

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Xuân Hà

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM CHUYỂN ĐỔI
ANGIOTENSIN 2 (ACE-2) CỦA CÁC HỢP CHẤT COUMARIN
TỪ RỄ CÂY XÁO TAM PHẦN
(*PARAMIGNYA TRIMERA*)**

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



Nguyễn Xuân Hà

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM CHUYỂN ĐỔI
ANGIOTENSIN 2 (ACE-2) CỦA CÁC HỢP CHẤT COUMARIN
TỪ RỄ CÂY XÁO TAM PHẦN
(*PARAMIGNYA TRIMERA*)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8440114

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

Cán bộ hướng dẫn 1

Cán bộ hướng dẫn 2

TS. DS. Phạm Ngọc Khanh

GS. TS. Nguyễn Mạnh Cường

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 dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a long horizontal stroke extending to the right.

Nguyễn Xuân Hà

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những thầy cô hướng dẫn GS. TS. Nguyễn Mạnh Cường và TS. DS. Phạm Ngọc Khanh đã chỉ bảo tận tình và tạo mọi điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình thực hiện luận văn thạc sĩ.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và các anh, chị, bạn đồng nghiệp phòng Hoạt chất sinh học và Phân tích hóa học – Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã có sự ủng hộ, giúp đỡ và có những góp ý quý báu trong quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo, phòng Đào tạo và các thầy cô bên Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành tới toàn thể gia đình và bản bè đã luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong quá trình hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả



Nguyễn Xuân Hà

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Chi <i>Paramignya</i>	4
1.1.1. Giới thiệu về chi <i>Paramignya</i>	4
1.1.2. Chi <i>Paramignya</i> trong y học cổ truyền	4
1.1.3. Thành phần hóa học	4
1.1.4. Hoạt tính sinh học.....	6
1.2. Cây Xáo tam phân (<i>Paramignya trimeria</i>)	8
1.2.1. Đặc điểm thực vật, phân bố và công dụng	8
1.2.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học cây Xáo tam phân	8
1.3. Thụ thể ACE-2 và vai trò trong điều trị COVID-19	14
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu	17
2.2.1. Phương pháp chiết	17
2.2.2. Phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất	17
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập	18
2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế ACE-2	18
2.3. Thực nghiệm	18
2.3.1. Chiết và phân lập các hợp chất từ rễ cây Xáo tam phân	18
2.3.2. Dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được	20
2.3.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được ...	20
2.3.4. Mô phỏng docking phân tử	21

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1. Phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside từ rễ Xáo tam phân (<i>P. trimera</i>)	23
3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất 1 và 2	23
3.2.1. <i>cis</i> -Paratrimerin B (1).....	23
3.2.2. <i>cis</i> -Paratrimerin A (2).....	28
3.3. Đánh giá hoạt tính ức chế enzym ACE-2 của các hợp chất 1 và 2	39
3.4. Nghiên cứu mô phỏng docking phân tử	41
KẾT LUẬN	46
KIẾN NGHỊ	47
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	49
PHỤ LỤC	55

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ COSY
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetate
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy	Phổ tương tác qua nhiều liên kết dị hạt nhân
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy	Phổ tương quan đơn lượng tử dị hạt nhân
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50% thử nghiệm
J (Hz)	Coupling constant	Hằng số tương tác
MeOH	Methanol	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
TLC	Thin-layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
COVID-19	Coronavirus disease 2019	Bệnh vi rút corona
SAR-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome corona virus 2	Virus corona gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng 2

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1 và Paratrimerin B.....	26
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 2 và Paratrimerin A.....	36
Bảng 3.3. Thử nghiệm hoạt tính <i>in vitro</i> ức chế ACE-2.....	39
Bảng 3.4. Ải lực liên kết, liên kết hydro và các tương tác khác như các tương tác kỵ nước của các hợp chất biscoumarin glycoside (1-4) trong vị trí hoạt động của enzyme ACE-2.....	44

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ về vai trò của ACE2 trong hệ thống renin-angiotensin-aldosterone và tác dụng bảo vệ của nó đối với các cơ quan.....	15
Hình 2.1. Cây Xáo tam phân (<i>Paramignya trimeria</i>).....	17
Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside 1 và 2 từ cao nước của loài Xáo tam phân.....	19
Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất <i>cis</i> -Paratrimerin B.....	25
Hình 3.2. Tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất <i>cis</i> -Paratrimerin B.....	25
Hình 3.3. Phổ ¹ H-NMR của hợp chất 1	28
Hình 3.4. Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất 1	28
Hình 3.5. Phổ DEPT-NMR của hợp chất 1	29
Hình 3.6. Phổ HSQC của hợp chất 1	30
Hình 3.7. Phổ HMBC của hợp chất 1	31
Hình 3.8. Phổ COSY của hợp chất 1	32
Hình 3.9. Phổ NOESY của hợp chất 1	33
Hình 3.10. Phổ ROESY của hợp chất 1	34
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất <i>cis</i> -Paratrimerin A.....	35
Hình 3.12. Tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất <i>cis</i> -Paratrimerin A.....	35
Hình 3.13. Phổ ¹ H-NMR của hợp chất 2	37
Hình 3.14. Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất 2	38
Hình 3.15. Hình tương tác 2D and 3D re-dock của chất ức chế MLN-4760 (PDB ID: 1R4L) hiển thị hình dạng khoang liên kết của ACE-2.....	40
Hình 3.16. Các tương tác 2D và 3D của (A) <i>cis</i> - và (B) <i>trans</i> -paratrimerin A (2 và 4); (C) <i>cis</i> - và (D) <i>trans</i> -paratrimerin B (1 và 3) với các gốc amino acid trong vị trí hoạt động ACE-2.....	43

MỞ ĐẦU

Thế giới hiện đang phải đối mặt với một đại dịch nhiễm trùng nghiêm trọng giống như bệnh cúm, gây ra bởi một loại coronavirus, cụ thể là SARS-CoV-2. Kể từ năm 2019, nó đã lan rộng ra hơn 130 quốc gia trên toàn cầu, lây nhiễm cho hơn 600 triệu người và gây ra cái chết cho hơn 6 triệu người mắc bệnh (chiếm khoảng 1% ca tử vong) (<https://covid19.gov.vn/> - truy cập ngày 23/8/2023). Các biến thể của virus SAR-CoV-2 và các hội chứng hậu COVID-19 đang diễn biến phức tạp đòi hỏi cần tiếp tục nghiên cứu để đưa ra những liệu pháp phòng ngừa và điều trị thích hợp [1].

Đường hô hấp là con đường chính mà SARS-CoV-2 xâm nhập vào cơ thể con người [2]. Virus SARS-CoV-2 xâm nhập vào tế bào phổi của người thông qua protein Spike S tương tác với các thụ thể của enzyme chuyển đổi angiotensin-2 (ACE-2) ở phổi của người [3]. Do ảnh hưởng của virus, hệ Renin-angiotensin của người bị phá vỡ, dẫn đến các triệu chứng bệnh lý trầm trọng ở phổi, gan, thận và gây chết người rất nhanh chóng [4]. Enzym ACE-2 và các thụ thể ở người này là đích phân tử tiềm năng trong nghiên cứu tìm kiếm và phát triển các loại sản phẩm và thuốc trong phòng ngừa và điều trị bệnh dịch COVID-19.

Hiện nay, kỹ thuật docking phân tử (*in silico*) với sự hỗ trợ của máy tính đang là một phương pháp hiệu quả trong việc sàng lọc và đánh giá các hoạt chất có tác dụng sinh học ở cấp độ phân tử [5]. Ví dụ, một loạt các hợp chất hóa học có hoạt tính sinh học như flavonoid (rutin, astragalín, quercetin, isoquercitrin (từ cây tầm ma Himalaya (*Urtica dioica*), glyasperin A, broussonin F, isorhamnetin (từ keo ong *Sulawesi*), chalcone (butein), triterpenoid (cucurbitacin E, cucurbitacin B, isocucurbitacin B7) được phát hiện là chất ức chế mạnh thụ thể ACE-2 bằng phương pháp docking phân tử [6-9]. Sáu hợp chất từ các cây dược liệu từ bao gồm tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, baicalein, and glycyrrhetic acid đã được phát hiện có tác dụng ức chế virus SARS-CoV-2 qua thử nghiệm *in vitro* và nghiên cứu docking phân tử [10]. Việc tìm kiếm chất ức chế ACE-2 từ cây thuốc và các thành phần tự nhiên là một trong những cách tiếp cận hiệu quả để tạo ra các sản phẩm tiềm năng để phòng ngừa và điều trị bệnh COVID-19.

Chúng tôi đã bước đầu sàng lọc *in silico* của trên 1000 hợp chất thiên nhiên Việt Nam đến đích protein liên quan đến SARS-CoV-2 như Mpro, RdRp và ACE-2. Kết quả cho thấy, một số hợp chất coumarin từ cây Xáo tam phân và các hợp chất khác từ một số cây thuốc Việt Nam có tác dụng mạnh thể hiện qua năng lượng liên kết mạnh và tương tác các vị trí axit amin quan trọng trong vùng hoạt động của protein ACE-2. Trên cơ sở này, chúng tôi lựa chọn nghiên cứu phân lập các hợp chất

coumarin từ cây Xáo tam phân và đánh giá tác dụng của chúng trên *in vitro* và *in silico*

Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) loài cây bụi thân gỗ thuộc họ Rutaceae, phân bố chủ yếu ở tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Trong dân gian rễ của loại thảo dược này được dùng để điều trị các bệnh về gan, đặc biệt là xơ gan cổ trướng. Rễ của Xáo tam phân có thành phần hóa học chính là các coumarin và coumarin glycoside, ví dụ như ostruthin, ninhvanin, và paratrimerin A, B, ... [11-15].

Như vậy, việc nghiên cứu phân lập và đánh giá tác dụng ức chế enzym chuyển đổi angiotensin (ACE-2) *in vitro* và *in silico* của các hợp chất coumarin trong cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) có tính cấp thiết và có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Việc nghiên cứu trên sẽ góp phần phát hiện nguồn tài nguyên thực vật Việt Nam trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh COVID-19. Do đó, tôi lựa chọn thực hiện đề tài: **“Đánh giá hoạt tính ức chế enzym chuyển đổi angiotensin 2 của các hợp chất coumarin từ rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*).**”

Mục tiêu của luận văn:

- Phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside từ rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.)
- Nghiên cứu hoạt tính ức chế ACE-2 *in vitro* và *in silico* của các hợp chất phân lập được.

Nội dung luận văn bao gồm :

1. Thu thập mẫu rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.)
2. Xử lý mẫu, ngâm chiết, tạo cao tổng và các cao phân đoạn.
3. Phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside bằng các phương pháp sắc ký.
4. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất biscoumarin glycoside phân lập được
5. Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme ACE-2 *in vitro* và *in silico* của các hợp chất biscoumarin glycoside phân lập được.

Những đóng góp của luận văn :

Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của hai hợp chất mới lần đầu tiên phân lập trong tự nhiên từ rễ loài Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.) bao gồm *cis*-paratrimerin B (**1**) và *cis*-paratrimerin A (**2**).

Các cao chiết, cao phân đoạn và các hợp chất phân lập **1** và **2** đã được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme ACE-2. Hai hợp chất **1** và **2** thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể với IC₅₀ lần lượt là 28,9 và 68 μM

Nghiên cứu mô phỏng docking phân tử được thực hiện trên đích protein ACE-2 (PDB ID : 1R4L) để đánh giá khả năng tương tác liên kết của các hợp chất biscoumarin glycoside **1-4** kết quả cho thấy ái lực liên kết là -14,70, -12,95, -11,94 và -10,69 kcal/mol, thấp hơn đáng kể so với MLN-4760 đối chứng dương (-9,12 kcal/mol).

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Chi *Paramignya*

1.1.1. Giới thiệu về chi *Paramignya*

Chi Cựa gà, Xáo (*Paramignya*) là chi thuộc họ Cam (Rutaceae) và phân bố rộng rãi ở vùng nhiệt đới miền Nam Việt Nam, miền Nam Philippines, Thái Lan, Malaysia, Java-Indonesia, Úc, vùng khô và ẩm ướt của Sri Lanka [12, 13, 16, 17].

Theo các dữ liệu thực vật học “The World Flora Online” (<https://wfoplantlist.org/> truy cập vào 21/3/2024) có 24 loài thuộc chi *Paramignya* có tên khoa học được chấp nhận.

Ở Việt Nam, theo các tài liệu đã báo cáo chỉ ra có 7 loài thuộc chi *Paramignya* [18] đã được đề cập đến gồm:

- *Paramignya armata* (Thwaites) Oliv. (Cựa gà) mọc ở Đà Nẵng, Khánh Hòa.
- *Paramignya griffithii* Hook. f (Xáo griffith), phân bố ở Lâm Đồng, Khánh Hòa.
- *Paramignya hispida* Pierre ex Guillaum (Cựa gà nhám) phân bố ở Nghệ An, Quảng Trị, Đồng Nai.
- *Paramignya monophylla* Wight (Xáo một hoa) phân bố ở Ba Vì.
- *Paramignya petelotii* Guillaum (Xáo petelot) mọc ở Mai Châu (Hòa Bình).
- *Paramignya scandens* (Griff.) Craib. (Xáo leo) phân bố ở Hà Nam, Quảng Trị, Lâm Đồng.
- *Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill (Xáo tam phân) phân bố ở núi Lấp Vò (Tây Ninh), Khánh Hòa, Lâm Đồng.

Trong danh sách 7 loài kể trên có 6 loài có tên khoa học được chấp nhận, bao gồm: *Paramignya trimera*, *P. armata*, *P. hispida*, *P. monophylla*, *P. petelotii* và *P. scandens*.

1.1.2. Chi *Paramignya* trong y học cổ truyền

Loài Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) đã được sử dụng trong y học dân gian ở tỉnh Khánh Hòa Việt Nam để chữa các bệnh về gan như viêm gan, xơ gan cổ trướng [19]. Ở Thái Lan, thân cây *P. griffithii* được dùng để chữa viêm mũi [20].

1.1.3. Thành phần hóa học

Cho đến nay, các nghiên cứu về thành phần hóa học tập trung chủ yếu vào các bộ phận khác nhau (rễ, thân, vỏ, vỏ thân, lá, cành và quả) của 4 loài *P. trimera*, *P.*

scandens, *P. griffithii*, *P. monophylla*, đặc biệt ở rễ và thân của *P. trimera*. Các hợp chất được phân thành nhiều loại lớp chất bao gồm coumarin, coumarin glycoside, tirucallane, tirucallane saponin, acridone alkaloid, flavanone, flavon và flavanone glycoside, phenol, chromen và megastigman. Trong đó, các hợp chất coumarin và coumarin glycoside được phân lập nhiều nhất.

a) Các hợp chất coumarin và coumarin glycoside

Cho đến nay đã xác định được khoảng 39 hợp chất coumarin và coumarin glycoside. Đây là các thành phần chính được phát hiện từ các loài *P. trimera* và *P. monophylla*. Trong đó, 33 hợp chất được phát hiện từ loài *P. trimera* và 6 hợp chất được tìm thấy từ loài *P. monophylla*. Cụ thể, các hợp chất thuộc lớp coumarin gồm 7-hydroxycoumarin (**1**), 7-methoxycoumarin (**2**), ostruthin (**3**), ninhvanin (**4**), ninhvannin B, 6-(6-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,7 -dienyl)-7-hydroxycoumarin (**5**), paratrimerin A,B (**6,7**) J-Y, paratrimerin E, F (**8, 9**), umbelliferone (**10**), scopoletin (**11**), xanthyletin (**12**), pandanusin A (**13**), 8-geranyl-7-hydrocoumarin (**14**), 6-(7-hydroperoxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-7-hydroxycoumarin (**15**), luvangetin (**16**), poncitrin (**17**), nordentatin (**18**), 5-hydroxy-8,8-dimethyl-10-(3',7'-dimethylocta-1',6'-dimethylocta-1',6'-dien-3'-yl) pyranocoumarin (**19**), 5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(3',7'- dimethylocta-1',6'-dimethylocta-3'-dien-3'- yl) pyranocoumarin (**20**), 5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(7-hydroxy-3,7-dimethylocta-1,5-dien-3-yl) pyranocoumarin (**21**), 5-hydroxy-8,8-dimethyl-10-(7-hydroxy-3,7-dimethylocta-1,5-dien-3-yl) pyranocoumarin (**22**) (Phụ lục 1) [11, 21, 22]. Điều đáng chú ý, đã có 18 biscoumarin glycosides mới (paratrimerin A, B, J-Y) được phát hiện từ rễ của Xáo tam phân với đặc trưng cấu trúc là hai vòng coumarin được nối với nhau qua một vòng monoterpene. Các biscoumarin glycoside từ Xáo tam phân về mặt cấu trúc khác biệt với các biscoumarin từ các chi khác thuộc họ Rutaceae, chẳng hạn như bisparasin từ *Citrus paradise* hoặc thamnosin từ *Thamnos mamontana* [23].

b) Triterpenoid

Tổng cộng có 15 hợp chất triterpenoid được phân lập từ các loài thuộc chi *Paramignya* (Phụ lục 2) trong đó bảy tirucallane **23–29** flindissone, deoxyflindissone, tirucalla-7,24-diene-3-diol, 3-oxotirucalla-7,24-diene-21,23-diol, 3-oxo-tirucalla-7,24-dien-23-ol, 24-dimethyl-lanosta-25-en-3-ol từ quả, lá và thân của loài *P. monophylla* [17, 24], một tirucallane **30** 3-oxo-tirucalla-7,24-diene-21-al từ thân của loài *P. griffithii* [20], bảy dẫn xuất glycosyl **31–37**, paramignylol A, B, paramignyoside A-E từ thân và lá của loài *P. scandens* [25, 26].

c) Acridone alkaloid

Cho đến nay, 7 hợp chất alkaloid được phát hiện, bao gồm hợp chất citrusine-I, glycocitrine-III, oriciacridone E, oriciacridon, 5-hydroxynoracronycin, paratrimerin C, D (**38–44**), Z (Phụ lục 4), tất cả hợp chất này được tìm thấy ở loài *P. trimera* có bộ khung acridone đặc trưng [13, 27].

d) Flavonoid

Tổng 6 hợp chất flavonoid được tìm thấy từ chi *Paramignya*, bao gồm ba flavanone, hai flavone và một dẫn xuất glycosyl **45–50** đã được phân lập (Phụ lục 4) [20, 24, 28]. Hai flavanon prenylat hóa 3',4'-dihydroxy-7 methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-furan-(4'',5'':6,5)-flavanon (**46**), và 3',4'-dihydroxy-7-metoxi-8-(3-metylbut-2-enyl)-2'''-(1-hydroxy 1-metyletyl)-furan-(4'',5'':6, 5)-flavanone (**47**), cùng với một amoradicin (**45**) đã biết được phân lập từ cao chiết methanol của thân cây *P. grithii* trong khi flavanone diglycoside atripliside B (**50**) được lấy từ dịch chiết nước của cành và lá *P. scandens*. Trong số các flavon này, các flavon **48–49** trong cao chiết ete dầu hỏa và chloroform của thân cây *P. monophylla* [24].

e) Các hợp chất khác

Phân tích thành phần hóa học của cao chiết chloroform từ thân của loài *P. trimera* đã chỉ ra bảy hợp chất phenolic **51–57** [29]. Ngoài ra, axit vanillic (**58**) và *trans-N-p*-coumaroyl tyramine (**59**) được phân lập tương ứng từ cao chiết methanol *P. tripera* và cao chiết nước *P. scandens*, cũng có thể được xác định là hợp chất phenolic [13, 28]. Một số glycosid sesquiterpene trong chi *Paramignya* xuất hiện dưới dạng megastigmane glycoside, chỉ có hai hợp chất có tên là gusanlungionoside C (**62**) và (6*R*,9*S*)-roseoside (**63**), được phân lập từ cao chiết nước của cành và lá khô của *P. scandens* (Phụ lục 5) [28].

