃OD, ^d65 MHz * δ_{C} của hợp chất vomifoliol đo trong CD₃OD [156]

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

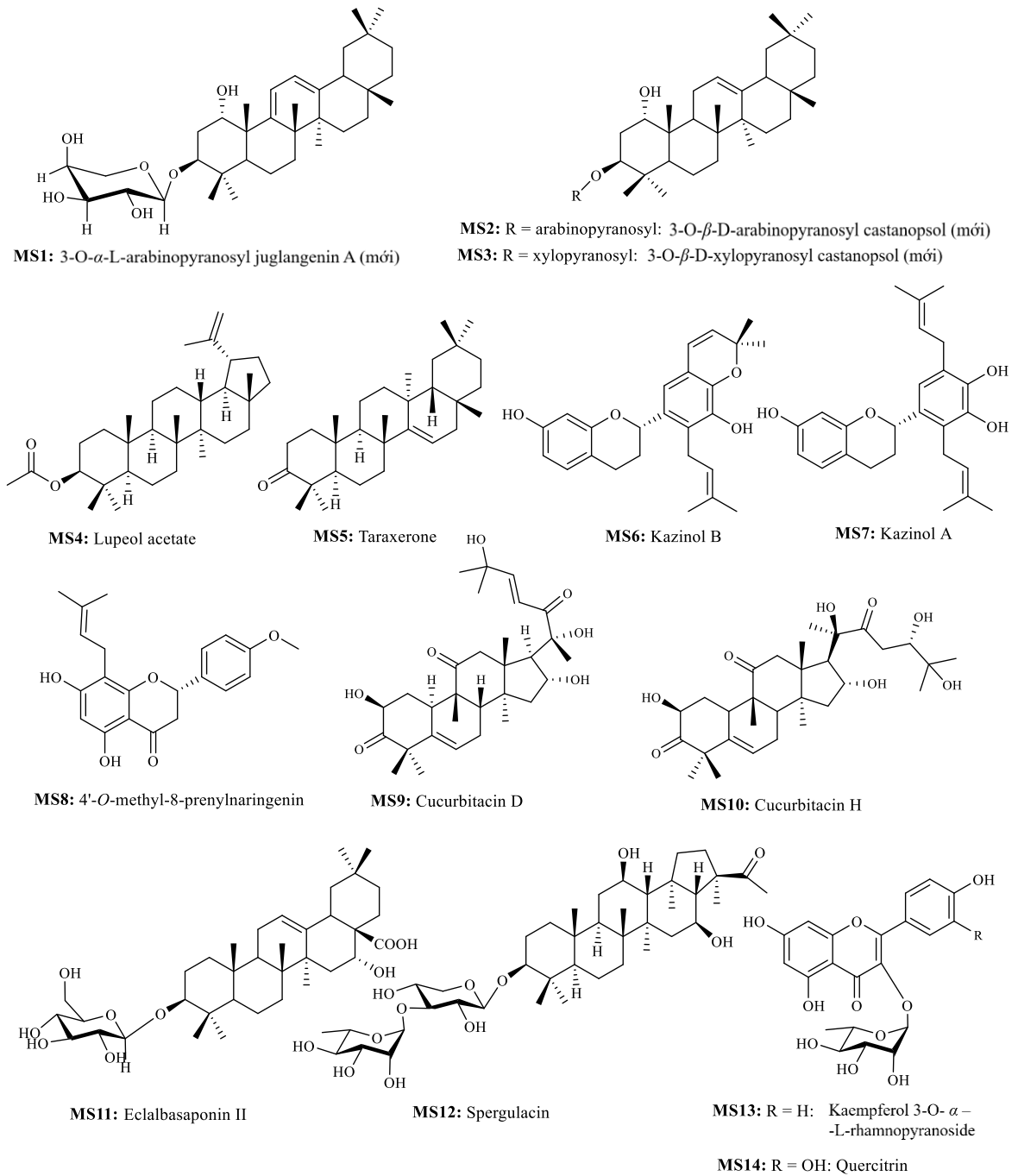
Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp từ hai loài xay răng nhọn và bản giác đã phân lập và xác định cấu trúc của 32 hợp chất bao gồm: 10 hợp chất flavonoid (kazinol B (**MS6**), kazinol A (**MS7**), 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin (**MS8**, **OE15**),

kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**MS13**), quercitrin (**MS14**), 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone (**OE2**), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone (**OE3**), chrysoeriol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**OE6**), 16 hợp chất triterpene saponin và triterpenoid (myrsineoside A (**MS1**), myrsineoside B (**MS2**), myrsineoside C (**MS3**), 3- α -L-arabinopyranosyl castanopsol (**MS2**), lupeol acetate (**MS4**, **OE1**), taraxerone (**MS5**), cucurbitacin D (**MS9**), cucurbitacin H (**MS10**), eclalbasaponin II (**MS11**), spergulacin (**MS12**), 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**)) và 6 hợp chất khác (dehydrovomifoliol (**OE4**), protocatechuic acid (**OE5**), 7*Z*-roseoside (**OE7**), 6,7,8-trimethoxycoumarin (**OE16**), 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (**OE17**), vomifoliol (**OE18**)).

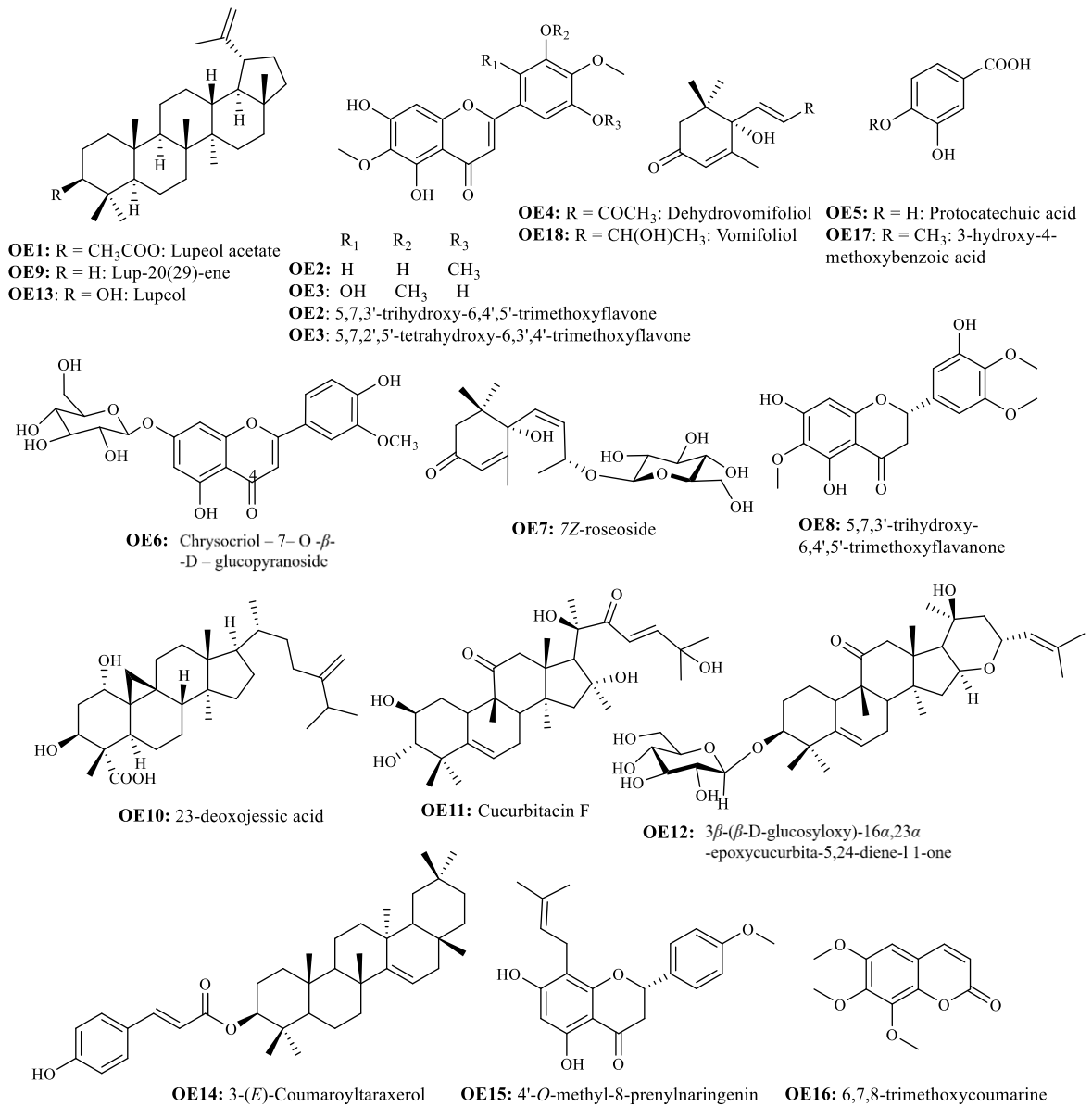
Đặc biệt, 3 hợp chất: myrsineoside A (**MS1**), myrsineoside B (**MS2**) và myrsineoside C (**MS3**) phân lập từ loài *M. semiserrata* là những hợp chất mới, cùng 18 hợp chất phân lập từ loài *O. eberhardtii* là những hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Oligoceras*.

