

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phùng Thị Tình

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH
TỪ LOÀI *PHYSALIS PERUVIANA* L.**

LUẬN VĂN THẠC 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



Phùng Thị Tình

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH
TỪ LOÀI *PHYSALIS PERUVIANA L.***

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

Cán bộ hướng dẫn 1

Cán bộ hướng dẫn 2

TS. Nguyễn Hà Thanh

PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Hà Thanh và PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh.

Các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan, một phần đã được công bố với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả



Phùng Thị Tình

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu khoa học này được hỗ trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) theo số tài trợ TĐDIOX.06/22-24; QTBY01.01/22-23 và trong khuôn khổ đề tài “Phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư từ các loài dược liệu *Physalis angulata* và *Physalis peruviana*” được thực hiện tại phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Em xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc, phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện cho em trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn này.

Với lòng biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn thầy cô hướng dẫn – TS. Nguyễn Hà Thanh và PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh là người cô, người thầy đã giao đề tài, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kinh nghiệm và tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ em trong khi thực hiện đề tài và trong suốt quá trình thực hiện luận văn. Xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị và các bạn cùng nhóm nghiên cứu đã giúp đỡ em trong quá trình thực hiện đề tài.

Em xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô giảng viên trong khoa Hóa học – Học viện Khoa học và Công nghệ đã chỉ dạy và trang bị kiến thức cho em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện.

Cuối cùng em xin gửi lời cảm ơn tới tất cả bạn bè, đồng nghiệp và gia đình những người luôn ủng hộ, động viên và tạo mọi điều kiện tốt nhất để em hoàn thành luận văn này.

Em xin chân thành cảm ơn!

Tác giả



Phùng Thị Tình

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Physalis</i>	3
1.1.1. Đặc điểm thực vật chi <i>Physalis</i>	3
1.1.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của chi <i>Physalis</i>	5
1.1.2.1. Withanolide.....	5
1.1.2.2. Physalin.....	9
1.2. Tổng quan về loài <i>Physalis peruviana</i> L.	16
1.2.1. Đặc điểm thực vật loài <i>Physalis peruviana</i> L.	16
1.2.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài <i>Physalis peruviana</i> L.....	17
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	22
2.2. Vật liệu nghiên cứu	22
2.3. Hoá chất và dung môi	22
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.4.1. Phương pháp xử lý mẫu.....	23
2.4.2. Phương pháp chiết xuất	23
2.4.3. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất từ mẫu <i>Physalis peruviana</i> L.	23
2.4.4. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất.....	24

2.4.5. Các phương pháp đánh giá hoạt tính.....	25
2.4.5.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro	25
2.4.5.2. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7	25
2.4.5.3. Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT	26
2.5. Thực nghiệm	27
2.5.1. Tạo cao chiết.....	27
2.5.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất	28
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1. Xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất phân lập từ loài <i>Physalis peruviana</i> L.	30
3.1.1. Hợp chất withanolide J (PP01)	30
3.1.2. Hợp chất 4 β -hydroxywithanolide E (PP02).....	33
3.1.3. Hợp chất physapruin A (PP03)	37
3.1.4. Hợp chất withaperuvin C (PP04).....	42
3.1.5. Hợp chất physaperuvin G (PP05)	46
3.1.6. Hợp chất 28-hydroxywithaperuvin C (PP06)	51
3.2. Hoạt tính ức chế NO của các hợp chất được phân lập từ loài <i>Physalis peruviana</i> L.	56
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	59

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
VAST	VietNam Academy of Science and Technology	Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
δ	Chemical Shift	Độ dịch chuyển hoá học
^1H – NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
^{13}C – NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
HR-ESI-MS	High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân trong không gian – tương tác xa
br s	Broad singlet	Tín hiệu đơn rộng
d	Doublet	Tín hiệu đôi
dd	Doublet – doublet	Tín hiệu đôi đôi
ddd	Doublet – doublet – doublet	Tín hiệu đôi đôi đôi
t	Triplet	Tín hiệu ba
m	Multiplet	Tín hiệu đa
NO	Nitric oxide	
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế tối thiểu 50%

L-NMMA	N ^G -Methyl-L-arginine acetate	
LPS	Lipopolysaccharide	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	
TCA	Trichloroacetic acid	
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
H ₂ O	Water	Nước
EtOAc	Ethyl acetate	
n – BuOH	Buthanol	
EtOH	Ethanol	
MeOH	Methanol	
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane	
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
CDCl ₃	Deuterated chloroform	
CD ₃ OD	Deuterated methanol	
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư biểu mô gan
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư biểu mô vú ở người
MG-63	Human osteosarcoma cell line	Dòng tế bào ung thư xương ở người
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Yếu tố hạt nhân-kappa B

TNF- α	Tumor Necrosis Factors	Yếu tố hoại tử khối u alpha
ROS	Reactive oxygen species	
JNK	Kinase c-Jun N-terminal	
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
STT		Số thứ tự
TLTK		Tài liệu tham khảo

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Các hợp chất được phân lập từ chi <i>Physalis</i>	13
Bảng 1.2: Các hợp chất được phân lập từ loài <i>Physalis peruviana</i> L.	20
Bảng 3.1: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất PP01 và hợp chất tham khảo	32
Bảng 3.2: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất PP02 và hợp chất tham khảo	35
Bảng 3.3: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất PP03 và hợp chất tham khảo	39
Bảng 3.4: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất PP04 và hợp chất tham khảo	44
Bảng 3.5: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất PP05 và hợp chất tham khảo	48
Bảng 3.6: Số liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất PP06 và hợp chất tham khảo	53
Bảng 3.7: Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ loài <i>Physalis peruviana</i> L.	56

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Hình ảnh lá, thân, rễ, đài hoa và quả của loài <i>Physalis angulata</i> L.	3
Hình 1.2: Một số hình ảnh về loài <i>Physalis alkekengi</i> L.	4
Hình 1.3: Hoa (A), Quả (B), Lá (C), đài quả (D) của loài <i>Physalis minima</i> L.	4
Hình 1.4: Một số hợp chất chứa khung Withanolide phân lập từ chi <i>Physalis</i>	5
Hình 1.5: Một số hợp chất có chứa khung Physalin phân lập từ chi <i>Physalis</i>	10
Hình 1.6: Hình ảnh về loài <i>Physalis peruviana</i> L.	17
Hình 2.1: Sơ đồ chiết và phân lập các chất từ phần trên mặt đất cây <i>Physalis peruviana</i> L.	29
Hình 3.1: Cấu trúc hoá học của hợp chất PP01	30
Hình 3.2: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất PP01 (CD ₃ OD, 600 MHz)	31
Hình 3.3: Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất PP01 (CD ₃ OD, 150 MHz)	31
Hình 3.4: Cấu trúc hoá học của hợp chất PP02	33
Hình 3.5: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất PP02 (CD ₃ OD, 500 MHz)	33
Hình 3.6: Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất PP02 (CD ₃ OD, 125 MHz)	34
Hình 3.7: Phổ HSQC của hợp chất PP02 (CD ₃ OD, 500/125 MHz)	34
Hình 3.8: Các tương tác HMBC chính của hợp chất PP02	36
Hình 3.9: Phổ HMBC của hợp chất PP03 (CD ₃ OD, 500/125 MHz)	37
Hình 3.10: Cấu trúc hoá học của hợp chất PP03	37
Hình 3.11: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất PP03 (CD ₃ OD, 500 MHz)	38
Hình 3.12: Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất PP03 (CD ₃ OD, 125 MHz)	38
Hình 3.13: Phổ HSQC của hợp chất PP03 (CD ₃ OD, 500/125 MHz)	39
Hình 3.14: Các tương tác HMBC chính của hợp chất PP03	40
Hình 3.15: Phổ HBMC của hợp chất PP03 (CD ₃ OD, 500/125 MHz)	41
Hình 3.16: Cấu trúc hoá học của hợp chất PP04	42
Hình 3.17: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất PP04 (CD ₃ OD, 500 MHz)	42

Hình 3.18: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PP04 (CD_3OD , 125 MHz).....	43
Hình 3.19: Phổ HSQC của hợp chất PP04 (CD_3OD , 500/125 MHz).....	43
Hình 3.20: Các tương tác HMBC chính của hợp chất PP04	45
Hình 3.21: Phổ HMBC của hợp chất PP04 (CD_3OD , 500/125 MHz).....	45
Hình 3.22: Cấu trúc hoá học của hợp chất PP05	46
Hình 3.23: Phổ ^1H -NMR của hợp chất PP05 (CD_3OD , 500 MHz).....	47
Hình 3.24: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PP05 (CD_3OD , 125 MHz).....	47
Hình 3.25: Phổ HSQC của hợp chất PP05 (CD_3OD , 500/125 MHz).....	48
Hình 3.26: Các tương tác HMBC chính của hợp chất PP05	49
Hình 3.27: Phổ HMBC của hợp chất PP05 (CD_3OD , 500/125 MHz).....	50
Hình 3.28: Cấu trúc hoá học và tương tác HMBC chính của hợp chất PP06	51
Hình 3.29: Phổ ^1H -NMR của hợp chất PP06 (CD_3OD , 500 MHz).....	51
Hình 3.30: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PP06 (CD_3OD , 125 MHz).....	52
Hình 3.31: Phổ HSQC của hợp chất PP06 (CD_3OD , 500/125 MHz).....	52
Hình 3.32: Các hợp chất phân lập từ cây Thù lù lông (<i>Physalis peruviana</i> L.)	55

MỞ ĐẦU

Chi *Physalis* được coi là một trong các chi quan trọng nhất trong họ *Solanaceae*, bao gồm khoảng 120 loài mọc hoang ở các vùng nhiệt đới và các vùng cận nhiệt đới. Trong y học cổ truyền, các loài thuộc chi *Physalis* được sử dụng rộng rãi để điều trị ho, viêm họng, sốt cảm, viêm da, v.v.. Đến năm 2016, đã có khoảng 216 hợp chất của các loài thuộc chi *Physalis* đã xác định và phân lập và trong đó cho thấy withanolide là thành phần xuất hiện nhiều nhất [1]. Trong đó, withanolide và physalin được coi là thành phần chính quyết định hoạt tính của các loài thực vật chi *Physalis*.

Sau khi tìm hiểu tài liệu về các nghiên cứu ở loài *Physalis peruviana* L. Tại Việt Nam, các kết quả tìm được cho thấy tới hiện tại chưa có các nghiên cứu chuyên sâu tìm hiểu về thành phần hoá học, cũng như các hoạt tính sinh học của loài này. Dựa trên việc tìm hiểu về tình hình nghiên cứu chi *Physalis* trên thế giới về phân lập các hợp chất chứa khung withanolide và physalin thể hiện những hoạt tính tốt cho thấy tiềm năng nghiên cứu của loài *Physalis peruviana* L. tại Việt Nam. Do đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính từ loài *Physalis peruviana* L.**” Với những lý do đó, mục tiêu của đề tài là nghiên cứu thành phần hoá học và thử nghiệm, đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ loài *Physalis peruviana* L. ở Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở khoa học vững chắc cho định hướng ứng dụng, khai thác và phát triển bền vững nguồn dược liệu tiềm năng này ở Việt Nam.

Mục tiêu của đề tài

- Phân lập và xác định được các hợp chất từ loài *Physalis peruviana* L.
- Thử nghiệm, đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ loài *Physalis peruviana* L.

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là toàn bộ phần trên mặt đất cây Thù lù lông (*Physalis peruviana* L.) được tiến hành thu hái tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu bao gồm

- Nội dung 1: Thu thập, định danh và thu mẫu lượng lớn cây Thù lù lông (*Physalis peruviana* L.) phân bố tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam.

- Nội dung 2: Xử lý mẫu, chiết tách, tạo cao chiết và phân đoạn các cao chiết dược liệu.
- Nội dung 3: Phân lập các hợp chất chính từ các cao chiết phân đoạn.
- Nội dung 4: Xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất được phân lập.
- Nội dung 5: Khảo sát, đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7 của các hợp chất phân lập được trên mô hình *in vitro*.

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về chi *Physalis*

1.1.1. Đặc điểm thực vật chi *Physalis*

Chi *Physalis* thuộc họ Cà (*Solanaceae*), bộ Cà (*Solanales*), lớp thực vật hai lá mầm (*Magnoliopsida*), ngành thực vật có hoa (*Magnoliophyta*). Hiện nay, trên thế giới đã tìm thấy khoảng 120 loài thuộc chi *Physalis*, chúng phân bố khắp nơi chủ yếu ở vùng nhiệt đới và các vùng cận nhiệt đới [1], Các loài thuộc chi *Physalis* là cây thân thảo, bán cây bụi, thẳng đứng, cao 0,4 m đến 3 m, có nhiều nhánh, hầu hết sống ở nơi có đủ ánh sáng, khí hậu ẩm áp và một số loài có thể chịu được ở nhiệt độ cao. Lá mọc so le nhau, có hình bầu dục, hình thùy hoặc không thùy, chiều dài khoảng 30 - 35 mm, rộng từ 20 - 40 mm, cuống lá dài 15 - 30 mm. Hoa lưỡng tính, mọc đơn lẻ, có cuống hoa mỏng, dài tầm khoảng 1 cm. Đài hoa hình chiếc chuông, có lông, được chia làm 5 thùy từ ở phía chính giữa. Tròng hoa có màu vàng tươi hoặc trắng nhạt, đôi khi có những chấm tím ở gốc, cũng được chia thành 5 thùy như đài hoa. Quả căng mọng, tròn, vỏ trơn nhẵn, có đài hoa lớn cùng với quả bao phủ bên ngoài như chiếc đèn lồng, dài 3 - 4 cm, rộng 2 cm. Khi chín, quả có màu cam và có nhiều ngăn rỗng bên trong, một số loài thì quả lại đặc ruột và là loại quả ăn được.

Ở Việt Nam, phần lớn các loài thuộc chi *Physalis* được coi là cỏ dại mọc ở ven ruộng, bãi cỏ, bìa rừng, vùng đất thấp như *Physalis angulata* L. (cây tầm bóp, hay cây lu lu cái), *Physalis alkekengi* L. (cây thù lù kiêng), *Physalis peruviana* L. (cây thù lù lông), *Physalis minima* L. (cây thù lù nhỏ),...[2]



Hình 1.1: Hình ảnh lá, thân, rễ, đài hoa và quả của loài *Physalis angulata* L.



Hình 1.2: Một số hình ảnh về loài *Physalis alkekengi* L.

A



B



C



D



Hình 1.3: Hoa (A), Quả (B), Lá (C), đài quả (D) của loài *Physalis minima* L.

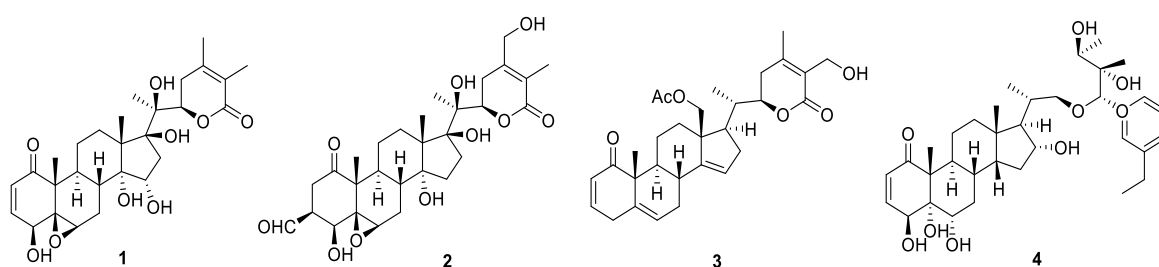
1.1.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của chi *Physalis*

Các nhà khoa học trên thế giới đã quan tâm nghiên cứu các loài thuộc chi *Physalis* từ lâu và có rất nhiều công trình nghiên cứu đã công bố thành phần hoá học và tác dụng sinh học của các hợp chất đã được phân lập từ loài được liệt kê này. Các nghiên cứu về các thành phần hoá học các loài thuộc chi *Physalis* đã cho thấy khung withanolide là thành phần xuất hiện nhiều nhất [1]. Các lớp chất chính của chi *Physalis* được xác định là các chất chứa khung withanolide, tiếp đến labdane diterpene, sucrose ester, flavonoid, ceramide và một số chất khác [1]. Trong đó, các chất chứa khung withanolide, các physalin được xem là thành phần chính quyết định hoạt tính của các loài thực vật chi *Physalis*.

Hầu hết các loài thuộc chi *Physalis* đã được dùng từ lâu trong y học dân gian để dùng điều trị cho các loại bệnh khác nhau, như sốt rét, hen suyễn, viêm gan, viêm da, rối loạn gan và như một loại thuốc chống vi khuẩn, chống ung thư, chống bệnh bạch cầu, thuốc hạ sốt và điều hòa miễn dịch [3].

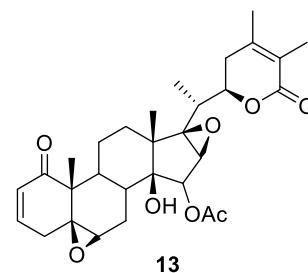
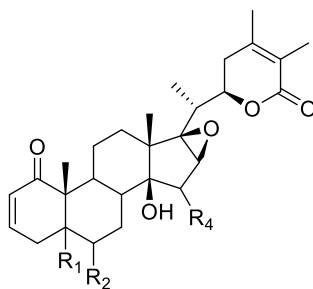
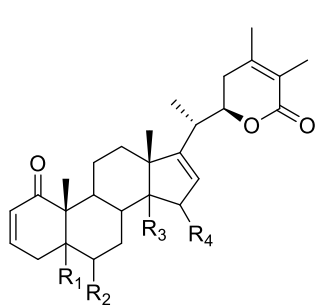
1.1.2.1. Withanolide

Withanolide được định nghĩa là một nhóm C_{28} ergostane steroid với nhóm 26,22- δ -lactone. Withanolide được xem là thành phần chính và phổ biến nhất từ chi *Physalis* bao gồm các 5 β ,6 β -epoxide withanolide, withanolide 5-ene, và withanolide trung gian [1]. Tính đến năm 2019, đã có khoảng 351 hợp chất withanolide được phân lập từ chi *Physalis*, chủ yếu từ các loài như *Physalis angulata* và *Physalis peruviana* [4].

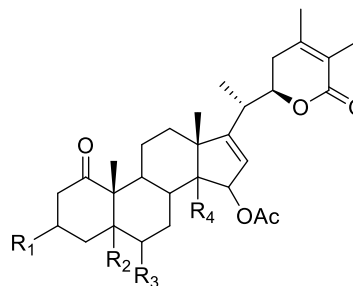
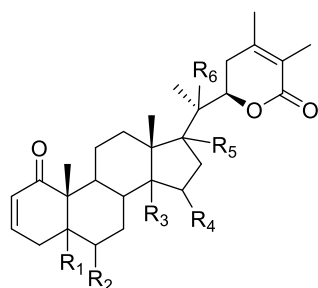
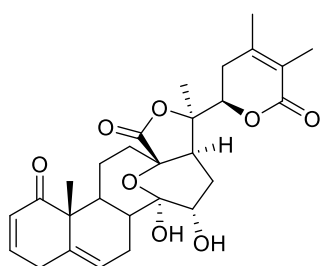


Hình 1.4: Một số hợp chất chứa khung Withanolide phân lập từ chi *Physalis*

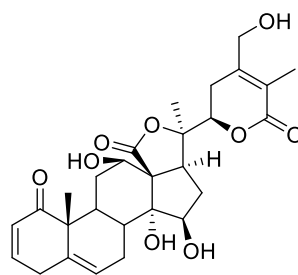
Theo công trình nghiên cứu của Sun và cộng sự (2016), chiết xuất EtOH của thân và lá khô loài *Physalis angulata* L. đã phân lập được 16 hợp chất withanolide mới (trong đó có 14 loại withanolide mới chưa biến đổi được đặt tên là physangulatin A-N (5 – 18); hai loại withaphysalin hiếm được đặt tên là withaphysalin Y-Z (19 và 20) và 12 hợp chất đã biết khác (21 – 32).[5]



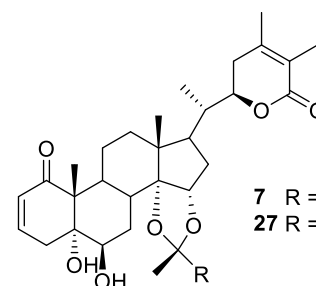
13

5 $R_1=R_4=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=\beta\text{-OH}$ 6 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_4=\beta\text{-OH}$ 8 $R_1=R_3=\beta\text{-OH}$, $R_2=\alpha\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$ 9 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OCH}_3$ 10 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=\beta\text{-OH}$, $R_4=\beta\text{-OCH}_3$ 12 $R_1=\alpha\text{-OCH}_3$, $R_2=R_3=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$ 23 $R_1=R_3=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$ 24 $R_1=R_2=\beta\text{-epoxy}$, $R_3=\alpha\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$ 25 $R_1=\alpha\text{-Cl}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=\alpha\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$ 14 $R_1=\alpha\text{-OAc}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=\alpha\text{-OAc}$ 16 $R_1=R_3=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\beta\text{-OH}$ 28 $R_1=R_2=\beta\text{-epoxy}$, $R_3=\alpha\text{-OAc}$ 29 $R_1=\alpha\text{-Cl}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=\alpha\text{-OAc}$ 30 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=\alpha\text{-OAc}$ 15 $R_1=\alpha\text{-OCH}_3$, $R_2=R_3=R_5=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_6=\text{H}$ 17 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=R_5=\alpha\text{-H}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_6=\text{H}$ 18 $R_1=R_4=\alpha\text{-OH}$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=R_5=\alpha\text{-H}$, $R_6=\text{OH}$ 21 $R_1=R_2=\beta\text{-epoxy}$, $R_3=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_5=\alpha\text{-H}$, $R_6=\text{H}$ 22 $R_1=R_2=\beta\text{-epoxy}$, $R_3=R_5=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_5=\alpha\text{-H}$, $R_6=\text{H}$ 31 $R_1=R_2=\beta\text{-epoxy}$, $R_3=R_5=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_6=\text{H}$ 32 $R_1=\alpha\text{-OH}$, $R_2=R_3=R_5=\beta\text{-OH}$, $R_4=\alpha\text{-OAc}$, $R_6=\text{H}$ 11 $R_1=R_3=R_4=\beta\text{-OH}$, $R_2=\alpha\text{-OH}$ 26 $R_1=\beta\text{-OCH}_3$, $R_2=R_3=\beta\text{-epoxy}$, $R_4=\alpha\text{-OH}$ 