Ngoài ra, các hợp chất khác như limonoid methyl isolimonate (**64**), lignin glycoside syringaresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside (**65**), nucleoside adenosine (**66**) cũng được phát hiện từ cành và lá khô của *P. scandens* (Phụ lục 6) [25]. Một hợp chất phổ biến, β -sitosterol (**67**) từ vỏ thân của loài *P. monophylla* cũng đã được báo cáo [11].

1.1.4. Hoạt tính sinh học

a) Hoạt tính gây độc tế bào

Từ cao chiết methanol thân và lá của *Paramignya scandens*, hai hợp chất paramigynol A, B thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đáng kể với IC₅₀ nằm trong khoảng 3.55 đến 10.50 μ M trên 4 dòng tế bào KB (ung thư biểu mô biểu bì), SK-Mel-2 (khối u ác tính), LU-1 (ung thư biểu mô tuyến phổi) và MCF-7 (ung thư vú). Trong số đó,

paramignylol A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào κB mạnh nhất với IC_{50} $3,55 \pm 0,15 \mu\text{M}$ [26].

Từ cao chiết methanol của rễ cây Xáo tam phân thể hiện hoạt tính gây độc tế bào chống lại HepG2, MCF-7 tiềm năng với giá trị IC_{50} lần lượt là 114.0 and 260.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hai hợp chất coumarin, ostruthin và dẫn xuất 8-methoxy của nó, cùng với bốn acridone alkaloid citrusinine-I, glycocitrine-III, oriciacridon và 5-hydroxynoracronycin có hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư biểu mô gan Hep-G2 cho giá trị IC_{50} trong phạm vi từ $30,53 \pm 0,61 \mu\text{M}$ đến $62,90 \pm 2,58 \mu\text{M}$ [27].

b) Hoạt tính kháng viêm

Các hợp chất ostruthin, ninhvanin, 6-(6-Hydroxy-3,7-dimethylocta-2,7-dienyl)-7-hydroxycoumarin, paratrimerin E, 8-geranyl-7-hydroxycoumarin, luvangetin và 6-(2-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran được sử dụng để ức chế các sản phẩm gây viêm NO và PGE2, cũng như sự biểu hiện protein nitric oxit tổng hợp (iNOS) và cyclooxygenase-2 (COX-2) cảm ứng trong lipopolysacarit (LPS)- kích thích các tế bào microglia BV2. Coumarin ostruthin và dẫn xuất 8-methoxy của nó có tác dụng ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} là 9,8 và 12,3 μM và làm giảm sự tạo thành PGE2 với giá trị IC_{50} là 9,4 và 13,4 μM , tương ứng. Các hợp chất ostruthin và ninhvanin cũng có khả năng kháng viêm thông qua ức chế biểu hiện của các yếu tố tiền viêm như protein iNOS và COX-2 trên tế bào BV2 được kích thích bằng LPS [11].

Tác giả N. H. T. Phan và cộng sự đã phân lập được năm tirucallane saponin paramignyoside A-E từ loài *Paramignya scandens* [25] thu ở Đà Lạt và đã đánh giá tác dụng của chúng đến các cytokine gây viêm interleukin (IL)-12 p40, IL-6 và TNF- α trên tế bào các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ tủy xương (bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)) được kích thích bằng LPS [25]. Hợp chất Paramignyoside C được phát hiện có tác dụng mạnh và chọn lọc đối với việc sản sinh interleukin IL-12 p40 với giá trị IC_{50} là $5,03 \pm 0,19 \mu\text{M}$. Ngoài ra, paramignyoside D, paramignyoside E thể hiện hoạt tính đáng kể, trong khi paramignyoside B và paramignyoside A thể hiện tác dụng ức chế trung bình và yếu.

c) Hoạt tính ức chế α -glucosidase

Cao chiết methanol của rễ loài Xáo tam phân đã được chứng minh thể hiện tác dụng ức chế α -glucosidase đáng kể với giá trị IC_{50} là 36.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Các hợp chất được xác định từ rễ loài này gồm 7-hydroxycoumarin, 7-methoxycoumarin, ostruthin, 8-

methoxyostruthin, oriciacridone, citrusicin I, glycocitrin III, 5-hydroxynoracronycin, 6,7-dihydroxycoumarin, 6-methoxy-7-hydroxycoumarin, 7-demethylsuberosin, xanthyletin, 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyde, eulatachromene, paratrimerins C–F, ostruthin, umbelliferone, scopoletin, xanthyletin, pandanusin A, citrusicin-I, glycocitrine-III, oriciacridone E, daedalin A, vanillic acid và ninvhanin đều thể hiện tác dụng ức chế α -glucosidase với IC_{50} nằm trong khoảng 14,5 – 198,6 μ M. Trong số đó, hợp chất alkaloid paratrimerin C thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là $14,5 \pm 1,2 \mu$ M [13]. Một hợp chất alkaloid, (*R*)-2-ethylhexyl 2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate được phát hiện từ thân cây Xáo tam phân, thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 137,9 μ M [30].

1.2. Cây Xáo tam phân (*Paramignya trimeria*)

1.2.1. Đặc điểm thực vật, phân bố và công dụng

Cây Xáo tam phân có tên khoa học là *Paramignya trimeria* thuộc họ Rutaceae. Cây Xáo tam phân phân bố ở Tây Ninh, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Phú Yên.

Cây Xáo tam phân có nhiều công dụng và thường dùng thân rễ cây để tăng cường và bảo vệ gan, hỗ trợ điều trị xơ gan cổ trướng và ung thư gan.

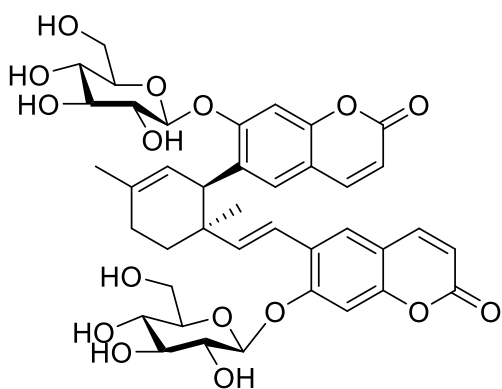
Cây Xáo tam phân là cây gỗ nhỏ, bụi leo hay trườn, thân dài tới 4-5 m; có gai nhọn, hơi cong hay ngang, dài 0,4-1,2 cm. Lá mọc so le. Phiến lá đơn, dày, hình bầu dục thuôn, kích thước khoảng 2,3-5 x 1,8-2 cm; đỉnh lá có khía nhỏ, góc lá tròn, mép lá có khía ở phía trên; mặt trên xanh đậm, mặt dưới nhạt và bóng, có 8-10 đôi gân bên; cuống lá dài khoảng 4-8 mm, nhẵn. Cụm hoa dạng chùm mọc ở nách lá, gồm 2-8 hoa. Hoa mẫu 3; cuống hoa ngắn, nhẵn, có lá bắc; đài tồn tại trên quả, 3 lá đài dính nhau, có tuyến rõ, mép có lông; 3 cánh hoa nhỏ, dài 4 mm; nhị 6, ngắn hơn cánh hoa, chỉ nhị dày và dẹt; bao phấn hình bầu dục; bầu 2-3 ô, mỗi ô chứa 1 noãn, vòi nhụy dày, có tuyến, đầu nhụy dẹt, có 3 gờ. Quả gần hình cầu, có đài và vòi nhụy tồn tại, đường kính quả chỉ khoảng 1,5cm. Gỗ thân cứng, màu vàng. Rễ màu nâu sẫm hay vàng. Lõi rễ màu vàng ngà. Toàn thân chứa tinh dầu, nhất là ở rễ. Cây ra hoa và quả vào khoảng tháng 5-10 [31].

1.2.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học cây Xáo tam phân

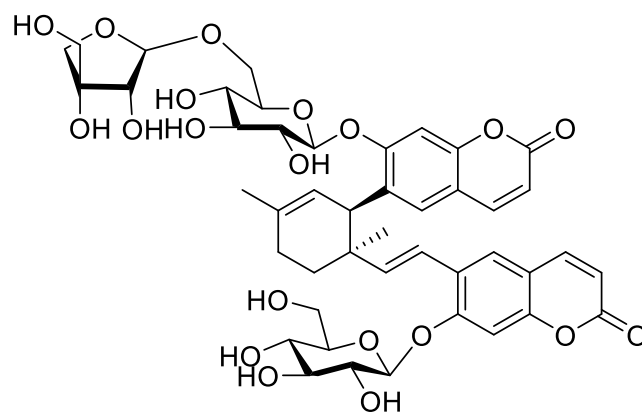
Các nghiên cứu hóa thực vật trên thế giới về các bộ phận khác nhau của *Paramignya trimeria* như thân, rễ, và lá đã chỉ ra rằng các thành phần hóa học chính bao gồm các lớp chất: coumarin, alkaloid, flavonoid, các axit hữu cơ. Cho đến nay,

hơn 70 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học trong đó thành phần chính là các hợp chất coumarin và coumarin glycoside.

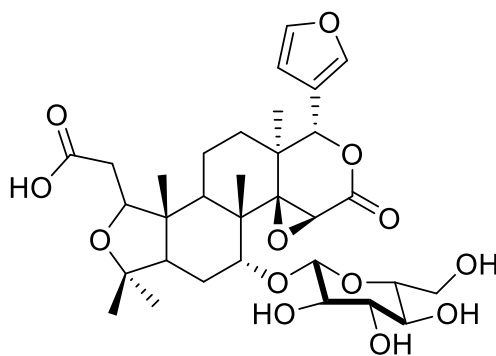
Từ rễ và thân của cây Xáo tam phân, tác giả Trần Thu Hương và cộng sự đã phân lập được 3 hợp chất gồm ninhvanin B, paramitrimerol, parabacunoic acid [32]. Nhóm tác giả này cũng đã phát hiện được hai hợp chất mới là paratrimerin A và paratrimerin B từ rễ và thân cây Xáo tam phân trong một nghiên cứu khác [12].



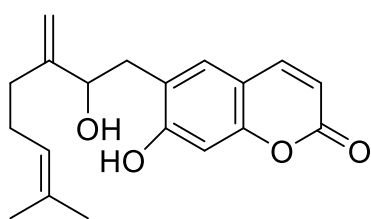
Paratrimerin A



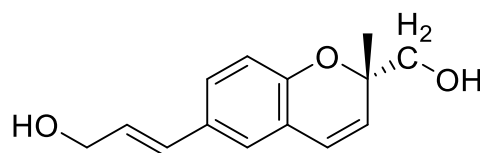
Paratrimerin B



Parabacunoic acid



Ninhvanin B



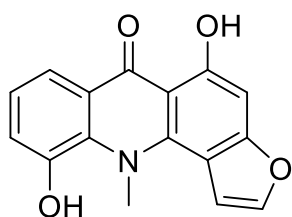
Paramitrimerol

Từ thân cây Xáo tam phân, nhóm tác giả Nguyễn Trung Nhân và cộng sự đã phân lập paratrimerin C, paratrimerin D thuộc lớp chất acridone và paratrimerin E, paratrimerin F thuộc lớp chất coumarin từ cao chiết CHCl_3 và EtOAc. Các hợp chất mà nhóm tác giả xác định được có hoạt tính ức chế α -glucosidase, giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 14,6 đến 112,2 μM , mạnh hơn so với acarbose đối chứng dương (IC_{50} , 214,5 μM) [13].

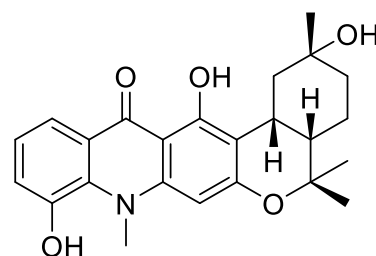
Hai hợp chất prenylated phenolic, paratrimerins G và H cũng đã được phân lập từ thân cây Xáo tam phân (Rutaceae). Các hợp chất này được kiểm tra hoạt tính

ức chế α -glucosidase, hiệu quả ức chế ở mức trung bình lần lượt với giá trị IC_{50} là 89.2 và 58.8 μM [14].

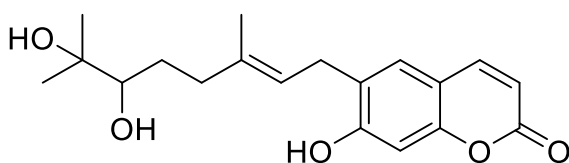
Một hợp chất acridone alkaloid là paratrimerin I được tác giả Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự phân lập từ cặn chiết hòa tan bởi $CHCl_3$ của rễ cây Xáo tam phân. Paratrimerin I có khả năng gây độc tế bào đáng chú ý đối với các dòng tế bào ung thư biểu mô gan ở người HepG2 và ung thư biểu mô vú ở người MCF-7, với các giá trị IC_{50} tương ứng là 0,43 và 0,26 μM . Các nhóm N-methyl, C-4 methoxy, và C-5 hydroxy trong khung acridone được đề xuất như một đặc điểm cấu trúc ảnh hưởng đến khả năng gây độc tế bào mạnh [33].



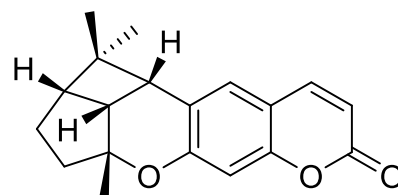
Paratrimerin C



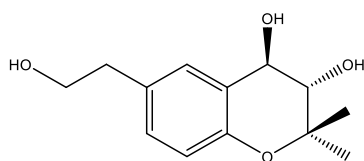
Paratrimerin D



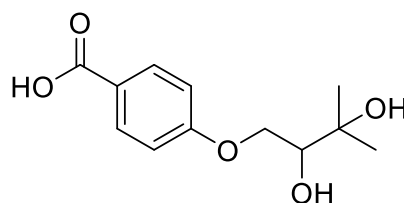
Paratrimerin E



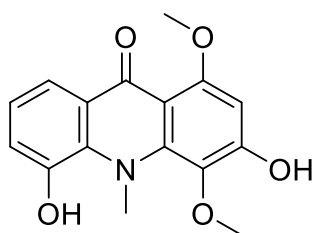
Paratrimerin F



Paratrimerin G



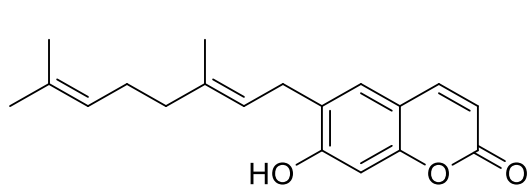
Paratrimerin H



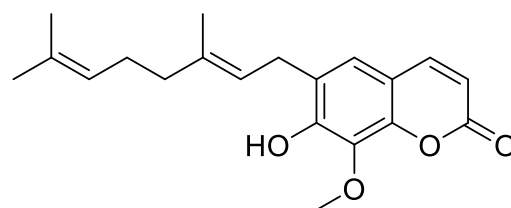
Paratrimerin I

Từ thân cây Xáo tam phân, tác giả Phan Văn Kiệm và cộng sự, đã phân lập được bảy hợp chất: ostruthin, ninhvanin, 8-geranyl-7-hydroxycoumarin, 6-(6',7'-dihydroxy-3',7'-dimethylocta-2'-enyl)-hydroxycoumarin, 6-(7-hydroperoxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-7-hydroxycoumarin, 6-(2-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran, luvangetin. Kết quả nghiên cứu hoạt tính kháng viêm cho thấy, hợp

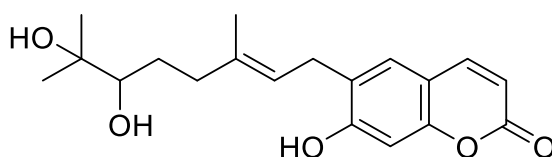
chất ostruthin, ninhvanin, 8-geranyl-7-hydroxycoumarin, 6-(6',7'-dihydroxy-3',7'-dimethylocta-2'-enyl)-hydroxycoumarin và luvangetin ức chế sản sinh NO và PGE₂ trong các tế bào BV2 được kích hoạt bởi LPS lần lượt với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng 9,8-46,8 μM và 9,4-52,8 μM. Đặc biệt ostruthin và ninhvanin được chứng minh là ngăn chặn sự biểu hiện của protein iNOS và COX-2 do LPS gây ra. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học về việc sử dụng *P. trimera* trong phòng ngừa và điều trị các bệnh viêm thần kinh. Ostruthin và ninhvanin có thể có các tác dụng điều trị tiềm năng và cần được xem xét để phát triển thêm như các chất chống viêm thần kinh mới [11].



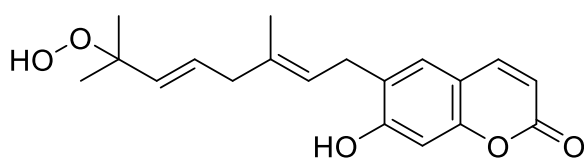
Ostruthin



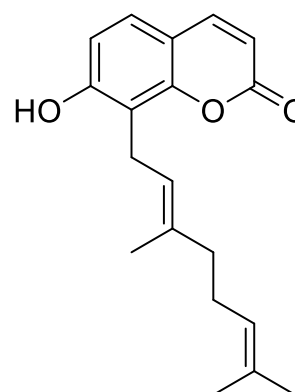
Ninhvanin



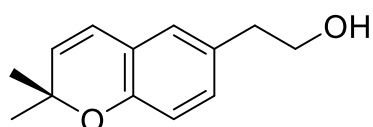
6-(6',7'-dihydroxy-3',7'-dimethylocta-2'-enyl)-7-hydroxycoumarin



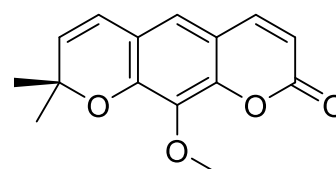
6-(7-hydroperoxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-7-hydroxycoumarin



8-geranyl-7-hydroxycoumarin



6-(2-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran



Luvangetin

Từ cao chiết EtOH của thân Xáo tam phân, nhóm tác giả Không Trọng Quân và cộng sự, đã phân lập các dimeric coumarin mới, paratrimerin J-Y. Trong số các hợp chất này, paratrimerin W có tác dụng gây độc tế bào đối với ung thư biểu mô tế bào gan Huh7, sarcoma sợi HT1080 và tế bào ung thư đại trực tràng HT29 với giá trị IC_{50} lần lượt là 14,9, 18,4 và 22,5 μ M.