Thành phần hóa học chính từ loài *M. semiserrata* được nghiên cứu chủ yếu là các hợp chất terpenoid (khung oleanane, lupane, cucurbitane và hopane) và flavonoid hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đó về thành phần chính của chi *Myrsine*.

Cấu trúc hóa học của các hợp chất trên được xác định dựa vào các dữ liệu phổ IR, HR-ESI-MS, MS, 1D, 2D NMR, đồng thời so sánh với các tài liệu đã công bố trước đây đối với các hợp chất đã biết.



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*

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 IC₅₀ > 200 μM

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 (MCF7), 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, MCF7 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 (IC₅₀ = 6,76 ± 0,15).

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 $43,57 \pm 1,41 \mu M$ 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 $32,80 \pm 0,77 \mu M$ 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-prenylnaringenin (**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 3β -(β -D-glucosyloxy)- $16\alpha,23\alpha$ -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 $38,34 \pm 1,28 \mu M$ so với chất đối chứng dương ellipticine ($IC_{50} = 1,78 \mu M$), 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 bốn 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, ...[155]. 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.

Ta thấy **MS2** có biểu hiện khả năng gây độc tế bào ở mức trung bình với hai dòng ung thư biểu mô và ung thư phổi trong khi **MS1** lại có biểu hiện gây độc yếu với hai dòng này, điều này có thể là do sự xuất hiện thêm một nối đôi ở vị trí C9-C11 trong khung oleanane của **MS1**. Thêm nữa, hợp chất **MS3** hầu hết đều có biểu hiện gây độc yếu hơn ở cả 4 dòng tế bào thử nghiệm so với **MS2** là do sự có mặt của đơn vị đường khác nhau ở hai hợp chất có cùng khung này.

Các hợp chất **OE12**, **MS9**, **MS10** đều là các hợp chất cucurbitacin tuy nhiên hợp chất **OE12** có biểu hiện gây độc tế bào trung bình đến yếu với ba dòng tế bào ung thư biểu mô, ung thư gan, ung thư vú trong khi **MS9**, **MS10** đều có biểu hiện gây độc tế bào khá mạnh với ba dòng này. Điều này có thể giải thích do sự đóng vòng epoxy và gắn thêm đường glucose ở C-3 trong khung cucurbitane của hợp chất **OE12** này.

Mỗi sự thay thế của các nhóm thế trong cấu trúc sẽ quyết định hoạt tính sinh học riêng của chúng. Qua các nghiên cứu cho thấy giữa cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất có mối tương quan với nhau, tuy nhiên không có một quy tắc chung nào về mối quan hệ giữa cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của chúng.

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*

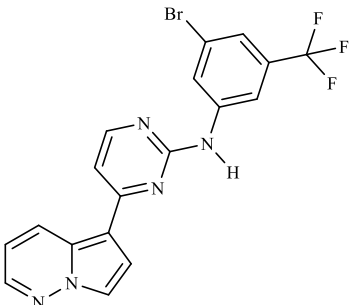
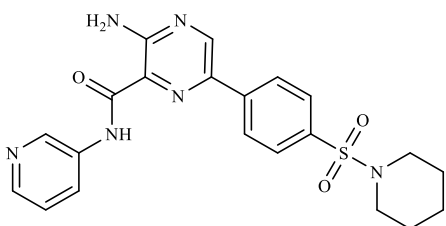
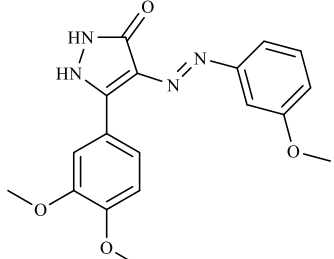
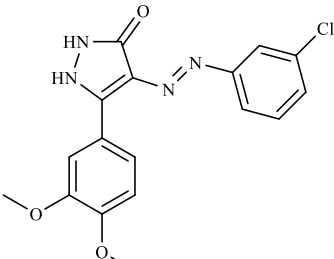
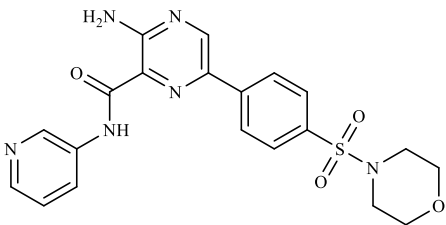
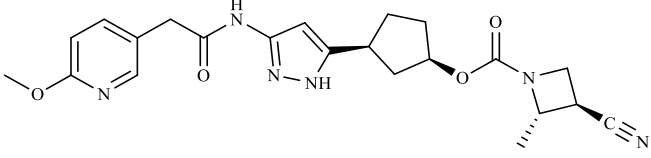
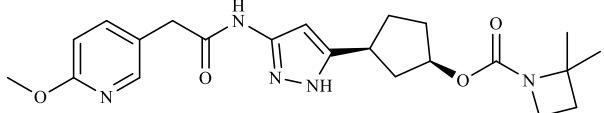
4.2.2.1. Kiểm tra sự phù hợp khả năng tính toán của phiên bản mVina với 11 chất ức chế GSK-3 β đã biết

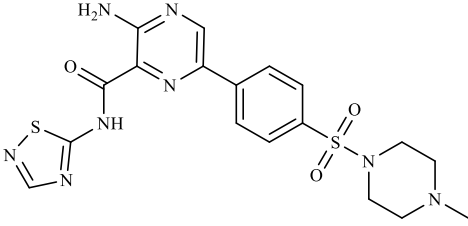
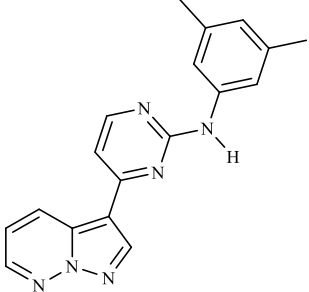
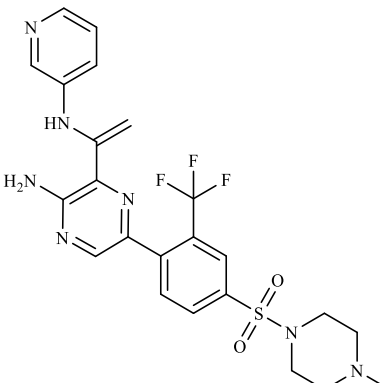
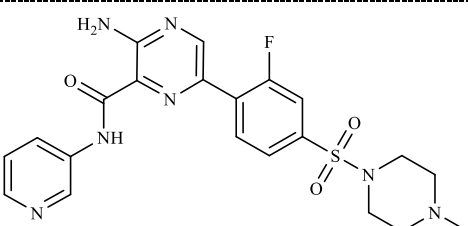
a) Sử dụng docking phân tử tính toán đối với 11 chất ức chế GSK-3 β đã biết

Thông thường, mô phỏng lắp ghép phân tử có thể dự đoán cấu hình liên kết của phối tử với protein. Phiên bản mVina là một phiên bản cải tiến của AutoDock Vina [39], được xem là một trong những phần mềm lắp ghép phân tử phổ biến nhất, đã được sử dụng rộng rãi trong các công thức nghiên cứu thuốc có sự hỗ trợ của máy tính, với hơn 20 nghìn trích dẫn trong 12 năm qua. Do đó, công cụ này được sử dụng để tính toán sơ bộ về năng lượng tự do liên kết và cấu hình liên kết của các phối tử với GSK-3 β .

Trước tiên phải đánh giá độ tin cậy của phiên bản mVina trên GSK-3 β bằng cách kiểm tra với 11 chất ức chế đã biết trong ngân hàng cơ sở dữ liệu thực nghiệm hoạt tính sinh học của Mỹ. Cấu trúc hóa học của 11 chất ức chế đã biết được thể hiện trong bảng 4.32.