19



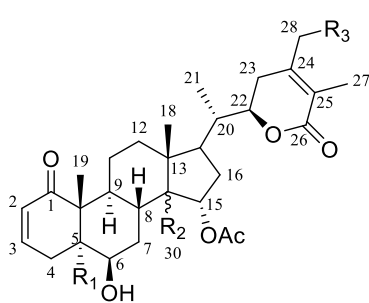
20

7 $R = \text{H}$
27 $R = 23$

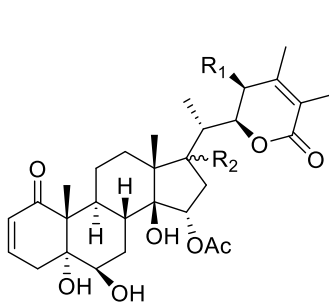
Các hợp chất phân lập được thử nghiệm về hoạt tính chống tăng sinh chống lại tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người (C4-2B và 22Rv1), tế bào ung thư biểu mô thận ở người (786-O, A-498, và ACHN), và tế bào u hắc tố ở người (A375-S2), cũng như tác dụng ức chế sản xuất NO do lipopolysaccharide (LPS) gây ra trong đại thực bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy các hợp chất physangulatin I (13), physagulide I-J (31 và 21), physagulins A-B (24 – 25) và

physagulin **I** (**29**) đã thể hiện tốt hoạt tính trên tất cả các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt của con người (C4-2B và 22Rv1), tế bào ung thư biểu mô thận ở người (786-O, A-498 và ACHN) và tế bào u ác tính ở người (A375-S2) với giá trị IC_{50} trong khoảng 0.18-7.43 μ M. Ngoài ra các hợp chất physangulatin **C-E** (**7 – 9**), physangulatin **I-K** (**13 – 15**), physagulide **I-J** (**31** và **21**), physagulin **A-B** (**24 – 25**), physagulin **H-I** (**28 – 29**) và physagulin **N** (**26**) còn có khả năng ức chế sự sản sinh NO do lipopolysaccharide (LPS) gây ra trong các đại thực bào với giá trị IC_{50} trong khoảng 1,36-11,59 μ M. [5]

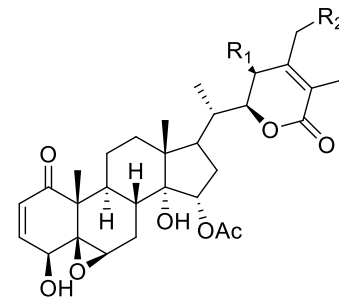
Theo báo cáo kết quả do Ma cùng cộng sự (2016), đã tiến hành nghiên cứu, từ dịch chiết tổng EtOH của toàn bộ cây *Physalis angulata* var. *villosa* đã phân lập được và xác định được tám loại withanolide mới, physagulide A–H (**33 – 40**), cùng với mười hợp chất tương tự đã biết (**41 – 50**). Tất cả các hợp chất sau khi phân lập được đánh giá về khả năng gây độc tế bào đối với ba dòng tế bào ung thư ở người, ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô vú (MCF-7) và tế bào ung thư xương ở người (MG-63). [6]



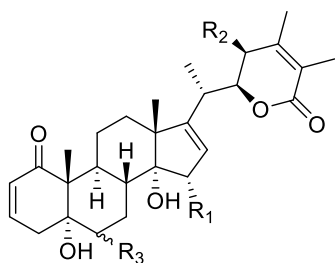
- 33** $R_1=\alpha\text{-OH}$ $R_2=\beta\text{-OH}$ $R_3=\text{OH}$
45 $R_1=\text{H}$ $R_2=\beta\text{-OH}$ $R_3=\text{H}$
49 $R_1=\alpha\text{-Cl}$ $R_2=\beta\text{-OH}$ $R_3=\text{H}$
50 $R_1=\alpha\text{-Cl}$ $R_2=\alpha\text{-OH}$ $R_3=\text{H}$



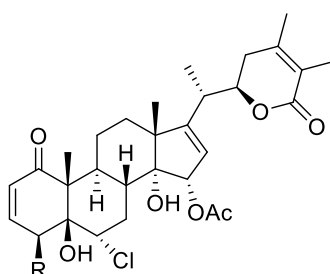
- 34** $R_1=\text{OH}$ $R_2=\alpha\text{-H}$
37 $R_1=\text{H}$ $R_2=\alpha\text{-OH}$
44 $R_1=\text{H}$ $R_2=\beta\text{-OH}$



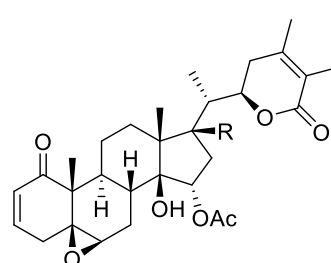
- 35** $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{OH}$
36 $R_1=\text{OH}$ $R_2=\text{H}$
46 $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{H}$



- 38** $R_1=\text{OH}$ $R_2=\text{H}$ $R_3=\beta\text{-OH}$
39 $R_1=\text{OAc}$ $R_2=\text{H}$ $R_3=\alpha\text{-OH}$
47 $R_1=\text{OAc}$ $R_2=\text{H}$ $R_3=\beta\text{-OH}$
48 $R_1=\text{OAc}$ $R_2=\text{OH}$ $R_3=\beta\text{-OH}$



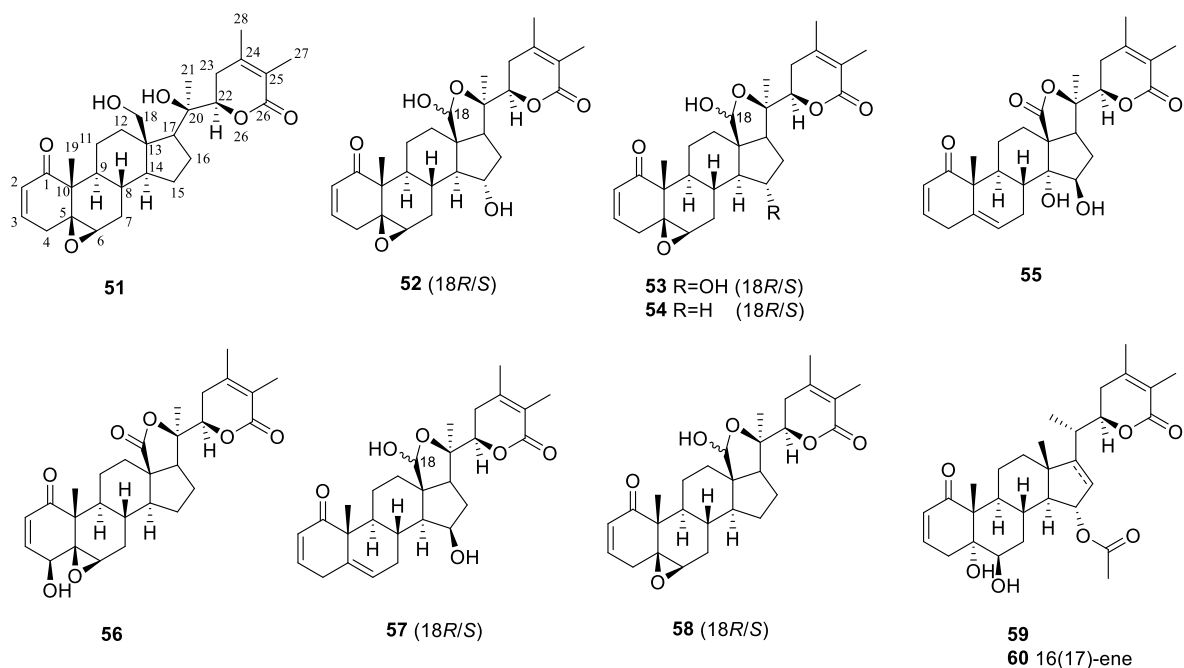
- 40** $R=\text{OH}$
43 $R=\text{H}$



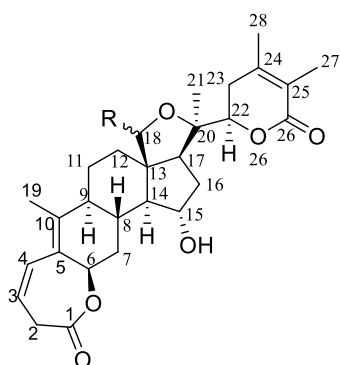
- 41** $R=\beta\text{-OH}$
42 $R=\alpha\text{-H}$

Kết quả cho thấy các hợp chất withanolide physagulide I (**41**), J (**42**), withangulatin A (**46**), (20*S*,22*R*)-15 α -chloro-6 β , 14 β -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide (**49**), và physagulin (**50**) được phân lập từ phần dịch chiết tổng từ thân cây *P. angulata* var. *villosa* có hoạt tính mạnh trên cả 3 dòng tế bào ung thư người là ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MCF-7) và ung thư xương ác tính với giá trị IC₅₀ trong khoảng 0.06-6.73 μ M. Hợp chất physagulide I (**41**) biểu hiện mạnh khả năng bắt giữ các tế bào trong pha G2/M và đồng thời đã kích hoạt các con đường biểu hiện sự phụ thuộc caspase với apoptosis. Bên cạnh đó, quá trình apoptosis diễn ra bởi physagulide I (**41**) trong các tế bào MG-63 có liên quan đến việc tạo ra các gốc oxy phản ứng (ROS) và kích hoạt enzyme kinase điều hòa tín hiệu ngoại bào (ERK) và kinase c-Jun N-terminal (JNK). Những kết quả trên cho thấy rằng physagulide I (**41**) có thể là một tác nhân đầy hứa hẹn trong điều trị ung thư.[6]

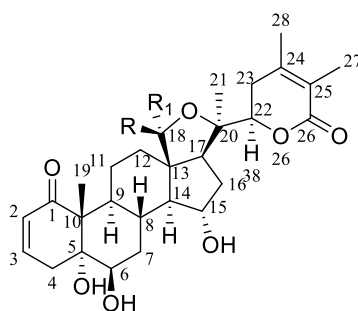
Trong quá trình nghiên cứu về các loài thuộc chi *Physalis*, Yi Sun và cộng sự (2020), khi nghiên cứu đài hoa của *Physalis alkekengi* var. *franchetii* đã phân lập được 5 hợp chất mới khung withanolide (**51–55**), cùng với 5 chất tương tự đã biết (**56–60**). Tất cả các withanolide sau khi phân lập đều được thử nghiệm đánh giá về hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào A549 và K562. Hợp chất (**51**) và (**58**) có tác động kích hoạt apoptosis trong dòng tế bào A549 của bệnh ung thư phổi.[7]



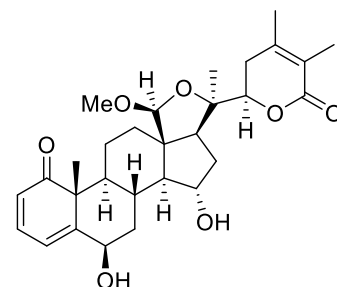
Trong báo cáo công bố của YZ Guan và cộng sự (2014) khi tiến hành nghiên cứu từ toàn bộ cây *Physalis minima*, đã phân lập được sáu loại withanolide mới (**61–66**) và năm loại withanolide đã biết (**67–71**). Các hợp chất sau khi phân lập được tiến hành khảo sát, đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO trong các đại thực bào RAW264.7 được kích hoạt bằng lipopolysaccharide. Kết quả đánh giá cho thấy hợp chất (**62**) và (**65**) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 8,04 và 10,01 μM . Các hợp chất (**61**), (**69**) và (**70**) thể hiện hoạt tính ức chế vừa phải với giá trị IC_{50} từ 25,54 đến 43,58 μM . [8]



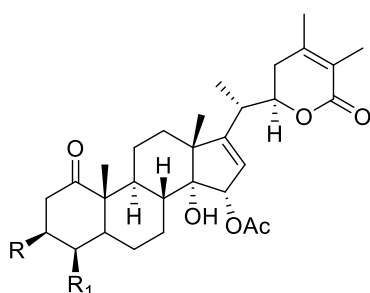
61 R= α -OMe
62 R= β -OMe



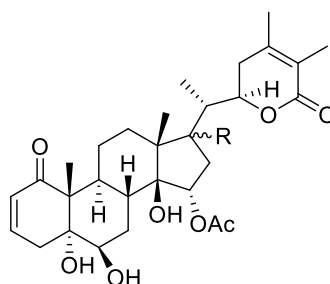
63 R=OH R₁=H
64 R=H R₁=OMe



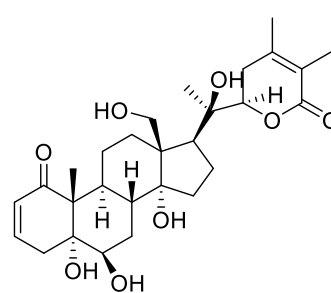
65



66 5 β ,6 β -epoxy R=OH R₁=OH
67 $\Delta^{2,3}$ 5 β ,6 β -epoxy R=H R₁=OH
68 $\Delta^{2,3}$ 5 α -OH,6 β -OH R=H R₁=H



69 R= α -H
70 R= β -OH

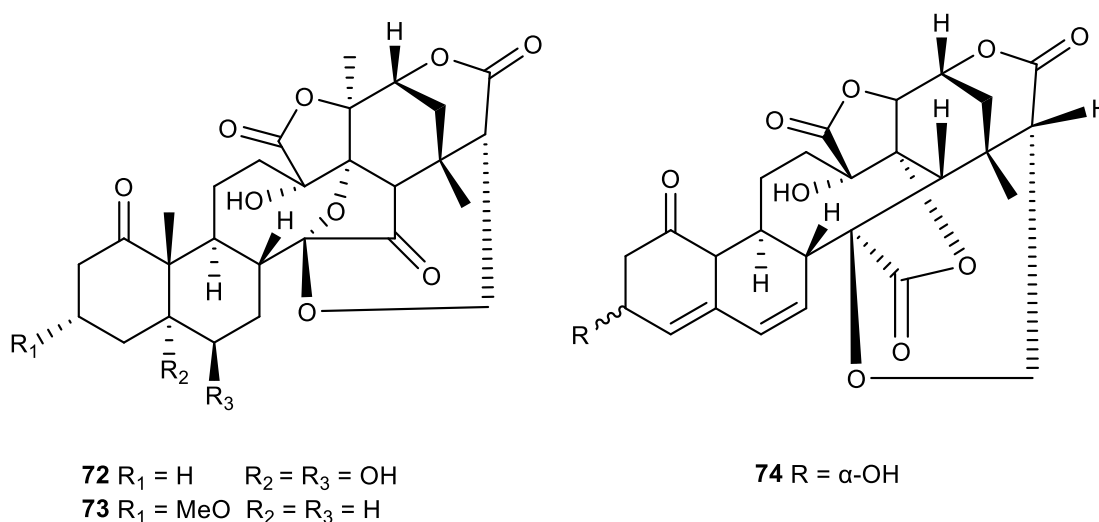


71

1.1.2.2. Physalin

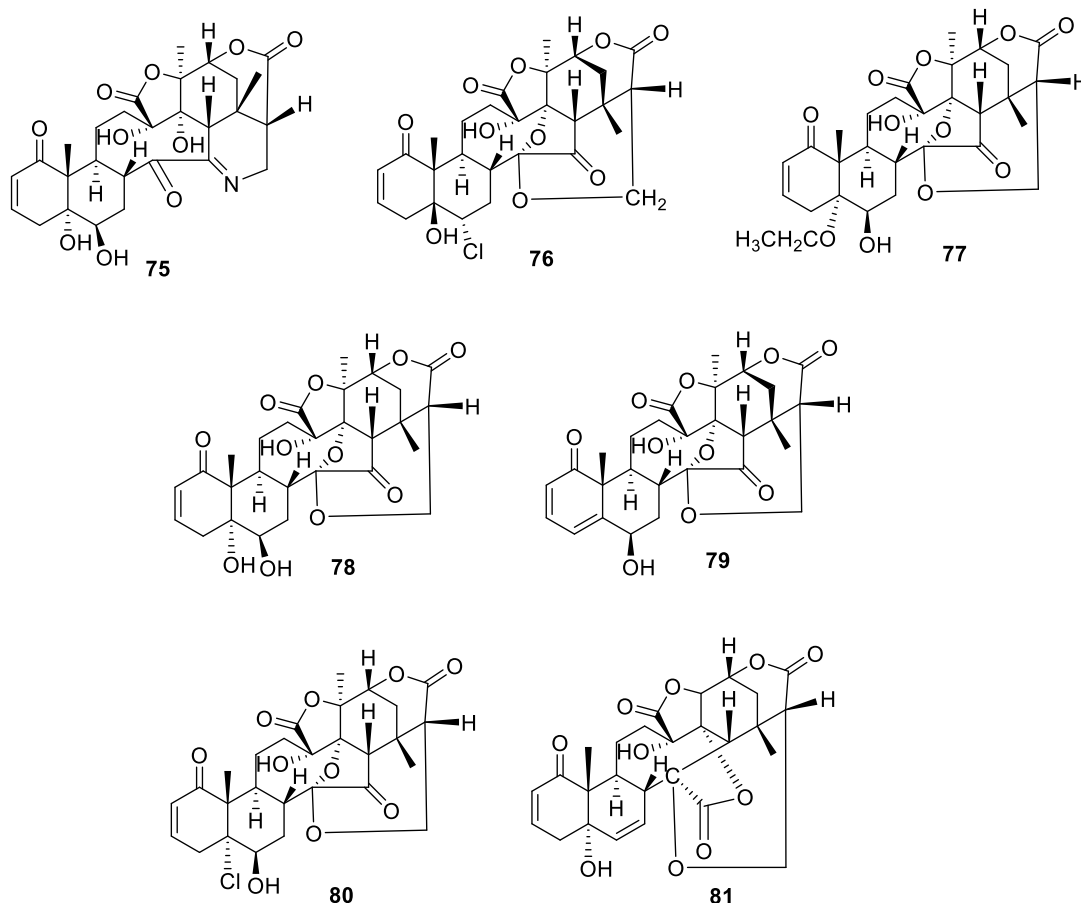
Withanolide với bộ khung bị biến đổi được phân lập từ chi *Physalis* có thể tạo thành physalins [1]. Physalin cũng là thành phần điển hình trong các cây thuộc chi *Physalis*, được đặc trưng bởi sự có mặt của bộ khung 16,24-cyclo-13,14-seco-ergostane [9], trong đó sự ngắt kết nối của C-13 và C-14 tạo ra một vòng tám hoặc chín cạnh và quá trình carbocyclization của C-16 và C-24 tạo ra một vòng sáu cạnh mới [10]. Trong khi đó, quá trình oxy hóa nhóm C-18 methyl thành nhóm carboxyl tạo thành 18,20-lactone, và quá trình oxy hóa C-14 và C-17 tạo thành một oxy vòng dị vòng qua các vòng C và D [10]. Ngoài

ra, physalin thường tạo thành cầu nối oxy để kết nối C-14 với C-27. Theo Jiangping Wu và các cộng sự (2021) có khoảng 78 hợp chất physalin đã được báo cáo xác định và phân lập được từ chi *Physalis* [10]. Các physalin đã được báo cáo có nhiều hoạt tính dược lý, bao gồm chống ung thư, chống viêm, điều hòa miễn dịch, kháng khuẩn, chống đái tháo đường và một số hoạt tính khác [10].



Hình 1.5: Một số hợp chất có chứa khung Physalin phân lập từ chi *Physalis*

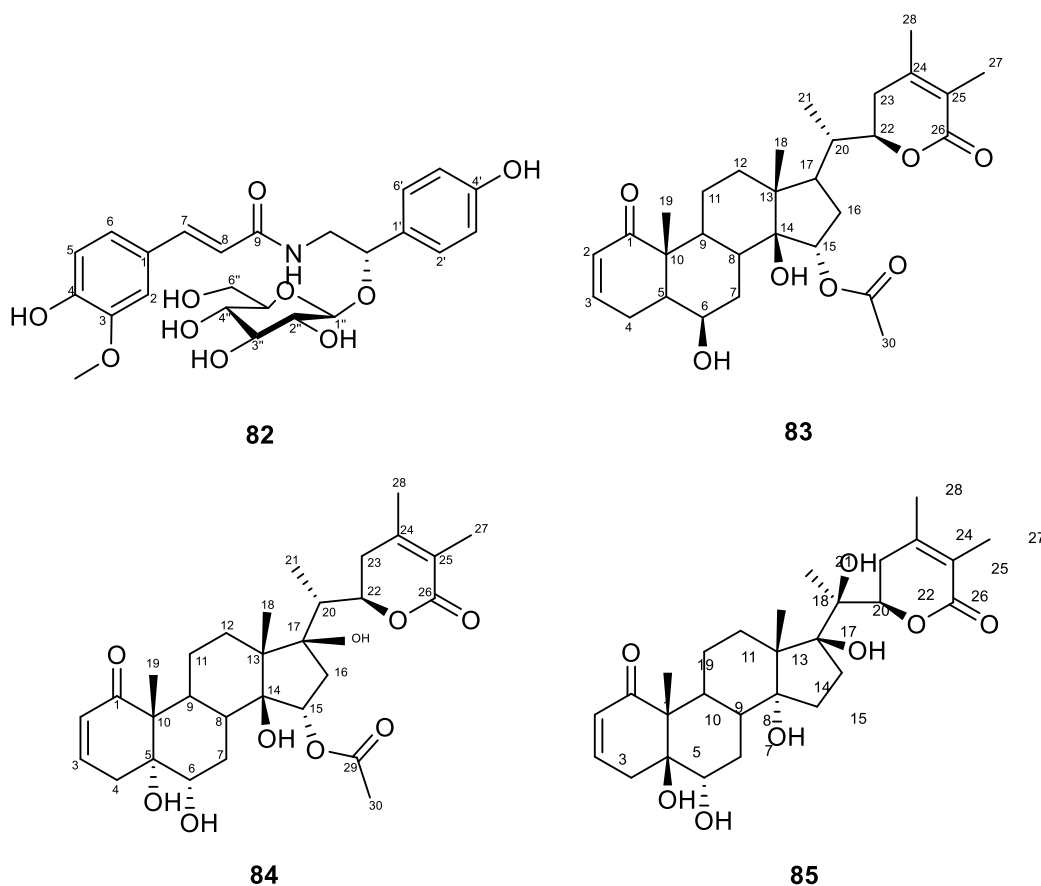
Theo báo cáo kết quả nghiên cứu của Rui-Zhi Men và cộng sự (2014), từ dịch chiết tổng EtOH của toàn bộ cây *Physalis angulata* Linn., tiến hành phân lập thu được hai hợp chất mới có tên là aminophysalin A (**75**) và 5 β -hydroxy-6 α -chloro-5, 6-dihydrophysalin B (**76**); cùng với năm physalin đã biết là 5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B (**77**), physalin D (**78**), physalin G (**79**), physalin H (**80**) và physalin P (**81**). Các hợp chất phân lập được đã được đánh giá về hoạt động của quinone reductase trong tế bào hepa 1c1c7. Các kết quả thu được cho thấy physalin H (**80**) có hoạt động cảm ứng quinone reductase mạnh với giá trị IR (Tỷ lệ cảm ứng, hoạt động cảm ứng quinone reductase) là $3,74 \pm 0,02$, và 4-bromoflav được sử dụng làm chất đối chứng dương có giá trị IR là $2,17 \pm 0,01$, 10 $\mu\text{g/mL}$, trong khi các hợp chất aminophysalin A (**75**) và 5 β -hydroxy-6 α -chloro-5, 6-dihydrophysalin B (**76**); cùng với năm physalin đã biết là 5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B (**77**), physalin G (**79**) cho thấy hoạt động cảm ứng quinone reductase yếu. [9]