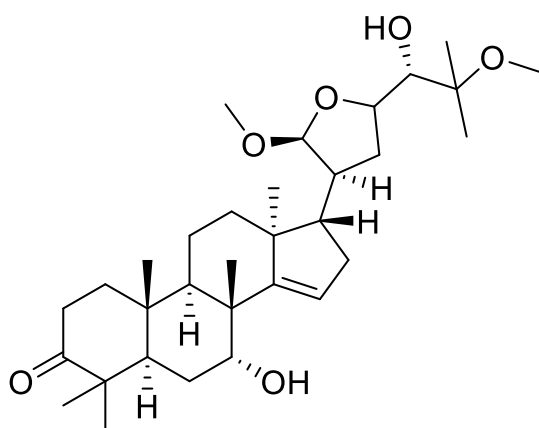
Tác giả Nguyễn Thị Hoài và cộng sự, đã xác định hoạt tính sinh học của tinh dầu được chiết xuất từ lá *Paramignya trimera* bao gồm tác dụng gây độc tế bào, kháng vi rút, kháng khuẩn, chống nấm, chống trichomonas. Kết quả cho thấy, tinh dầu *P. trimera* không gây độc tế bào trên các tế bào thông thường cụ thể MT-4, BHK-21, MDBK, và Vero-76. Tinh dầu *P. trimera* thể hiện ức chế mạnh chống lại *Staphylococcus aureus*, *Candida parapsilosis* lần lượt với giá trị MIC và MLC là 2%, 8% (v/v) và ở các chủng còn lại giá trị MIC và MLC lớn hơn hoặc bằng 16% (v/v). Ngoài ra, hoạt tính chống trichomonas của tinh dầu *P. trimera* thể hiện giá trị IC_{50} , IC_{90} , MLC lần lượt là 0.016%, 0.03% và 0.06% (v/v). Tinh dầu này không hoàn toàn hiệu quả chống lại các virus ssRNA+ (HIV-1, YFV, BVDV, Sb-1, CV-B4). ssRNA- (RSV, VSV), dsRNA (Reo-1) và dsDNA (HSV-1, VV) [34].

Thành phần hóa học tinh dầu trong cây *Paramignya trimera* rất đa dạng và phong phú. Theo tác giả Ain Raal và cộng sự, tinh dầu từ lá của cây *Paramignya trimera* thu được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Phân tích sắc ký khí ghép phổ khối (GC/MS) xác định được tổng số 43 thành phần, chiếm 89.5% lượng tinh dầu, chủ yếu là hydrocacbon sesquiterpene (39.6%) và sesquiterpenes chứa oxy (41.7%). Thành phần chính trong tinh dầu này là β -caryophyllene (10.5 %), β -caryophyllene oxide (9.9 %), 7-epi- α -eudesmol (7.6 %), and γ -muurolene (6.8 %) [34].

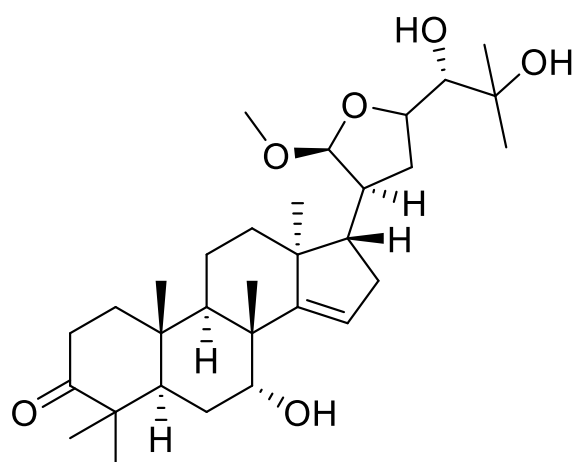
Tác giả Gang MinHur và cộng sự cho rằng hai geranylated 7-hydroxy coumarins chính, 6-geranyl-7-hydroxycoumarin (ostruthin) và 8-geranyl-7-hydroxycoumarin (8-geranylumbelliferone, 8-GU) được phân lập từ *Paramignya trimera*, tạo điều kiện thuận lợi cho hai phương thức apoptosis và hoại tử kép phụ thuộc RIPK1 bằng cách nhắm mục tiêu IKK β khi thắt chặt protein TNF1 (TNFR1). Phân tích các sự kiện ngược dòng của NF- κ B cho thấy 8-GU và ostruthin ức chế đáng kể quá trình phosphoryl hóa IKK do TNF gây ra, trong khi không ảnh hưởng đến sự phosphoryl hóa TAK1 và sự hình thành phức hợp TNFR1. Điều thú vị là 8-GU không ảnh hưởng đến sự chết tế bào gây ra bởi phối tử Fas hoặc phối tử gây apoptosis liên quan đến TNF hoặc gây ra bởi các tác nhân gây hại DNA, 8-GU chỉ nhạy cảm với sự chết tế bào do TNF gây ra. Hơn nữa, 8-GU làm tăng tốc độ hoại tử do TNF điều khiển

bằng cách điều chỉnh tăng sự hình thành hoại tử trong FADD thiếu tế bào ung thư chứa RIPK3 [35].

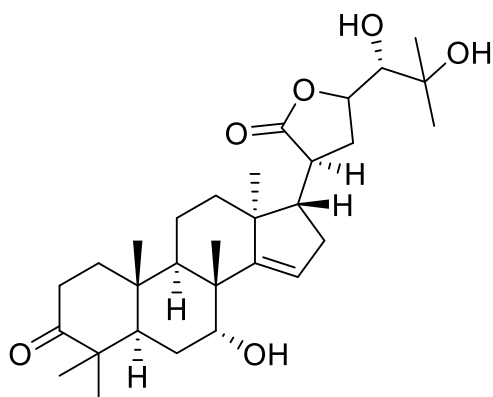
Các nghiên cứu gần đây vào năm 2023, nhóm Trần Hoài Tú và cộng sự đã phát hiện các kiểu apotirucallane protolimonoid mới từ lá của cây *Paramignya trimera* gồm methyl-1,2-dihydroprotoxylocarpin D, (20*S*,21*R*,23*R*)-21,23-epoxy-7 α ,24,25-trihydroxy-21-*O*-methyl-3-oxapotirucalla-14-ene và 7 α ,24,25-trihydroxy-3-oxapotirucalla-14-en-21,23-olide. Ba hợp chất này không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào chống dòng tế bào MCF-7 tại nồng độ 100 μ M. Điều thú vị là, khi các tế bào MCF-7 được xử lý bằng methyl-1,2-dihydroprotoxylocarpin D ở các nồng độ khác nhau, người ta đã quan sát thấy phản ứng kích thích đáng chú ý, dẫn đến khả năng sống sót của tế bào tăng đáng kể, lên tới 127% [36].



methyl-1,2-dihydroprotoxylocarpin D

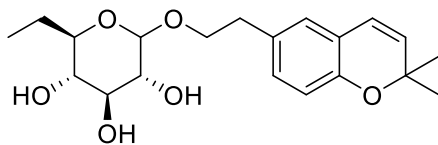


(20*S*,21*R*,23*R*)-21,23-epoxy-7 α ,24,25-trihydroxy-21-*O*-methyl-3-oxapotirucalla-14-ene



7 α ,24,25-trihydroxy-3-oxapotirucalla-14-en-21,23-olide

Gần đây vào năm 2024, từ phân đoạn EtOAc của rễ cây *Paramignya trimera*, nhóm Đặng Hoàng Phú phân lập một dẫn xuất chromene mới là paratrimerin Z. Cấu trúc của nó đã được làm sáng tỏ trên cơ sở giải thích quang phổ NMR. Paratrimerin Z ở nồng độ 100 μM không thể hiện khả năng gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư gan người Hep3B [37].



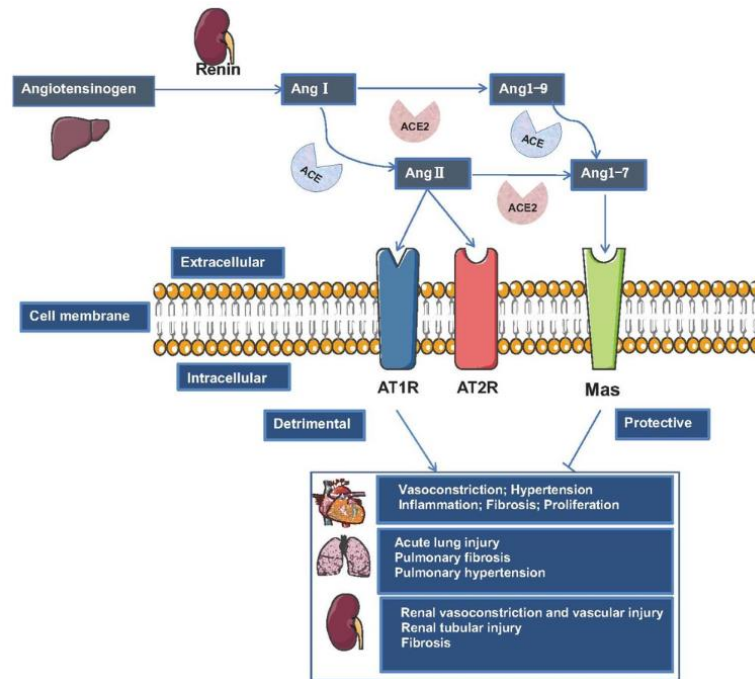
Paratrimerin Z

Cây Xáo tam phân được biết đến như một vị thuốc nam cổ truyền ở Việt Nam. Do đó, các hợp chất có trong loài này đã được nhiều tác giả phân lập và nghiên cứu tính chất. Các kết quả nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học cây Xáo tam phân chứa nhiều coumarin, flavonoid, alkaloid, phenol và có nhiều hoạt tính sinh học như gây độc tế bào, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm...

1.3. Thụ thể ACE-2 và vai trò trong điều trị COVID-19

Enzyme chuyển đổi angiotensin 2 (ACE-2) được phát hiện vào năm 2000 dưới dạng tương đồng của enzyme chuyển đổi angiotensin (ACE). ACE-2 là một protein xuyên màng loại I bao gồm 805 axit amin và có hai miền, cụ thể là miền xúc tác đầu cuối amino và carboxy. Miền xúc tác chứa một vị trí hoạt động, miền metalloprotein kẽm, phù hợp với 41,8% trình tự của ACE. Gen mã hóa ACE-2 nằm trên nhiễm sắc thể X, Xp22.2. Bằng chứng cho thấy ACE-2 được biểu hiện ở tim, thận, phổi, gan, tinh hoàn, ruột và các mô khác [38-41]

Chức năng sinh học của ACE-2 có thể được chia thành hai loại: phụ thuộc peptidase và độc lập peptidase. Chức năng phụ thuộc peptidase đề cập đến quá trình chuyển hóa angiotensin I (Ang I) thành peptide angiotensin 1-9 (Ang 1-9) và angiotensin II (Ang II) thành peptide angiotensin 1-7 (Ang 1-7) (Hình 1.8). Chức năng không phụ thuộc vào peptidase của ACE-2 chủ yếu đề cập đến việc điều hòa nhiễm trùng coronavirus. Chức năng không phụ thuộc vào peptidase cũng liên quan đến sự hấp thu axit amin trong ruột. ACE-2 liên kết với chất vận chuyển axit amin B0AT1 để điều hòa sự hấp thu các axit amin trung tính trong ruột [41].



Hình 1.1. Sơ đồ về vai trò của ACE2 trong hệ thống renin-angiotensin-aldosterone và tác dụng bảo vệ của nó đối với các cơ quan [42].

Protein ACE-2 có trên 20 dạng cấu trúc tinh thể tùy thuộc vào cấu trúc và các phối tử đồng kết tinh [43]. Trong nghiên cứu về *in silico* đánh giá docking người ta thường sử dụng các cấu trúc tinh thể với các thuốc ức chế đồng kết tinh của chúng về những đặc điểm tương tác và ái lực liên kết. Điều này có ý nghĩa đối với tính đặc hiệu và xúc tác của cơ chất. MLN-4760 là chất ức chế ACE2 mạnh và chọn lọc ở người ($IC_{50} = 0,44 \text{ nM}$) đã được bán trên thị trường hiện nay như một tác nhân để đánh giá, đối chứng ACE-2. Việc kiểm tra sự tương tác giữa MLN-4760 và ACE2 cho thấy các gốc amino acid quan trọng chịu trách nhiệm liên kết với chất ức chế và có lẽ là miền xúc tác của cơ chất. Chất ức chế MLN-4760 có hai nhóm carboxylate, một trong số đó liên kết với nguyên tử kẽm bằng cách thay thế phân tử nước liên kết có trong cấu trúc ACE-2 tự nhiên. Bằng phân tích thực nghiệm, các liên kết hydro được quan sát khi chất ức chế MLN-4760 gắn trong miền xúc tác ACE2 tại các vị trí hoạt động gồm Arg273, His505, His345, Pro346, Thr371, Tyr515, Glu375 [44]. Những vị trí này góp phần làm cơ sở cho việc đánh giá khả năng ức chế ACE-2 của các hợp chất từ sàng lọc *in silico*.

Theo các nghiên cứu trước đây, việc sử dụng các công cụ sàng lọc *in silico* trong việc tìm ra các hoạt chất tự nhiên ức chế ACE-2 đang được áp dụng rộng rãi. Có thể kể đến như, hỗn hợp protein-peptide từ hạt tam giác mạch (*Fagopyrum* sp.) và hạt diêm mạch (*Chenopodium quinoa*, Willd) đã cho thấy các peptide có nguồn gốc từ thực phẩm có tiềm năng ức chế ACE-2. Thông qua việc sử dụng docking phân tử, một loạt các hợp chất hoạt tính sinh học như flavonoid (rutin, astragalín, quercetin, isoquercitrin (từ cây tầm ma của *Urtica dioica*), glyasperin A, brousoflavonol F, isorhamnetin (từ keo ong *Sulawesi*), chalcone (butein), triterpenoids (cucurbitacin E,

cucurbitacin B và isocucurbitacin B) được phát hiện là chất ức chế mạnh mẽ thụ thể ACE-2 [7, 45].

Việc sử dụng phương pháp *in silico* trong sàng lọc phát hiện chất ức chế ACE-2 từ cây thuốc, thực vật và kết hợp đánh giá tác dụng *in vitro* các thành phần tự nhiên của chúng sẽ góp phần các hợp chất thiên nhiên tiềm năng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh do vi rút SARS-CoV-2 gây ra.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) được thu thập tại xã Ninh Vân, tỉnh Khánh Hòa và được xác định bởi nhà thực vật học TS. Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Quốc gia Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản (C-765) được lưu giữ tại phòng Hoạt chất sinh học và Phân tích hóa học của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam.



Hình 2.1. Quả cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) (GS. TS. Nguyễn Mạnh Cường cung cấp)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết

Phương pháp chiết được sử dụng trong nghiên cứu là phương pháp chiết rắn-lỏng và phương pháp chiết lỏng-lỏng.

2.2.2. Phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất

- Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography-TLC): được thực hiện trên bản mỏng đã tráng sẵn DC Alufoline 60 F254 (Merck, 1,05715), RP-18 F254SS (Merck). Chất trên bản mỏng được phát hiện bằng đèn UV tại hai bước sóng chỉ định 254 nm và 365 nm và dùng thuốc thử dung dịch H₂SO₄ 10 % sau đó gia nhiệt đến khi để hiện màu.

- Sắc ký cột (Column Chromatography-CC): sử dụng silica gel 60 (Merck, 15-40 μm), silica gel 100 (Merck, 63-200 μm), Sephadex LH -20 (GE Healthcare) và silica gel pha đảo C18 (RP-18, Merck, 15-25 μm) làm chất hấp phụ cho pha tĩnh.

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): được thực hiện với cột sắc ký HPLC pha đảo (RP-HPLC, pha tĩnh không phân cực, trong khi pha động là chất lỏng phân cực. Cột điều chế được làm bằng thép không rỉ độ dài 250 mm với đường kính 20 mm. Đầu dò UV nằm ở cuối cột có tác dụng để phát hiện chất. Tín hiệu đầu dò được ghi lại qua phần mềm lưu trữ và xử lý dữ liệu, sau đó hứng phân đoạn thu được.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập

Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ rễ cây Xáo tam phân được xác định bằng phương pháp phổ hiện đại và dựa trên so sánh với dữ liệu đã được báo cáo trước đó.

- Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa học.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được thực hiện đo trên máy NMR Bruker AM600 và Bruker AV500 tại Viện Hóa học với chất nội chuẩn được sử dụng là Tetramethylsilane (TMS). Các kỹ thuật phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã được áp dụng bao gồm: phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D-NMR) gồm ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (2D-NMR) sử dụng các kỹ thuật hiện đại như HSQC, HMBC, COSY và NOESY.

- Phổ lưỡng ký sắc tròn CD được đo trên máy Chirascan sử dụng cuvet 1mm tại Viện Hóa sinh biển.

2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme ACE-2

Thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế enzyme ACE-2 của các chất thử được đo theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với bộ sàng lọc chất ức chế ACE-2 (MAK378, Merck KGaA, Darmstadt, Đức) do PGS. TS Đỗ Hữu Nghị, phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên hỗ trợ hợp tác thực hiện.