Bảng 4.32. Cấu trúc hóa học của 11 hợp chất ức chế GSK-3 β đã biết

STT	Hợp chất	Cấu trúc hóa học
1	CHEMBL365229	
2	CHEMBL2177163	
3	CHEMBL1088145	
4	CHEMBL1088011	
5	CHEMBL2177165	
6	CHEMBL4758595	
7	CHEMBL4764153	

STT	Hợp chất	Cấu trúc hóa học
8	CHEMBL2177177	
9	CHEMBL186101	
10	CHEMBL2177155	
11	CHEMBL2182001	

Sử dụng công thức Cheng-Prusoff [42], hằng số ức chế K_i được tính như sau:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \rightarrow IC_{50} = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) + \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \times \frac{[S]}{K_m}$$

Trong điều kiện lý tưởng, giả sử giá trị IC_{50} bằng K_i , năng lượng tự do liên kết thực nghiệm có thể được suy ra từ công thức nói trên như sau:

$$\Delta G_{\text{exp}} = RT \ln(K_i) = RT \ln(IC_{50})$$

Trong đó, $R = 1,987 \times 10^{-3}$ (kcal/K.mol); $T = 300$ (K) và hằng số ức chế K_i được đo bằng mol. Năng lượng ΔG được đo bằng kcal.mol⁻¹. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4.33 và bảng 4.34:

Bảng 4.33. Cấu hình liên kết giữa GSK-3 β và 11 chất ức chế đã biết

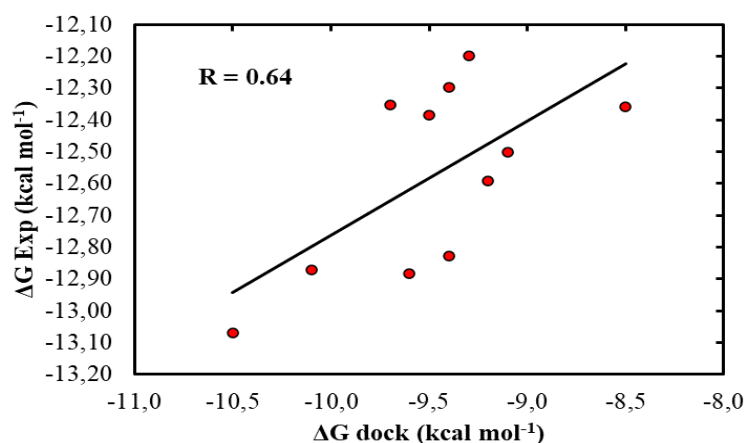
TT	Hợp chất	Cấu hình liên kết	TT	Hợp chất	Cấu hình liên kết
1	CHEMBL 365229		7	CHEMBL 4764153	
2	CHEMBL 2177163		8	CHEMBL 2177177	
3	CHEMBL 1088145		9	CHEMBL 186101	
4	CHEMBL 1088011		10	CHEMBL 2177155	
5	CHEMBL 2177165		11	CHEMBL 2182001	
6	CHEMBL 4758595				

Bảng 4.34. Điểm số của các chất ức chế GSK-3 β có sẵn so với giá trị thử nghiệm^a

TT	Hợp chất	K_i	ΔG_{Dock}	ΔG_{EXP}
1	CHEMBL365229	0,30	-10,5	-13,07 [43]
2	CHEMBL2177163	0,42	-10,1	-12,87 [44]
3	CHEMBL1088145	0,41	-9,6	-12,88 [45]
4	CHEMBL1088011	0,45	-9,4	-12,83 [45]
5	CHEMBL2177165	0,67	-9,2	-12,59 [44]
6	CHEMBL4758595	0,78	-9,1	-12,50 [46]
7	CHEMBL4764153	0,95	-9,5	-12,38 [46]
8	CHEMBL2177177	0,99	-8,5	-12,36 [44]
9	CHEMBL186101	1,00	-9,7	-12,35 [43]
10	CHEMBL2177155	1,10	-9,4	-12,30 [44]
11	CHEMBL2182001	1,30	-9,3	-12,20 [46]

^aĐơn vị của hằng số ức chế và năng lượng tự do liên kết lần lượt là nM và kcal.mol⁻¹

Hệ số tương quan giữa năng lượng tự do liên kết mô phỏng và năng lượng tự do liên kết thực nghiệm được xác định là $R = 0,64$ (Hình 4.72) cho thấy mVina có thể dự đoán một cách tương đối tốt năng lượng tự do liên kết của phối tử với GSK-3 β . Kết quả thu được bước đầu bởi mô phỏng docking phân tử này tiếp tục được tinh chỉnh bởi mô phỏng động lực học phân tử.



Hình 4.72. Hệ số tương quan giữa năng lượng tự do liên kết mô phỏng và năng lượng tự do liên kết thực nghiệm

b) Sử dụng mô phỏng động lực học phân tử tinh chỉnh kết quả docking phân tử đối với 11 chất ức chế GSK-3 β đã biết

Mặc dù mVina thể hiện hệ số tương quan khá tin cậy với dữ liệu thực nghiệm, tuy nhiên docking phân tử chỉ là quá trình mô phỏng bước đầu với các tính toán sơ cấp. Do đó, cần phải xác nhận kết quả docking bằng các phương pháp tính toán chính

xác và chuyên sâu hơn để đảm bảo độ chính xác [49, 50]. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp kéo phối tử nhanh (Fast pulling ligand - FPL) là một phương pháp phù hợp để tinh chỉnh nhanh chóng và chính xác năng lượng tự do liên kết [40]. Độ chính xác của kỹ thuật này đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây [51-53]. Cấu hình liên kết của phối tử - protein (phức hệ) có từ mô phỏng docking phân tử được chọn làm dữ liệu đầu vào cho mô phỏng MD. Phức hệ được tiến hành mô phỏng động lực học phân tử trong 20 ns với 8 quỹ đạo lặp lại, kết quả cho thấy phức hệ đạt đến trạng thái cân bằng trên tất cả các quỹ đạo nhanh chóng sau 5ns.

Do đó, cấu hình liên kết cuối cùng của phức hệ thu từ mô phỏng MD được sử dụng làm dữ liệu đầu vào để tính toán ái lực liên kết thông qua mô phỏng FPL. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật FPL đã được áp dụng trên 11 chất ức chế đã biết, trong đó sử dụng một ngoại lực tác dụng lên khối tâm của mỗi chất ức chế, khiến chúng di chuyển ra khỏi vùng liên kết với GSK-3 β trong khoảng thời gian mô phỏng 700 ps. Lực kéo nhanh chóng đạt giá trị tối đa, xấp xỉ trong vòng 200 ps, trước khi đột ngột trở về 0, điều này có nghĩa đã không còn sự liên kết giữa protein và phối tử. Giá trị công kéo cao nhất được ghi lại tương ứng với lực gây gãy đứt liên kết. Trong suốt quá trình mô phỏng, công của lực kéo cũng được tính toán. Dữ liệu thu được bao gồm lực gây gãy đứt liên kết trung bình, $\langle F_{Max} \rangle$ và công kéo, $\langle W \rangle$, được báo cáo trong bảng 4.35.

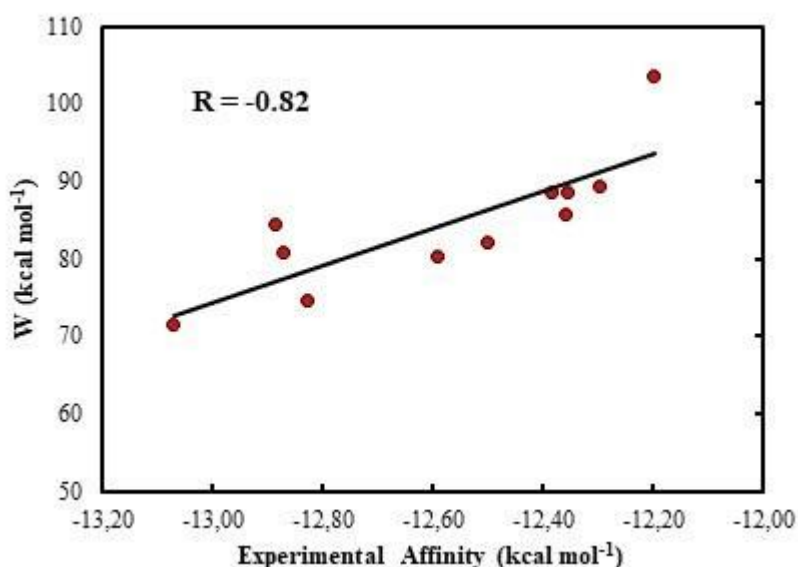
Bảng 4.35. Kết quả mô phỏng FPL của các chất ức chế GSK-3 β có sẵn so với giá trị thử nghiệm^a