Năm 2020, tại Viện Nghiên cứu khoa học miền Trung tác giả Hoàng Lê Tuấn Anh và cộng sự đã nghiên cứu thực hiện thí nghiệm so sánh thành phần hoạt chất chính trong cây dược liệu tự nhiên và cây dược liệu nuôi cấy mô (*Physalis angulata* L., *Physalis minima* L. và *Ophiorrhiza japonica*) sinh trưởng tại Việt Nam và Belarus thông qua việc sử dụng phương pháp sắc ký dầu vân tay. Kết quả thu được từ loài *Physalis minima* L. ở Việt Nam là thành công phân lập và xác định cấu trúc hóa học, thành phần hóa học của 05 hợp chất bao gồm: withanolide E, withaperuvin C, quecetin-3-*O*-rutinoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside. Kết quả xác định hàm lượng của các hoạt chất có trong cao MeOH của mẫu *Physalis minima* L. bản địa lần lượt là: withanolide E (0,237%), quecetin-3-*O*-rutinoside (0,073%), kaempferol-3-*O*-rutinoside (0,364%), kaempferol-3-*O*-rutinoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside (0,534%) trọng lượng bột khô. Đối với mẫu nuôi cấy mô, chỉ xác định được hàm lượng của kaempferol-3-*O*-rutinoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside trong mẫu nuôi cấy mô là 1,5mg/g bột khô, chiếm 0,15% trọng lượng bột khô; các chất còn lại không xác định được. Bên cạnh đó, đã nghiên cứu và phân lập được 6 hợp chất

từ loài *Physalis angulata* bản địa gồm các hợp chất physagulin J, K, L, M, physalin D và withaminimin.[11]

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Phạm Thị Hải Yến khi thực hiện đề tài “Nghiên cứu hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư của một số hợp chất phân lập từ hai loài Tầm bóp (*Physalis angulata* L.) và Thù lù nhỏ (*Physalis minima* L.), họ Cà – *Solanaceae*”. Kết quả là lần đầu tiên phân lập, xác định được cấu trúc hóa học của 03 hợp chất mới lần đầu tiên được ghi nhận là: physalucoside A (**82**), physagulin P (**83**), physagulin Q (**84**) từ loài *Physalis angulata* và phân lập 01 hợp chất 4-deoxywithaperuvin (**85**) thuộc chi *Physalis* từ loài *Physalis minima* ở Việt Nam.[12]



Đánh giá được hoạt tính gây độc tế bào với 6 dòng tế bào ung thư và hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7 của các hợp chất từ phân lập được 2 loài *Physalis angulata* và *Physalis minima*. Kết quả thu được đã xác định hợp chất withanolide E từ loài *Physalis minima* có hoạt tính ức chế enzyme gây viêm mạnh, hợp chất mới physagulin P (**83**) từ loài *Physalis angulata* có tác động kích hoạt apoptosis của tế bào ung thư phổi(A549). [12]

Bảng 1.1: Các hợp chất được phân lập từ chi *Physalis*

STT	Tên hợp chất	Bộ phận phân lập	Loài	TLTK
1	Withagulatin B	Toàn bộ cây	<i>Physalis angulata</i>	[13]
2	Withaperuvin K	Phần trên mặt đất	<i>Physalis peruviana</i>	[14]
3	Witha-5,14,24-trienolide	Toàn bộ cây	<i>Physalis minima</i>	[15]
4	Alkekengin B	Quả	<i>Physalis alkekengi</i>	[16]
5 – 18	Physangulatin A-N	Thân và lá	<i>Physalis angulata L.</i>	[5]
19 – 20	Withaphysalin Y-Z			
21	Physagulide J			
22	Physagulin J			
23	Withaminimin			
24 – 25	Physagulin A-B			
26	Physagulin N			
27	Withaminimin acetone			
28 – 29	Physagulin H-I			
30	Physagulin F			
31	Physagulide I			
32	Physagulin K			
33 – 40	Physagulide A-H			
41 – 42	Physagulide I-J			
43	Physagulin Q			
44	Physagulin K			
45	Physagulin J			
46	Withangulatin A			

47	Withaminimin			
48	Physagulin M			
49	(20 <i>S</i> ,22 <i>R</i>)-15 α -chloro-6 β , 14 β -dihydroxy-1- oxowitha-2,24-dienolide			
50	Physagulin B			
51	(17 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-5 β ,6 β - epoxy-18,20-dihydroxy- 1-oxowitha-2,24- dienolide			
52	15-hydroxy-withaphysalin B [(17 <i>S</i> , 20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)- 5 β ,6 β :18,20-diepoxy- 15 α ,18 β -dihydroxy-1- oxowitha-2,24-dienolide] (18 <i>R</i> và 18 <i>S</i>)			
53	(17 <i>S</i> , 20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)- 5 β ,6 β :18,20-diepoxy- 15 α ,18 β -dihydroxy-1- oxowitha-24-enolide (18 <i>R</i> và 18 <i>S</i>)	Đài hoa	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>franchetii</i>	[7]
54	17 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)- 5 β ,6 β :18,20-diepoxy-18 β - hydroxy-1-oxowitha-24- enolide (18 <i>R</i> và 18 <i>S</i>)			
55	5-hydroxy-withphysalin U [(17 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-18,20- epoxy-14 α ,15 β - dihydroxy-1,18- dioxowitha-2,5,24- trienolide]			
56	Withaphysalin N			

57	Withaphysalin U			
58	Withaphysalin B			
59	Physagulin J			
60	Withaminimin			
61 – 66	Physaminimin A – F	Toàn bộ cây	<i>Physalis minima</i>	[8]
67	Withangulatin A			
68	Withaminimin			
69	Physagulin J			
70	Physagulin K			
71	Physacoztolide B			
72	Physalin T	Phần trên mặt đất	<i>Physalis alkekengi</i>	[1]
73	Physalin W	Toàn bộ cây	<i>Physalis angulata</i>	
74	Physalin W	Phần trên mặt đất	<i>Physalis alkekengi</i>	
75	Aminophysalin A	Toàn bộ cây	<i>Physalis angulata</i> Linn.	[9]
76	5 β -hydroxy-6 α -chloro-5,6-dihydrophysalin B			
77	5 α -ethoxy-6 β -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B			
78	Physalin D			
79	Physalin G			
80	Physalin H			
81	Physalin P			
82	Physalucoside A	Phần trên mặt đất	<i>Physalis angulata</i>	[12]
83 – 84	Physagulin P – Q			
85	4-deoxywithaperuvin		<i>Physalis minima</i>	

1.2. Tổng quan về loài *Physalis peruviana* L.

1.2.1. Đặc điểm thực vật loài *Physalis peruviana* L.

Loài *Physalis peruviana* L. thuộc chi *Physalis* là cây bụi phân nhánh rải rác, cành xòe, chiều cao đạt tới 1–1,6 m, lá hình trái tim mềm. Hoa có hình chuông và rủ xuống, chiều rộng 15–20 mm, có màu vàng với các đốm màu nâu tím bên trong hoa. Sau khi hoa rụng, đài hoa nở ra, khi chín biến thành lớp áo màu be bao bọc hoàn toàn quả. Để phân biệt, mép lá *Physalis angulata* có răng cưa, trong khi mép lá *Physalis peruviana* không có răng cưa. Quả có hình tròn, nhẵn, có màu vàng sáng hay màu cam, có đài hoa lớn cùng với quả bao phủ bên ngoài như chiếc đèn lồng, to cỡ 1,25–2 cm.[17]

- Phân bố: *Physalis peruviana* mọc ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới [17]. Tại Việt Nam, loài này thường xuất hiện ở các khu vực có khí hậu ôn đới và cận nhiệt đới, nhất là ở các tỉnh miền núi phía Bắc như Lào Cai, Sơn La, Hà Giang và một số tỉnh Tây Nguyên như Lâm Đồng, Đắk Lắk, và Gia Lai... Cây *Physalis peruviana* thích hợp với điều kiện thổ nhưỡng tơi xốp, giàu dinh dưỡng, và thường phát triển mạnh ở những khu vực có ánh sáng tốt.

Loài này thường được trồng nhỏ lẻ hoặc mọc hoang dã, và có giá trị trong y học cổ truyền. Trong thời gian gần đây, *Physalis peruviana* đã thu hút sự chú ý và được đưa vào một số mô hình nông nghiệp mới nhằm cung cấp nguồn thực phẩm lành mạnh.

- Trong y học dân gian *Physalis peruviana* có vị đắng, có tính hàn, không gây độc, có khả năng thanh nhiệt và giải độc và lợi niệu tiêu thũng. *Physalis peruviana* được sử dụng trong điều trị sốt, ho sung họng,...

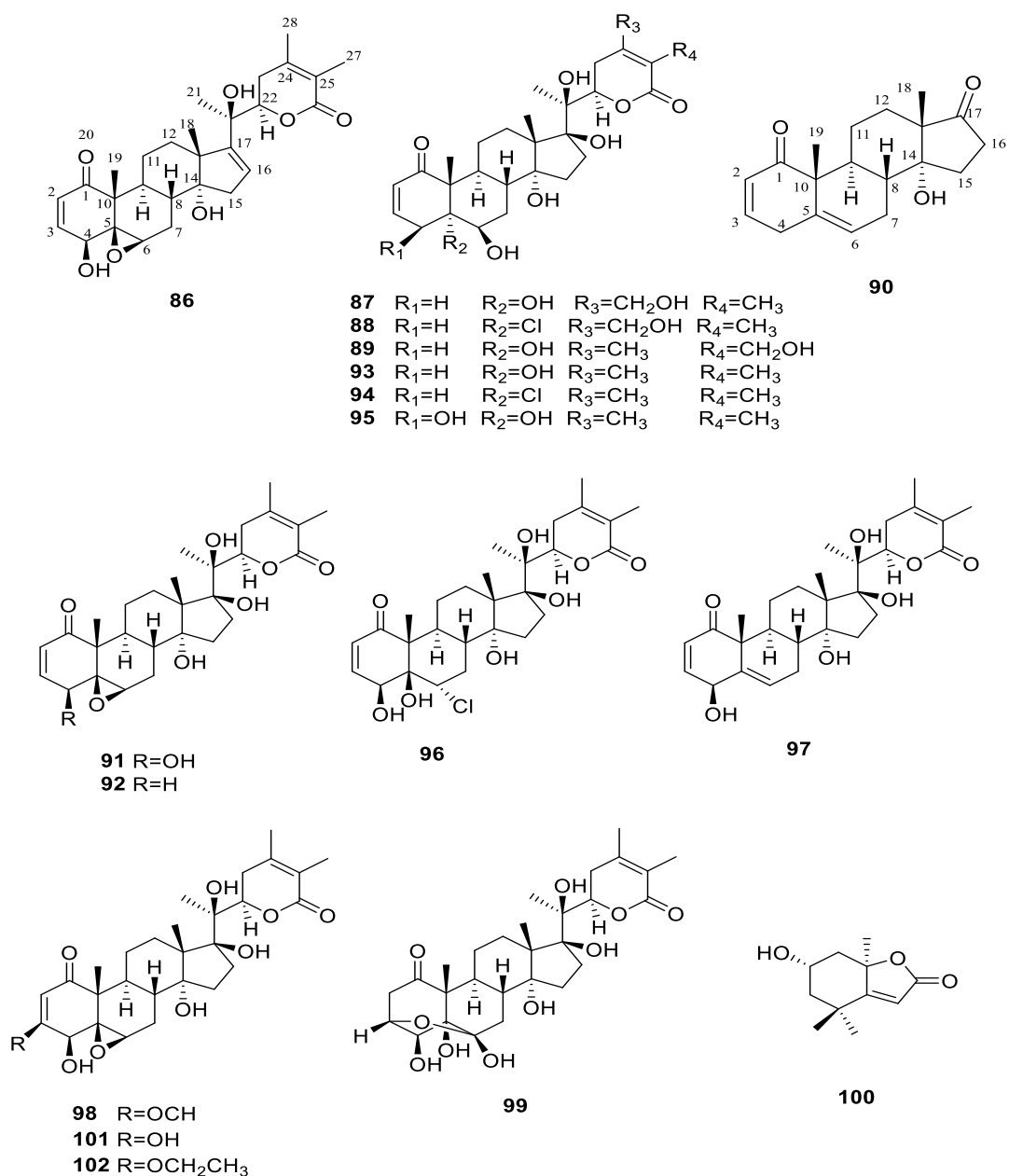




Hình 1.6: Hình ảnh về loài *Physalis peruviana* L.

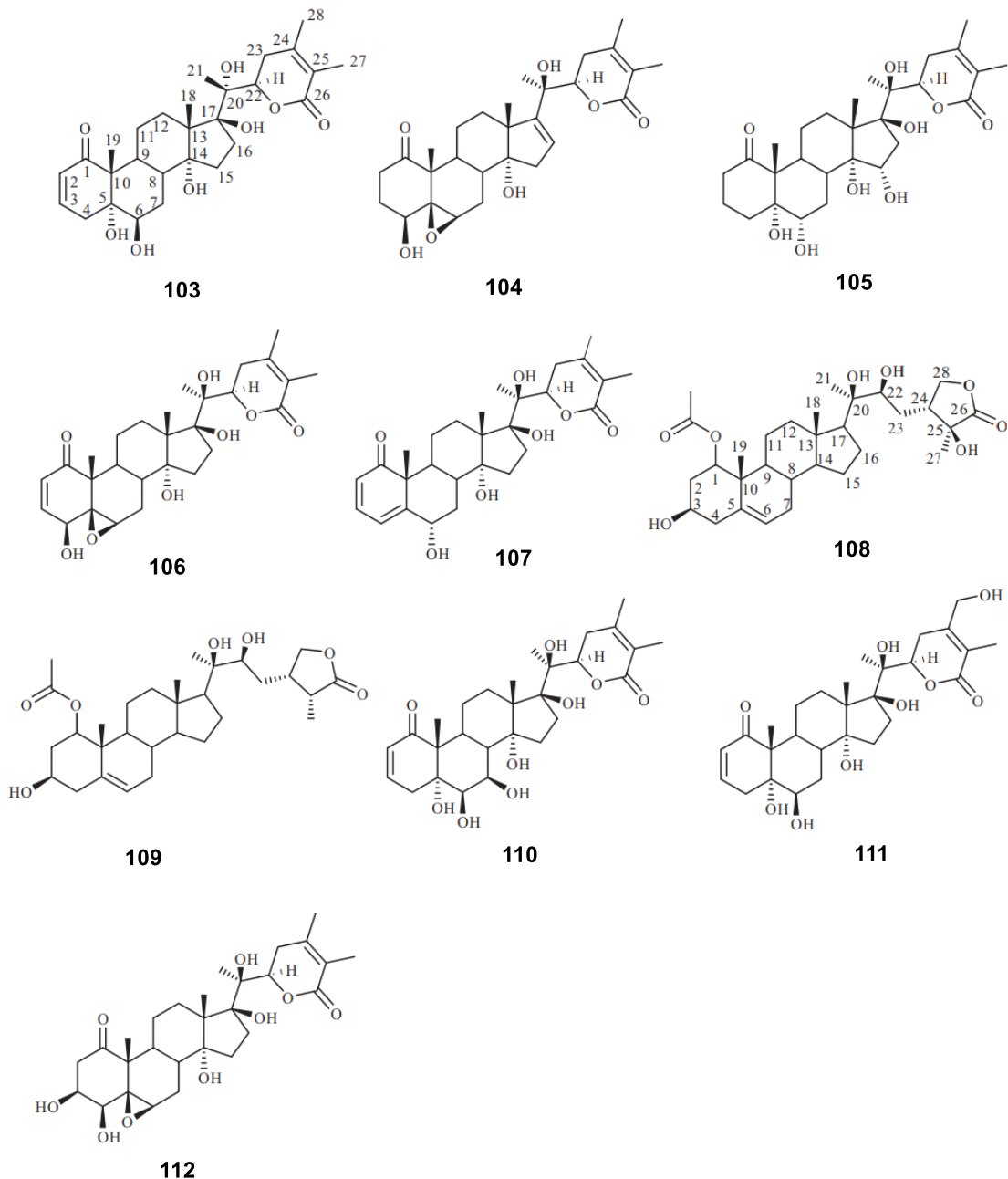
1.2.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài *Physalis peruviana* L.

Quá trình nghiên cứu của nhóm YH Lan và cộng sự (2009) về các chất chiết xuất từ thân và lá của *Physalis peruviana* L. đã phân lập được bảy loại withanolide mới, phyperunolide A (**86**), phyperunolide B (**87**), phyperunolide C (**88**), phyperunolide D (**89**), peruvianoxide (**90**), phyperunolide E (**101**), và phyperunolide F (**102**) cùng với mười withanolide đã biết. Tất cả các withanolide phân lập được tiến hành đánh giá, khảo sát khả năng gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MDA-MB-231 và MCF7) và ung thư gan (Hep G2 và Hep 3B). Kết quả cho thấy các hợp chất (**86**), (**91**), (**92**) và (**94**) thể hiện tốt khả năng gây độc tế bào đối với các dòng ung thư.[18]



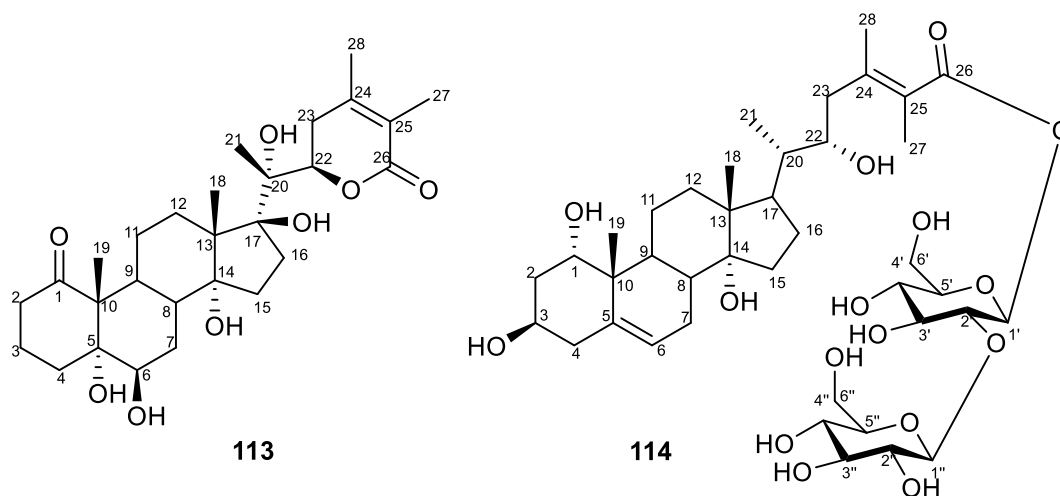
Theo công bố của M Sang-Ngern và cộng sự (2016), khi tiến hành phân lập các bộ phận trên mặt đất của loài *Physalis peruviana* L. thu được các hợp chất gồm ba loại withanolide mới, physaperuvin G (**103**), với physaperuvin I (**104**) và J (**105**), cùng với bảy dẫn xuất đã biết (**106–112**). Các hợp chất (**106–112**) sau khi phân lập được đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO trong các tế bào RAW 264.7 của đại thực bào chuột được kích hoạt bằng lipopolysaccharide (LPS) và đánh giá về khả năng ức chế hoạt động của yếu tố hạt nhân-alpha (TNF- α) được kích hoạt bởi yếu tố hạt nhân-kappa B (NF- κ B) trong các tế bào thận phôi người được truyền nhiễm (293). Các kết quả thu được cho thấy các

hợp chất (106), (107) và (112) có hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh trong tế bào RAW 264,7 được kích hoạt bằng LPS, với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 0,32–7,8 μM . Hợp chất (106–109) ức chế hoạt động NF- κB do TNF- α gây ra với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,04–5,6 μM . [19]



LW Demgne và cộng sự (2024) đã tiến hành phân lập từ dịch chiết methanol của toàn bộ cây *Physalis peruviana* L. được thu hái tại Bangoua. Kết quả đã phân lập được hai dẫn xuất steroid mới (20*S*, 22*R*)-5 α ,6 β ,14 α ,17 β ,20 α -pentahydroxy-1-oxowithan-24-en-22,26-olide (**113**) và withaperuvinoside: (24*E*, 22*R*)-1 α ,3 β -dihydroxyergosta-5,24-dienolide-26-*O*- β -*D*-glucopyranosyl

(1→2)- β -D-glucopyrano-side (**114**) và sáu hợp chất đã biết: saringosterol, physalindicanol B, physalindicanol A, perulactone, β -sitosterol, và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside. [20]



Tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết methanol, EtOAc, n-BuOH và các hợp chất phân lập được bằng cách xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (giá trị MIC được xác định bằng phương pháp so màu nhanh p-iodonitrotetrazolium clorua (INT)) đối với năm chủng vi khuẩn gây bệnh (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (Isolat), *Salmonella typhi* (ATCC 6539) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026)). Cao chiết tổng methanol và phần cao chiết EtOAc cho thấy hoạt tính yếu chống lại tất cả các chủng vi khuẩn có giá trị MIC nằm trong khoảng từ 128 – 512 μ g/mL, trừ *Staphylococcus aureus*. Phần cao chiết n-BuOH, hai dẫn xuất steroid mới (**113 – 114**) và các hợp chất phân lập được không có hoạt tính chống lại tất cả các chủng vi khuẩn gây bệnh.[20]

Bảng 1.2: Các hợp chất được phân lập từ loài *Physalis peruviana* L.

STT	Tên hợp chất	Bộ phận phân lập	Loài	TLTK
86 – 89	Phyperunolide A – D	Thân và lá	<i>Physalis peruviana</i> L.	[18]
90	Peruvianoxide			
91	4 β -hydroxywithanolide E			
92	Withanolide E			
93	Withanolide E			

94	Withanolide C			
95	Withaperuvin			
96	Physalolactone			
97	Withaphysanolide			
98	Physalactone			
99	Withaperuvin D			
100	Loliolide			
101 – 102	Phyperunolide E – F			
103	Physaperuvin G	Phần trên mặt đất	<i>Physalis peruviana</i> L.	[19]
104 – 105	Physaperuvin I – J			
106	4 β -hydroxywithanolide E			
107	Withaperuvin C			
108	Perulactone C			
109	Perulactone			
110	Withaperuvin N			
111	Phyperunolide B			
112	Phyperunolide E			
113	(20 <i>S</i> , 22 <i>R</i>)-5 α ,6 β ,14 α , 17 β ,20 α -pentahydroxy-1- oxowithan-24-en-22,26- olide	Toàn bộ cây	<i>Physalis peruviana</i> L.	[20]
114	withaperuvinoside: (24 <i>E</i> , 22 <i>R</i>)-1 α ,3 β - dihydroxyergosta-5,24- dienolide-26- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β - <i>D</i> -glucopyrano-side			

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Toàn bộ phần trên mặt đất cây Thù lù lông (*Physalis peruviana* L.) sau khi được thu hoạch vào ngày 12/01/2022 và được định danh bởi TS. Đỗ Thanh Tuấn trường Đại học Y dược Thái Bình. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao - VAST- Số hiệu mẫu là PP2022.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

- Lipopolysaccharide (LPS) từ *Escherichia coli* của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) đến từ Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, USA). Sodium nitrite, sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride and dimethyl sulphoxide (DMSO) của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). các hóa chất cần thiết khác của các hãng Sigma, GIBCO, Invitrogen, Promega v.v.

- Dòng tế bào: RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia và GS.TS. Chi-Huang, Đại học quốc gia Yang-Ming, Đài Loan cung cấp.