2.3. Thực nghiệm

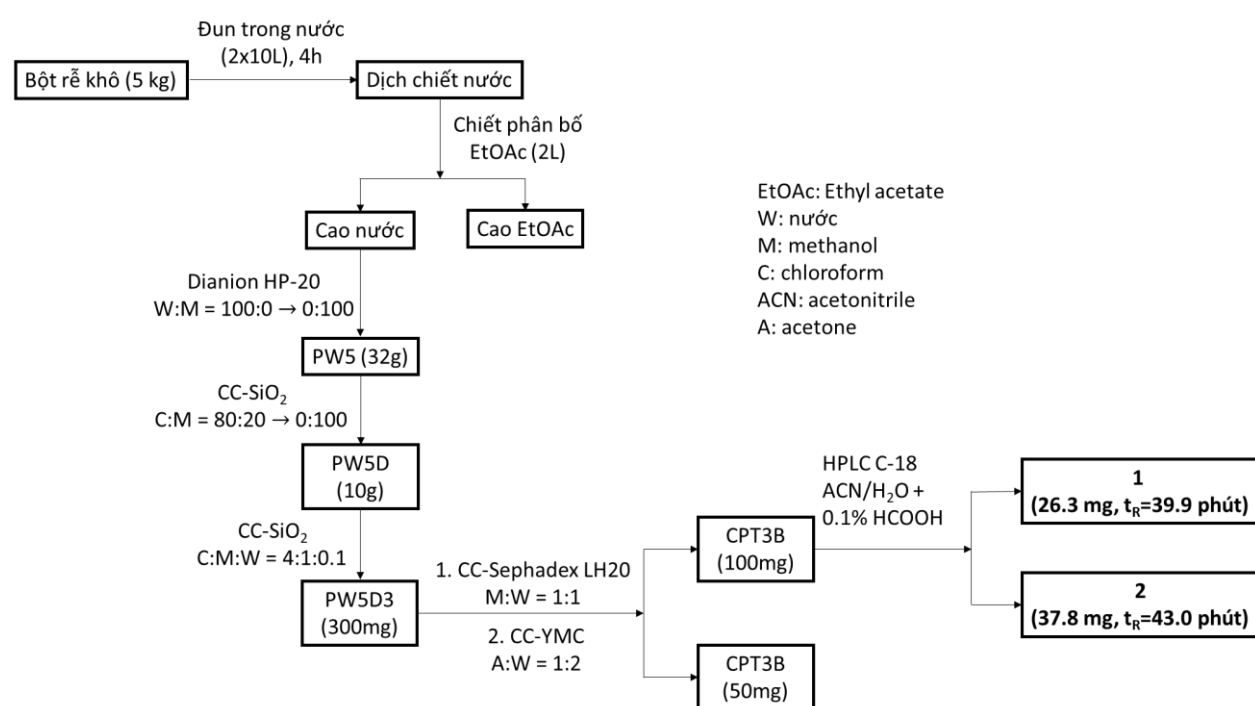
2.3.1. Chiết và phân lập các hợp chất từ rễ cây Xáo tam phân

Mẫu rễ cây Xáo tam phân sau khi thu hái được mang đi làm sạch, thái nhỏ, sau đó được sấy khô đến khối lượng không đổi, tiếp theo được nghiền thành bột mịn. Mẫu sau khi nghiền nhỏ được tiến hành đun sôi với nước cất trong 4 giờ. Hỗn hợp thu được được lọc qua giấy lọc để lấy phần dịch và được phân bố qua ethyl acetate. Sau đó, phần dịch nước được thực hiện cô quay chân không để cô đặc dịch lọc tạo ra cao nước.

Cao nước được đưa lên cột Dianion HP-20 và được rửa giải bằng gradient từng bước nước: methanol (W:M) (W:M = 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 v/v, mỗi lần 2 L) để tạo ra 6 phân đoạn con, cụ thể là PW1 đến PW6. Phân đoạn PW-5 (32g) được xử lý sắc ký cột silica gel pha thường và rửa giải bằng hệ dung môi gradient từng bước chloroform-methanol (C:M = 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 v/v, mỗi lần 2L) để cho ra 5 phân đoạn ký hiệu PW-5A đến PW-5E. Phân đoạn PW-5D (10g) được đưa lên cột silica gel (70-100 mesh) và giải ly với hệ dung môi chloroform-methanol-nước (4:1:0,1, v/v/v) để thu được năm phân đoạn ký hiệu PW-5D1 đến PW-5D5. Phân đoạn con PW-5D3 (300mg) được chạy sắc ký trên cột Sephadex LH-20 giải ly với hệ dung môi methanol-nước (1:1 v/v) và tiếp tục chạy tiếp trên cột pha đảo YMC giải ly với hệ dung môi acetone-nước (1:2, v/v) thu được các phân đoạn CPT3A đến CPT3E.

Từ phân đoạn CPT3B được chuẩn bị đưa lên máy Agilent 1260 HPLC sử dụng một cột Optima Pak_C18 (10 × 250 mm, kích thước hạt: 10 μm) giải ly với hệ dung môi được duy trì ACN-H₂O thêm 0.1 % acid formic (tốc độ dòng 2.0 mL/phút) khoảng 50 phút, đầu dò UV tại bước sóng 200, 260, và 330 nm, dẫn đến phân lập được hai chất sạch **1** (26,3 mg; thời gian lưu $t_R = 39,9$ phút) và **2** (37,8 mg; $t_R = 43$ phút) (Phụ lục 15).

Sơ đồ phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside **1** và **2** được trình bày cụ thể trong hình 2.2. sau đây:



Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside **1** và **2** từ cao nước của loài Xáo tam phân

2.3.2. Dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được

a) Hợp chất 1 (*cis*-Paratrimerin B)

Bột vô định hình màu ngà. Công thức hóa học: $C_{45}H_{52}O_{20}$

1H -NMR (600 MHz, methanol- d_4) và ^{13}C -NMR (150 MHz, methanol- d_4): xem trong Bảng 3.1.

HR-ESI-QTOFMS (m/z): 947.2756 $[M + Cl]^-$ (theo tính toán $C_{45}H_{52}O_{20}Cl^-$: 947.2740, $\Delta m/m = 1.69$), 781.2707 $[M - api + H]^+$, 619.2180 $[M - api - glc + H]^+$, 413.2182, 352.3405, 310.2007, 223.2047.

CD (MeOH, c 0.2 mg/mL) λ_{max} (θ : mdeg): 209 (39.59), 230 (14.73), 263 (-8.84), 290 (-0.36), 324 (-3.22).

b) Hợp chất 2 (*cis*-Paratrimerin A)

Bột vô định hình màu trắng. Công thức hóa học: $C_{40}H_{44}O_{16}$

1H -NMR (600 MHz, methanol- d_4) and ^{13}C -NMR (150 MHz, methanol- d_4): xem trong Bảng 3.2.

HR-ESI-QTOFMS (m/z): 781.2673 $[M + H]^+$ (theo tính toán $C_{40}H_{45}O_{16}^+$: 781,2707, $\Delta m/m = 4,35$), 619.2132 $[M - Glc + H]^+$, 617.1963 $[M - Glc - H]^-$, 457.1642 $[M - 2Glc + H]^+$.

CD (MeOH, c 0.2 mg/mL) λ (θ : mdeg) λ_{max} 209 (+16.13), 229 (7.02), 263 (-4.88), 295 (-0.32), 322 (-1.45).

2.3.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được

Các cao chiết và các hợp chất sạch được tiến hành đánh giá bằng các phương pháp sau [46-49]:

Tác dụng ức chế enzyme ACE-2 *in vitro* (IC_{50}) được đo theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với kit thử ACE-2 (MAK378, Merck KGaA, Darmstadt, Đức).

Enzyme ACE-2, đệm, cơ chất gắn huỳnh quang 4-methoxycoumarin-7-acetic acid (MCA-ACE-2) được mua từ hãng Merck KGaA, Darmstadt, CHLB Đức và lưu giữ ở nhiệt độ $-20^\circ C$ đến khi sử dụng.

Tiến hành

Pha dung dịch stock đối chứng (-), chất chuẩn/đối chứng (+) trong đệm pha

loãng (ACE2 Dilution Buffer), và enzyme ACE2 trong đệm thử nghiệm (ACE2 Assay Buffer). Mẫu thử được pha trong DMSO ở các dải nồng độ từ 100 đến 6.25 $\mu\text{g/mL}$, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần.

Chuẩn bị 5 giếng phản ứng, gồm chất đối chứng (-) của enzyme (Enzyme Control, EC), mẫu (Sample, S), đối chứng (+) (inhibitor control, IC), và đối chứng chuẩn nền (Background control, BC). Sau đó, bổ sung 50 μL dung dịch enzyme ACE2 vào mỗi giếng. Bổ sung 10 μL mẫu thử (với dải nồng độ như trên) vào giếng S, 10 μL dung dịch đệm vào các giếng EC và BC. Thêm 10 μL chất ức chế ACE2 [ĐC (+)] vào giếng IC, và 10 μL dung môi pha mẫu vào giếng SC. Ủ các giếng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thêm 40 μL cơ chất enzyme (MCA-ACE2) vào mỗi giếng.

Trộn đều dung dịch trong các giếng, ủ phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và tiến hành đo huỳnh quang tại bước sóng Ex/Em = 320/420 nm (Fluorescence multi-mode microplate reader Spark[®], Männedorf, Switzerland).

Tỷ lệ % hoạt tính ức chế ACE-2 được xác định theo công thức :

$$\% \text{Hoạt tính ức chế} = \left[\frac{\Delta RFU(S)}{\Delta RFU(EC)} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Trong đó : RFU(S) là tín hiệu huỳnh quang thu được từ giếng mẫu thử tại thời điểm T_1 và T_2 .

RFU(EC) là tín hiệu huỳnh quang thu được từ giếng EC tại thời điểm T_1 và T_2 .

Độ lệch tiêu chuẩn σ tính theo công thức của Duncan:

$$\sigma = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính ức chế ACE-2 được xác định giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế được 50% hoạt tính của ACE-2, sử dụng phần mềm TableCurve AISN (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

2.3.4. Mô phỏng docking phân tử

a) Thiết bị và phần mềm

Máy tính Asus VivoBook – Hệ điều hành Window 10

Hệ thống máy tính tại – Trung tâm Tin học và Tính toán thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phần mềm phục vụ cho nghiên cứu mô phỏng docking phân tử gồm: PyMOL v2.5, AutoDockTools v1.5.6, AutoDock Vina, Discovery Studio Visualizer, Chimera v1.15, ChemDraw, Chem3D, Gaussian 09, GaussView, Python, Origin 8.0.

b) Cách tiến hành

Trong nghiên cứu này, quy trình docking phân tử đã được thực hiện bằng chương trình AutoDock Vina v.1.2.3 [50, 51]. Cấu trúc của paratrimerin (**1** và **2**) và MLN-4760 được vẽ bằng Marvin JS và được nghiên cứu về cấu trúc và các mức năng lượng của chúng bằng trường lực MMFF94s. Cấu hình của chất mà có năng lượng thấp nhất được xác định và sử dụng cho nghiên cứu docking phân tử. Protein đích ACE-2 (ID PDB: 1R4L) được chuẩn bị bằng cách loại bỏ các phối tử và phân tử nước bằng phần mềm UCSF Chimera. Nghiên cứu docking trên protein ACE-2 (PDB ID: 1R4L) được thực hiện tại trung tâm hoạt động có tọa độ hộp là $X = 41.4 \text{ \AA}$, $Y = 5.85 \text{ \AA}$ và $Z = 28.08 \text{ \AA}$, được xác định protein đồng kết tinh của ACE-2 với MLN-4760. Giá trị “exhaustiveness” là 400 và tất cả các thông số khác như các giá trị mặc định của chúng. Các hợp chất được docking với tâm hoạt động ở cả hai trạng thái cứng nhắc (rigid) và linh động (flexible), để cho phép xác định các tương tác ổn định với amino acid trong vùng hoạt động ACE-2. Khác với docking ở trạng thái cứng nhắc, ở trạng thái linh hoạt, 11 amino acid là các amino acid quan trọng có liên hệ chặt chẽ với MLN-4760 (bán kính $<4,5 \text{ \AA}$) [44], được di chuyển tự do trong hộp lưới, bao gồm Arg273, Thr371, Cys344, His345, Met360, Lys363, Asp368, Tyr510, Arg514, Tyr515 và Arg518. Cấu hình của các chất gắn kết (binding) với một tâm tọa độ xác định có mức năng lượng liên kết thấp nhất (kcal/mol) được tính toán khi sử dụng phần mềm docking nguồn mở thông dụng AutoDock Vina v.1.2.3. Việc nghiên cứu đánh giá các tương tác liên kết như liên kết hydro, các tương tác π , các tương tác kỵ nước (hydrophobic) và các tương tác khác được thực hiện bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer v2021.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các hợp chất biscoumarin glycoside từ rễ Xáo tam phân (*P. trimera*)

Rễ loài Xáo tam phân được xử lý, đun trong nước để thu được cao tổng nước. Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký cột với pha tĩnh là các chất hấp phụ như: silica gel pha thường, silica gel pha đảo (RP-18), Sephadex LH-20 và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), 2 hợp chất biscoumarin glycoside (**1** và **2**) đã được phân lập theo sơ đồ hình 2.2.

3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất **1** và **2**

3.2.1. *cis*-Paratrimerin B (**1**)

Hợp chất **1** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng có độ quay cực ($[\alpha]_D^{25} -25,0^\circ$, $c = 0,02$, MeOH). Công thức phân tử được xác định từ phổ khối là $C_{45}H_{52}O_{20}$ ($M = 912,3$ g/mol) dựa trên pic ion giả phân tử quan sát được ở m/z 947,2756 [$M + Cl$] $^-$ (tính toán cho $C_{45}H_{52}O_{20}Cl^-$ 947,2740) (Phụ lục 8), tương tự các biscoumarin glycoside chứa ba gốc đường như paratrimerin B, K-R, được tìm thấy trước đây trong rễ loài Xáo tam phân thu hái ở tỉnh Khánh Hòa [12, 15].

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **1** (trong MeOD) với 45 tín hiệu carbon ($13 \times C$, $23 \times CH$, $7 \times CH_2$, $2 \times CH_3$), hiển thị các mẫu tương tự như của paratrimerin B [12], từ phổ 1H cho thấy các đặc trưng tín hiệu proton của hai nhân coumarin, cầu monoterpene và ba gốc đường (Bảng 3.1, Hình 3.3, 3.4, 3.5). Vị trí liên kết của từng đơn vị cấu trúc được xác định dựa trên phân tích phổ HMBC, COSY, NOESY và ROESY (Bảng 3.1, Phụ lục 6, 7, 8, 9, 10).

Tương tự như paratrimerin B, cả hai nhân coumarin trong hợp chất **1** đều được thế ở vị trí C-6 và C-7, được biểu thị bằng sự xuất hiện của hai cặp proton olefinic vị trí *ortho*- ở δ_H 6,28 (H-3) và 7,94 (H-4), và δ_H 6,21 (H-3') và 7,80 (H-4') với $J = 9,6$ Hz, cũng như hai cặp proton thơm *para*- singlet ở δ_H 7,45 (H-5) và 7,09 (H-8), và δ_H 7,37 (H-5') và 7,08 (H-8'). Các nguyên tử cacbon được oxy hóa C-7/C-7' của chúng được nối với hai gốc glucopyranosyl được xác định bởi mối tương quan HMBC giữa các proton anomeric H-1'' (δ_H 4,91, d, $J = 7,8$ Hz) và H-1''' (δ_H 4,88, d, $J = 7,8$ Hz) với các nguyên tử cacbon C-7 (δ_C 158,5) và C-7' (δ_C 160,1), và bằng các tương tác ROESY từ các proton đường H-2'' (δ_H 3,42) và H-2''' (δ_H 3,58) với các proton thơm nhóm đơn H-8 (δ_H 7,09) và H-8' (δ_H 7,08), tương ứng (Bảng 3.1, Hình 3.1). Vị trí của cầu monoterpene gắn với hai đơn vị glucopyranosyl coumarin ở các nguyên tử cacbon

thơm C-6 (δ_C 127,6) và C-6' (δ_C 131,7) được xác định dựa trên các tương tác HMBC (tương tác 3J) từ các proton coumarin H-5 (δ_H 7,45) và H-5' (δ_H 7,37) tương ứng với các nguyên tử cacbon methine của gốc vinylcyclohexene C-9 (δ_C 121,3) và C-9' (δ_C 44,4), và các tương tác ROESY từ H-5 và H-5' với proton vinylic H-9 (δ_H 6,38) và proton methine H-9' (δ_H 4,12), tương ứng (Bảng 3.1, Hình 3.1). Dữ liệu phổ HMBC giữa H-9' và C-5', H-10 và C-6 thể hiện vị trí gắn kết giữa hai nhân coumarin và cầu nối monoterpene (C-10, 1,4-dimethyl-4-vinylcyclohexene) tại vị trí C-6/C-9 và C-6'/C-9', tương tự như trong 18 biscoumarin đã được phân lập trước đây từ rễ cây *P. trimera* [12, 15]. Nhưng khác với paratrimerin B, hai proton olefinic H-9 (δ_H 6,38) /H-10 (δ_H 6,38) xuất hiện dưới dạng hai tín hiệu singlet, cho thấy chúng ở vị trí *cis*-so với nhau (Bảng 3.1). Ở *trans*-paratrimerin B, hai proton vicinal này, H-9 và H-10 ở vị trí *trans*- với $J = 16,5$ Hz [12, 15].

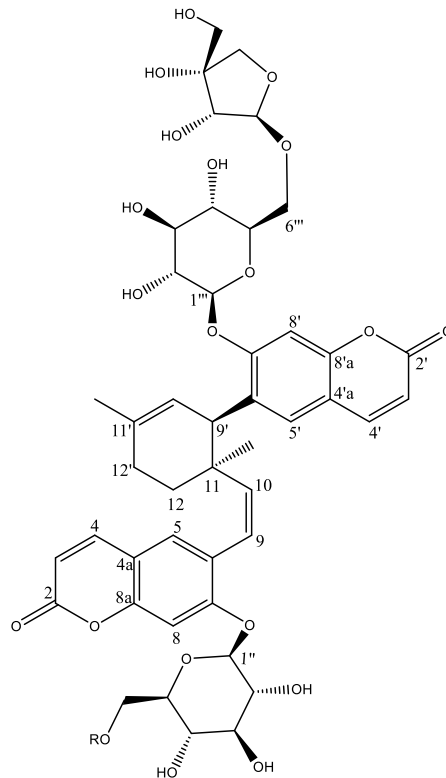
Sự hiện diện của hai gốc glucosyl có cấu hình β được xác nhận bằng hai tín hiệu proton anomeric ở δ_H 4,91 (d, H-1'') và δ_H 4,88 (d, H-1''') ($J = 7,8$ Hz), và được thể hiện đầy đủ bởi dữ liệu 2D-NMR (HMBC, COSY, ROESY) (Bảng 3.1). Có thể thấy proton anomeric H-1''' (4,88, d, $J = 7,8$ Hz) có tương tác ROESY tới H-5''' (δ_H 3,62), thêm nữa có tương tác COSY với -CH₂-O-C methylene proton H-6'' (δ_H 4,02, H-6'''a) và (δ_H 3,61, H-6'''b) của đơn vị glucopyranosyl được thể. C-6''' có tương tác HMBC như sau với proton anomeric H-1'''' của đường: apiose hoặc gốc xylose.

Gốc đường này sau đó được xác định là apiose nhờ sự có mặt của hai nguyên tử cacbon methylene đặc trưng mang oxy (-CH₂-O-) ở δ_C 75,0 (C-4''') và ở δ_H 3,62 (C-5'''). Phần đường apiose này được xác định gắn vào gốc glucosyl do có tương tác HMBC giữa proton anomeric của nó ở δ_H 4,91 (H-1''') với carbon glucosyl methylene ở δ_C 69,1 (C-6''') của gốc glucosyl (Phụ lục 3.7). Carbon C-1'''' anomeric của apiosyl xuất hiện tại δ_C 111,2 biểu thị cấu hình β -D, trong khi dữ liệu ¹³C-NMR của α -D-apiofuranoside xuất hiện tại δ_C 104,5 và β -D-apiofuranoside tại δ_C 111,5. Khi thủy phân bằng axit, hợp chất **1** tạo ra các đơn vị D-glucose và D-apiose trên cơ sở sắc ký bản mỏng với mẫu xác định. Ở m/z 781.2707 cũng chỉ ra sự hiện diện của mảnh apiosyl (Phụ lục 8, 9).