Hợp chất	$\langle F_{Max} \rangle$	$\langle W \rangle$	ΔG_{EXP}
CHEMBL365229	541,7 \pm 17,6	71,5 \pm 3,1	-13,07 [43]
CHEMBL2177163	672,6 \pm 25,2	80,7 \pm 2,9	-12,87 [44]
CHEMBL1088145	608,4 \pm 35,1	84,4 \pm 4,6	-12,88 [45]
CHEMBL1088011	597,8 \pm 24,0	74,6 \pm 3,4	-12,83 [45]
CHEMBL2177165	602,9 \pm 27,5	80,2 \pm 4,6	-12,59 [44]
CHEMBL4758595	722,5 \pm 31,6	82,1 \pm 5,1	-12,50 [46]
CHEMBL4764153	568,7 \pm 39,3	88,6 \pm 3,6	-12,38 [46]
CHEMBL2177177	693,3 \pm 22,4	85,8 \pm 2,2	-12,36 [44]
CHEMBL186101	679,1 \pm 32,5	88,5 \pm 4,5	-12,35 [43]
CHEMBL2177155	816,5 \pm 37,1	89,3 \pm 3,8	-12,30 [44]
CHEMBL2182001	894,4 \pm 38,9	103,5 \pm 4,0	-12,20 [46]

^aĐơn vị của lực, công và năng lượng tự do liên kết lần lượt là pN, kcal.mol⁻¹ và kcal.mol⁻¹

Lực gây gãy đứt liên kết trung bình thay đổi từ 541,7 \pm 17,6 đến 894,4 \pm 38,9 pN, cho giá trị trung bình là 672,5 \pm 32,4 pN. Trong khi đó, phạm vi công kéo trung bình dao động trong khoảng từ 71,5 \pm 3,1 đến 103,5 \pm 4,0 kcal. mol⁻¹, mang lại mức giá trị trung bình là 84,5 \pm 2,6 kcal. mol⁻¹. So sánh kết quả tính toán với năng lượng tự do liên kết thực nghiệm, hệ số tương quan lúc này đã tăng lên với giá trị là R_FPL=

-0,82 cho thấy rằng FPL đóng vai trò là một công cụ thích hợp để tinh chỉnh các kết quả lắp ghép phân tử (Hình 4.73).



Hình 4.73. Mối tương quan giữa công kéo (W) và năng lượng tự do liên kết thực nghiệm

Như vậy có thể xác nhận độ tin cậy của việc sử dụng dùng mVina và mô phỏng động lực học phân tử trong tính toán đối với các chất phân lập được từ *O. eberhardtii*.

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*

Ái lực liên kết của 18 hợp chất phân lập từ *Oligoceras eberhardtii* đến GSK-3 β được dự đoán bằng mVina. Các kết quả được thể hiện trong 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.

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)

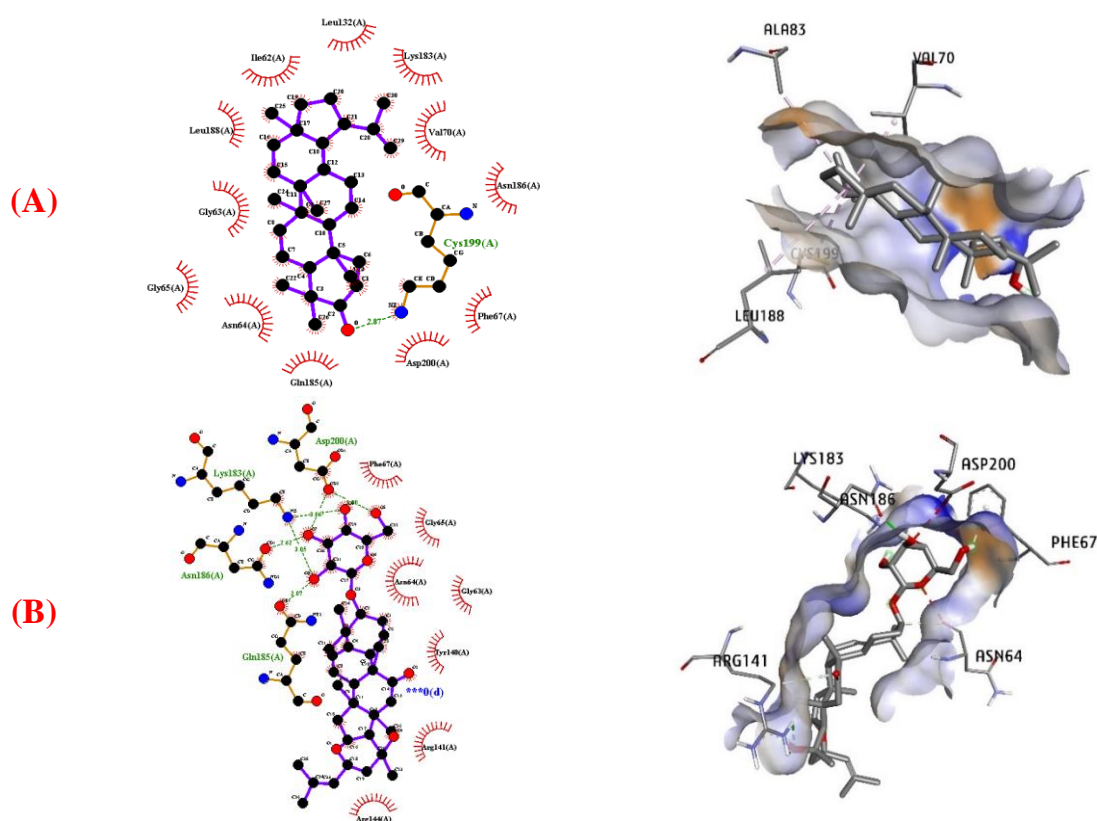
TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}	TT	Hợp chất	ΔG_{Dock}
1	OE1	-8,2	11	OE11	-7,9
2	OE2	-8,6	12	OE12	-9,4
3	OE3	-8,4	13	OE13	-9,1
4	OE4	-6,5	14	OE14	-8,5
5	OE5	-6,8	15	OE15	-7,7
6	OE6	-8,7	16	OE16	-7,5
7	OE7	-6,3	17	OE17	-7,0
8	OE8	-5,7	18	OE18	-6,2
9	OE9	-6,4	19	indirubin-3'-monoxime	-10,5
10	OE10	-8,6			

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.

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

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.



Hình 4.74. Cấu hình liên kết giữa **OE12** (A), **OE13** (B) với GSK-3 β

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.

b) Sử dụng mô phỏng động lực học phân tử tính toán đối với các chất phân lập được từ *O. eberhardtii*

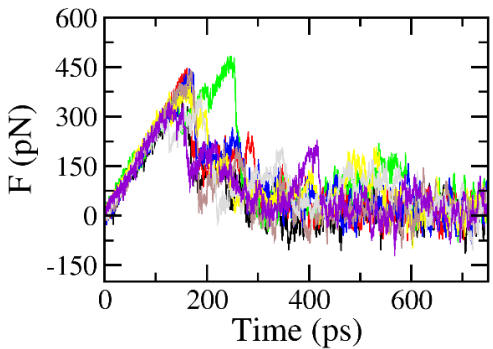
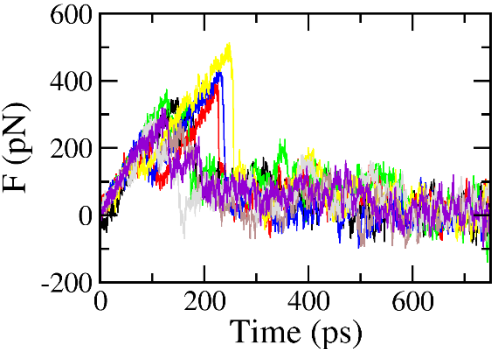
Thông qua phương pháp hồi quy tuyến tính, năng lượng tự do liên kết dự kiến của phối tử với GSK-3 β có thể được tính như sau:

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

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.

Các kết quả được trình bày chi tiết trong bảng 4.38 và hình 4.74. Cụ thể, 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.

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

TT	Hợp chất	Công kéo
1	OE12	
2	OE13	

Đồ thị lực gây gãy đứt 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 gãy đứt 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*

Bảng 4.40. 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	
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	Cycloheximide*							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 > 256 $\mu\text{g/ml}$.

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: 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml và 2µg/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* ATCC299212, *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 µg/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 µg/ml, **MS13** biểu hiện kháng 01 chủng gram dương là *Enterococcus faecalis* tương đương với chất đối kháng Streptomycin ở giá trị MIC 256 µg/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 µg/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.

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 xác định 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**), 7*Z*-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-trimethoxycoumarine (**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 $2,05 \pm 0,05$; $2,32 \pm 0,07$; $5,45 \pm 0,15$ μ M. **MS10** thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh đối với KB (IC₅₀ = $6,76 \pm 0,15$) và mức trung bình đối với HepG2 và MCF7 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là $11,21 \pm 0,34$, $37,56 \pm 1,22$ 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 IC₅₀ tương ứng là $43,57 \pm 1,41$ và $23,39 \pm 2,02$ μ 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 KB 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* và 18 hợp chất lần đầu được phân lập từ chi *Oligoceras*

- Ba hợp chất mới là: myrsineoside A, myrsineoside B, myrsineoside C.