2.3. Hoá chất và dung môi

- Dung môi: *n*-hexane (kỹ thuật $\geq 95\%$), dichloromethane (kỹ thuật $\geq 95\%$), methanol (kỹ thuật $\geq 95\%$), ethyl acetate (kỹ thuật $\geq 95\%$), acetone ((kỹ thuật $\geq 95\%$) acid formic, nước cất.

- Dụng cụ, trang bị: găng tay, giấy lọc thường, giấy lọc tinh, bình cầu thủy tinh các thể tích, quả bóp 3 chạc, quả bóp cao su, ống đong thủy tinh, bình tam giác thủy tinh các thể tích, khẩu trang, pipette micropipette, pipette pasteur, cột sắc ký thủy tinh các cỡ, đầu tip pipette, xy lạnh các loại, ống nghiệm v.v.

- Thuốc thử: để hiện hình các vết hữu cơ trên bản mỏng, phun xịt H_2SO_4 10%, soi đèn UV.

- Silica gel 60 H loại dùng cho sắc kí lớp mỏng, Merck.

- Silica gel 60 (0,040 – 0,063mm), Merck dùng cho sắc kí cột.

- Silica gel RP-18, YMC Merck dùng cho sắc kí cột pha đảo.

- Shephadex LH-20 dùng cho sắc kí cột pha đảo

- Sắc ký lớp mỏng loại pha thường (bản kính và bản nhôm) và pha đảo (bản kính).

- Máy cô quay thu hồi dung môi; hệ thiết bị làm lạnh tuần hoàn, bơm chân không, máy hứng phân đoạn, tủ sấy, máy sấy bản mỏng, đèn UV 2 bước sóng (254nm, 365nm) v.v

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu dược liệu thuộc loài *Physalis peruviana* L. sau khi thu hoạch, rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ và sấy khô ở 40-50°C (hoặc phơi khô trong bóng râm), sau đó đem nghiền thành dạng bột.

2.4.2. Phương pháp chiết xuất

Mẫu sau khi xử lý được ngâm chiết ba lần trong methanol ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Cát loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao chiết tổng methanol. Cao tổng methanol được chiết tiếp với từng dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate. Tiếp tục cất loại dung môi của các dịch chiết sau khi chiết, dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng.

2.4.3. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất từ mẫu *Physalis peruviana* L.

Các hợp chất được phân lập và tinh chế từ các cao chiết bằng cách sử dụng các phương pháp sắc ký khác nhau như: Sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột silica gel, sắc ký cột pha đảo (RP-18), sắc ký rây phân tử, sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC).

- Sắc ký lớp mỏng (TLC): Được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ có chất phát quang thích hợp thường là bản mỏng đã tráng sẵn silica gel bản nhôm hoặc bản kính đối với pha thường, đối với pha đảo sử dụng bản kính. Tiến hành triển khai sắc ký lớp mỏng bằng cách sau khi mẫu được xử lý ở dạng lỏng nhờ một ống vi quản đưa mẫu lên bản mỏng tạo thành các vết chấm nhỏ, sấy nhẹ để dung môi bay đi khỏi vết chấm, rồi nhúng bản vào dung dịch giải ly với hệ dung môi phù hợp với từng chất để dung môi giải ly di chuyển lên. Hiện hình các vết sau khi giải ly bằng tia tử ngoại UV (chiếu đèn UV) hoặc

bằng các thuốc thử hiện màu như hơi iod, 2,7-fluorescein hoặc dung dịch acid sulfuric 10%.

- Sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC): Sau khi tiến hành hiện hình các vết chất tiến hành cạo lớp silica gel chứa các chất giống nhau, sau đó tiến hành giải hấp để thu các chất cần tinh chế.

- Sắc ký cột

+ Sắc ký cột silicagel: Sử dụng chất hấp phụ là silica gel 60 (0,040 – 0,063mm), Merck và dung môi rửa giải thường được sử dụng như nước, n-hexane, dichloromethane, methanol, acetone, ethyl acetate với tỷ lệ phù hợp đối với từng chất.

+ Sắc ký cột pha đảo (RP-18): Sử dụng chất hấp phụ là silica gel RP-18, YMC Merck

+ Sắc ký rây phân tử: Sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường hoặc pha đảo và dùng Shephadex LH-20 làm pha tĩnh với dung môi rửa giải là methanol, dichloromethane theo tỷ lệ thích hợp.

2.4.4. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất

Các hợp chất sau khi phân lập được tiến hành xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại như phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ 1 chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), phổ 2 chiều (HSQC, HMBC),...

- Phổ khối lượng (MS): Phổ khối lượng đo tại Viện Hóa sinh biển và Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer của Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là TMS (Tetrametyl Silan).

- Phổ 1 chiều (1D)

+ Phổ proton $^1\text{H-NMR}$: Trong phổ $^1\text{H-NMR}$, mỗi loại proton cộng hưởng ở một trường khác nhau từ đó dựa vào độ dịch chuyển hoá học của các proton cho biết loại proton và số lượng proton của mỗi loại.

+ Phổ carbon $^{13}\text{C-NMR}$: Trong phổ $^{13}\text{C-NMR}$, mỗi nguyên tử carbon sẽ cộng hưởng và cho một tín hiệu phổ khác nhau, từ đó giúp phân biệt tất cả các

loại carbon và cung cấp thông tin bộ khung carbon của hợp chất. Độ dịch chuyển hoá học cho biết loại nhóm chức.

- Phổ 2 chiều (2D)

+ Phổ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation): Cho biết tương tác trực tiếp giữa C và H trong phân tử. Tương tác nhóm CH₂ màu xanh, tương tác CH, CH₃ màu đỏ.

+ Phổ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity): Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết, biểu diễn các tương tác xa của H và C trong phân tử. Thông tin tín hiệu giữa H và C qua hai hoặc ba liên kết.

Dung môi đo phổ: CDCl₃, CD₃OD, pyridine-*d*₅, DMSO-*d*₆. Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo.

2.4.5. Các phương pháp đánh giá hoạt tính

2.4.5.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro*

Dòng tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM (gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvate) và bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO). Sau 3-5 ngày, các tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ 1:3 được nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C với nồng độ CO₂ là 5%. [21]

2.4.5.2. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7

Khả năng kháng viêm *in vitro* được đánh giá thông qua phương pháp xác định hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxit (NO) trên tế bào RAW 264.7 cung cấp bởi GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia và GS.TS. Chi-Huang, Đại học quốc gia Yang-Ming, Đài Loan.

+ Tế bào macrophage RAW 264.7 được triển khai vào đĩa có 96 giếng với nồng độ là 2 x 10⁵ tb/giếng và được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C và chứa 5% CO₂ trong thời gian 24h.

+ Sau đó, môi trường dùng để nuôi cấy tế bào sẽ được loại bỏ và thay vào bằng môi trường DMEM không chứa FBS trong 3h.

+ Sau đó tiếp tục ủ mẫu nghiên cứu trong các nồng độ môi trường khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh NO bằng LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) trong 24h.

Đối với những giếng không tiến hành ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được gọi là đối chứng âm. Còn đối chứng dương được sử dụng là N^G-Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

Nitrite (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định thông qua bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA).

+ Chuyển 100 μL dịch môi trường dùng để nuôi tế bào (ủ mẫu) sang bộ đĩa 96 giếng mới và sau đó thêm vào các giếng 100 μL Griess reagent gồm 50 μL sulfanilamide 1% (w/v) trong 5% (v/v) acid phosphoric và 50 μL 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.

+ Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và tiến hành xác định hàm lượng nitrite bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).

Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

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

Phép thử được tiến hành lặp lại 3 lần để đảm bảo được tính chính xác của thí nghiệm. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định thông qua phần mềm TableCurve 2Dv4 của máy tính. [21-24]

2.4.5.3. Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT

Phép thử được tiến hành dựa theo phương pháp của Monks (1991), phép thử xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi protein của tế bào được nhuộm bằng 3'-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng MTT gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

+ Chất thử (10 μ L) pha trong DMSO 1% được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng để có dải nồng độ 100 μ g/ml; 20 μ g/ml; 4 μ g/ml; 0,8 μ g/ml.

+ Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Thêm vào các giếng của đĩa 96 giếng một lượng tế bào phù hợp (trong 190 μ L môi trường) và để chúng phát triển trong vòng từ 3-5 ngày. Giếng không có chất thử chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 1% sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0.

+ Ủ trong tủ ấm CO₂ nuôi trong 24 giờ.

+ Sau 24 giờ, 10 μ L MTT (nồng độ cuối cùng là 5mg/mL) được cho vào mỗi giếng.

+ Sau 24 giờ, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hoà tan bằng 50 μ L (DMSO) 100% và đọc kết quả OD ở bước sóng 540nm trên máy quang phổ. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = [\text{OD (chất thử)} - \text{OD (ngày 0)}] \times 100 / [\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}]$$

Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve. [21-24]

2.5. Thực nghiệm

2.5.1. Tạo cao chiết

Toàn bộ phần trên mặt đất cây Thù lù lông sau khi thu hoạch, rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ và sấy khô ở 40-50°C, sau đó đem nghiền thành dạng bột. 3,0 kg bột khô của cây Thù lù lông được ngâm chiết 3 lần với methanol ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Cát loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, dịch chiết methanol được chiết với từng dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, dichloromethane, ethyl acetate. Tiếp tục cất loại dung môi của các dịch chiết sau khi chiết, dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (**PPH**) (113 g), dichloromethane (**PPD**) (34 g) và ethyl acetate (**PPE**) (24 g). Dịch chiết nước được cất loại nước dưới áp suất giảm cho một phần dịch chiết nước (**PPW**).

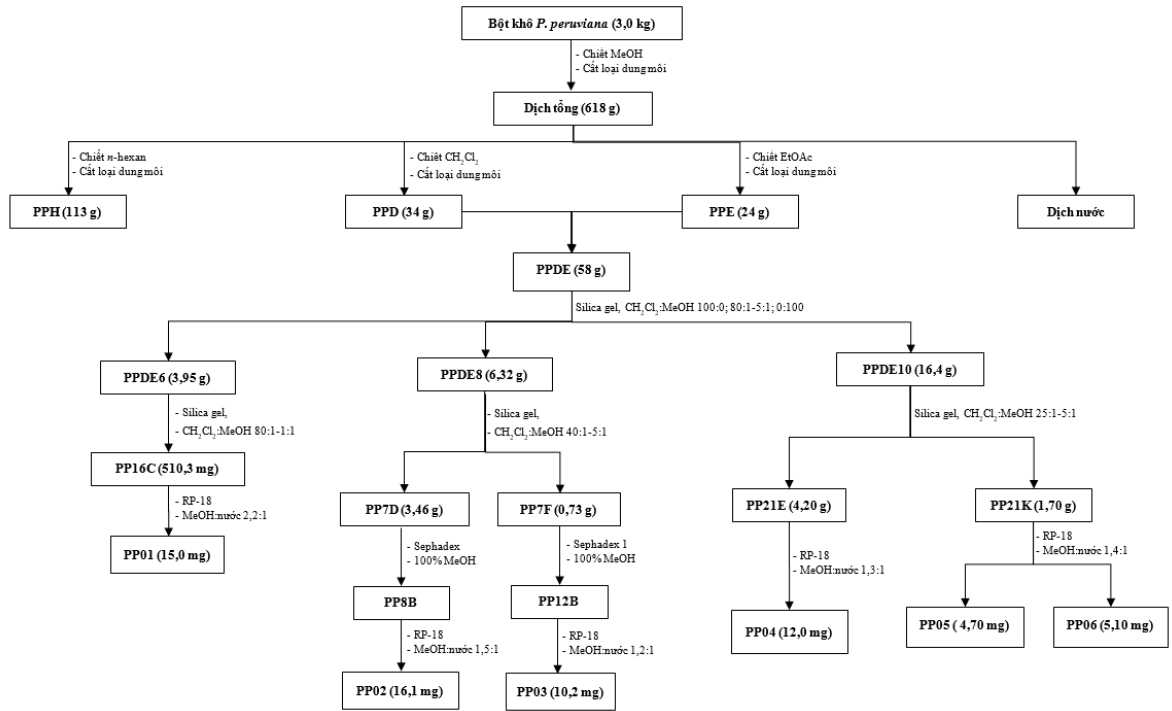
2.5.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất

Tiến hành khảo sát cao chiết dichloromethane (**PPD**) và cao chiết ethyl acetate (**PPE**) bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy sự giống nhau giữa hai cặn chiết. Gộp hai cao chiết này thu được 58 g **PPDE**. Cao chiết **PPDE** được phân tách trên cột silica gel, hệ dung môi để rửa giải gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (100:0; 80:1–5:1; 0:100) thu được 12 phân đoạn, kí hiệu là **PPDE1 – PPDE12**.

+ Phân đoạn **PPDE6** (3,95 g) được tinh chế tiếp trên cột silica gel, hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (80:1-1:1) thu được 03 phân đoạn nhỏ, ký hiệu là **PP16A - PP16C**. Tiếp tục tinh chế phân đoạn **PP16C** (510,3 mg) bằng cột đảo RP-18, hệ dung môi MeOH-nước 2,2:1 thu được hợp chất sạch **PP01** (15,0 mg).

+ Phân đoạn **PPDE8** (6,32 g) được tách tiếp trên cột silica gel, với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (40:1-5:1) tách được 07 phân đoạn nhỏ, ký hiệu là **PP7A – PP7G**. Tiếp tục tinh chế phân đoạn **PP7D** (3,46 g) bằng cột Sephadex với 100% MeOH đã thu được 4 phân đoạn nhỏ, ký hiệu là **PP8A – PP8D**. Phân đoạn nhỏ **PP8B** được tinh chế lại bằng cột đảo RP-18, hệ dung môi MeOH-nước 1,5:1 thu được hợp chất sạch **PP02** (16,2 mg). Phân đoạn nhỏ **PP7F** (0,73 g) được tinh chế lại bằng cột đảo RP-18, hệ dung môi MeOH-nước 1,2:1 thu được hợp chất sạch **PP03** (10,2 mg).

+ Phân đoạn **PPDE10** (20,86 g) được tách tiếp trên cột silica gel, sử dụng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (25:1-5:1) thu được 11 phân đoạn nhỏ, ký hiệu là **PP21A – PP21K**. Tiếp tục tiến hành tinh chế phân đoạn **PP21E** bằng cột RP-18, hệ dung môi MeOH-nước 1,3:1 thu được hợp chất sạch **PP04** (12,0 mg). Tiếp tục tinh chế phân đoạn **PP21K** bằng cột RP-18, hệ dung môi MeOH-nước 1,4:1 thu được 02 hợp chất sạch **PP05** (4,70 mg) và **PP06** (5,10 mg). Quy trình chiết xuất và phân lập mẫu cây Thù lù lông được trình bày ở hình 2.1.



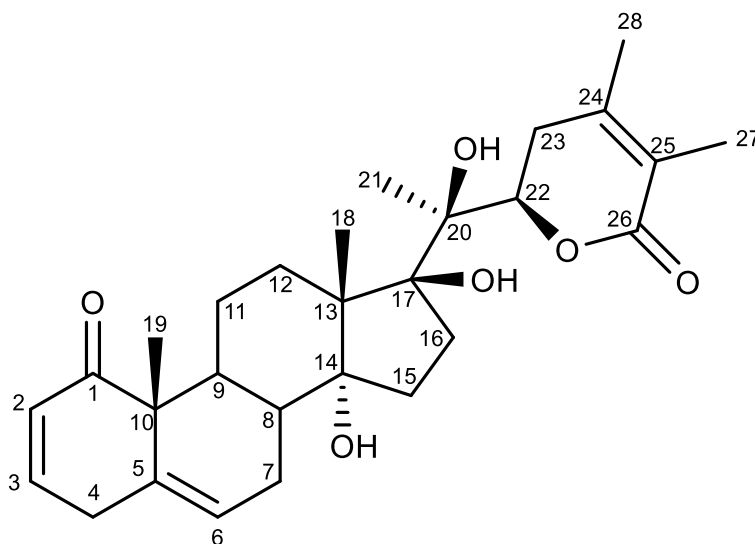
Hình 2.1: Sơ đồ chiết và phân lập các chất từ phần trên mặt đất cây *Physalis peruviana* L.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật sắc ký khác nhau, sắc ký cột pha thường (CC), sắc ký cột pha đảo và sắc ký rây phân tử Sephadex LH20, chiết xuất methanol của *Physalis peruviana* L. đã được tách ra để thu được sáu withanolide đã biết, bao gồm withanolide J (**PP01**), 4 β -hydroxywithanolide E (**PP02**), physapruin A (**PP03**), withaperuvin C (**PP04**), physaperuvin G (**PP05**), 28-hydroxywithaperuvin C (**PP06**). Tất cả các hợp chất đều được xác định bằng phổ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC và HMBC, kết hợp với so sánh với dữ liệu phổ của các công bố trước đây.

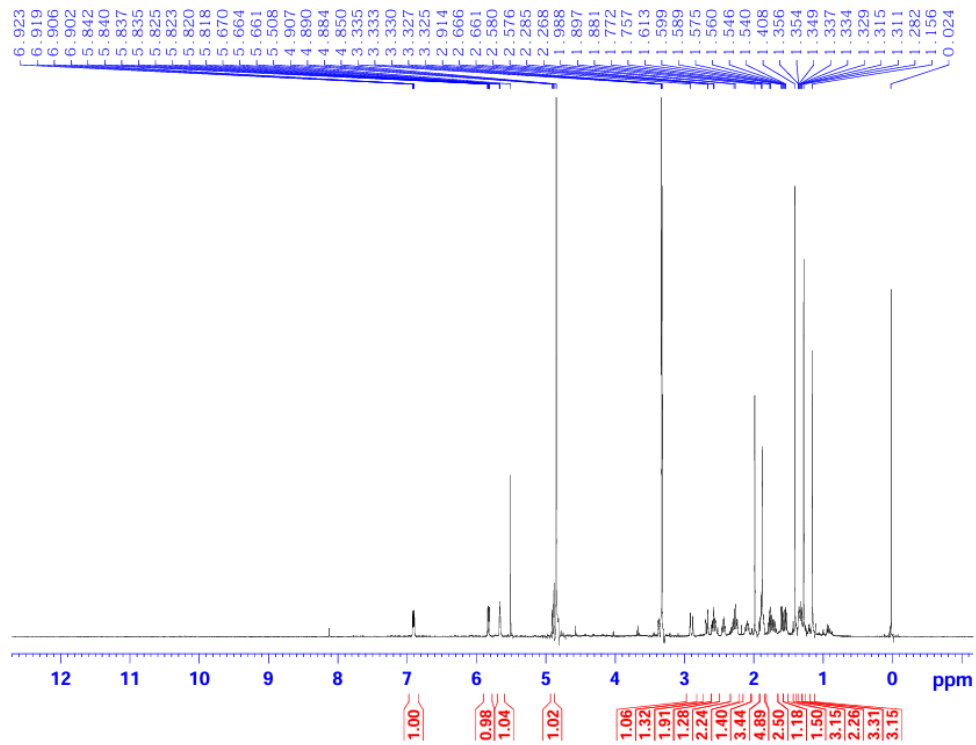
3.1. Xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất phân lập từ loài *Physalis peruviana* L.

3.1.1. Hợp chất withanolide J (**PP01**)

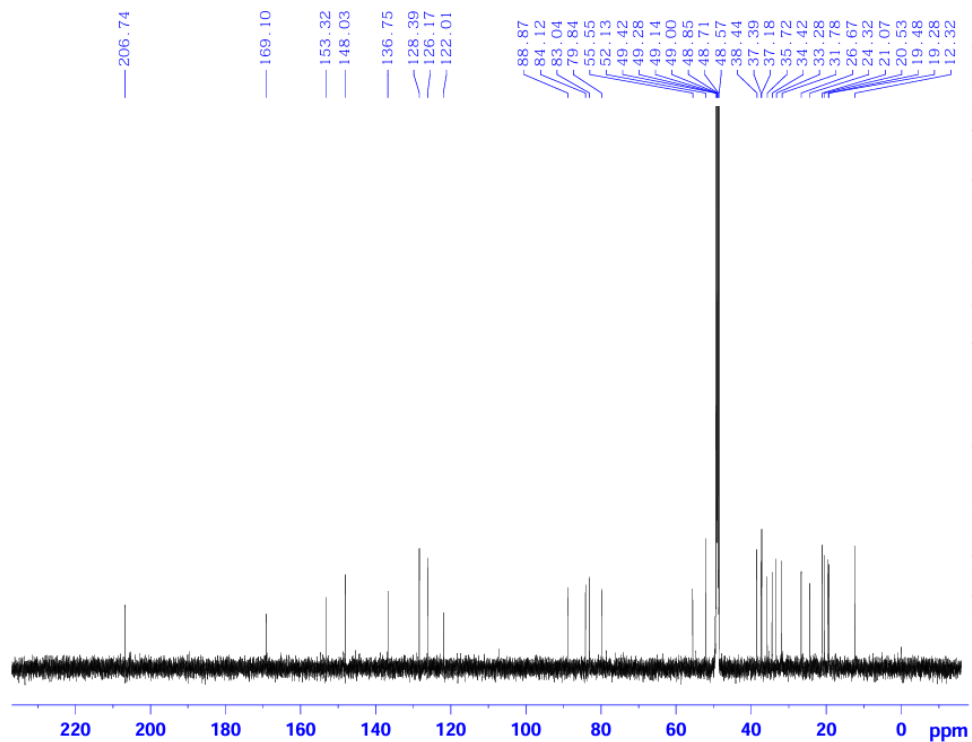


Hình 3.1: Cấu trúc hoá học của hợp chất **PP01**

Trên phổ proton $^1\text{H-NMR}$ của **PP01** có thể thấy các tín hiệu đặc trưng các nhóm của hợp chất withanolide gồm 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1,16 (H-18, 3H, s), 1,41 (H-19, 3H, s), 1,28 (H-21, 3H, s), 1,88 (H-27, 3H, s) và 1,99 (H-28, 3H, s), 3 proton olefinic tại δ_{H} 5,83 (1H, m), 6,91 (1H, m), 5,56 (1H, t, $J = 1,8$ Hz) xác định sự xuất hiện của nhóm $\text{CH}=\text{CH}$.



Hình 3.2: Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PP01** (CD_3OD , 600 MHz)



Hình 3.3: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PP01** (CD_3OD , 150 MHz)

Trên phổ carbon ^{13}C -NMR xuất hiện 28 tín hiệu carbon bao gồm: 5 nhóm methyl (δ_{C} trong khoảng 12,3-21,1), 4 carbon olefin (δ_{C} 126,2; 148,0), 7 nhóm methylene (δ_{C} trong khoảng 21,1-37,2), 3 nhóm methine (δ_{C} 38,4; 37,4; 83,0),

7 carbon bậc 4 (δ_C 52,1;55,6; 84,1; 88,9; 79,8; 153,3; 122,0), 1 carbon ketone (δ_C 206,7), 1 carbon este (δ_C 169,1). Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PP01** rất giống với dữ liệu phổ NMR của hợp chất withanolide J [25], hợp chất **PP01** được xác định là withanolide J.