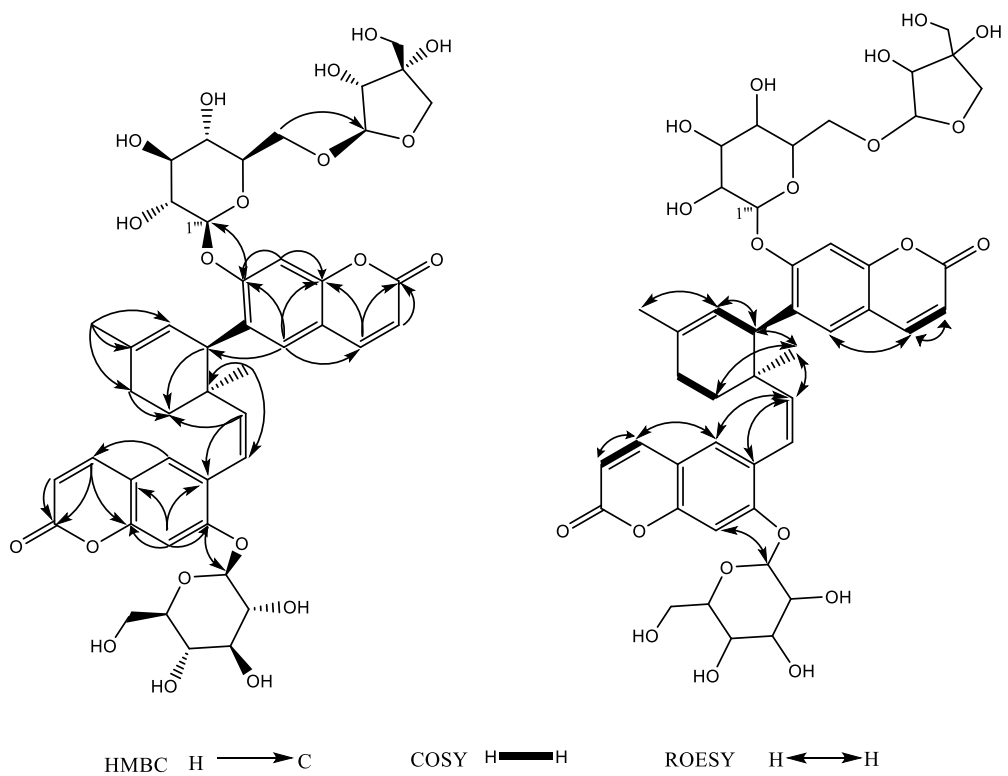
Ngoài ra, cấu trúc của **1** đã được xác định bằng cách phân tích các mảnh HR-MS/MS, thể hiện qua sự hiện diện của các mảnh chính bao gồm m/z 781.2707 [M - api + H]⁺, 619.2180 [M - api - glc + H]⁺, và 352,3405 amu (Phụ lục 8, 9).

Phổ lưỡng sắc tròn CD cho thấy hợp chất **1** có cấu hình tuyệt đối 9'S,11'S, tương tự như cấu hình của các *trans*-paratrimerin A và B và một số paratrimerin khác (A, B, L, N, S) [12, 15] (Hình 3.1). Dựa trên các kết quả phổ này, hợp chất **1** được xác định

là một coumarin glycoside liên kết với monoterpene mới; một đồng phân hình học của paratrimerin B, được đặt tên tương ứng là *cis*-paratrimerin B.



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất *cis*-Paratrimerin B



Hình 3.2. Tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất *cis*-Paratrimerin B

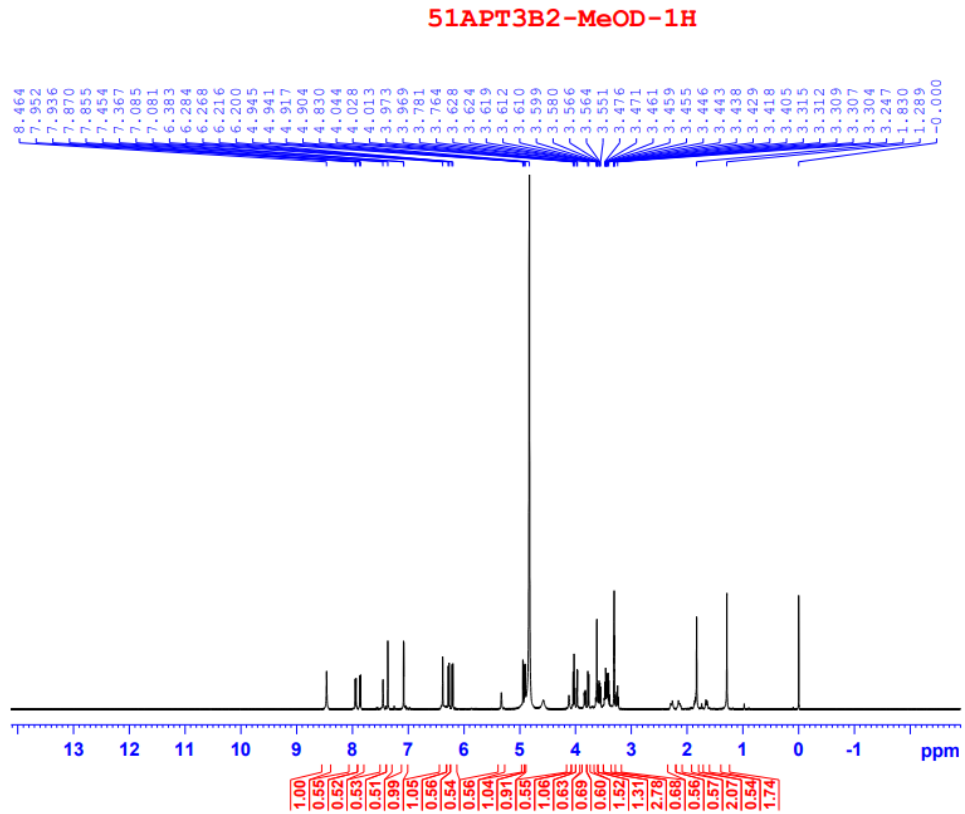
Bảng 3.1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **1** và *trans*-Paratrimerin B

Vị trí	1		Paratrimerin B	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
2	163,6 (s)	-	163,3 (s)	-
3	114,3 (d)	6,28, d, 9,6 Hz	114,5 (d)	6,32, d, 9,5 Hz
4	146,2 (d)	7,94, d, 9,6 Hz	146,1 (d)	7,91, d, 9,5 Hz
4a	115,3 (s)	-	115,3 (s)	-
5	126,6 (d)	7,45, s	126,4 (d)	7,42, s
6	127,6 (s)	-	127,7 (s)	-
7	158,5 (s)	-	158,5 (s)	-
8	104,4 (d)	7,09, s	104,2 (d)	7,07, s
8a	155,2 (s)	-	155,1 (s)	-
2'	163,5 (s)	-	163,9 (s)	-
3'	114,1 (d)	6,21, d, 9,6 Hz	114,0 (d)	6,25, d, 9,5 Hz
4'	145,9 (d)	7,80, d, 9,6 Hz	146,0 (d)	7,91, d, 9,5 Hz
4'a	114,4 (s)	-	114,4 (s)	-
5'	131,0 (d)	7,37, s	131,0 (d)	7,39, s
6'	131,7 (s)	-	131,5 (s)	-
7'	160,1 (s)	-	160,0 (s)	-
8'	103,7 (d)	7,08, s	103,8 (d)	7,18, s
8'a	155,0 (s)	-	155,2 (s)	-
9	121,3 (d)	6,38, s	121,0 (d)	6,49, d, 16,5 Hz
10	140,9 (d)	6,38, s	140,9 (d)	6,23, d, 16,5 Hz
11	40,2 (s)	-	40,0 (s)	-
12	32,2 (t)	1,85 m ^a 1,66, dt like, 6 và 18 Hz ^b	31,7 (t)	1,61, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, 1,83, m
11-CH ₃	25,8 (q)	1,29, s	25,3 (q)	1,33, br s
9'	44,4 (d)	4,12, br s	44,3 (d)	4,11, s
10'	124,6 (d)	5,36, br s	124,6 (d)	5,35, s
11'	135,6 (s)	-	136,0 (s)	-
12'	28,5 (t)	2,28, dt-like, 4,5 và 18 Hz ^a 2,14, dt-like, 6,6 và 14,5 Hz ^d	28,5 (t)	2,18, dt-like, 18,2, 7,0 Hz, 2,27, dt-like, 18,2, 5,9 Hz
11'-CH ₃	23,7 (q)	1,83, s	23,7 (q)	1,85, br s
1''	102,6 (d)	4,91, d, 7,8 Hz	102,0 (d)	5,03, d, 7,5 Hz

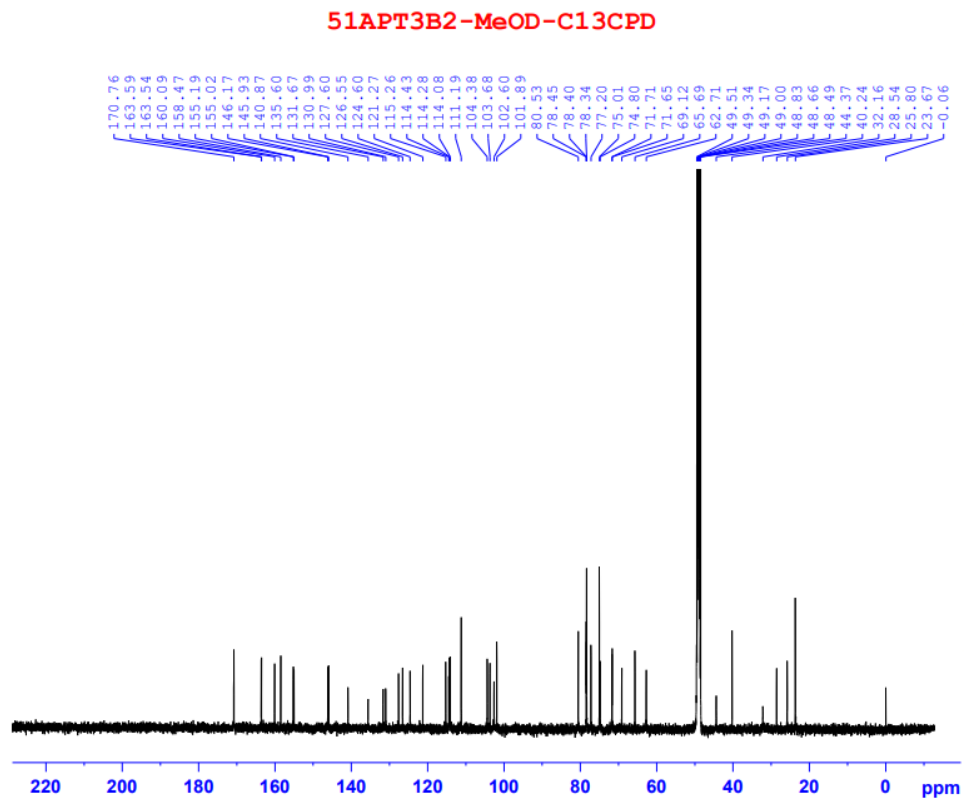
2''	74,8 (d)	3,42, m	74,9 (d)	ca. 3,46 ^{a,e} , m
3''	78,5 (d)	ca. 3,5, m ^{a,d}	78,4 (d)	ca. 3,46 ^{a,e} , m
4''	71,9 (d)	3,03, m	71,2 (d)	ca. 3,41, m
5''	78,3 (d)	3,48 ^d , m	78,4 (d)	ca. 3,46 ^{a,e} , m
6''	62,7 (t)	3,83, dd, 11,4; 1,8 Hz 3,46, m	62,4 (t)	3,71, dd, 2, 12 Hz, 3,89, dd, 2, 12,5 Hz
1'''	101,9 (d)	4,88, d, 7,8 Hz	102,4 (d)	4,90 ^c , d, 7,5 Hz
2'''	75,0 (d)	3,58 ^a , m	75,0 (d)	ca. 3,61 ^b , m
3'''	78,4 (d)	3,48, m ^d	78,60 (d)	ca. 3,46 ^{a,e} , m
4'''	71,7 (d)	3,25, t, 9 Hz	72,1 (d)	3,15, t, 9,5 Hz
5'''	77,2 (d)	3,62, m ^d	77,2 (d)	ca. 3,66 ^b , m
6'''	69,1 (t)	4,02, d, 9 Hz ^d , 3,61, m ^d	69,4 (t)	3,22, dd, 2, 11 Hz, 3,96, dd, 2, 11 Hz
1''''	111,2 (d)	4,91, d, 5,5 Hz	111,2 (d)	4,84, d, 2,5 Hz
2''''	78,3 (d)	3,97, d, 2,4 Hz	78,3 (d)	4,03, 2,5 Hz
3''''	80,5 (s)	-	80,5 (s)	-
4''''	75,0 (t)	4,04, d, 9,6 Hz ^d , 3,77, d, 10,2 Hz ^d	75,01 (t)	3,80, d, 9,5 Hz, 4,12, d, 10 Hz
5''''	65,7 (t)	3,62, m ^d	65,7 (t)	3,68, d, 3,5 Hz

*Các hợp chất được đo trong dung môi CD₃OD, 600 MHz cho ¹H- và 150 MHz cho phổ ¹³C-NMR.

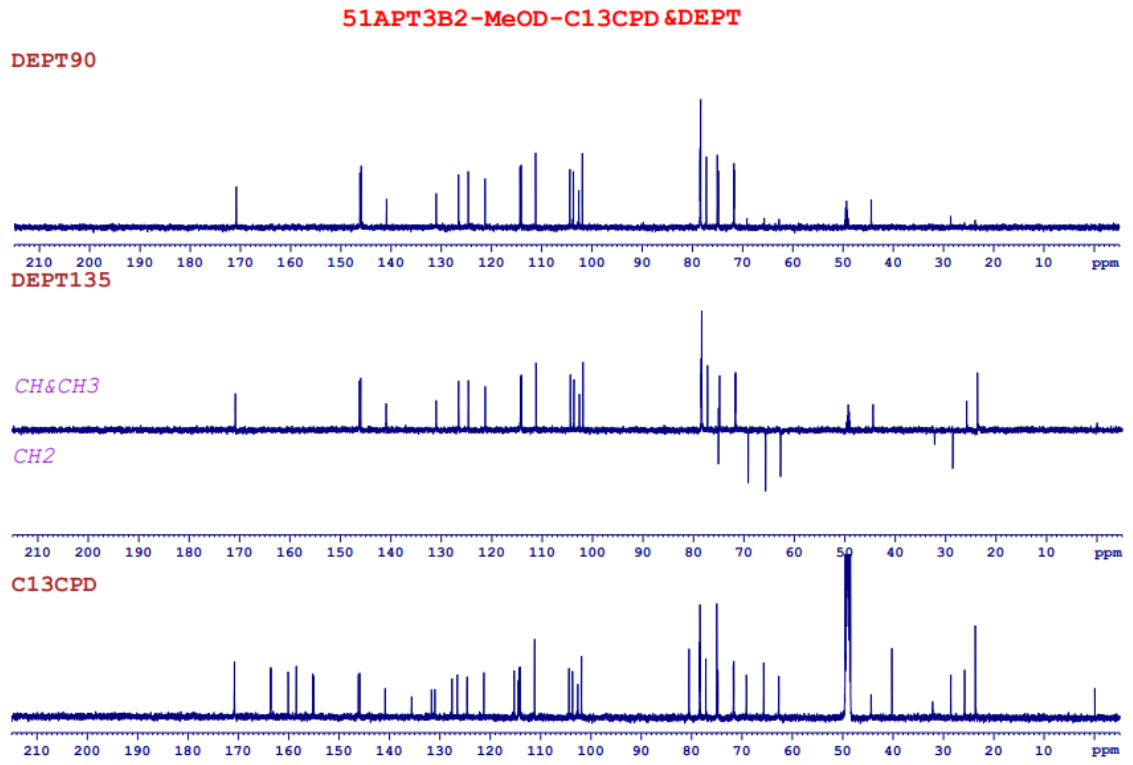
^aTín hiệu chồng chập mạnh. ^bĐộ chuyển dịch hóa học của pic tương tác HSQC. ^cTín hiệu chồng chập với dung môi. ^dTín hiệu có thể thay thế cho nhau.