- 18 hợp chất lần đầu phân lập từ chi *Oligoceras* gồm: Lupeol acetate, 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone, dehydrovomifoliol, protocatechuic acid, chrysoeriol-7-*O*- β -D-glucopyranoside, 7*Z*-roseoside, 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone, lup-20(29)-ene, 23-deoxojessic acid, cucurbitacin F, 3 β -(β -D-glucosyloxy)-16 α ,23 α -epoxycucurbita-5,24-diene-11-one, lupeol, 3-(*E*)-coumaroyltaraxerol, 4'-*O*-methyl-8-prenylnaringenin, 6,7,8-trimethoxycoumarin, 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid, vomifoliol.

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 IC₅₀ lần lượt 2,05 ± 0,05; 2,32 ± 0,07; 5,45 ± 0,15 μ M. Hai hợp chất mới myrsineoside B, myrsineoside C phân lập từ *M. semiserrata* và 3 β -(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 IC₅₀ lần lượt 43,57 ± 1,41; 23,39 ± 2,02 và 38,34 ± 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** (3 β -(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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, 2009, *Qui hoạch phát triển mạng lưới phòng chống ung thư tại Việt Nam giai đoạn 2009-2020*, Hà Nội.
2. Nguyễn Văn Hùng, 2011, Họ Na (Annonaceae)-Hóa học và hoạt tính sinh học của các loài *Desmos rostrata*, *Goniothalamus tamirensis*, *Fissistigma villosissium* - Quyển 1, *NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 2011.
3. R. Beaglehole, R. Bonita, R. Magnusson, 2011, Global cancer prevention: An important pathway to global health and development, *Public Health*, 125, 821-831.
4. M. J. Nirmala, A. Samundeeswari and P.D. Sankar, 2011, Natural plant resources in anti-cancer therapy – A review, *Research in Plant Biology*, 1 (3), 1-14.
5. R.J. Papac, 2001, Origins of Cancer Therapy, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 74, 391-398.
6. Paul M Dewick, 2002, Medicinal Natural Products, *John Wiley & Sons, LTD*, England.
7. Võ Văn Chi, 2004, Từ điển thực vật thông dụng, tập 2, *NXB Khoa học và kỹ thuật*.
8. Trần Thị Kim Liên, 2002, Thực vật chí Việt Nam, quyển 4, *NXB Khoa học và Kỹ thuật*.
9. Phạm Hoàng Hộ, 1999, Cây cỏ Việt Nam, quyển 1, *NXB trẻ*.
10. Zabta KS, Ashiq AK, Toshiyuki N, 2003, Medicinal plants and other useful plants of District Swat, *Pakistan, Al Aziz Press, Peshawar, Pakistan*, 79.
11. Kokwaro JO, 1993, Medicinal plants of East Africa, *Kenya Literature Bureau. Nairobi*, 2, 401.
12. Beentje HJ, 1994, Kenya trees, shrubs, and lianas, *National museums of Kenya, Nairobi*, 722.
13. Desta B, 1995, Ethiopian traditional herbal drugs. Part I: Studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medications, *J Ethnopharmacol*, 45:27-33.
14. Zhong HBC, 1985, State administration of traditional Chinese medicine of the people's republic of China, *Shanghai Science and Technology Press: Shanghai*, 3:245.
15. Xi – ning Zhong, Hideaki Otsuka, Toshinori ide, EiJi Hirata, Anki Takushi, Yoshio Takeda, 1997, Three Flavonol Glycosides from leaves of *Myrsine Seguinii*, *Phytochemistry*, Vol 46. No 5. pp 943 - 946.
16. K. R. Markham et al., 1978, Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives, *Tetrahedron*, Vol 34, pp 1389 – 1397.
17. Navneet Kishore, Danielle Twilley, Analike Blom van Staden, Praveen Verma, Bikram Singh, Giorgia Cardinali, Daniela Kovacs, Mauro Picardo, Vivek Kumar, Namrita Lall, 2018, Isolation of Flavonoids and Flavonoid Glycosides from *Myrsine africana* and Their Inhibitory Activities against Mushroom *Tyrosinase*, *Journal of Natural Products*, 81, 49 – 56.
18. Yanping Zou, Changheng Tan, Dayuan Zhuf, 2009, A New Acetylated Flavonoid Glycoside from *Myrsine africana* L, *Bulletin of Korean Chemical Society*, Vol. 30, No. 9.
19. Bashir Ahmad, Sadiq Azam, Shumaila Bashir, Achyut Adhikari, Farrukh Hussain, 2011, Anti-inflammatory activity and a new compound isolated from aerial parts of *Myrsine africana*, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(42), pp. 8465-8470.
20. Stephen J. Bloor, 1994, Cytotoxic saponins from New Zealand *Myrsine* species, *Journal of Natural Products*, Vol. 57, No. 10, 1354-1360.

21. Kupchan, Pieter S. Steyn, Michael D. Grove, Stella M. Horsfield, Sean W. Meitner, 1969, Tumor Inhibitors, XXXV, *Myrsine* Saponin, the Active Principle of *Myrsine africana* L., Vol 12.
22. Xiao – Hua li' and Jerry L. Mclaughlin, 1989, Bioactive compounds from the root of *Myrsine africana*, *Journal of Natural Products*, Vol. 52, No. 3, pp. 660-662, Maydm.
23. K. Foubert, M. Theunis, S. Apers, A.J. Vlietinck and L. Pieters, 2008, Chemistry, Distribution and Biological Activities of 13,28-Epoxy-Oleanane Saponins from the Plant Families Myrsinaceae and Primulaceae, *Current Organic Chemistry*, 12, 629-642.
24. Catherine Lavaud, Georges Massiot, Jose Bravo Barrera, Christian Moretti, Louisette le Menolivier, 1994, Triterpene saponins from *Myrsine pellucida*, *Phytochemistry*, Vol. 37, No. 6, pp 1671-1677.
25. V.R. Hegde, J. Silver, M.G. Patel, R. Bryant, J. Pai, P.R. Das, M.S. Puar, 1995, Phospholipase D inhibitors from a *Myrsine* species, *Journal of Natural Products*, Vol. 58, No. 10, pp. 1492-1497.
26. Xi – ning Zhong, Hideaki Otsuka, Toshinori ide, Eiji Hirata, Anki Takushi, Yoshi Takeda, 1998, Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*, *Phytochemistry*, Vol. 49, No. 7, pp. 2149 - 2153.
27. Lawrence O. Arot Manguro, Jacob O. Midiwo, Wolfgang Kraus, Ivar Ugi, 2003, Benzoquinone derivatives of *Myrsine africana* and *Maesa lanceolata*, *Phytochemistry*, 64, 855–862.
28. Hideaki Otsuka, Xi-Ning Zhong, Eiji Hirata, Takakazu Shinzato, and Yoshio Takeda, 2001, Myrsiniosides A–E: Megastigmane Glycosides from the Leaves of *Myrsine seguinii* LEV., *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 49(9) 1093—1097.
29. Hidefumi Makabe, Shintaro Miyazaki, Tsunashi Kamo, Mitsuru Hirota, 2003, Myrsinoic Acid E, an Anti-inflammatory Compound from *Myrsine seguinii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 67 (9), 2038–2041.
30. Mei Dong, Maki Nagaoka, Shintaro Miyazaki, Ryozi Iriye, Mitsuru Hirota, 1999, 3 – Geranyl – 4- hydroxyl – 5 – (3' - methyl – 2' – butenyl) benzoic Acid as an Anti-inflammatory Compound from *Myrsine seguinii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 63 (9), 1650 – 1653.
31. Mitsuru Hirota, Shintaro Miyazaki, Tomomi Minakuchi, Tomoko Takagi, and Hisao Shibata, 2002, Myrsinoic Acids B, C and F, Anti-inflammatory Compounds from *Myrsine seguinii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66 (3), 655–659.
32. Marcela Carmen de Melo Burger, Ana Paula Terezanb, Gracielle Silva de Oliveira Cunhaa, Joao Batista Fernandes, Maria Fatima das Grac, as Fernandes da Silva, Paulo Cezar Vieira, Antonio Carlos Severo Menezes, 2015, Antimicrobial activity of the myrsinoic acid A from *Myrsine coriacea* and the semi-synthetic derivatives, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 451–454.
33. Sadiq Azam, Shumaila Bashir, Bashir Ahmad, 2011, Anti-spasmodic action of crude methanolic extract and a new compound isolated from the aerial parts of *Myrsine africana*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
34. Mei Dong, Maki Nagaoka, Shintaro Miyazaki, Ryozi Iriye, Mitsuru Hirota, 1999, 3-Geranyl-4-hydroxyl-5-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoic Acid as an Anti-inflammatory Compound from *Myrsine seguinii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 63 (9), 1650 – 1653.