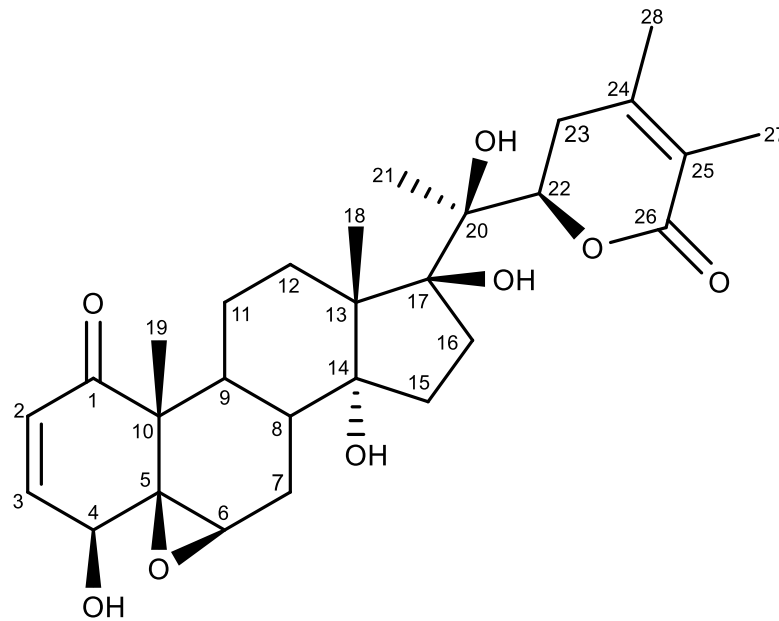
Bảng 3.1: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **PP01** và hợp chất tham khảo

C	TLTK # δ_C	$\delta_C^{a,b}$	PP01
			$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	205,3	206,7	-
2	127,9	128,4	5,83 (1H, m)
3	146,3	148,0	6,91 (1H, m)
4	33,6	34,4	2,91 (1H, m) 2,68 (1H, m)
5	135,3	136,8	-
6	125,3	126,2	5,56 (1H, t, $J = 1,8$ Hz)
7	24,9	24,3	2,55 (1H, m) 2,24 (1H, m)
8	36,0	38,4	1,77 (1H, m)
9	36,4	37,4	2,27 (1H, m)
10	51,4	52,1	-
11	22,2	21,1	2,10 (2H, m)
12	26,8	26,7	2,43 (1H, m) 1,55 (1H, m)
13	51,0	55,6	-
14	86,1	84,1	-
15	33,3	35,7	2,58 (1H, m) 1,60 (1H, m)
16	33,3	37,2	1,72 (1H, m) 1,53 (1H, m)
17	88,9	88,9	-
18	18,7	19,3	1,16 (3H, s)
19	19,0	19,5	1,41 (3H, s)
20	77,2	79,8	-
21	19,9	20,5	1,28 (3H, s)
22	81,0	83,0	4,91 (1H, dd, $J = 13,2; 10,2$ Hz)
23	32,4	31,8	2,60 (1H, m) 2,55 (1H, m)
24	152,0	153,3	-
25	120,9	122,0	-
26	167,1	169,1	-
27	12,2	12,3	1,88 (3H, s)

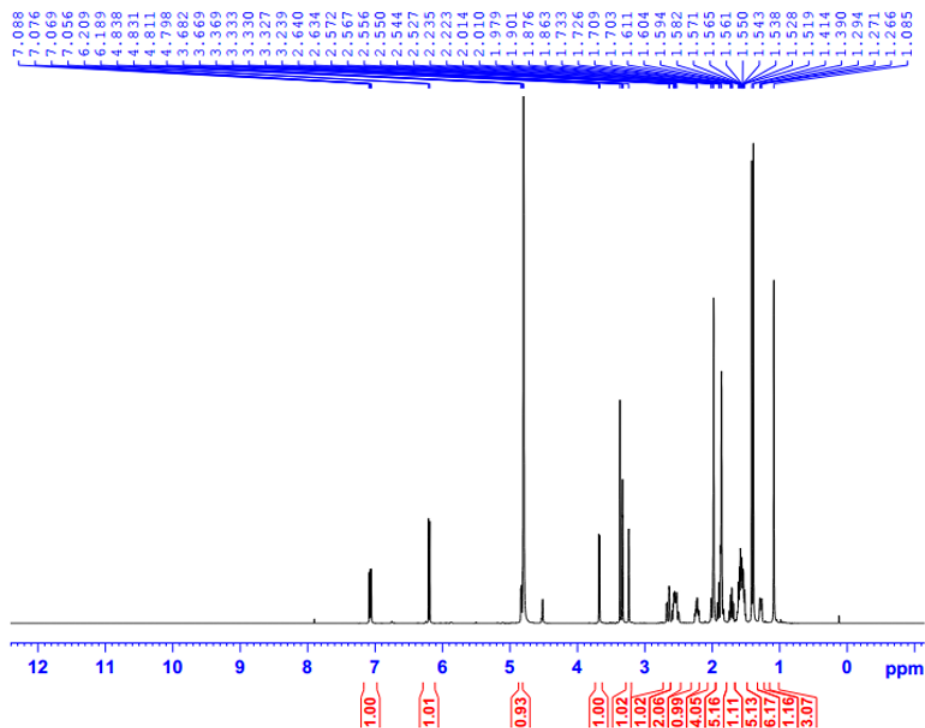
28 20,6 21,1 1,99 (3H, s)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 150 MHz, ^c đo tại 600 MHz. # δ_C của hợp chất withanolide J đo trong CDCl₃ [25].

3.1.2. Hợp chất 4 β -hydroxywithanolide E (PP02)



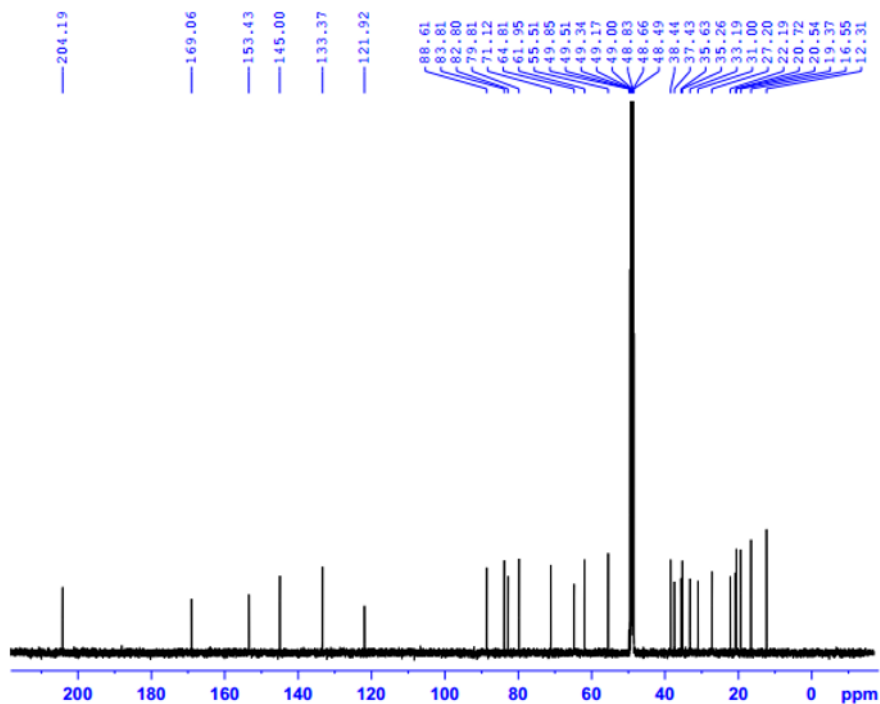
Hình 3.4: Cấu trúc hoá học của hợp chất **PP02**



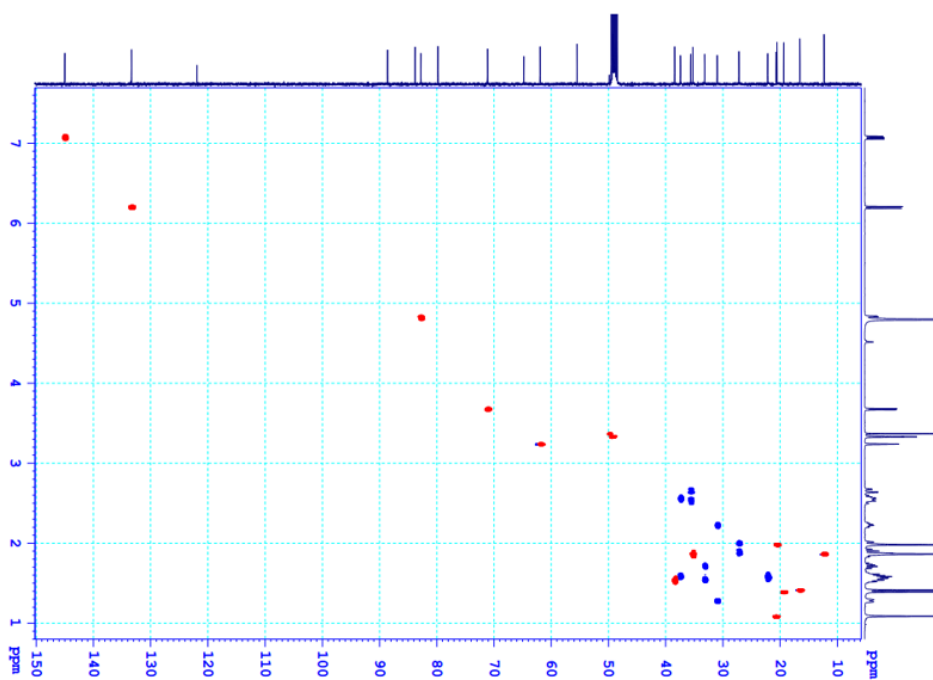
Hình 3.5: Phổ ¹H-NMR của hợp chất **PP02** (CD₃OD, 500 MHz)

Hợp chất **PP02** được xác định ở dạng chất bột, có màu trắng. Trên phổ ¹H-NMR của **PP02** có thể thấy các tín hiệu đặc trưng các nhóm của hợp chất

withanolide gồm 5 nhóm methyl tại δ_H 1,09 (H-18, 3H, s), 1,41 (H-19, 3H, s), 1,39 (H-21, 3H, s), 1,86 (H-27, 3H, s) và 1,98 (H-28, 3H, s); 3 proton oxymethine tại δ_H 3,68 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-4), 3,24 (1H, br s, H-6) và 4,83 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-22); 2 olefinic proton tại δ_H 6,20 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-2), 7,07 (1H, dd, $J = 6,5, 10,0$ Hz, H-3) xác định sự có mặt của nhóm CH=CH.



Hình 3.6: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PP02** (CD_3OD , 125 MHz)



Hình 3.7: Phổ HSQC của hợp chất **PP02** (CD_3OD , 500/125 MHz)

Phân tích các tín hiệu trên phổ carbon ^{13}C -NMR và HSQC của **PP02** xác định sự có mặt của 28 carbon bao gồm: 5 nhóm methyl, 6 nhóm methylene, 5 nhóm methine, 4 carbon của 2 liên kết olefin, 2 carbon ketone, và 6 carbon bậc 4 (**Bảng 3.2**). Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của **PP02** khá giống với hợp chất withanolide E ngoại trừ sự dịch chuyển về vùng trường trung bình của tín hiệu C-4 (δ_{C} 71,1) của **PP02** so với tín hiệu C-4 (δ_{C} 33,7) của withanolide E [26]. Điều này đã cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **PP02** có thêm sự xuất hiện của 1 nhóm hydroxy tại C-4 ở **PP02**.

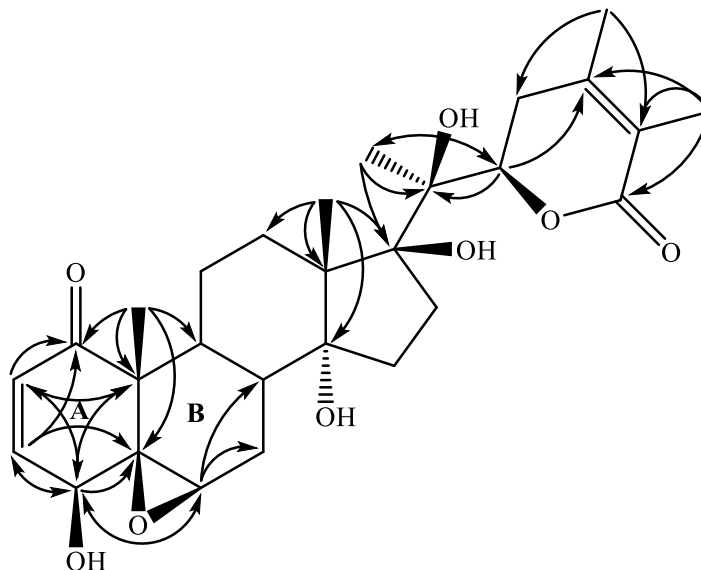
Bảng 3.2: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất **PP02** và hợp chất tham khảo

C	TLTK # δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	PP02 $\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	205,4	204,2	-
2	129,9	133,4	6,20 (1H, d, $J = 10,0$ Hz)
3	146,7	145,0	7,07 (1H, dd, $J = 10,0; 6,5$ Hz)
4	33,7	71,1	3,68 (1H, d, $J = 6,5$ Hz)
5	63,3	64,8	-
6	65,1	62,0	3,24 (1H, br s)
7	27,5	27,2	1,90 (1H, m) 2,01 (1H, m)
8	35,2	35,3	1,83 (1H, m)
9	38,4	38,4	1,52 (1H, m)
10	49,8	49,9	-
11	24,3	22,2	1,57 (2H, m)
12	33,3	33,2	1,55 (1H, m) 1,72 (1H, m)
13	55,6	55,5	-
14	84,0	83,8	-
15	31,5	31,0	1,28 (1H, m) 2,23 (1H, m)
16	37,4	37,4	1,58 (1H, m) 2,56 (1H, m)
17	88,7	88,6	-
18	21,0	20,7	1,09 (3H, s)
19	15,1	16,6	1,41 (3H, s)
20	79,8	79,8	-
21	19,4	19,4	1,39 (3H, s)
22	82,9	82,8	4,83 (1H, d, $J = 3,5$ Hz)
23	35,7	35,6	2,54 (1H, m) 2,65 (1H, m)

24	153,4	153,4	-
25	122,0	121,9	-
26	169,1	169,1	-
27	12,3	12,3	1,86 (3H, s)
28	20,5	20,5	1,98 (3H, s)

^a đo trong CD₃OD, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz. [#]δ_C của hợp chất withanolide E đo trong CDCl₃ [26].

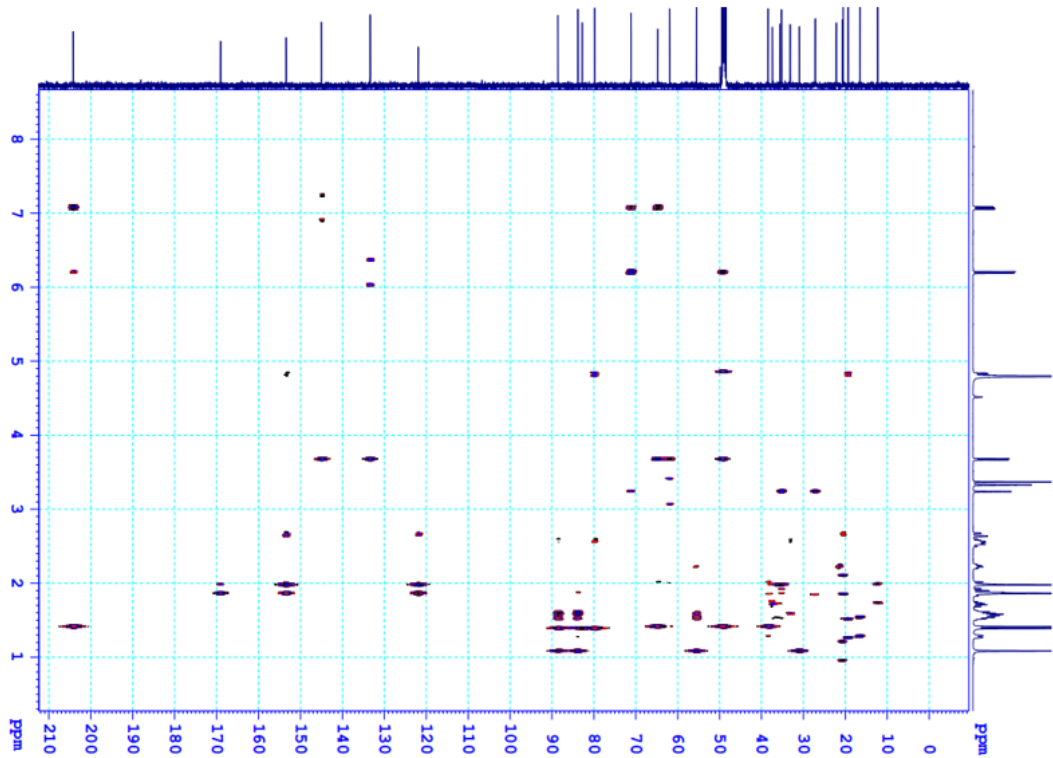
Các tín hiệu tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 6,20) với C-4 (δ_C 71,1)/ C-10 (δ_C 49,9), H-3 (δ_H 7,07) với C-1 (δ_C 204,2)/ C-4 (δ_C 71,1)/ C-5 (δ_C 64,8) và H-19 (δ_H 1,41) với C-1 (δ_C 204,2)/ C-5 (δ_C 64,8)/ C-9 (δ_C 38,4)/ C-10 (δ_C 49,9) đã xác định sự có mặt của 2,3-en-1-one tại vòng A. Tại vòng B, từ các tín hiệu của proton H-6 (δ_H 3,24, br s) cùng với độ dịch chuyển hoá học của C-5 (δ_C 64,8) và C-6 (δ_C 62,0) cho thấy sự có mặt của một nhóm epoxy liên kết tại C-5/C-6 [27]. Bên cạnh đó, các tín hiệu tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 6,20) đến C-1 (δ_C 204,2)/ C-4 (δ_C 71,1)/ C-10 (δ_C 49,9), H-3 (δ_H 7,07) đến C-1 (δ_C 204,2)/ C-4 (δ_C 71,1)/ C-5 (δ_C 64,8) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-4 (δ_C 71,1) góp phần khẳng định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-4 (**Hình 3.8**).



Hình 3.8: Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PP02**

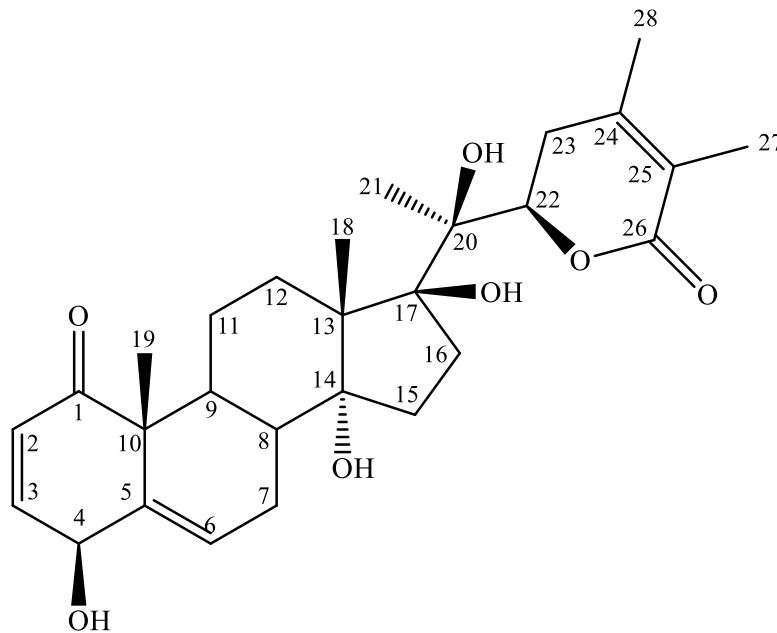
Hơn nữa, hằng số tương tác của proton H-4 ($J = 6,5$ Hz) cho phép xác định H-4 nằm ở vị trí α và nhóm hydroxy tại C-4 nằm ở vị trí β . Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H-18 (δ_H 1,09) và H-21 (δ_H 1,39) với C-17 (δ_C 88,6) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-17 (δ_C 88,6) cho thấy sự có mặt của nhóm hydroxy tại vị trí C-17. Từ các phân tích trên hợp chất **PP02** được

xác định là 4 β -hydroxywithanolide E [28], hợp chất này được Sakurai và cộng sự thông báo phân lập được từ loài này lần đầu tiên vào năm 1976 [28].



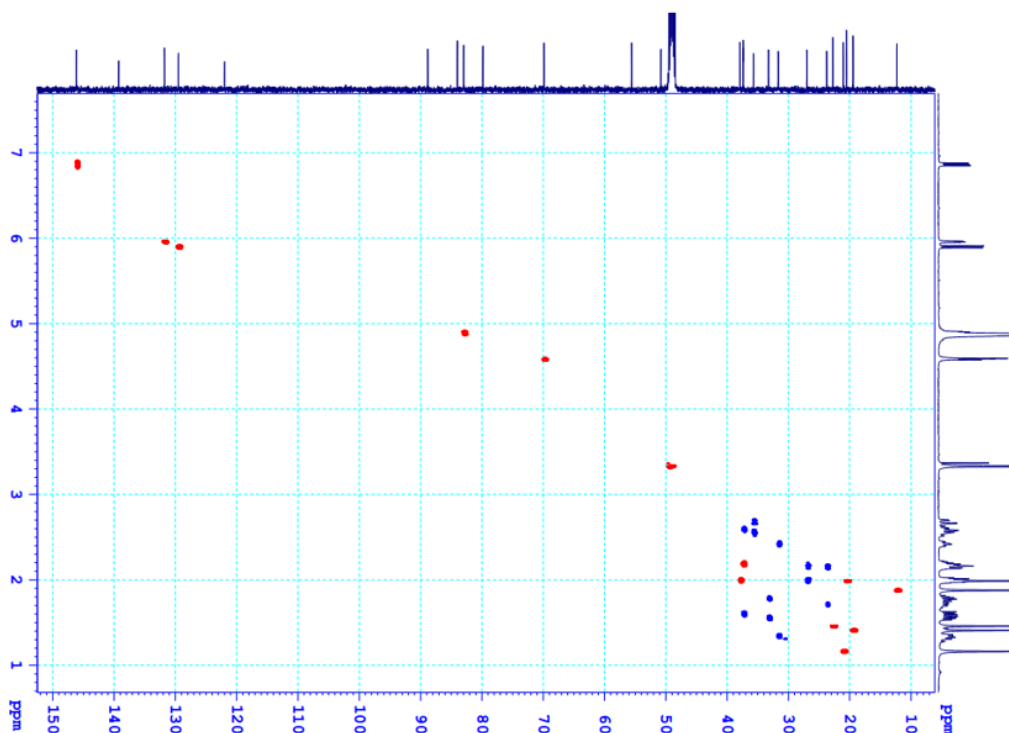
Hình 3.9: Phổ HMBC của hợp chất **PP03** (CD₃OD, 500/125 MHz)

3.1.3. Hợp chất physapruin A (PP03)



Hình 3.10: Cấu trúc hoá học của hợp chất **PP03**

Khi phân tích các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **PP03** xác định sự có mặt của 28 tín hiệu carbon bao gồm: 10 carbon bậc bốn (trong đó có 2 nhóm carbonyl) tại δ_{C} 50,8; 55,6; 79,9; 84,0; 88,9; 122,0; 139,3; 153,4; 169,1; 205,9; cùng với 7 nhóm methine tại δ_{C} 37,4; 37,9; 69,9; 83,0; 129,5; 131,8; 146,2; 6 nhóm methylene tại δ_{C} 23,8; 27,0; 31,7; 33,3; 35,7; 37,4; và 5 nhóm methyl tại δ_{C} 12,3; 19,5; 20,5; 21,1; 22,8. Từ các dữ liệu phổ thu được của **PP03** cho phép dự đoán đây là một withanolide.