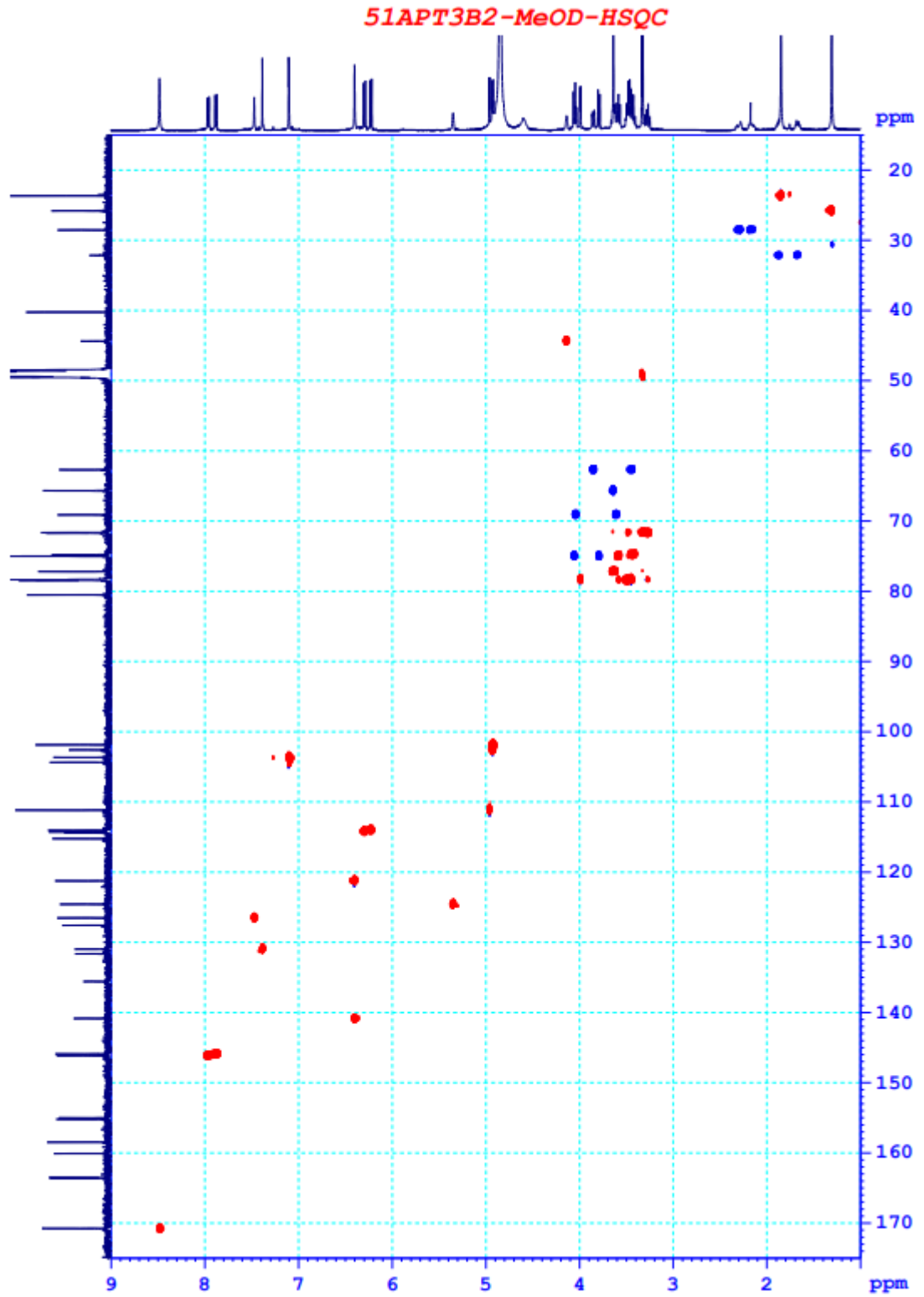
Hình 3.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 1



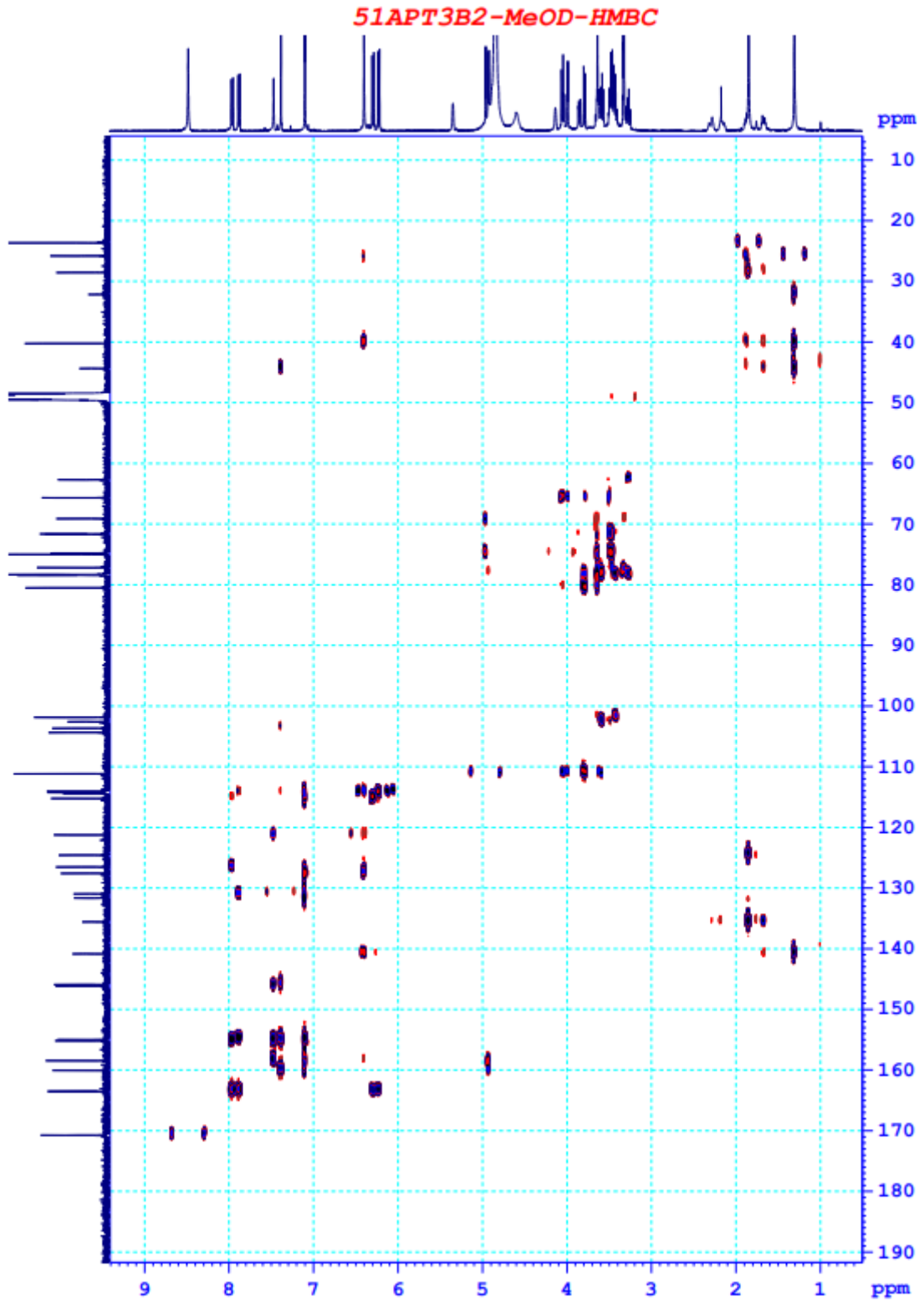
Hình 3.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất 1



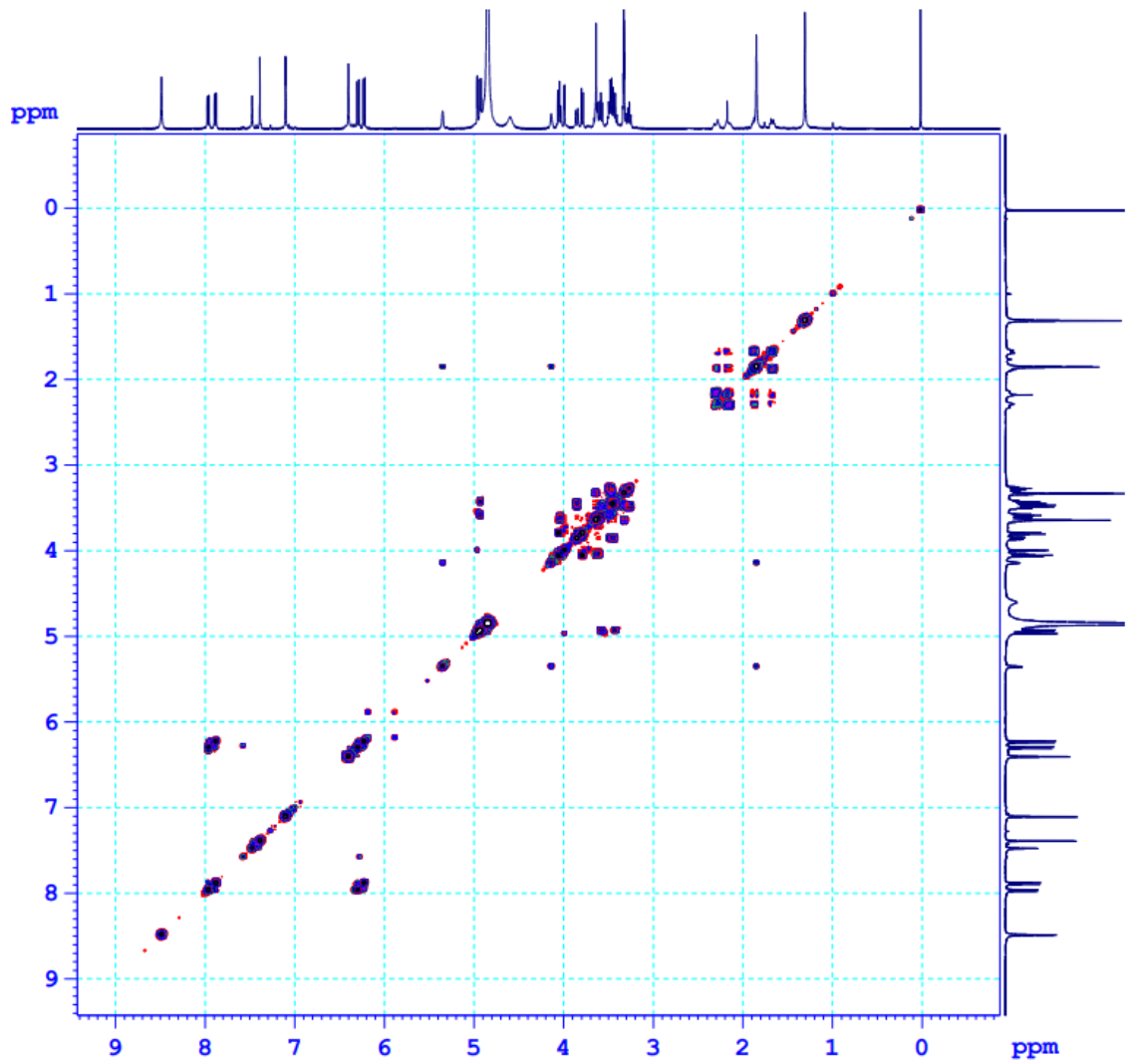
Hình 3.5. Phổ DEPT-NMR của hợp chất 1



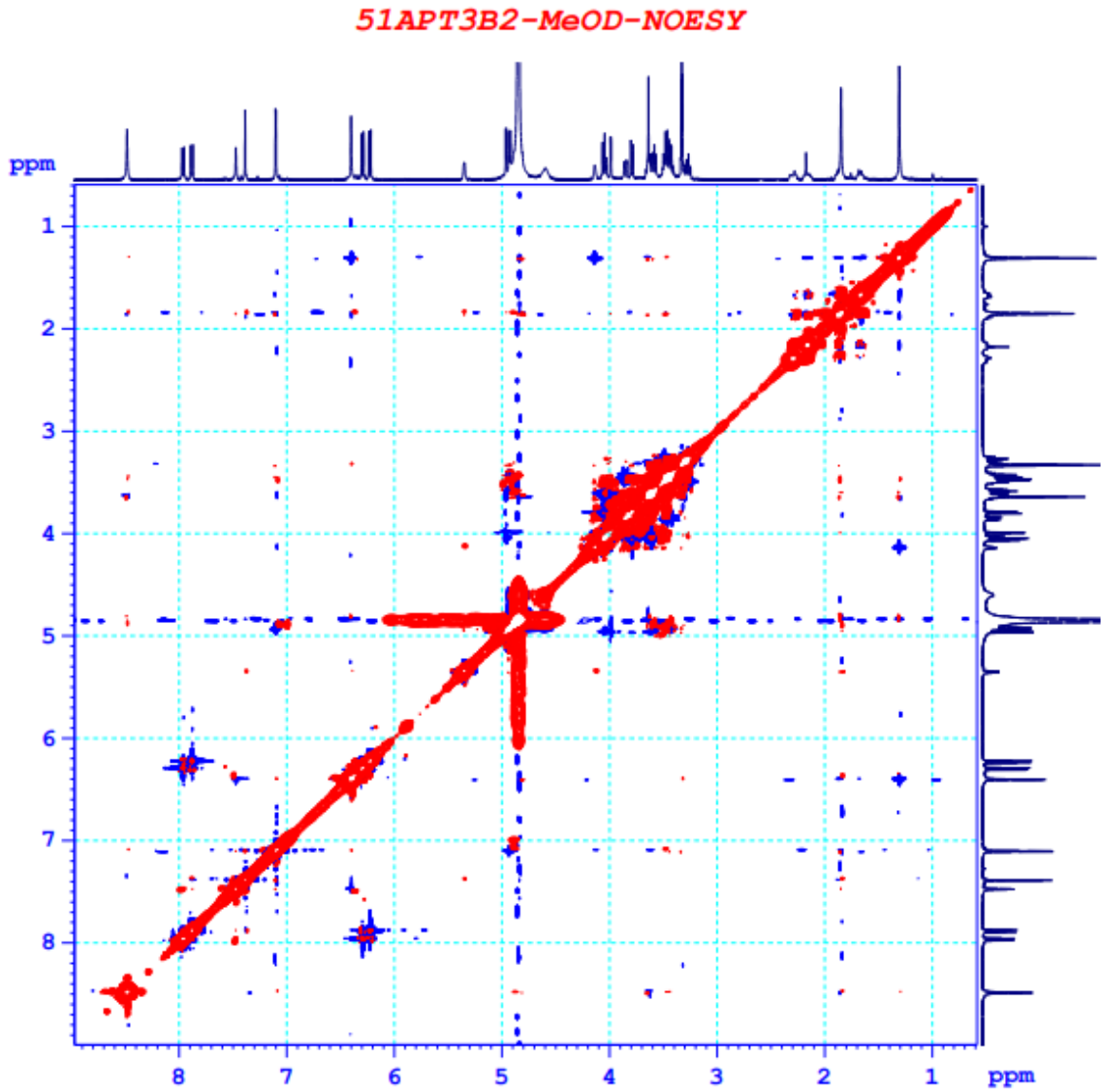
Hình 3.6. Phổ HSQC của hợp chất 1



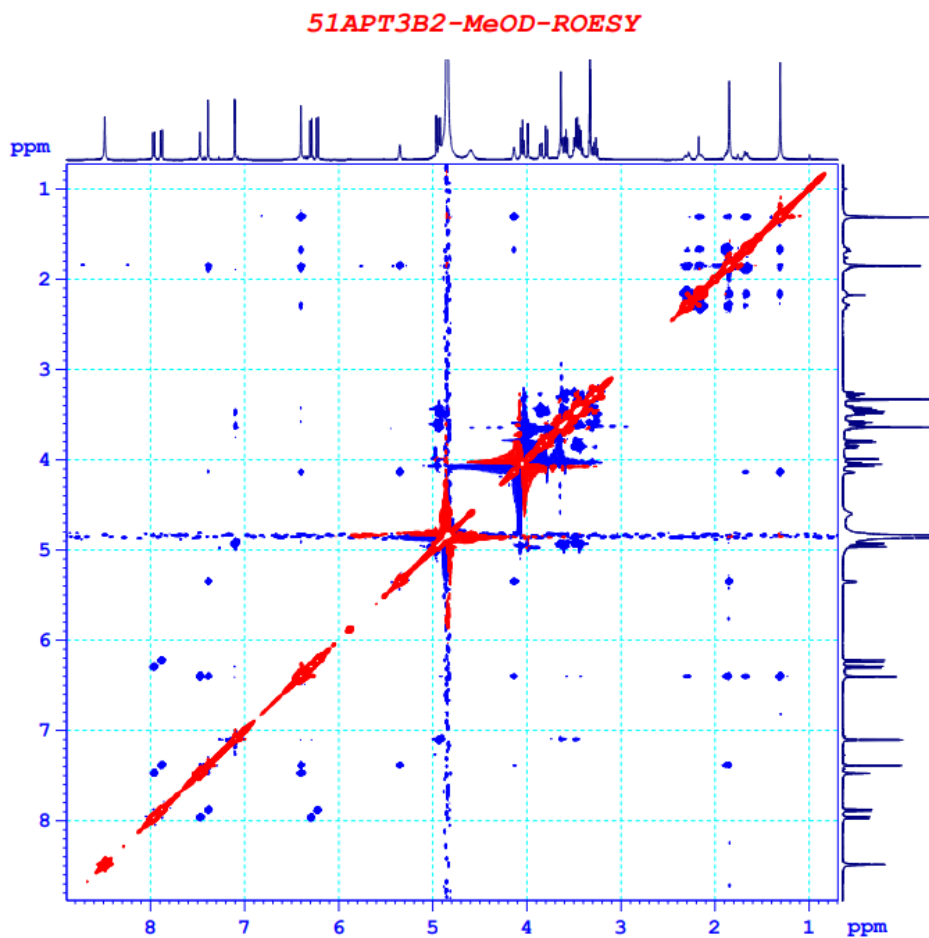
Hình 3.7. Phổ HMBC của hợp chất 1

51APT3B2-MeOD-COSYGP

Hình 3.8. Phổ COSY của hợp chất 1



Hình 3.9. Phổ NOESY của hợp chất 1



Hình 3.10. Phổ ROESY của hợp chất 1

3.2.2. *cis*-Paratrimerin A (2)

Một biscoumarin mới khác, *cis*-paratrimerin A (2) (Hình 3.11, 3.12), cũng được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Hợp chất này được đánh giá cấu trúc bằng dữ liệu phổ NMR và phổ CD (Bảng 3.2 và Hình 3.13, 3.14, Phụ lục 11, 12, 13, 14, 16) tương tự như hợp chất *cis*-paratrimerin B ngoại trừ không có mặt của các tín hiệu tương ứng với gốc đường apiosyl.

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất 2 cho thấy 45 tín hiệu carbon ($12 \times \text{C}$, $22 \times \text{CH}$, $4 \times \text{CH}_2$, $2 \times \text{CH}_3$), với các tín hiệu tương tự như của *trans*-paratrimerin A [12]. Dữ liệu phổ ^1H -NMR thể hiện các tín hiệu proton đặc trưng của hai nhân coumarin, cầu monoterpene, và hai gốc glucopyranosyl (xem Bảng 3.1, Hình 3.3, 3.4, 3.5). Vị trí liên kết của các đơn vị cấu trúc được xác định thông qua phân tích phổ HMBC, COSY, NOESY và ROESY (xem Bảng 3.1, Phụ lục 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

Giống như *trans*-paratrimerin A, cả hai nhân coumarin trong hợp chất 2 đều có nhóm thế tại vị trí C-6 và C-7, được xác nhận qua sự xuất hiện của hai cặp proton olefinic ortho- tại δ_{H} 6,22 (H-3) và 7,96 (H-4), cùng với δ_{H} 6,28 (H-3') và 7,89 (H-4') với $J = 9,6$ Hz. Ngoài ra, còn có hai cặp proton thơm *para*- singlet tại δ_{H} 7,48 (H-5) và 7,04

(H-8), cùng với δ_{H} 7,39 (H-5') và 7,10 (H-8'). Các nguyên tử carbon C-7/C-7' của hai nhóm coumarin bị oxy hóa được nối với hai gốc glucopyranosyl, điều này được xác định thông qua mối tương quan HMBC giữa các proton anomeric H-1'' (δ_{H} 4,99, d, $J = 7,8$ Hz) và H-1''' (δ_{H} 4,93, d, $J = 7,8$ Hz) với các nguyên tử carbon C-7 (δ_{C} 158,4) và C-7' (δ_{C} 160,1). Hơn nữa, các tương tác ROESY từ proton đường H-2'' (δ_{H} 3,50) và H-2''' (δ_{H} 3,57) đến các proton thơm H-8 (δ_{H} 7,04) và H-8' (δ_{H} 7,10) cũng hỗ trợ thông tin này (xem Bảng 3.1, Hình 3.1).