35. Mitsuru Hirota, Shintaro Miyazaki, Tomomi Minakuchi, Tomoko Takagi, and Hisao Shibata, 2002, Myrsinoic Acids B, C and F, Anti-inflammatory Compounds from *Myrsine seguinii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66 (3), 655–659.
36. Satomi Ito, Susumu Shimura, Tomoko Tanaka, Ken Yaegaki, 2010, Myrsinoic acid B inhibits the production of hydrogen sulfide by periodontal pathogens in vitro, *Journal of Breath Research*, 4, 026005 (8pp).
37. Sadiq Azam, Shumaila Bashir, Bashir Ahmad, 2011, Anti – spasmodic action of crude methanolic extract and a new compound isolated from the aerial parts of *Myrsine africana*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:55.
38. J.M Gathuma et al., 2004, Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 91, Issue 1, pages 7-12.
39. Ooms F., 2000, Molecular Modeling and Computer Aided Drug Design. Examples of their Applications in Medicinal Chemistry, *Current Medicinal Chemistry*, 7 (2), 141-158.
40. Gasteiger J., 2005, Chemoinformatics: a new field with a long tradition, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (1), 57-64.
41. Downs G. M., Barnard J. M., 2002, Clustering Methods and Their Uses in Computational Chemistry, *In Reviews in Computational Chemistry*, Vol 18, 1-40.
42. Van Drie J. H., 2007, Computer-aided drug design: the next 20 years, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21 (10-11), 591-601.
43. Tamimi N. A. M. and Ellis P., 2009, Drug Development: From Concept to Marketing, *Nephron Clinical Practice*, 113 (3) c125-c131.
44. Song C. M., Lim S. J., Tong J. C., 2009, Recent advances in computer-aided drug design, *Briefings in Bioinformatics*, 10 (5), 579-591.
45. Sliwoski G., Kothiwale S., Meiler J., Lowe E. W., Barker E. L., 2013, Computational Methods in Drug Discovery, *Pharmacological Reviews*, 66 (1), 334-395.
46. Yu W., MacKerell A. D., 2017, Computer-Aided Drug Design Methods. *In Antibiotics*, Chapter Chapter 5, 85-106.
47. Singh B. K., Surabhi S., 2018, Computer Aided Drug Design: An Overview, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8 (5), 504-509.
48. Silva Rocha S. F. L., Olanda C. G., Fokoue H. H. and Sant'Anna C. M. R., 2019, Virtual Screening Techniques in Drug Discovery: Review and Recent Applications, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19 (19), 1751-1767.
49. Slater O., Kontoyianni M., 2019, The compromise of virtual screening and its impact on drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14 (7), 619-637.
50. Kontoyianni M., 2017, Docking and Virtual Screening in Drug Discovery, *In Proteomics for Drug Discovery*, Chapter 18, pp 255-266.
51. Du X., Li Y., Xia Y.-L., Ai S.-M., Liang J., Sang P., Ji X.-L., Liu S., 2016, Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods, *International Journal of Molecular Science*, 17 (2).
52. Muegge I., 2006, Oloff S., Advances in virtual screening, *Drug Discovery Today: Technologies*, 3 (4), 405-411.
53. Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E., 1982, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *Journal of Molecular Biology*, 161 (2), 269-288.

54. Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R., 2002, Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 47 (4), 409-443.
55. Bentham Science Publisher B. S. P., 2006, Docking and Scoring - Theoretically Easy, Practically Impossible, *Current Medicinal Chemistry*, 13 (25), 2995-3003.
56. Kontoyianni M., Madhav P., Suchanek E., Seibel W., 2008, Theoretical and Practical Considerations in Virtual Screening: A Beaten Field, *Current Medicinal Chemistry*, 15 (2), 107-116.
57. Brooijmans N., Kuntz I. D., 2003, Molecular Recognition and Docking Algorithms, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32 (1), 335-373.
58. Nguyen N. T., Nguyen T. H., Pham T. N. H., Huy N. T., Bay M. V., Pham M. Q., Nam P. C., Vu V. V., Ngo S. T., 2019, Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60 (1), 204-211.
59. Pham T. N. H., Nguyen T. H., Tam N. M., Y. Vu T., Pham N. T., Huy N. T., Mai B. K., Tung N. T., Pham M. Q., V. Vu V., Ngo S. T., 2021, Improving ligand-ranking of AutoDock Vina by changing the empirical parameters, *Journal of Computer Chemistry*, 43 (3), 160-169.
60. McConkey B. J., Sobolev V., Edelman M., 2002, The performance of current methods in ligand-protein docking, *Current Science*, 83 (7), 845-856.
61. Fischer E., 2006, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27 (3), 2985-2993.
62. Koshland D. E., 1963, Correlation of Structure and Function in Enzyme Action, *Science*, 142 (3599), 1533-1541.
63. Hammes G. G., 2002, Multiple Conformational Changes in Enzyme Catalysis, *Biochemistry*, 41 (26), 8221-8228.
64. McCammon J. A., Gelin B. R., Karplus M., 1977, Dynamics of folded proteins, *Nature*, 267 (5612), 585-590.
65. Warshel A., Levitt M., 1976, Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme, *Journal of Molecular Biology*, 103 (2), 227-249.
66. Roccatano D., Barthel A., Zacharias M., 2007, Structural flexibility of the nucleosome core particle at atomic resolution studied by molecular dynamics simulation, *Biopolymers*, 85 (5-6), 407-421.
67. Tinoco I., Wen J.-D., 2009, Simulation and analysis of single-ribosome translation, *Physics Biology*, 6 (2).
68. Tran L., Ngo S. T. and Nguyen M. T., 2018, Propafenone effects on the stable structures of A β 16-22 system, *Chemical Physics Letters*, 696, 55-60.
69. Vu K. B., Vu V. V., Thi Thu H. P., Giang H. N., Tam N. M., Ngo S. T., 2018, Conjugated polymers: A systematic investigation of their electronic and geometric properties using density functional theory and semi-empirical methods, *Synthetic Metals*, 246, 128-136.
70. Ngo S. T., 2018, Computational Investigations of the Transmembrane Italian-Mutant (E22K) in Aqueous Solution, *Communications in Physics*, 28 (3).
71. Hung H. M., Nguyen V. P., Ngo S. T., Nguyen M. T., 2016, Theoretical study of the interactions between the first transmembrane segment of NS2 protein and a

- POPC lipid bilayer, *Biophysical Chemistry*, 217, 1-7.
72. Orozco M., Orellana L., Hospital A., Naganathan A. N., Emperador A., Carrillo O. and Gelpí J. L., 2011, Coarse-grained Representation of Protein Flexibility. Foundations, Successes, and Shortcomings, *In Computational chemistry methods in structural biology*, 183-215.
 73. Roux B. T. and Simonson T., 1999, Implicit solvent models, *Biophysical Chemistry*, 78 (1-2), 1-20.
 74. Lazaridis T. and Karplus M., 1999, Effective energy function for proteins in solution, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 35 (2), 133-152.
 75. Orozco M. and Luque F. J., 2000, Theoretical Methods for the Description of the Solvent Effect in Biomolecular Systems, *Chemistry Reviews*, 100 (11), 4187-4226.
 76. Hermans J., Berendsen H. J. C., Van Gunsteren W. F. and Postma J. P. M., 1984, A consistent empirical potential for water-protein interactions, *Biopolymers*, 23 (8), 1513-1518.
 77. MacKerell A. D., Wiorkiewicz-Kuczera J. and Karplus M., 2002, An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic acids, *Journal of America Chemistry Society*, 117 (48), 11946-11975.
 78. Rueda M., Ferrer-Costa C., Meyer T., Pérez A., Camps J., Hospital A., Gelpí J. L. and Orozco M., 2007, A consensus view of protein dynamics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (3), 796-801.
 79. Perilla J. R. and Schulten K., 2017, Physical properties of the HIV-1 capsid from all-atom molecular dynamics simulations, *Nature Communications*, 8 (1).
 80. Pérez A., Lankas F., Luque F. J. and Orozco M., 2008, Towards a molecular dynamics consensus view of B-DNA flexibility, *Nucleic Acids Research*, 36 (7), 2379-2394.
 81. Prieto-Martínez F. D., López-López E., Eurídice Juárez-Mercado K. and Medina-Franco J. L., 2019, Computational Drug Design Methods-Current and Future Perspectives, *In Silico Drug Design*, 19-44.
 82. Case D. A., Ben-Shalom I. Y., Brozell S. R., Cerutti D. S., Cheatham T. E., Cruzeiro I., V.W.D. , Darden T. A., Duke R. E., Ghoreishi D., Gilson M. K., Gohlke H., Goetz A. W., Greene D., Harris R., Homeyer N., Huang Y., Izadi S., Kovalenko A., Kurtzman T., Lee T. S., LeGrand S., Li P., Lin C., Liu J., Luchko T., Luo R., Mermelstein D. J., Merz K. M., Miao Y., Monard G., Nguyen C., Nguyen H., Omelyan I., Onufriev A., Pan F., Qi R., Roe D. R., Roitberg A., Sagui C., Schott-Verdugo S., Shen J., Simmerling C. L., Smith J., SalomonFerrer R., Swails J., Walker R. C., Wang J., Wei H., Wolf R. M., Wu X., Xiao L., D.M. Y. and P.A. a. K., 2018, AMBER 18, *University of California, San Francisco*.
 83. Brooks B. R., Brooks III C. L., MacKerell Jr A. D., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M. and Karplus M., 2009, CHARMM: The Biomolecular Simulation Program, *Journal of Computer Chemistry*, 30.
 84. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B. and Lindahl E., 2015, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 1-2, 19-25.