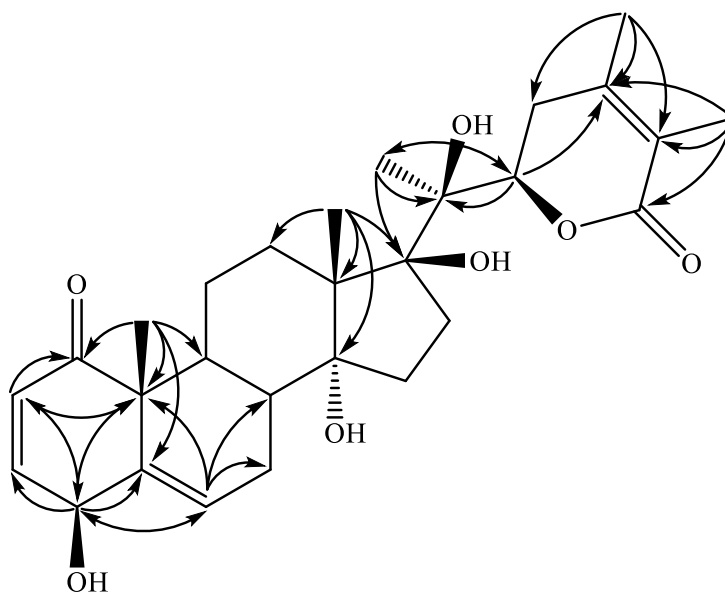
Hình 3.13: Phổ HSQC của hợp chất **PP03** (CD_3OD , 500/125 MHz)

Bảng 3.3: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất **PP03** và hợp chất tham khảo

C	TLTK	PP03	
	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	203,4	205,9	-
2	129,2	129,5	5,90 (1H, d, $J = 10,0$ Hz)
3	143,2	146,2	6,87 (1H, d, $J = 10,0, 5,0$ Hz)
4	69,3	69,9	4,59 (1H, d, $J = 5,0$ Hz)
5	138,2	139,3	-
6	131,5	131,8	5,96 (1H, dd, $J = 5,0; 2,0$ Hz)
7	25,9	27,0	2,01 (1H, m) 2,15 (1H, m)
8	35,8	37,9	2,00 (1H, m)

9	36,9	37,4	2,18 (1H, m)
10	49,5	50,8	-
11	22,5	23,8	1,71 (1H, m) 2,14 (1H, m)
12	34,2	31,7	1,35 (1H, m) 2,42 (1H, m)
13	54,5	55,6	-
14	81,9	84,0	-
15	30,2	33,3	1,55 (1H, m) 1,78 (1H, m)
16	37,7	37,4	1,60 (1H, m) 2,60 (1H, m)
17	88,0	88,9	-
18	20,5	21,1	1,16 (3H, s)
19	22,6	22,8	1,46 (3H, s)
20	78,9	79,9	-
21	19,7	19,5	1,41 (3H, s)
22	80,1	83,0	4,90 (1H, d, $J = 3,5$ Hz)
23	32,5	35,7	2,55 (1H, m) 2,68 (1H, m)
24	150,7	153,4	-
25	121,4	122,0	-
26	166,2	169,1	-
27	12,3	12,3	1,88 (3H, s)
28	20,6	20,5	1,99 (3H, s)

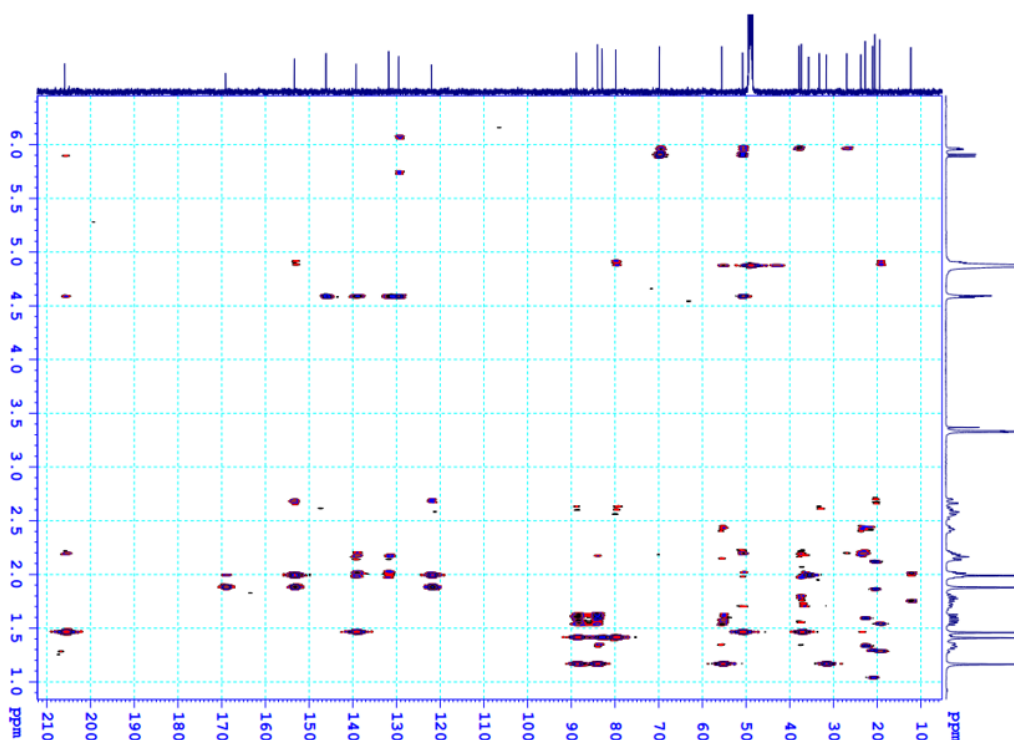
^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất physapruin A đo trong CDCl₃ [29].



Hình 3.14: Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PP03**

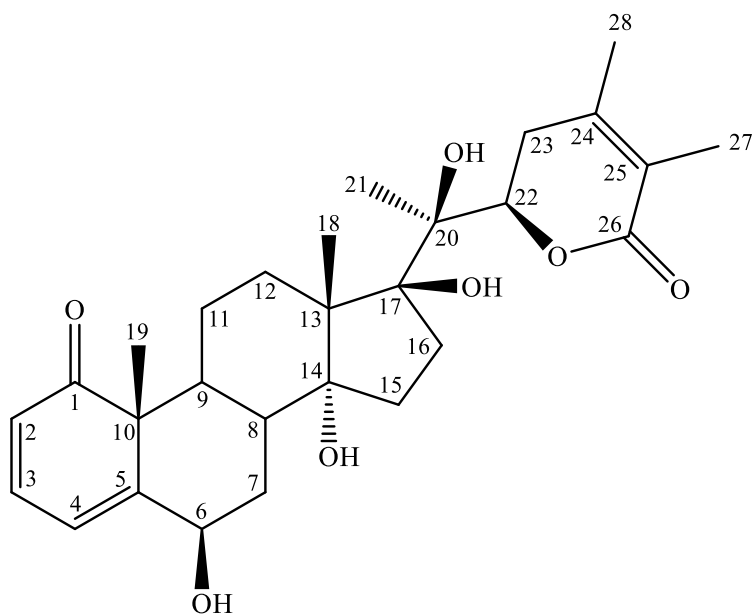
Quan sát các tín hiệu tương tác trên HMBC từ H-2 (δ_H 5,90) đến C-1 (δ_C 205,9)/ C-4 (δ_C 69,9)/ C-10 (δ_C 50,8), H-4 (δ_H 4,59) đến C-2 (δ_C 129,5)/ C-3 (δ_C 146,2)/ C-5 (δ_C 139,3)/ C-6 (δ_C 131,8)/ C-10 (δ_C 50,8), H-6 (δ_H 5,96) đến C-4 (δ_C 69,9)/ C-10 (δ_C 50,8) và H-19 (δ_H 1,46) đến C-1 (δ_C 205,9)/ C-5 (δ_C 139,3)/ C-9 (δ_C 37,4)/ C-10 (δ_C 50,8) cho thấy sự hiện diện của 2 liên kết đôi tại vị trí C-2/C-3 và C-5/C-6 cùng với sự xuất hiện của nhóm hydroxy tại vị trí C-4.

Các tín hiệu tương tác trên HMBC từ vị trí H-18 (δ_H 1,16) đến C14 (δ_C 84,0)/ C17 (δ_C 88,9), H-21 (δ_H 1,41) đến vị trí C-17 (δ_C 88,9)/ C-20 (δ_C 79,9) đã góp phần khẳng định sự có mặt của các nhóm hydroxy tại C-14, C-17 và C-20 (**Hình 3.14**). Từ các phân tích dữ liệu phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ với tài liệu công bố[29], hợp chất **PP03** đã được xác định là physapruin A.

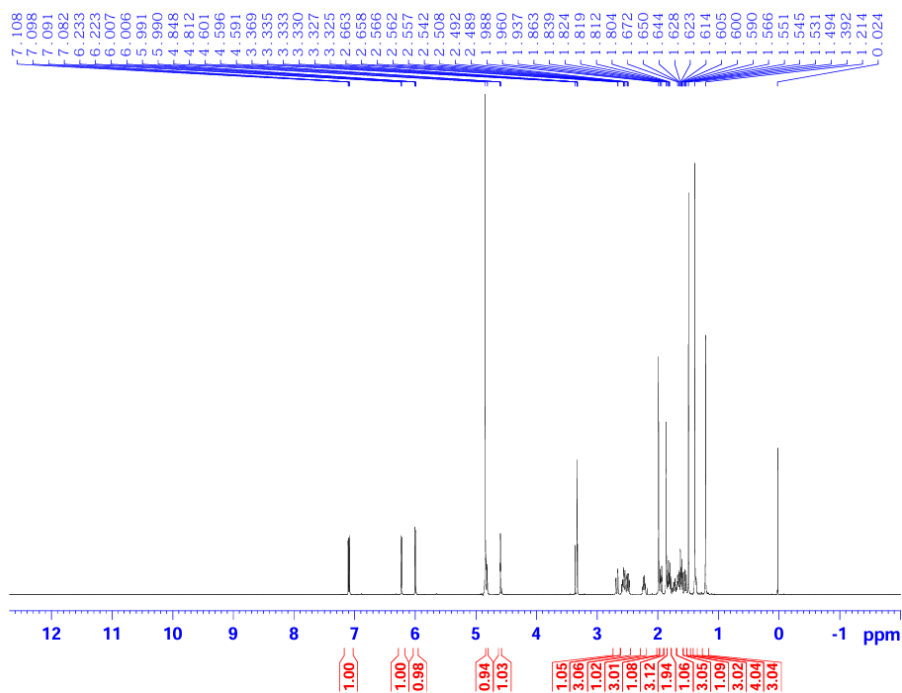


Hình 3. 15: Phổ HBMC của hợp chất **PP03** (CD₃OD, 500/125 MHz)

3.1.4. Hợp chất withaperuvin C (PP04)

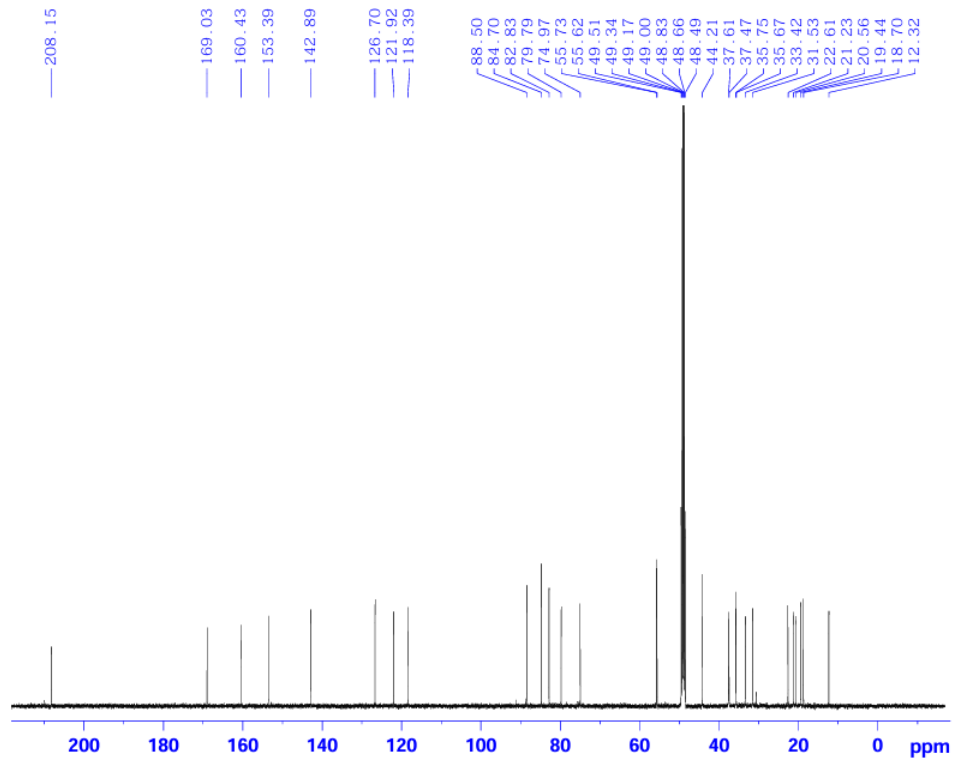


Hình 3.16: Cấu trúc hoá học của hợp chất **PP04**



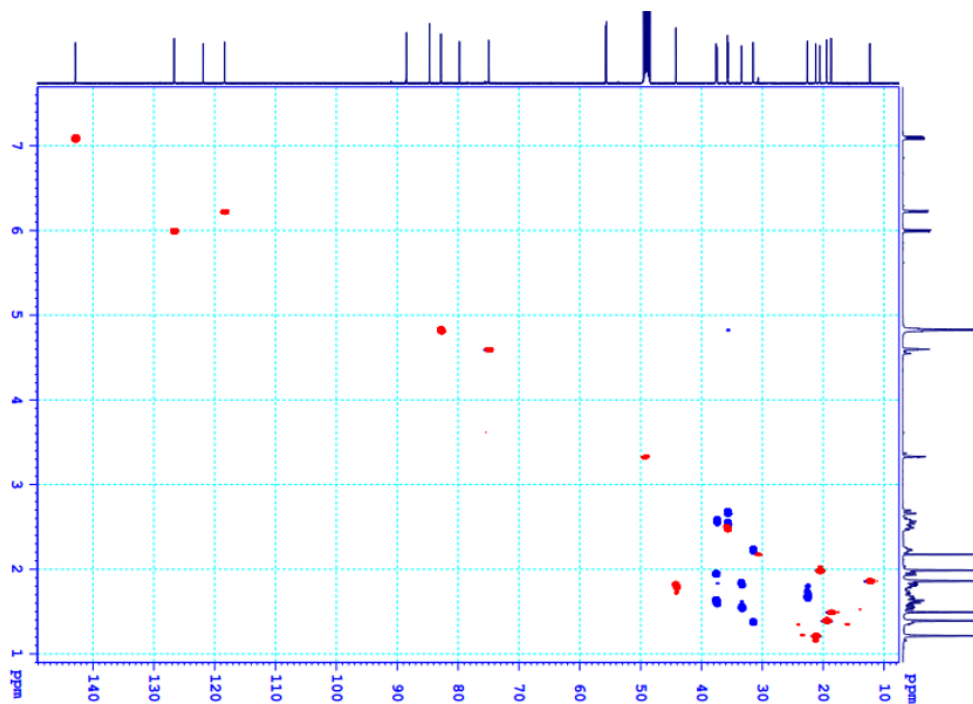
Hình 3.17: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **PP04** (CD_3OD , 500 MHz)

Hợp chất **PP04** thu được ở dạng chất bột, có màu trắng. Quan sát phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PP04** thấy các tín hiệu của 3 olefinic proton ở vị trí δ_{H} 6,00 (1H, d, $J = 10,0$ Hz); 6,23 (1H, d, $J = 6,0$ Hz) và 7,09 (1H, dd, $J = 10,0; 6,0$ Hz); 2 oxymethine proton tại δ_{H} 4,60 (t, 3,0) và 4,83 (m); 15 proton thuộc 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1,21 (3H, s); 1,39 (3H, s); 1,49 (3H, s); 1,85 (3H, s) và 1,99 (3H, s).



Hình 3.18: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PP04** (CD_3OD , 125 MHz)

Phân tích các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **PP04** xác định sự có mặt của 2 nhóm carbonyl, 8 carbon không liên kết với hydro, 7 nhóm methine, 6 nhóm methylen và 5 nhóm methyl (**Bảng 3.4**).



Hình 3.19: Phổ HSQC của hợp chất **PP04** (CD_3OD , 500/125 MHz)

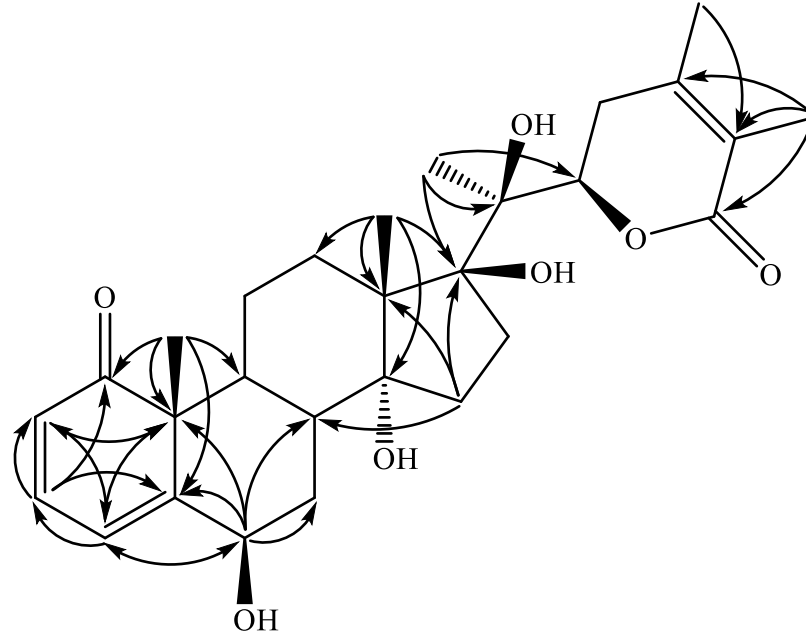
Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của **PP04** khá giống với hợp chất withanolide E [26] ngoại trừ các tín hiệu tại khu vực vòng A và vòng B bởi sự có mặt của liên kết đôi tại C-4/C-5 và mất đi cầu nối epoxy tại C-5/C-6 ở **PP04**.

Bảng 3.4: Dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất **PP04** và hợp chất tham khảo

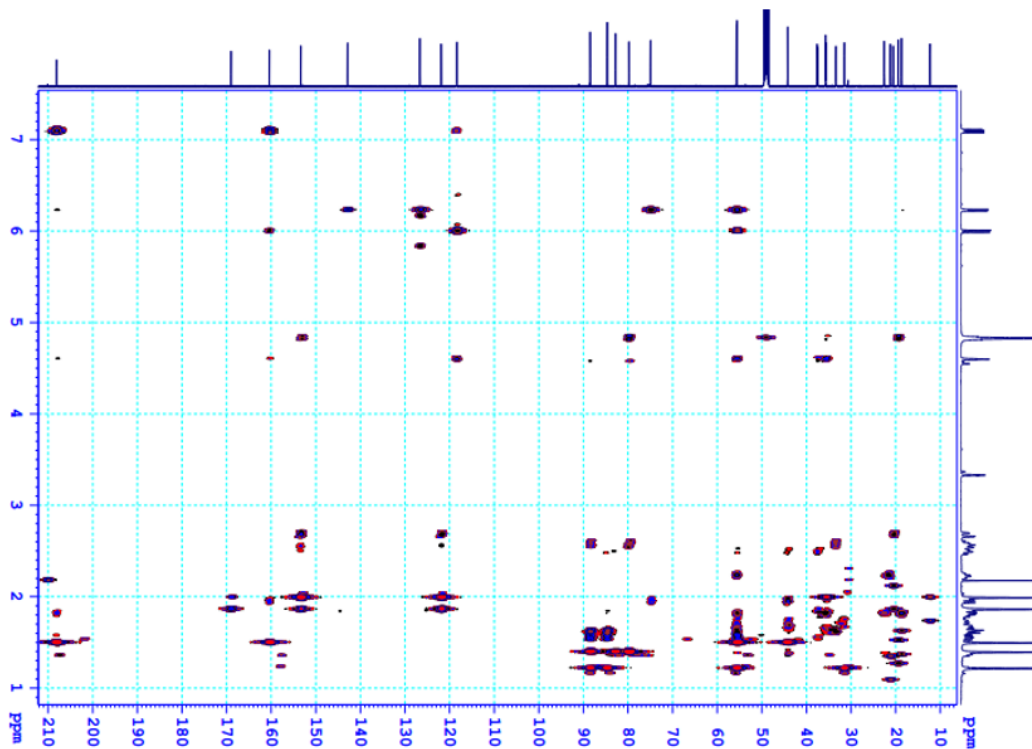
C	TLTK # δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	PP04 $\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	207,9	208,2	-
2	118,2	118,4	6,23 (1H, d, $J = 6,0$ Hz)
3	142,7	142,9	7,09 (1H, dd, $J = 10,0; 6,0$ Hz)
4	126,5	126,7	6,00 (1H, dd, $J = 10,0$ Hz)
5	160,2	160,4	-
6	74,7	75,0	4,60 (1H, t, $J = 3,0$ Hz)
7	37,4	37,6	1,64 (1H, m) 1,95 (1H, m)
8	35,5	35,8	2,47 (1H, m)
9	44,0	44,2	1,80 (1H, m)
10	55,5	55,7	-
11	22,4	22,6	1,67 (1H, m) 1,72 (1H, m)
12	35,5	35,7	1,37 (1H, m) 2,22 (1H, m)
13	55,5	55,6	-
14	84,5	84,7	-
15	31,4	31,5	1,54 (1H, m) 1,82 (1H, m)
16	37,4	37,5	1,59 (1H, m) 2,57 (1H, m)
17	88,3	88,5	-
18	21,2	21,2	1,21 (3H, s)
19	18,6	18,7	1,49 (3H, s)
20	79,6	79,8	-
21	19,4	19,4	1,39 (3H, s)
22	82,7	82,8	4,83 (1H, m)
23	33,3	33,4	1,54 (1H, m) 1,68 (1H, m)
24	153,2	153,4	-
25	121,7	121,9	-
26	168,9	169,0	-

27	12,3	12,3	1,85 (3H, s)
28	20,6	20,6	1,99 (3H, s)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất withaperuvin C đo trong CD₃OD [30].