Vị trí gắn kết của cầu monoterpene với hai đơn vị glucopyranosyl coumarin ở các carbon bậc ba C-6 (δ_{C} 127,7) và C-6' (δ_{C} 131,7) được xác định thông qua các tương tác HMBC (tương tác $3J$) từ proton H-5 (δ_{H} 7,48) và H-5' (δ_{H} 7,39) của nhóm coumarin đến các carbon bậc ba C-9 (δ_{C} 121,3) và C-9' (δ_{C} 44,4) của gốc vinylcyclohexene. Các tương tác ROESY từ H-5 và H-5' đến proton vinylic H-9 (δ_{H} 6,40) và proton methine H-9' (δ_{H} 4,14) cũng cung cấp thông tin về cấu trúc này (xem Bảng 3.1, Hình 3.1). Dữ liệu phổ HMBC giữa H-9' và C-5', cùng với H-10 và C-6, xác nhận vị trí gắn kết giữa hai nhân coumarin và cầu nối monoterpene (C10, 1,4-dimethyl-4-vinylcyclohexene) tại các vị trí C-6/C-9 và C-6'/C-9', tương tự như các biscoumarin trước đây phân lập từ rễ cây Xáo tam phân.

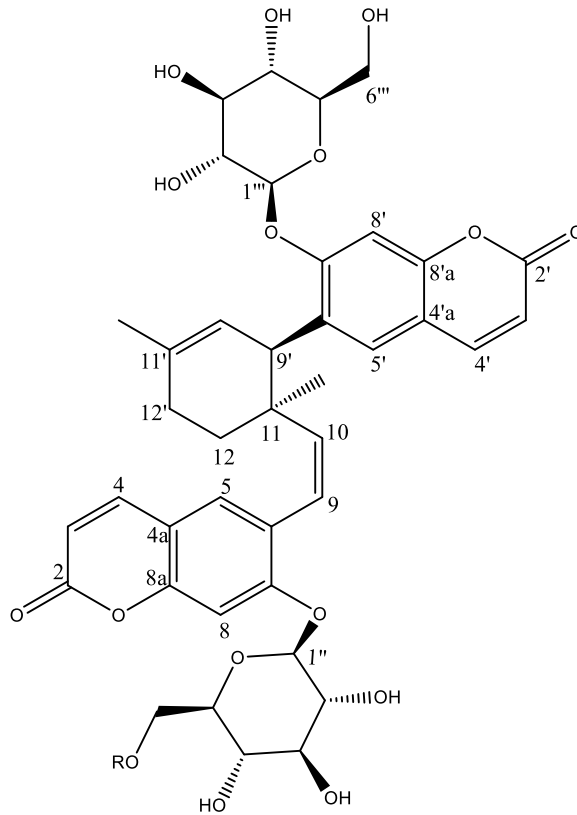
Tuy nhiên, khác với paratrimerin A, hai proton olefinic H-9 (δ_{H} 6,40) và H-10 (δ_{H} 6,40) trong hợp chất **2** xuất hiện dưới dạng hai tín hiệu singlet, cho thấy chúng ở dạng *cis*-, trong khi ở *trans*-paratrimerin A, hai proton này có sự tương tác *trans*- với $J = 16,5$ Hz.

Sự hiện diện của hai gốc glucosyl trong cấu hình β được xác nhận qua hai tín hiệu proton anomeric ở δ_{H} 4,99 (d, H-1'') và δ_{H} 4,93 (d, H-1''') ($J = 7,8$ Hz). Thông tin này được thể hiện rõ qua dữ liệu 2D-NMR (HMBC, COSY, ROESY) (xem Bảng 3.1). Proton anomeric H-1''' (δ_{H} 4,93, d, $J = 7,8$ Hz) có sự tương tác ROESY với H-5''' (δ_{H} 3,56), đồng thời tương tác COSY với các proton methylene -CH₂-O-C H-6''' (δ_{H} 3,89, H-6'''a) và (δ_{H} 3,71, H-6'''b) của gốc glucopyranosyl.

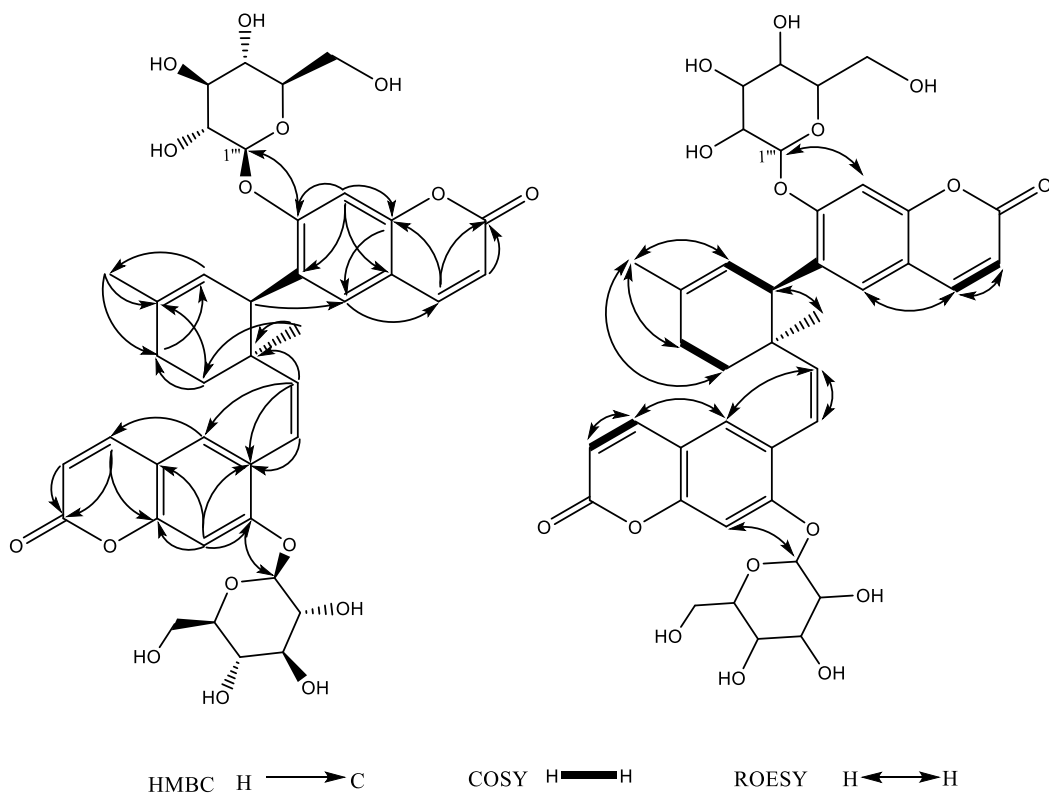
Phổ lưỡng sắc tròn CD cho thấy hợp chất **2** có cấu hình 9'S,11S, tương tự như cấu hình của *trans*-paratrimerin A và B và một số các paratrimerin khác (A, B, L, N, S) (xem Hình 3.1) [12, 15]. Dựa trên những dữ liệu phổ này, hợp chất **2** được xác định là một coumarin glycoside liên kết với monoterpene mới, là đồng phân hình học của paratrimerin A, và được đặt tên là *cis*-paratrimerin A.

Sự tồn tại bền vững của hai biscoumarin **1** và **2** cho thấy chúng không phải là các phân tử giả (artifact) như tác giả Quân đã đề xuất trước đây cho một dẫn xuất *cis* của paratrimerin J [15]. Một số hợp chất thiên nhiên được phát hiện tồn tại dưới dạng hỗn hợp diastereomeric, mỗi dạng lập thể có thể thể hiện mức độ hoạt tính sinh học khác nhau. Ví dụ, dl-1-benzoyloxy-2-dimethylamino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene tồn tại ở cả dạng *trans* và *cis* và cả hai dạng đều có hoạt tính gây tê cục bộ. Hợp chất *cis* có hiệu quả gấp 2,9 đến 6 lần so với đồng phân *trans* trong tác dụng ngăn chặn dây thần kinh giảm đau, trong da và đau thần kinh tọa, vượt qua tác dụng của procain,

lidocain và cocain ở chuột lang [52]. Captopril là thuốc được sử dụng rộng rãi trong điều trị tăng huyết áp, có hai dạng đồng phân (*cis* và *trans*) và cả hai đều có tác dụng trên hệ tim mạch [53].



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất *cis*-Paratrimerin A



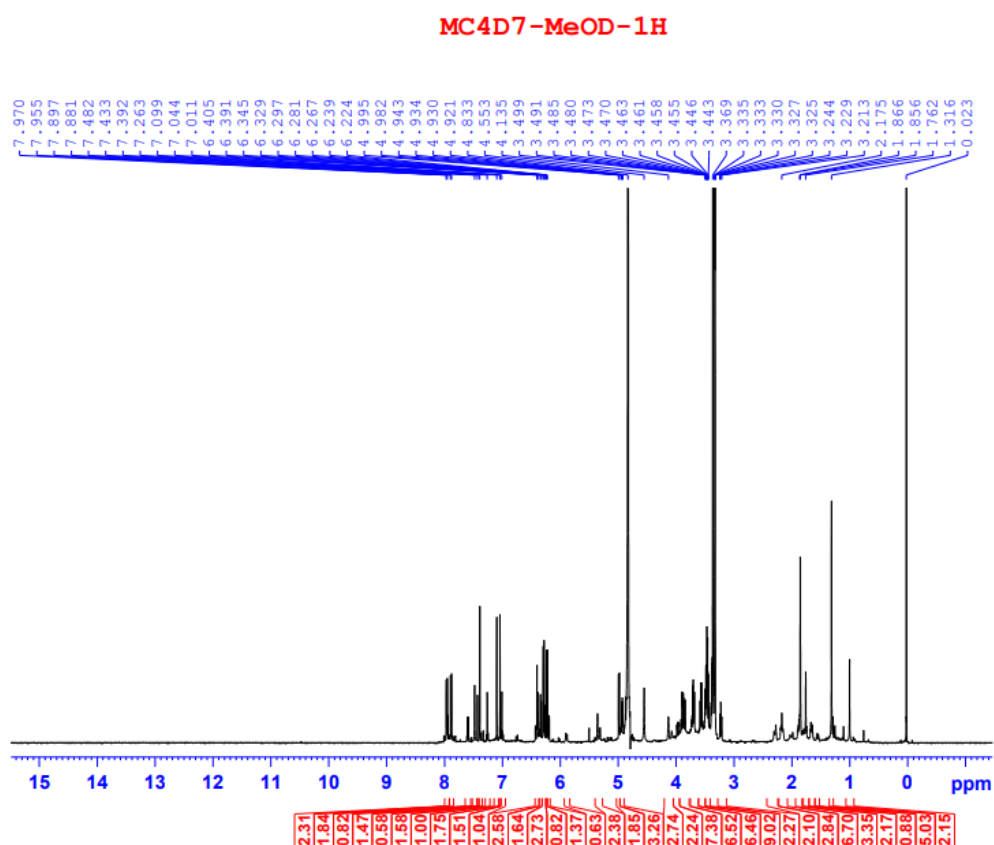
Hình 3.12. Tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất *cis*-Paratrimerin ABảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **2** và *trans*-Paratrimerin A

Vị trí	2		Paratrimerin A	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
2	163,3 (s)	-	163,3 (s)	-
3	114,3 (d)	6,22, d, 9.0 Hz	114,3 (d)	6,28, d, 9,5 Hz
4	146,0 (d)	7,96, d, 9.0 Hz	146,0 (d)	7,95, d, 9,5 Hz
4a	115,2 (s)	-	115,2 (s)	-
5	126,6 (d)	7,48, s	126,6 (d)	7,47, s
6	127,7 (s)	-	127,7 (s)	-
7	158,4 (s)	-	158,3 (s)	-
8	104,0 (d)	7,04, s	104,0 (d)	7,03, s
8a	155,3 (s)	-	155,2 (s)	-
2'	163,5 (s)	-	163,5 (s)	-
3'	114,1 (d)	6,28, d, 9,6 Hz	114,1 (d)	6,22, d, 9,5 Hz
4'	145,9 (d)	7,89, d, 9,6 Hz	145,9 (d)	7,88, d, 9,5 Hz
4'a	114,4 (s)	-	114,4 (s)	-
5'	131,0 (d)	7,39, s	131,0 (d)	7,39, s
6'	131,7 (s)	-	131,6 (s)	-
7'	160,1 (s)	-	160,0 (s)	-
8'	103,7 (d)	7,10, s	103,6 (d)	7,09, s
8'a	155,1 (s)	-	155,0 (s)	-
9	121,3 (d)	6,40, d, 8,4 Hz	121,2 (d)	6,41, d, 16,5 Hz
10	141,0 (d)	6,40, d, 8,4 Hz	140,9 (d)	6,37, d, 16,5 Hz
11	40,2 (s)	-	40,2 (s)	-
12	31,9 (t)	1,66, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, và 1,88, m	31,9 (t)	1,65, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, 1,87, m
11-CH3	25,8 (q)	1.32, s	25,8 (q)	1,31, br s
9'	44,4 (d)	4.14, s	44,3 (d)	4,13, s
10'	124,6 (d)	5.36, s	124,6 (d)	5,35, s
11'	135,6 (s)	-	135,6 (s)	-
12'	28,6 (t)	2,29, dt-like, 5,04, 17,8 Hz 2,18, m	28,6 (t)	2,16, dt-like, 18,4, 7,0 Hz, 2,29, dt-like, 18,4, 5,7 Hz
11'-CH3	23,7 (q)	1,86, s	23,7 (q)	1,85, br s
1''	101,7 (d)	4,99, d, 7,8 Hz	101,6 (d)	4,99, d, 8,0 Hz
2''	74,8 (d)	ca. 3,50, m ^{a,d}	74,8 (d)	3,39 ^b , m
3''	78,2 (d)	ca. 3,47, m ^{a,d}	78,2 (d)	ca. 3,5 ^{a,d} , m
4''	71,7 (d)	3,23, t, 9,0 Hz	71,7 (d)	3,23 ^b , t, 9,0 Hz

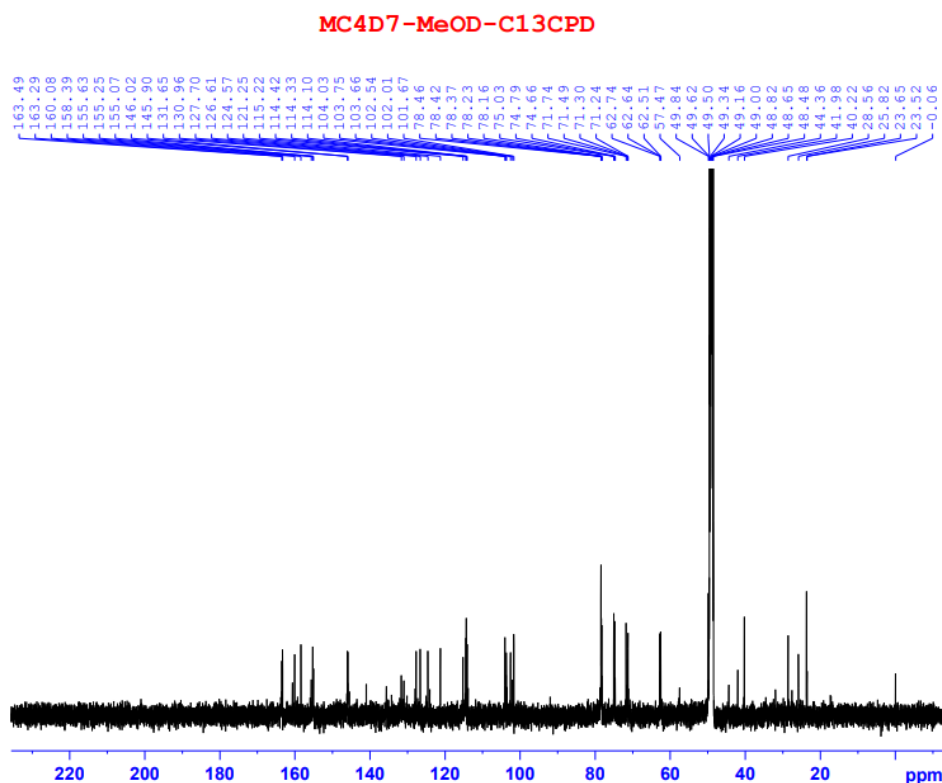
5''	78,4 (d)	ca. 3,56, m ^{a,d}	78,4 (d)	ca. 3,5 ^{a,d} , m
6''	62,7 (t)	3,37, m ^{a,d}	62,7 (t)	3,85, dd, 12,0; 2,0 Hz, 3,37 ^e
1'''	102,5 (d)	4,93, d, 7,8 Hz	102,5 (d)	4,93, d, 8,0 Hz
2'''	75,0 (d)	3,57, dd, 9,2, 7,7 Hz	75,0 (d)	3,58, dd, 9,0, 8,0 Hz
3'''	78,4 (d)	ca. 3,56, m ^{a,d}	78,3 (d)	ca. 3,5 ^{a,d} , m
4'''	71,2 (d)	ca. 3,36, m ^{a,d}	71,2 (d)	3,36 ^b , m
5'''	78,4 (d)	ca. 3,56, m ^{a,d}	78,4 (d)	ca. 3,5 ^{a,d} , m
6'''	62,5 (t)	3,89, dd, 12,2, 2,3 Hz 3,71, m ^{a,d}	62,5 (t)	3,89, dd, 12,0, 2,0 Hz, 3,70, dd, 12,0, 6,0 Hz

*Các hợp chất được đo trong dung môi CD₃OD, 600 MHz cho ¹H- và 150 MHz cho phổ ¹³C-NMR.

^aTín hiệu chồng chập mạnh. ^bĐộ chuyển dịch hóa học của pic tương tác HSQC. ^cTín hiệu chồng chập với dung môi. ^dTín hiệu có thể thay thế cho nhau.



Hình 3.13. Phổ ¹H-NMR của hợp chất 2



Hình 3.14. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 2

3.3. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme ACE-2 của các hợp chất 1 và 2

Bộ kit thử chất ức chế ACE-2 thương mại (MAK378, Merck KGaA, Darmstadt, Đức) đã được sử dụng để đo mức độ ức chế enzyme của các chất thử nghiệm. Bộ sản phẩm này sử dụng ACE-2 tái tổ hợp được gắn nhãn biotin và glycoprotein ($\geq 90\%$) được biểu hiện trong tế bào HEK-293 ở người. Phức hợp ACE2-biotin hình thành được hiển thị bằng đầu dò liên hợp streptavidin-HRP và hoạt tính đặc hiệu của ACE2 tái tổ hợp được đo bằng khả năng phân cắt cơ chất peptide sinh huỳnh quang 4-methoxycoumarin-Mca-YVADAPK(Dnp)-OH để giải phóng một chất huỳnh quang tự do. Khi có mặt chất ức chế, enzyme sẽ mất hoạt tính peptidase dẫn đến giảm cường độ huỳnh quang. Lượng enzyme cần thiết để phân cắt 1 picomole của chất nền peptit phát huỳnh quang, Mca-YVADAPK(Dnp)-OH trong một phút ở 37°C , pH 7,5 [54], được dùng làm đơn vị tính để đánh giá tác dụng ức chế ACE-2. MLN-4760, một chất ức chế carboxypeptidase liên quan đến ACE-2, được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Kết quả trong Bảng 3.2 cho thấy cao chiết nước và cao chiết ethanol-96% của Xáo tam phân có hoạt tính tác dụng ức chế ACE-2 yếu. *Cis*-paratrimerin B (1), *cis*-paratrimerin A (2) và *trans*-paratrimerin B (3) ức chế ACE-2 với giá trị IC_{50} lần lượt

là 28,9, 68 và 77 μM . Hợp chất (1) (*cis*-paratrimerin B) cho thấy tác dụng ức chế ACE-2 cao nhất ($103,11 \pm 0,4\%$) với giá trị IC_{50} là 26,4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) hoặc 28,9 (μM). Trong cùng điều kiện, giá trị IC_{50} của đối chứng dương tính là 33 (ng/mL) (Bảng 3.3). Những kết quả này chỉ ra rằng biscoumarin glycoside của Xáo tam phân có một số tiềm năng như chất ức chế chống ACE-2 nói riêng và do đó chống SARS-CoV-2 nói chung.