85. Embi N, Rylatt DB, Cohen P, 1980, Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase, *European Journal of Biochemistry*, 107: 519-27.
86. Cohen P, Goedert M, 2004, GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential, *Nature Reviews Drug discovery*, 3: 479-87.
87. Woodgett JR, Cohen P, 1984, Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5), *Biochimica Biophysica Acta*, 788: 339-47.
88. Peat AJ, Boucheron JA, Dickerson SH, Garrido D, Mills W, Peckham J, et al, 2004, Novel pyrazolopyrimidine derivatives as GSK-3 inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14: 2121-25.
89. Grimes CA, Jope RS, 2001, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling, *Progress in Neurobiol*, 65: 391-26.
90. Frame S, Cohen P, 2001, GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery, *Biochemistry Journal*, 359: 1-16.
91. Cross DA, Alessi DR, Vandenhede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P, 1994, The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf, *Biochemistry Journal*, 303: 21-6.
92. Hur EM, Zhou FQ, 2010, GSK3 signalling in neural development, *Nature Reviews Neuroscience*, 11: 539-51.
93. Valvezan AJ, Klein PS, 2012, GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5: 1.
94. Li X, Liu M, Cai Z, Wang G, Li X, 2010, Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment, *Bipolar Disorder*, 12: 741-52.
95. Beurel E, Mines MA, Song L, Jope RS, 2012, Glycogen synthase kinase-3 levels and phosphorylation undergo large fluctuations in mouse brain during development, *Bipolar Disorder*, 14: 822-30.
96. Eldar-Finkelman H, Martinez A, 2011, GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4: 32
97. Li DW, Liu ZQ, Chen W, Yao M, Li GR, 2014, Association of glycogen synthase kinase-3beta with Parkinson's disease (review), *Molecular Medical Representative*, 9: 2043-50.
98. Lorens-Martin M, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, Jurado-Arjona J, Ulloa F, deFelipe J, et al., 2013, GSK-3 beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo, *Molecular Psychiatry*, 18: 451-60.
99. Lim NK, Hung LW, Pang TY, McLean CA, Liddell JR, Hilton JB, et al., 2014, Localized changes to glycogen synthase kinase-3 and collapsin response mediator protein-2 in the Huntington's disease affected brain, *Human Molecular Genetics*, 23: 4051-63.
100. Dewhurst S, Maggirwar SB, Schifitto G, Gendelman HE, Gelbard HA, 2007, Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 beta) as a therapeutic target in neuroAIDS, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2: 93-6.
101. Garcia I, Fall Y, Gomez G, 2010, Using Topological Indices to Predict Anti-

- Alzheimer and Anti-Parasitic GSK-3 Inhibitors by Multi-Target QSAR in Silico Screening, *Molecules*, 15: 5408-22
102. Beurel E., 2011, Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4: 18.
 103. Fung TK, Gandillet A, So CW., 2012, Selective treatment of mixed-lineage leukemia leukemic stem cells through targeting glycogen synthase kinase 3 and the canonical Wnt/beta-catenin pathway, *Current Opin Hematol*, 19: 280-6.
 104. Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD, et al., 2005, Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis, *Cancer Research*, 65: 5792-801
 105. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR, 2000, Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation, *Nature*, 406: 86-90.
 106. ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J, 2001, Structure of GSK-3beta reveals a primed phosphorylation mechanism, *Nature Structural Biology*, 8: 593-6.
 107. Woodgett JR, 2001, Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Science STKE*, 100: re12.
 108. Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P, 1999, A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin, *FEBS letters*, 458: 247-51.
 109. Bijur GN, Jope RS, 2001, Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 37436-42.
 110. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ., 1998, Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, 12: 3499-511
 111. N.P. Thao, B.T.T. Luyen, J.S. Lee, J.H. Kim, N.T. Dat, Y.H. Kim, *Inhibition potential of cycloartane-type glycosides from the roots of Cimicifuga dahurica against soluble epoxide hydrolase*, *Journal of Natural products*, 2017, 80, 1867-1875.
 112. S. Milkovska-Stamenova, R. Schmidt, A. Frolov, C. Birkemeyer, *GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems*, *Journal of Agricultural, Food Chemistry*, 2015, 63, 5911-5919.
 113. Verena M Dirsch, Hermann Stuppner, Angelika M Vollmar, 1998, The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts, *Planta Medica*, 64(05), pp. 423-426.
 114. H. Nguyen, T. Nguyen, H. Tran, M. Litaudon, T. M. H. Doan, V. C. Pham. 2024, Five undescribed aryltetralin lignans with cytotoxic activities from the fruits of *Cleistanthus eberhardtii*, *Fitoterapia*, 65, 55.
 115. Andrews JM, 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1:5-16.
 116. Duc Canh Cao, Thi Thanh Van Trinh, Huong Doan Thi Mai, Van Nam Vu, Hong Minh Le, Quyen Vu Thi, Mai Anh Nguyen, Thu Trang Duong, Dang Thach Tran, Van Minh Chau, Rui Ma, Gauri Shetye, Sanghyun Cho, Brian T. Murphy, Van Cuong Pham, 2019, Antimicrobial Lavandulylated Flavonoids from a Sponge-Derived *Streptomyces* sp. G248 in East Vietnam Sea, *Marine drugs*, 17, 529.
 117. Schrodinger, LLC, 2010, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
 118. Allouche A.-R., 2011, Gabedit-A graphical user interface for computational

- chemistry softwares, *Journal of Computer Chemistry*, 32 (1) 174-182.
119. Bertrand J. A., Thieffine S., Vulpetti A., Cristiani C., Valsasina B., Knapp S., Kalisz H. M. and Flocco M., 2003, Structural Characterization of the GSK-3 β Active Site Using Selective and Non-selective ATP-mimetic Inhibitors, *Journal of Molecular Biology*, 333 (2), 393-407.
 120. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S. and Olson A. J., 2009, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computer Chemistry*, 30 (16), 2785-2791.
 121. Aliev A. E., Kulke M., Khaneja H. S., Chudasama V., Sheppard T. D. and Lanigan R. M., 2014, Motional timescale predictions by molecular dynamics simulations: Case study using proline and hydroxyproline sidechain dynamics, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82 (2), 195-215.
 122. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W. and Klein M. L., 1983, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *The Journal of Chemical Physics*, 79 (2) 926-935.
 123. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A. and Case D. A., 2004, Development and testing of a general amber force field, *Journal of Computer Chemistry*, 25 (9), 1157-1174.
 124. Ngo S. T., Hung H. M. and Nguyen M. T., 2016, Fast and accurate determination of the relative binding affinities of small compounds to HIV-1 protease using non-equilibrium work, *Journal of Computer Chemistry*, 37 (31) 2734-2742.
 125. H. Altunkeyik, D. Gülcemal, O. Caliskan, S. Piacente, T. Karayildirim, 2012, Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*, *Phytochemistry*, 73, 127.
 126. S.Y. Lee, K. H. Ki, K. L. Il, H. L. Kyu, U. C. Sang, R. L. Kang, 2012, A new flavonol Glycoside from *Hylomecon vernalis*, *Archives of Pharmacal Research*, 35, 415-421.
 127. Z. Y. Wei, L. Hua., B.Y. Li, W. Yin, X. Huang., L. Y.Xin, 2012, A new triterpenoid & other constituents from the stem bark of *Juglans mandshurica*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 136.
 128. Jun-Zeng Ma, Xing-Wei Yang, Jing-Jing Zhang, Xia Liu, Li-Lan Deng, Xiao-Ling Shen, Gang xu, 2014, sterol and terpenoids from *Vinurnum odoratissimum*, *Natural product*, 4, 175-180
 129. L. F. Liu, Xiao-Li Ma, 2009, Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis chinensis* Osbeck, *Journal of Asian Natural Products Research*.
 130. M. Asif Saeed, A.W. Sabir, 2003, Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming, *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol 5(1), 35-41.
 131. T. M. Tran, T. H. Tran, T. T. H. Dinh, D.T. Vu, 2015, Chemical Constituents of *Excoecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae) Growing in Vietnam, *Malaysian Journal of Chemistry*, Vol. 17, 20-25
 132. Jae-Ha Ryu, Hanna Ahn, Hwa Jin Lee, 2003, Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*, *Fitoterapia*, 74, 350-354
 133. Hyung Won Ryu, Ji Hye Lee, Jae Eun Kang, Young Min Jin, Ki Hun Park, 2012, Inhibition of Xanthine Oxidase by Phenolic Phytochemicals from *Broussonetia papyrifera*, *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55, 587-594.