Hình 3.20: Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PP04**

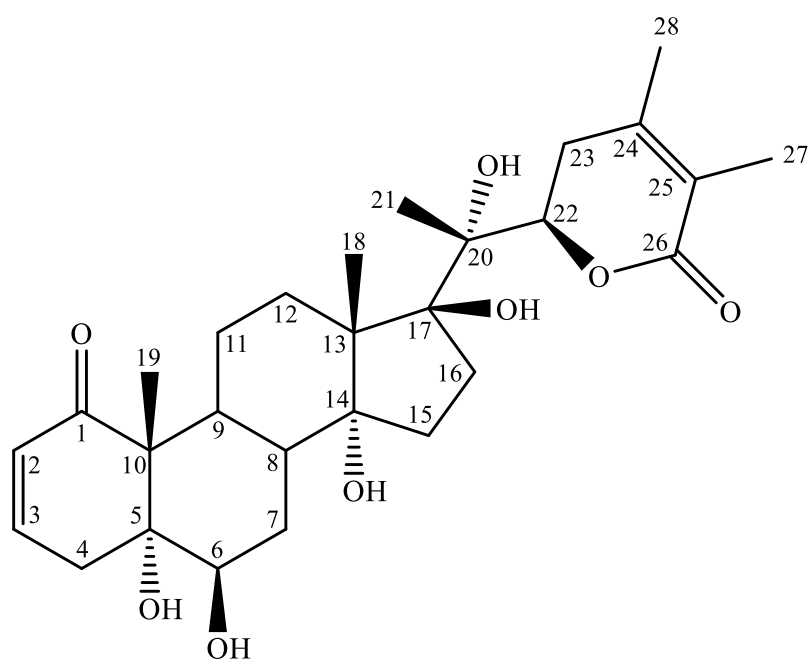


Hình 3.21: Phổ HMBC của hợp chất **PP04** (CD₃OD, 500/125 MHz)

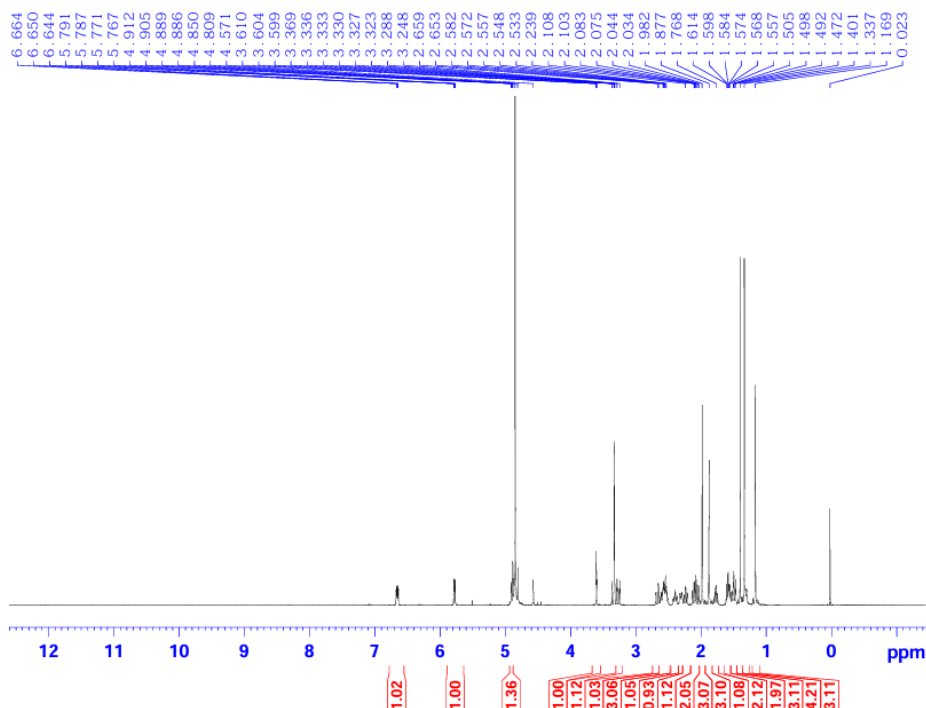
Sự xuất hiện của nhóm 2,4-dien-1-one ở vòng A được chứng minh dựa vào các tín hiệu tương tác trên phổ HMBC từ H-2 (δ_H 6,00) đến C-4 (δ_C 126,7)/ C-10 (δ_C 55,7), H-3 (δ_H 7,09) đến C-1 (δ_C 208,2)/ C-2 (δ_C 118,4)/ C-5 (δ_C 160,4), H-4 (δ_H 6,23) đến các carbon C-2 (δ_C 118,4)/ C-3 (δ_C 142,9)/ C-6 (δ_C 75,0)/ C-10 (δ_C 55,7) và từ H-19 (δ_H 1,49) đến C-1 (δ_C 208,2)/ C-5 (δ_C 160,4)/ C-9 (δ_C 44,2)/ C-10 (δ_C 55,7) (**Hình 3.20**). Các tương tác trên HMBC từ H-6 (δ_H 4,60) đến C-4 (δ_C 126,7)/ C-5 (δ_C 160,4)/ C-7 (δ_C 37,6)/ C-8 (δ_C 35,8)/ C-10 (δ_C 55,7) cùng với giá trị độ chuyển dịch hóa học của C-6 (δ_C 75,0) đã chứng minh sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-6.

Khi so sánh hai dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của **PP04** và withaperuvin C cho thấy giá trị độ chuyển dịch hóa học của các carbon ở tất cả các vị trí đều trùng khớp giữa tài liệu tham khảo và số liệu công bố của **PP04** (**Bảng 3.4**). Từ các phân tích trên hợp chất **PP04** được xác định là withaperuvin C. Hợp chất này được thông báo phân lập lần đầu tiên vào năm 1982 từ loài *Physalis peruviana* bởi Sahai và cộng sự [30].

3.1.5. Hợp chất physaperuvin G (PP05)

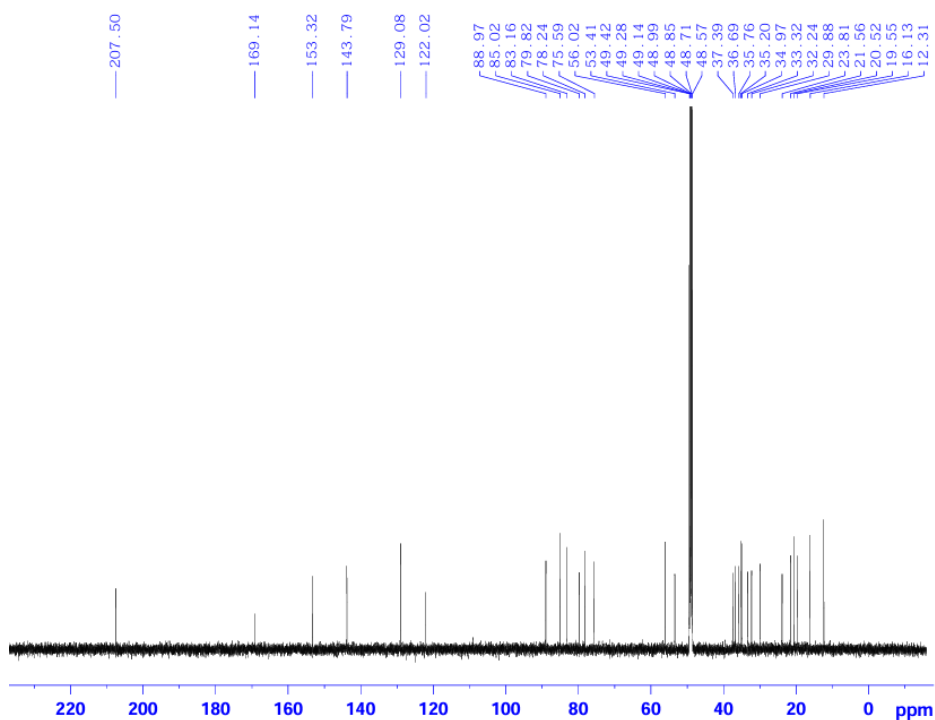


Hình 3.22: Cấu trúc hoá học của hợp chất **PP05**

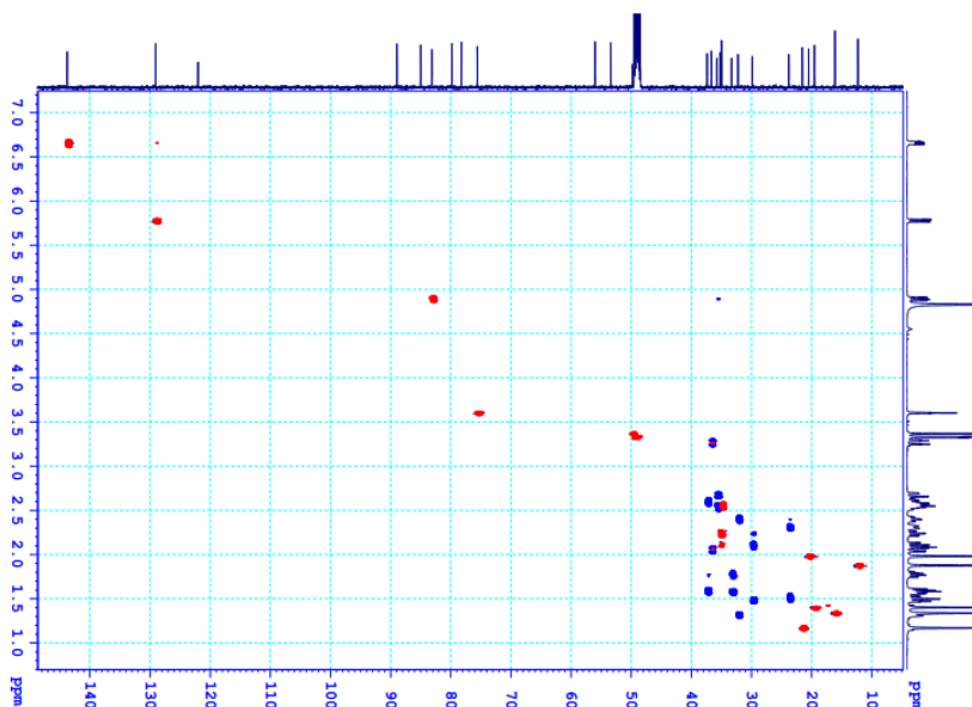


Hình 3.23: Phổ ^1H -NMR của hợp chất **PP05** (CD_3OD , 500 MHz)

Hợp chất **PP05** thu được ở dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ ^1H -NMR của **PP05** xuất hiện tín hiệu của 2 olefinic proton tại δ_{H} 5,78 (1H, dd, $J = 10,0$; 2,5 Hz), 6,66 (1H, dq, $J = 10,0$; 2,0 Hz); 2 oxymethine proton tại δ_{H} 3,60 (1H, t, $J = 2,5$ Hz); 4,90 (1H, dd, $J = 13,0$; 3,0 Hz) và 15 proton thuộc 5 nhóm methyl tại δ_{H} 1,17 (3H, s); 1,34 (3H, s); 1,40 (3H, s); 1,88 (3H, s); 1,98 (3H, s).



Hình 3.24: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PP05** (CD_3OD , 125 MHz)



Hình 3.25: Phổ HSQC của hợp chất **PP05** (CD₃OD, 500/125 MHz)

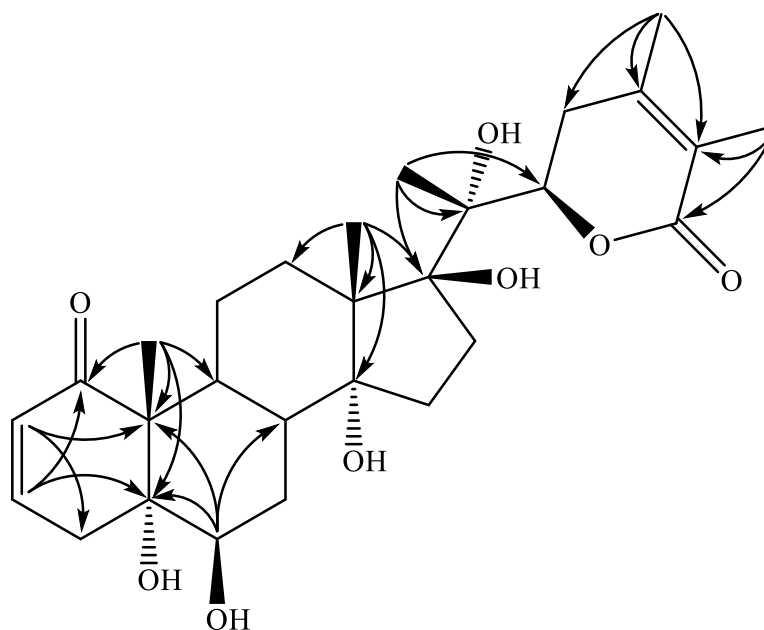
Các tín hiệu trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **PP05** cho phép xác định sự có mặt của 28 carbon đặc trưng của hợp chất withanolide gồm 10 carbon bậc bốn tại δ_C 53,4; 56,0; 78,2; 79,8; 85,0; 89,0; 122,0; 153,3; 169,1; 207,5; 6 nhóm methine tại δ_C 35,0; 35,2; 75,6; 83,2; 129,1; 143,8; 7 nhóm methylene tại δ_C 23,8; 29,9; 32,2; 33,3; 35,8; 36,7; 37,4; và 5 nhóm methyl tại δ_C 12,3; 16,1; 19,6; 20,5; 21,6.

Bảng 3.5: Dữ liệu phổ ¹H, ¹³C – NMR của hợp chất **PP05** và hợp chất tham khảo

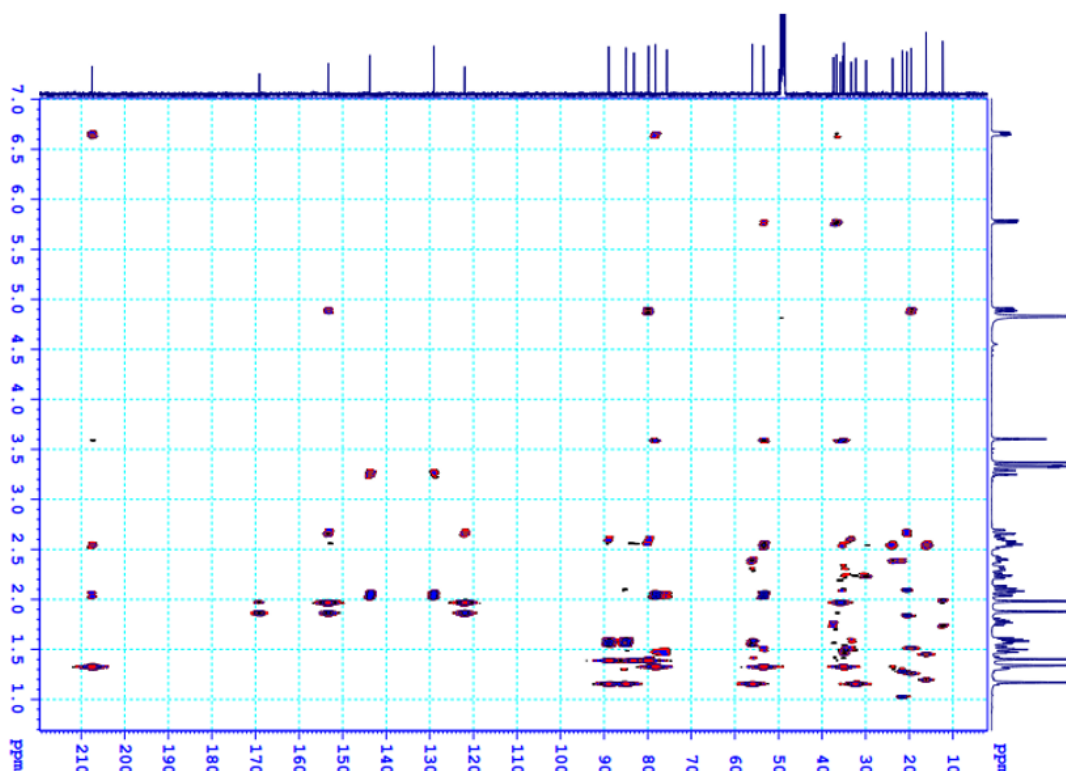
C	TLTK	PP05	
	#δ _C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (mult., J in Hz)
1	207,8	207,5	-
2	129,3	129,1	5,78 (1H, dd, J = 10,0; 2,5Hz)
3	144,0	143,8	6,66 (1H, dq, J = 10,0; 2,0 Hz)
4	36,8	36,7	2,06 (1H, dd, J = 20,0; 5,0 Hz) 3,27 (1H, dt, J = 20,0; 2,5 Hz)
5	78,3	78,2	-
6	75,8	75,6	3,60 (1H, t, J = 2,5 Hz)
7	30,0	29,9	1,49 (1H, m) 2,12 (1H, m)
8	35,1	35,0	3,55 (1H, m)
9	35,3	35,2	2,25 (1H, m)

10	53,5	53,4	-
11	23,9	23,8	1,52 (1H, m) 2,31 (1H, m)
12	32,4	32,2	1,31 (1H, m) 2,40 (1H, m)
13	56,1	56,0	-
14	85,1	85,0	-
15	33,4	33,3	1,58 (1H, m) 1,78 (1H, m)
16	37,5	37,4	1,57 (1H, m) 2,60 (1H, m)
17	89,1	89,0	-
18	21,7	21,6	1,17 (3H, s)
19	16,2	16,1	1,34 (3H, s)
20	79,9	79,8	-
21	19,6	19,6	1,40 (3H, s)
22	83,3	83,2	4,90 (1H, dd, $J = 13,0; 3,0$ Hz)
23	35,9	35,8	2,53 (1H, m) 2,67 (1H, m)
24	153,4	153,3	-
25	122,1	122,0	-
26	169,2	169,1	-
27	12,4	12,3	1,88 (3H, s)
28	20,6	20,5	1,98 (3H, s)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất physaperuvín G [19].



Hình 3.26: Các tương tác HMBC chính của hợp chất **PP05**

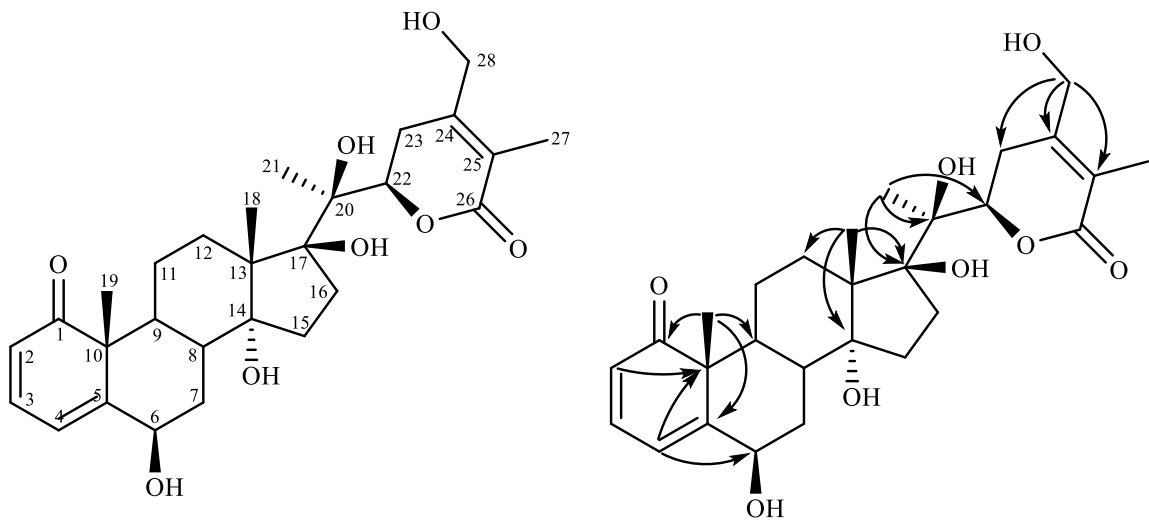


Hình 3.27: Phổ HMBC của hợp chất **PP05** (CD_3OD , 500/125 MHz)

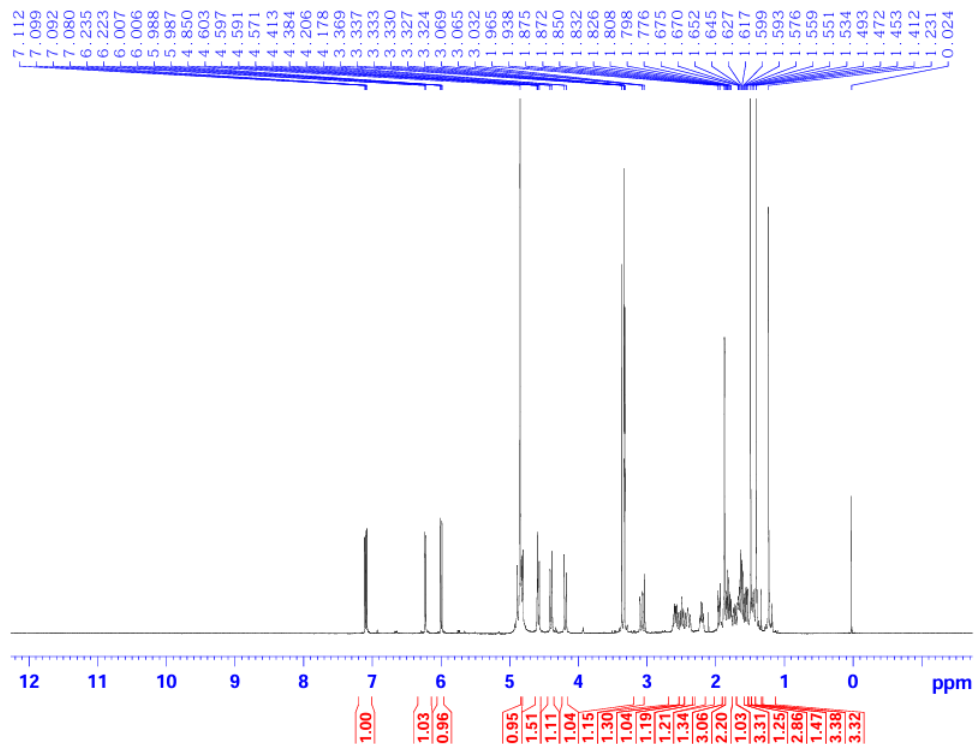
Các tín hiệu tương tác trên phổ HMBC từ vị trí H-19 (δ_{H} 1,34) với C-1 (δ_{C} 207,5)/ C-5 (δ_{C} 78,2)/ C-9 (δ_{C} 35,2)/ C-10 (δ_{C} 53,4), H-2 (δ_{H} 5,78) đến C-4 (δ_{C} 36,7)/ C-10 (δ_{C} 53,4) và vị trí H-3 (δ_{H} 6,66) đến các carbon C-1 (δ_{C} 207,5)/ C-5 (δ_{C} 78,2) chứng minh sự có mặt của nhóm carbonyl tại C-1, nối đôi $\text{CH}=\text{CH}$ tại C-2 (δ_{C} 129,1)/C-3 (δ_{C} 143,8) và nhóm hydroxy tại C-5 (δ_{C} 78,2).

Bên cạnh đó, tín hiệu tương tác trên HMBC từ vị trí của H-6 (δ_{H} 3,60) đến C-5 (δ_{C} 78,2)/ C-8 (δ_{C} 35,0)/ C-10 (δ_{C} 53,4) cho phép khẳng định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-6. Ngoài ra, các tương tác HMBC từ vị trí H-18 (δ_{H} 1,17) đến carbon C-12 (δ_{C} 32,2)/ C-13 (δ_{C} 56,0)/ C-14 (δ_{C} 85,0)/ C-17 (δ_{C} 89,0) và từ H-21 (δ_{H} 1,40) đến vị trí carbon C-17 (δ_{C} 89,0)/ C-20 (δ_{C} 79,8)/ C-22 (δ_{C} 83,2) cho thấy sự có mặt của 3 nhóm hydroxy tại C-14, C-17 và C-20. Kết hợp các phân tích trên và so sánh số liệu phổ NMR của **PP05** với tài liệu tham khảo [19], hợp chất **PP05** được xác định là physaperuvin G.

3.1.6. Hợp chất 28-hydroxywithaperuvin C (PP06)

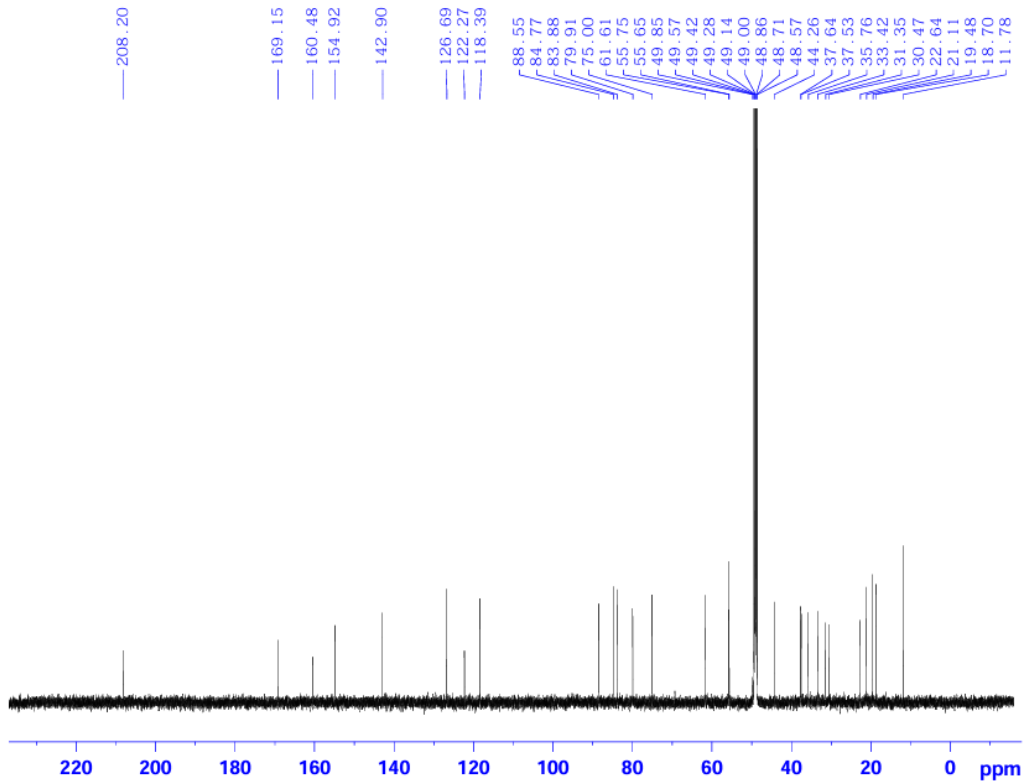


Hình 3.28: Cấu trúc hoá học và tương tác HMBC chính của hợp chất **PP06**

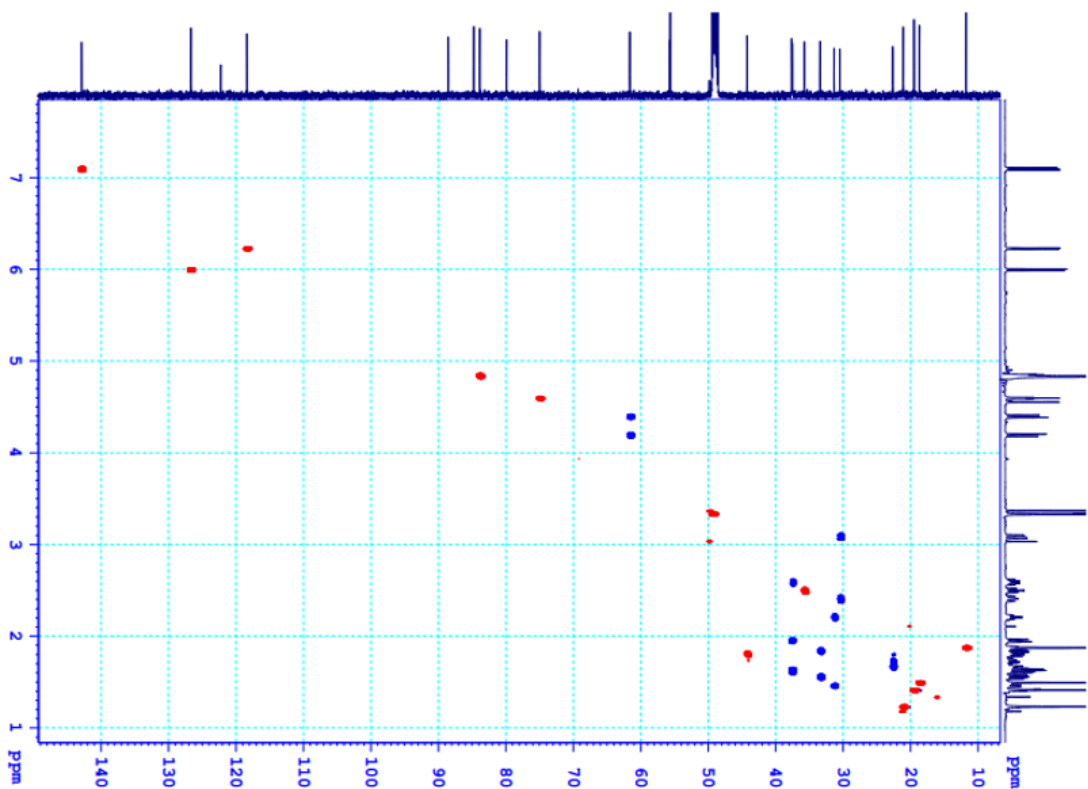


Hình 3.29: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **PP06** (CD_3OD , 500 MHz)

Hợp chất **PP06** thu được ở dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PP06** có thể thấy tín hiệu của 3 proton olefinic tại vị trí δ_{H} 6,00 (1H, d, $J = 10,0$ Hz); 6,23 (1H, d, $J = 6,0$ Hz) và 7,10 (1H, dd, $J = 10,0; 6,0$ Hz); 2 oxymethine proton tại δ_{H} 4,60 (t, 3,0) và 4,83 (m); 12 proton thuộc 4 nhóm methyl tại δ_{H} 1,23 (3H, s); 1,41 (3H, s); 1,49 (3H, s) và 1,88 (3H, s).



Hình 3.30: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **PP06** (CD_3OD , 125 MHz)



Hình 3.31: Phổ HSQC của hợp chất **PP06** (CD_3OD , 500/125 MHz)

Dữ liệu phổ ^1H -NMR của **PP06** rất giống với số liệu phổ NMR của **PP04** trừ sự khác biệt về độ chuyển dịch hóa học của carbon C-28 của hợp chất **PP04** là δ_{C} 20,6; trong khi C-28 của **PP06** là δ_{C} 61,6 cho phép khẳng định hợp chất **PP06** có sự hiện diện 1 nhóm OH tại vị trí carbon C-28. Điều này được chứng minh bởi các tương tác không gian trên phổ HMBC từ H-28 đến các carbon C-23 (δ_{C} 30,5)/ C-24 (δ_{C} 154,9)/ C-25 (δ_{C} 122,3), vì vậy nhóm $-\text{CH}_2\text{OH}$ được thế tại vị trí C-24. Kết hợp các phân tích số liệu phổ trên với dữ liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của **PP06**, hợp chất **PP06** được xác định là 28-hydroxywithaperuvin C. Hợp chất này được thông báo phân lập lần đầu ở loài *Physalis minima* là do nhóm tác giả Lê Cảnh Việt Cường và cộng sự đã công bố [31].

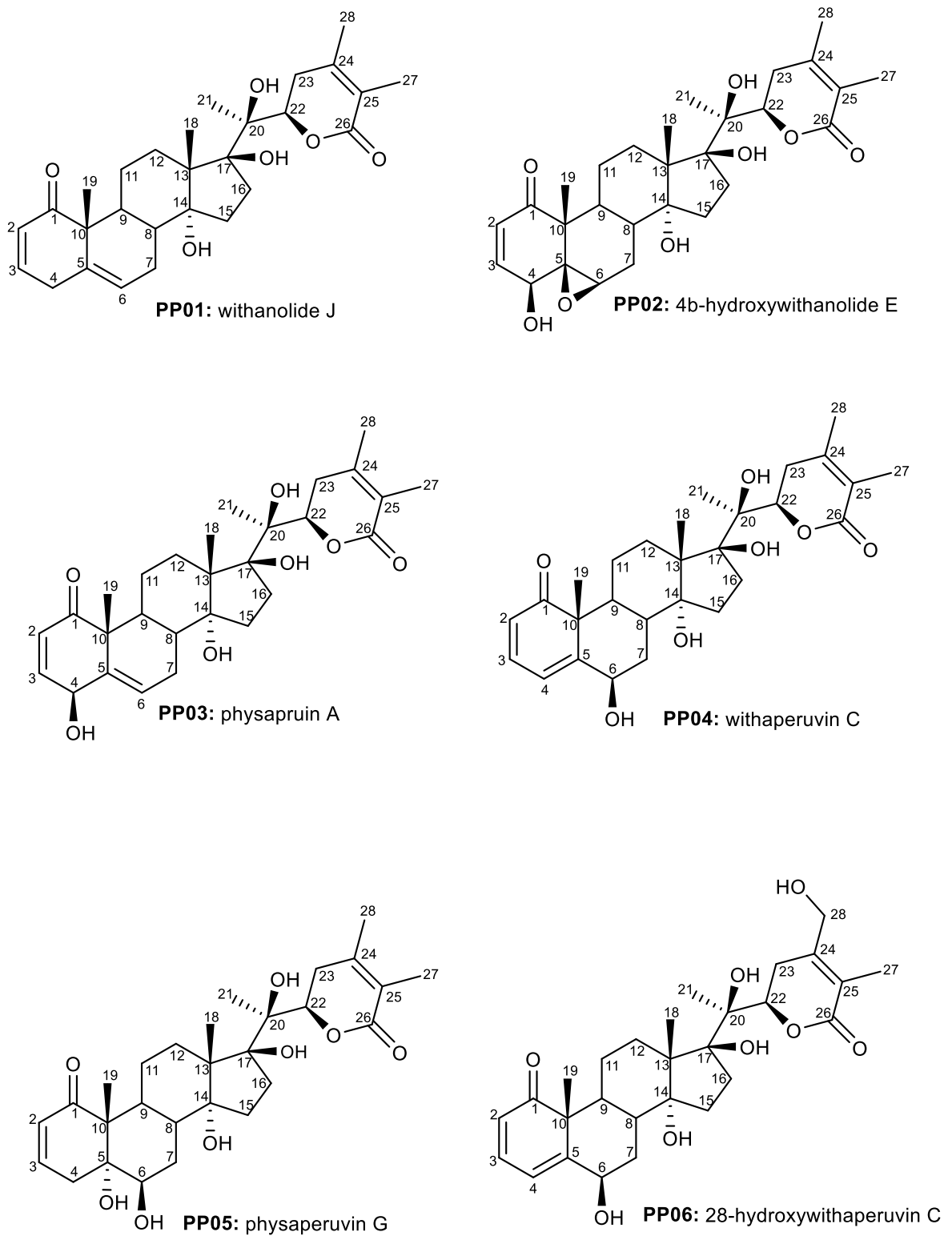
Bảng 3.6: Số liệu phổ ^1H , ^{13}C – NMR của hợp chất **PP06** và hợp chất tham khảo

C	PP04 # δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	PP06 $\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	208,2	208,2	-
2	118,4	118,4	6,00 (1H, dd, <i>J</i> = 10,0 Hz)
3	142,9	142,9	7,10 (1H, dd, <i>J</i> = 10,0; 6,0 Hz)
4	126,7	126,7	6,23 (1H, d, <i>J</i> = 6,0 Hz)
5	160,4	160,5	-
6	75,0	75,0	4,60 (1H, t, <i>J</i> = 3,0 Hz)
7	37,6	37,6	1,94 (1H, m) 1,58 (1H, m)
8	35,8	35,8	2,50 (1H, m)
9	44,2	44,3	1,74 (1H, m)
10	55,7	55,7	-
11	22,6	22,6	1,74 (1H, m) 1,68 (1H, m)
12	35,7	33,4	2,02 (1H, m) 1,48 (1H, m)
13	55,6	55,8	-
14	84,7	84,8	-
15	31,5	31,4	1,86 (1H, m) 1,56 (1H, m)
16	37,5	37,5	2,59 (1H, m) 1,65 (1H, m)
17	88,5	88,6	-
18	21,2	21,1	1,23 (3H, s)
19	18,7	18,7	1,49 (3H, s)
20	79,8	79,9	-

21	19,4	19,5	1,41 (3H, s)
22	82,8	83,9	4,83 (1H, d, $J = 3,0$ Hz)
23	33,4	30,5	3,10 (1H, m) 2,40 (1H, m)
24	153,4	154,9	-
25	121,9	122,3	-
26	169,0	169,2	-
27	12,3	11,8	1,88 (3H, s)
28	20,6	61,6	4,18 (1H, d, $J = 14,0$ Hz) 4,39 (1H, d, $J = 14,5$ Hz)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất **PP04** đo trong CD₃OD.

Kết quả đã phân lập và xác định được cấu trúc hoá học của 06 hợp chất đã biết từ loài *Physalis peruviana* L. đó là hợp chất withanolide J, 4 β -hydroxywithanolide E, physapruin A, withaperuvin C, physaperuvin G, 28-hydroxywithaperuvin C.



Hình 3.32: Sáu hợp chất phân lập từ cây Thù lù lông (*Physalis peruviana* L.)

3.2. Hoạt tính ức chế NO của các hợp chất được phân lập từ loài *Physalis peruviana* L.

Sáu hợp chất phân lập từ loài *Physalis peruviana* được tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7. Kết quả thu được như sau:

Bảng 3.7: Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ loài *Physalis peruviana* L.

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	L-NMMA		PP01		PP06	
	% ức chế NO	% tế bào sống	% ức chế NO	% tế bào sống	% ức chế NO	% tế bào sống
100	95,14	90,85	99,68	31,62	66,08	43,71
20	78,95	99,67	87,92	69,84	24,71	81,45
4	25,41		70,70	98,81	8,54	97,87
0,8	10,13		12,32		-0,07	
0,16			5,97			
IC₅₀	7,72 \pm 0,46		3,18 \pm 0,22		NA	

* NA- not available

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ loài *Physalis peruviana* cho thấy hợp chất withanolide J (**PP01**) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 3,18 \pm 0,22 $\mu\text{g/mL}$ mạnh hơn so với chất đối chứng dương L-NMMA với giá trị IC₅₀ là 7,72 \pm 0,46 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất 28-hydroxywithaperuvin C (**PP06**) không thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 ở nồng độ mẫu thử.

Các hợp chất **PP02**, **PP04**, **PP05** đã được nghiên cứu bởi nhóm tác giả Phạm Thị Hải Yến, Hoàng Lê Tuấn Anh (2023) đã tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ loài *Physalis minima* đối với các hợp chất như: 4 β -hydroxywithanolide E (**PP02**), withaperuvin C (**PP04**), physaperuvin G (**PP05**). Kết quả đánh giá hoạt tính cho thấy hợp chất physaperuvin G (**PP05**) thể hiện hoạt tính yếu với IC₅₀

là $70,25 \pm 2,43 \mu\text{g/mL}$ so với đối chứng dương L-NMMA với giá trị IC_{50} là $7,84 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$. Hợp chất withaperuvin C (**PP04**) xem như không có hoạt tính do $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ và hợp chất 4β -hydroxywithanolide E (**PP02**) không có hoạt tính do gây chết tế bào thử nghiệm. [12] Còn lại hợp chất physapruin A (**PP03**) không thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 ở nồng độ thử.

Ngoài ra, từ các kết quả thu được cho thấy hợp chất withanolide J (**PP01**) phân lập từ loài *Physalis peruviana* L. là các hợp chất có tiềm năng và có thể nghiên cứu sâu hơn để khẳng định về hoạt tính kháng viêm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập và xác định được cấu trúc hoá học của 06 hợp chất đã biết từ loài *Physalis peruviana* L. đó là hợp chất withanolide J, 4 β -hydroxywithanolide E, physapruin A, withaperuvin C, physaperuvin G, 28-hydroxywithaperuvin C.

2. Đã đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập được từ loài *Physalis peruviana* L., kết quả cho thấy hợp chất withanolide J có tác dụng ức chế rất mạnh sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7. Hợp chất physaperuvin G thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 rất yếu, các hợp chất 4 β -hydroxywithanolide E, physapruin A, withaperuvin C, 28-hydroxywithaperuvin C không có tác dụng ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả phân lập và nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất được phân lập từ loài *Physalis peruviana* chúng tôi nhận thấy rằng hợp chất withanolide J có hoạt tính ức chế sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 mạnh nhất cần được nghiên cứu đánh giá thêm để đưa ra kết luận về hoạt tính kháng viêm. Các hợp chất phân lập được có thể tiến hành nghiên cứu về khả năng gây độc tế bào đối với các tế bào ung thư để đưa ra thêm kết luận về hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập từ loài *Physalis peruviana* L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Zhang Wen-Na, et al., 2016, Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Physalis*, *Chemistry & biodiversity*, 13(1): 48-65.
- [2]. Hợp Vũ Văn, 2018, *Thực vật chí Việt Nam*, Vol. 17: 42-44.
- [3]. Singh Amritpal, et al., 2010, Withanolides: Phytoconstituents with significant pharmacological activities, *International Journal of Green Pharmacy*, 4(4): 229-237.
- [4]. Huang Min, et al., 2020, Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and pharmacological aspects, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(5): 649-669.
- [5]. Sun Cheng-Peng, et al., 2016, Antiproliferative and anti-inflammatory withanolides from *Physalis angulata*, *Journal of Natural Products*, 79(6): 1586-1597.
- [6]. Ma Ting, et al., 2016, Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* var. *villosa* and the apoptosis-inducing effect via ROS generation and the activation of MAPK in human osteosarcoma cells, *RSC advances*, 6(58): 53089-53100.
- [7]. Sun Yi, et al., 2020, Isolation and characterization of cytotoxic withanolides from the calyx of *Physalis alkekengi* L. var *franchetii*, *Bioorganic Chemistry*, 96: 103614.
- [8]. Guan Yu-Zhou, et al., 2014, Withanolides from *Physalis minima* and their inhibitory effects on nitric oxide production, *Steroids*, 82: 38-43.
- [9]. Men Rui-Zhi, et al., 2014, Unprecedented aminophysalin from *Physalis angulata*, *Steroids*, 88: 60-65.
- [10]. Wu Jiangping, et al., 2021, Naturally occurring physalins from the genus *Physalis*: A review, *Phytochemistry*, 191: 112925.
- [11]. Hoàng Lê Tuấn Anh, 2020, *Sử dụng phương pháp sắc ký dầu vân tay để so sánh thành phần hoạt chất chính trong cây dược liệu tự nhiên và cây dược liệu được nuôi cấy mô (Physalis angulata, Physalis minima và Ophiorrhiza japonica) sinh trưởng tại Việt Nam và Belarus*, Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung.

- [12]. Phạm Thị Hải Yến, 2023, *Nghiên cứu hoạt tính kháng viêm và kháng ung thư của một số hợp chất phân lập từ hai loài Tầm bóp (Physalis angulata) và Thù lù nhỏ (Physalis minima), họ Cà-Solanaceae*, Học Viện Khoa học và Công nghệ.
- [13]. Damu Amooru G, et al., 2007, Isolation, structures, and structure– cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*, *Journal of Natural Products*, 70(7): 1146-1152.
- [14]. Fang Sheng-Tao, et al., 2012, Ten new withanolides from *Physalis peruviana*, *Steroids*, 77(1-2): 36-44.
- [15]. Ahmad Saeed, et al., 1999, New withanolide glycosides from *Physalis peruviana* L, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47(4): 477-480.
- [16]. Li Xia, et al., 2014, Physalins and withanolides from the fruits of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and the inhibitory activities against human tumor cells, *Phytochemistry Letters*, 10: 95-100.
- [17]. Parker C, 2012, *Physalis peruviana* (Cape gooseberry), CABI Compendium.
- [18]. Lan Yu-Hsuan, et al., 2009, New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*, *Food Chemistry*, 116(2): 462-469.
- [19]. Sang-Ngern Mayuramas, et al., 2016, Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(12): 2755-2759.
- [20]. Demgne Léannick W, et al., 2024, Two new steroids from the medicinal plant *Physalis peruviana* L., *Phytochemistry Letters*, 59: 5-9.
- [21]. Liao Hui, et al., 2014, Effect of Honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α -glucosidase activity, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(3): 362-368.
- [22]. Tsai Po-Jung, et al., 2007, Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chemistry*, 103(1): 181-187.
- [23]. Bernardes Natalia R, et al., 2014, Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 644-650.

- [24]. Cheenpracha Sarot, et al., 2010, Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesiterterpene peroxide, epimuqubilin A, *Marine drugs*, 8(3): 429-437.
- [25]. Gottfried Hugo E and Kirson I %J *Organic Magnetic Resonance*, 1981, ^{13}C NMR spectroscopy of the withanolides and other highly oxygenated C_{28} steroids, *Organic Magnetic Resonance*, 16(1): 20-25.
- [26]. Shingu Kazushi, et al., 1992, Three new withanolides, physagulins A, B and D from *Physalis angulata* L, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(8): 2088-2091.
- [27]. Hsieh Pei-Wen, et al., 2007, Cytotoxic withanolides from *Tubocapsicum anomalum*, *Journal of natural products*, 70(5): 747-753.
- [28]. SAKURAI KENSUKE, et al., 1976, Isolation of 4 β -Hydroxywithanolide E, a New Withanolide from *Physalis peruviana* L., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24(6): 1403-1405.
- [29]. SHINGU Kazushi, et al., 1993, Physapruins A and B, two new withanolides from *Physalis pruinosa* Bailey, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 41(10): 1873-1875.
- [30]. Sahai Mahendra, et al., 1982, Structures of withaperwin B and C withanolides of *Physalis peruviana* roots, *Heterocycles*, 19(1): 37-40.
- [31]. Le Canh Viet Cuong, et al., 2021, Identification of potential cytotoxic inhibitors from *Physalis minima*, *Natural Product Research*, 35(12): 2082-2085.