134. Dae Sik Jang, Muriel Cuendet, Michael E. Hawthorne, Leonardus B.S. Kardono, Kazuko Kawanishi, Harry H.S. Fong, Rajendra G. Mehta, John M. Pezzuto, A. Douglas Kinghorn, 2002, Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2, *Phytochemistry*, 61, 867–872
135. Christoph Seger, Sonja Sturm, Ernst Haslinger, Hermann Stuppner, 2005, NMR Signal Assignment of 22-Deoxocucurbitacin D and Cucurbitacin D from *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae), *Monatshfte für Chemie*, 136, 1645–1649.
136. Neha Kapoor, Soma Mondal Ghorai, Prem Kumar Kushwaha, Richa Shukla, Charu Aggarwal, Rakeshwar Bandichhor, 2020, Plausible mechanisms explaining the role of cucurbitacins as potential therapeutic drugs against coronavirus 2019, *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 100484.
137. Phan Minh Giang, Nguyễn Thị Thơi, Nguyễn Văn Tài, Phan Tổng Sơn, 2015, Góp phần nghiên cứu thành phần hóa học của cây cỏ mực (*Eclipta prostrata* L., Asteraceae) của Việt Nam, *Tạp chí hóa học*, 53 (1), 56-61.
138. Niranjana P. Sahu, Kazuo Koike, Sukdeb Banerjee, Basudeb Achari, Tamotsu Nikaido, 2001, Triterpenoid saponins from *Mollugo spergula*, *Phytochemistry*, 58, 1177–1182.
139. Nguyen Cong Thuy Tram, Ninh The Son, Do Thi Thao, Nguyen Manh Cuong, 2016, Kaempferol and kaempferol glycosides from *Phyllanthus acidus* leaves, *Vietnam Journal of Chemistry*, 54(6), 790-793.
140. Vũ Đức Lợi, Đỗ Thị Nghĩa Tình, Bùi Thị Xuân, Vũ Kiều Oanh, Trịnh Nam Trung, Nguyễn Tiến Vững, 2017, Một số hợp chất flavonoid phân lập từ lá cây dâu (Morus alba L.) thu hái tại tỉnh Thái Nguyên, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Y dược*, 33 (1), 45-50.
141. F. A. Melikuziev, A. A. Ganiev, N. B. Begmatov, Kh. M. Bobakulov, B. Zhao, J. Y. Zhao, Sh. Sh. Sagdullaev, H. A. Aisa, 2022, phenolic compounds from *Artemisia namanganica*, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 58, No. 5.
142. Naowarat Kongkum, Patoomratana Tuchinda, Manat Pohmakotr, Vichai Reutrakul, Pawinee Piyachaturawat, Surawat Jariyawat, Kanoknetr Suksen, Chalobon Yoosook, Jitra Kasisit, Chanita Napaswa, 2012, DNA topoisomerase II α inhibitory and anti-HIV-1 flavones from leaves and twigs of *Gardenia carinata*, *Fitoterapia*, 83, 368–372
143. Hisahiro Kai, Masaki BABA, and Toru Okuyama, 2007, Two New Megastigmanes from the Leaves of *Cucumis sativus*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 133-136.
144. Guido Flamini, Elena Antognoli, Ivano Morelli, 2001, Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy, *Phytochemistry*, 57, 559–564.
145. Ashraf N.E. Hamed¹, Mamdouh N. Samy¹, Basma K. Mahmoud¹, Eman Z. Attial, Taha F.S. Ali, Ahmed H. Afifi, Mohamed S. Kamel, 2021, Flavonoidal glycosides and in vitro antioxidant activity of *Bignonia binata* Thunb. leaves Family Bignoniaceae and in silico evidence of their potential anti-COVID19 activity, *Journal of Advance Biomedicinal & Pharmaceutical Sciences*, 4, 98-106
146. Wu Jian-feng, Chen Si-ba, Gao Jing-chun, Wu Li-jun, Chen Shi-lit, Tu Peng-fei, 2007, Megastigmane Glycosides from *Polygala hongkongensis* Hemsl, *Chemical Research in Chinese universities*, 23 (5), 530-532.

147. Melissa L. Flagg, Gerald A. Wachter, Angela L. Davis, Gloria Montenegro, Barbara N. Timmermann, 2000, Two Novel Flavanones from *Greigia sphacelata*, *Journal of Natural Products*, 63, 1689-1691
148. Jose Enrique Herbert-Pucheta, Cinthia Mejía-Lara, Benito Reyes-Trejo, Lino Reyes, Holber Zuleta-Prada, 2019, Nuclear magnetic resonance assignment strategy for pentacyclic triterpenes, using lup-20(29)-ene from *Pilotrichella fexilis* as model system, combining spectrally filtered proton-to-carbon schemes and DFT–GIAO approach, *Herbert-Pucheta et al. Applied Biological Chemistry*, 62:28.
149. Arjun Hari Banskota, Yasuhiro Tezuka, Kim Qui Tran, Ken Tanaka, Ikuo Saiki, Shigetoshi Kadota, 2000, Methyl Quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48 (4), 496-504.
150. Dae Keun Kim, Sang Hoon Choi, Jung Ock Lee, Shi Yong Ryu, Dae Kyu Park, Dae Hee Shin, Jee Hyung Jung, Suhk Keung Pyo, Kang Ro Lee, Ok Pyo Zee, 1997, Cytotoxic Constituents of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila*, 20 (1), 85-87.
151. Orlando Muñoz, Carla Delporte, Nadine Backhouse, Silvia Erazo, Rosa Negrete, Sergio M aldonado, José L. López-Pérez, Arturo San Feliciano, 2000, A New Cucurbitacin Glycoside from *Kageneckia oblonga* (Rosaceae), *Z. Naturforsch.*, 55 c, 141-145.
152. Nguyen Huu Tung, Hyuk Joon Kwon, Jae Hong Kim, Jeong Chan Ra, Jeong Ah Kim, Young Ho Kim, 2010, An anti-influenza component of the bark of *Alnus japonica*, *Arch Pharm Res*, 33(3), 363-367.
153. Aranya Jutiviboonsuk, Hong-Jie Zhang, Tamara P. Kondratyuk, Angkana Herunsalee, Wongsatit Chaukul, John M. Pezzuto, Harry H.S. Fong, and Nuntavan Bunyapraphatsara, 2007, Isolation and Characterization of Cancer Chemopreventive Compounds from *Barringtonia maunwongyathiae*, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 45, No. 3, pp. 185–194.
154. Luciene F.G. Amaral, Suzana G. Leitao, Franco Delle Monache, Gilda G. Leitao, 2001, 3,4-seco-Lupanes and other constituents from *Platypodium elegans*, *Fitoterapia*, 72, 441-443
155. Hsiou-Yu Ding, Hang-Ching Lin, 2000, Phytochemical and Pharmacological Studies on Chinese Paeonia Species, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47, 381-388.
156. Mi Ran Kim, Seung Kyu Lee, Chang Soo Kim, Kyung Soon Kim, Dong Cheul Moon, 2004, Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* FR-et SAV, *Archives of Pharmacal Research*, 27(10), 1029-1033.
157. Siyuan Jing, Haoyang Zou, Zidan Wu, Li Ren, Tiehua Zhang, Jie Zhang, Zhengyi Wei, 2020, Cucurbitacins: Bioactivities and synergistic effect with small-molecule drugs, *Journal of functional foods*, 72, 1-9.
158. Abdulrhman Alsayari, Lucas Kopel, Mahmoud Salama Ahmed, 2018, Isolation of anticancer constituents from *Cucumis prophetarum* var. *prophetarum* through bioassay-guided fracrionation, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1-12.
159. Neha Kapoor, Soma Mondal Ghorai, Prem Kumar Kushwaha, Richa Shukla, Char Aggarwal, Rakeshwar Bandichhor, 2020, *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 1-11.