Có báo cáo chỉ ra rằng sự tương tác của SARS-CoV-2 với ACE-2 là rất quan trọng đối với sự xâm nhập của vi rút ở giai đoạn đầu của quá trình lây nhiễm COVID-19. Hơn nữa, virus liên quan đến quá trình đại thực bào cũng có thể di chuyển qua máu từ phổi đến các cơ quan khác có nồng độ ACE-2 cao. Người ta đã phát hiện ra rằng ACE2 đóng hai vai trò: thứ nhất, nó tạo điều kiện cho virus xâm nhập vào vật chủ; và thứ hai, nó bảo vệ khỏi tổn thương phổi nghiêm trọng do tổn thương angiotensin II [55]. Do đó, thực vật có chứa hợp chất ức chế ACE-2 có tác dụng giảm thiểu sự xâm nhập của virus và bảo vệ chống lại tổn thương phổi. Li và cộng sự (2013) bằng cách ngăn chặn sự điều hòa giảm của enzyme chuyển đổi angiotensin 2, một khung monocoumarin prenylat hóa, đã được chứng minh để giảm tổn thương phổi cấp tính do lipopolysaccharit (LPS) gây ra ở chuột [56]. Để đánh giá khả năng ngăn ngừa tổn thương phổi liên quan đến COVID, biscoumarin được tìm thấy trong Xáo tam phân cần được nghiên cứu thêm bằng cách sử dụng các thử nghiệm *in vivo*. Một số biscoumarin thực vật họ Rutaceae khác, như toddalosin từ *Toddalia asiatica*, hassmarin từ *Citrus hassaku* và bisparasin từ hỗn hợp rễ của cây *Citrus*, có thể hữu ích trong việc khám phá các hoạt tính sinh học nói chung cũng như tác dụng chống ACE 2 của chúng [57]. Biscoumarin của *Hypericum* sp. cũng cho thấy đặc tính gây độc tế bào và kháng vi-rút [57].

Bảng 3.3. Thử nghiệm hoạt tính *in vitro* ức chế ACE-2

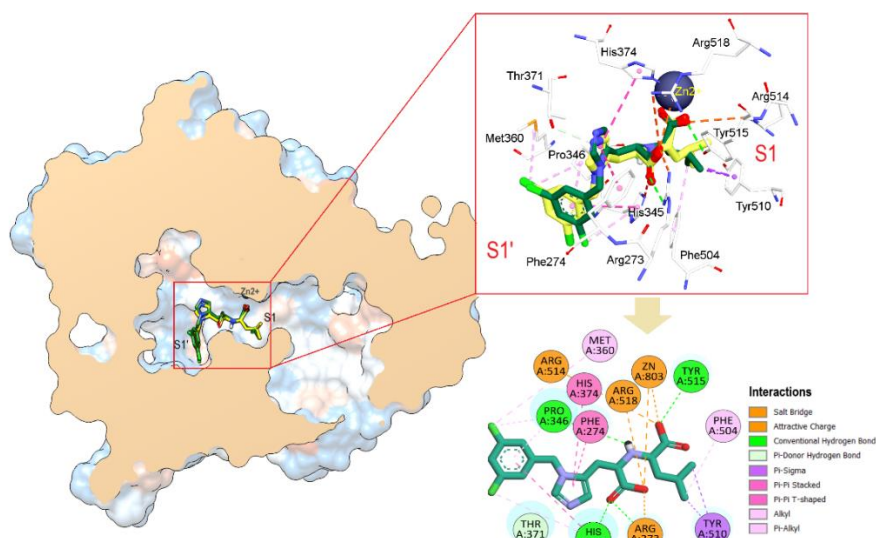
Tên mẫu thử	Phần trăm ức chế ACE-2	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{50} (μM)
Cao chiết nước <i>P. trimera</i>	19.1 ± 0.51	> 100	-
Cao chiết cồn EtOH-96% <i>P. trimera</i>	12.1 ± 0.12	> 100	-
<i>cis</i> -paratrimerin B (1)	103.1 ± 0.42	26.3	28.9
<i>cis</i> -paratrimerin A (2)	84.0 ± 0.33	53.1	68.1
Đối chứng âm	0	0	-
Đối chứng dương (MLN-4760)	99.7 ± 0.22	0.033	0,077

3.4. Nghiên cứu mô phỏng docking phân tử

Để hiểu rõ hơn về sự tương tác của hai hợp chất paratrimerin phân lập được và đồng phân khác của chúng (đồng phân *trans*-) với ACE-2, mô phỏng docking phân tử đã được thực hiện, sử dụng cấu trúc ACE-2 ở người (hACE-2, ID PDB: 1R4L) được báo cáo bởi Towler và cộng sự [44].

a) Xác thực giao thức docking bằng cách sử dụng vị trí liên kết của hACE-2

Độ chính xác và tin cậy của giao thức docking đã được xác thực thông qua quá trình re-docking. Mức độ xếp chồng cao giữa phối tử đồng kết tinh MLN-4760 (ID PDB: 1R4L) và phối tử re-dock được mô tả trong Hình 3.5 [44]. Độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) giữa tọa độ của MLN-4760 được re-dock và phối tử đồng kết tinh ban đầu là 0,816 Å. Như được tiết lộ bởi các tương tác MLN-4760, vị trí liên kết hACE-2 có thể được chia thành ba vị trí nhỏ, tức là S1, S1' và vị trí liên kết kẽm [44], với liên kết kẽm là một phần của mô típ xúc tác của enzyme này. Vị trí S1 bao gồm Thr347, Phe504, Arg514 và Tyr510, xác định tính chọn lọc của cơ chất chủ yếu là chất ức chế thông qua tương tác van der Waals. Trong khi đó, vị trí S1' lớn hơn nhiều so với S1 và có thể sử dụng nhiều cơ chất có thể hình thành tương tác liên kết H với Arg273, His345, Thr371, Pro346 và His505, cũng như các tương tác xếp chồng (stacking) với các gốc amino acid như Phe274, Cys344, Pro346, Met360, Cys361 và Thr371. Theo báo cáo thử nghiệm [44], MLN-4760 có thể chelat hóa ion Zn^{2+} và tương tác với nhiều gốc trong khoang S1 và S1' của ACE-2, như được hiển thị trong Hình 4. Các tương tác chính này của MLN-4760 là được duy trì trong quá trình docking, cho thấy độ tin cậy cao của giao thức docking.



Hình 3.15. Hình tương tác 2D and 3D re-dock của chất ức chế MLN-4760 (PDB ID: 1R4L) hiển thị hình dạng khoang liên kết của ACE-2

b) Docking các thành phần thực vật Xáo tam phân chống lại hACE-2

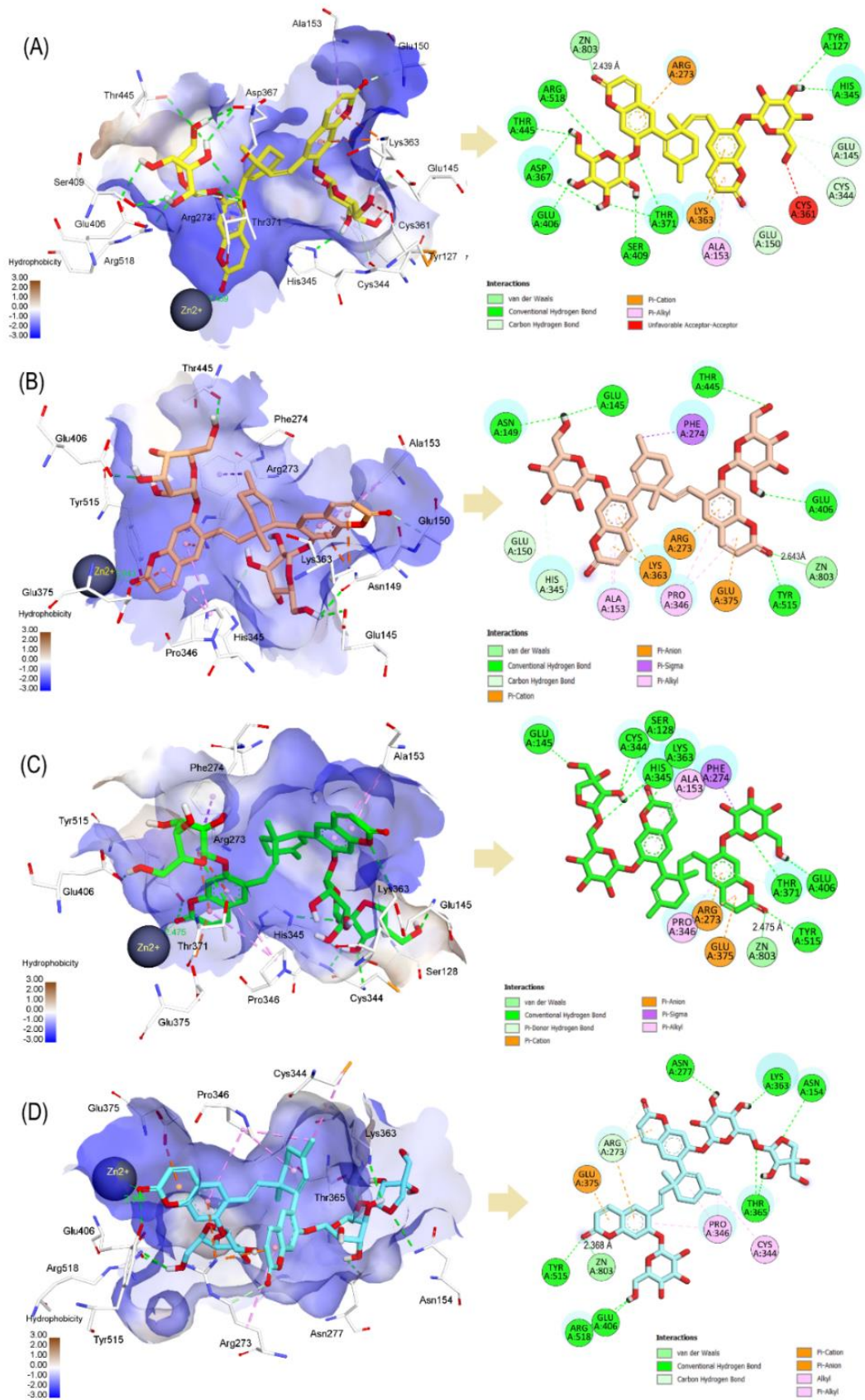
Giao thức docking đã được xác thực sử dụng để kiểm tra các tương tác cấu trúc của protein đích ACE-2 với hai hợp chất **1-4** từ rễ của Xáo tam phân và để tính toán năng lượng liên kết của các phức hợp. Kết quả docking linh động (Bảng 3.3) cho thấy rằng tất cả các hợp chất **1-4** và đối chứng dương MLN-4760 có thể liên kết với enzyme ACE-2 với giá trị ΔG nằm trong khoảng từ $-10,69$ đến $-14,70$ kcal/mol. Điều thú vị là, tất cả các hợp chất mới đều thể hiện điểm docking tốt hơn so với chất ức chế MLN-4760 đã biết (ΔG là $-9,12$ kcal/mol), cho thấy ái lực liên kết tốt với đích protein này. Giá trị ΔG của biscoumarin glycoside tốt hơn so với giá trị của một số hợp chất polyphenolic tự nhiên, như quercetin ($-9,0$ kcal/mol), kaempferol ($-8,7$ kcal/mol), catechin ($-8,3$ kcal/mol), axit galic ($-6,0$ kcal/mol), indirubin alkaloid ($-8,9$ kcal/mol) [58] hoặc stilbene glucoside rhaponticin ($-9,3$ kcal/mol) [59]. Các tương tác chính giữa các hợp chất này và ACE-2 sau đó đã được phân tích.

c) Phân tích tính toán về sự tương tác giữa biscoumarin glycoside (**1-4**) và dư lượng axit amin trong phức hợp ACE-2

Sự tương tác giữa biscoumarin glycoside (**1-4**) và gốc axit amin trong vị trí hoạt động của protein enzyme ACE-2 được tóm tắt trong Bảng 3.4 và Hình 3.6. Trong các mô hình giảm thiểu năng lượng, tất cả các hợp chất (**1-4**) có thể phù hợp tốt trong vị trí hoạt động của ACE-2. Chúng có thể liên kết với ion Zn thông qua một nhóm carbonyl coumarin (nhóm lactone) với khoảng cách gần ($2,3-2,6$ Å) như trong Hình 3.6. Nhìn chung, các biscoumarin glycoside chủ yếu tương tác với các gốc amino acid ở vị trí S1', khá khác so với MLN-4760. Với cấu trúc polyphenol, biscoumarin glycoside **1-4** do đó cho thấy số lượng liên kết hydro cao hơn chất ức chế MLN-4760. Hợp chất này chỉ tạo thành năm liên kết hydro, trong khi hầu hết các biscoumarin glycoside (**1-3**) thể hiện bảy liên kết hydro. Các biscoumarin glycoside lớn hơn nhiều so với MLN-4760; do đó, chúng có thể tương tác với nhiều gốc dọc theo kênh dọc của khoang S1' và cho thấy năng lượng liên kết cao hơn so với MLN-4760.

cis-Paratrimerin B (**1**), có điểm docking cao nhất, cho thấy bảy liên kết hydro (Bảng 3.4) với Ser128, Glu145, His345, Lys363, Thr371, Glu406 và Tyr803. Như có thể thấy trong Hình 5, các tương tác xếp chồng π giữa các amino acid Ala153, Arg273, Pro346 và Glu375 chống lại các vòng coumarin đóng vai trò thiết yếu trong liên kết của hợp chất này. Tương tự như **1**, biscoumarin **2**, tạo thành bảy liên kết hydro với Tyr127, His345, Asp367, Thr371, Glu406, Thr445 và Arg518. Đặc biệt, *cis*-paratrimerin A (**2**) có tương tác liên kết hydro với gốc amino acid Thr371, tương tự như chất ức chế MLN-4760 và các hợp chất tự nhiên khác như các flavonoid apigenin,

isovitexin, quercetin, isorhamnetin [7]. Nó cũng tham gia vào các tương tác sâu hơn với Glu145, Glu150, Ala153, Arg273, Cys344, Cys361 và Lys363. Tuy nhiên, sự tương tác từ Cys361 với gốc glycoside của hợp chất **2** có thể cản trở sự hình thành phức hợp phối tử protein ổn định. *Trans*-paratrimerin B (**3**) hình thành số lượng liên kết hydro giống như **1** và **2**, nhưng có tương tác thấp hơn với các gốc kỵ nước trong vùng. Như có thể thấy trong Hình 3.6, cấu trúc disacarit **3** được bố trí ở đầu vị trí S1', điều này làm suy yếu sự tương tác với các gốc chính trong vị trí hoạt động, chẳng hạn như His345 và Thr371. Trong số bốn hợp chất được dock, *trans*-paratrimerin A (**4**) cho thấy năng lượng liên kết thấp nhất với giá trị ΔG là $-10,69$ kcal/mol. Hợp chất này hình thành năm liên kết hydro với Glu145, Asn149, Glu406, Thr445 và Tyr515, khá khác biệt so với MLN-4760. Mặc dù có số lượng liên kết hydro thấp hơn, hợp chất **4** cho thấy tương tác xếp chồng cao hơn với các gốc kỵ nước ở vị trí S1' so với ba biscoumarin còn lại. Điều thú vị là các flavonoid quercetin-3-glucuronide-7-glucoside, cũng cho thấy các tương tác kỵ nước tương tự như **4** [60]. Vì các tương tác chiếm ưu thế trong vị trí S1' là liên kết hydro, nên liên kết của **4** có thể yếu hơn so với **1-3**.



Hình 3.16. Các tương tác 2D và 3D của (A) *cis*- và (B) *trans*-paratrimerin A (2 và 4); (C) *cis*- và (D) *trans*-paratrimerin B (1 và 3) với các gốc amino acid trong vị trí hoạt động ACE-2.

Bảng 3.4. Ái lực liên kết, liên kết hydro và các tương tác khác như các tương tác kỵ nước của các hợp chất biscoumarin glycoside (1-4) trong vị trí hoạt động của enzyme ACE-2.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Liên kết hydro	Các tương tác khác
1	<i>cis</i> -paratrimerin B	-11.94	Glu375, His374, Glu402, His345, Arg273, Glu145, Asn149	Thr347, Ala348, Tyr510, Phe504, His505, Pro346, Trp271, Glu150, Thr365, Lys363, Asn277, Glu150, Ala153, Thr445, Asp368, Leu370, Phe274, Asp367, Thr371
2	<i>cis</i> -paratrimerin A	-14.70	Glu406, Asp367, Thr445, Cys344, Arg273, His345	Glu375, Thr371, Pro346, Asn149, Trp271, Leu370, Phe274, Asp368, Ala153, Thr276, Lys363, Thr365, Glu150, Glu145, Trp271
3	<i>trans</i> -paratrimerin B	-10.69	Leu370, Glu406, His345, Asn149	Leu144, Ala153, Asp269, Trp271, Phe274, Cys344, His345, Pro346, Met360, Cys361, Lys363, Thr365, Asp367, Asp368, Leu370, His374, Ser409, Thr445, His505,
4	<i>trans</i> -paratrimerin A	-12.95	Thr371, Glu406, Thr445, Asp368, Asn149, Cys344	Leu370, Phe274, His374, Arg273, Lys363, Pro346, Glu145, Asp269, Asp367, Asn277, Ala153, Gly268, Thr365, Thr276
5	MLN-4760	-8.63	Arg273, Pro346, Tyr515	Tyr510, Phe504, Arg273, Thr371, Pro346, Arg514, His374, Met360, Arg518, Phe274

KẾT LUẬN

Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký cột thường, sắc ký cột Sephadex, sắc ký cột pha đảo và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), hai hợp chất biscoumarin mới được phân lập từ rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) mọc ở Khánh Hòa, Việt Nam, bao gồm *cis*-paratrimerin B (**1**) và *cis*-paratrimerin A (**2**). Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được đánh giá bằng các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm phổ 1D, 2D-NMR, HR-MS, UV và CD.

Hai hợp chất **1** và **2** có tác dụng ức chế ACE-2 *in vitro* với giá trị IC₅₀ lần lượt là 28,9 μ M và 68,1 μ M.

Sử dụng phương pháp docking phân tử, bốn biscoumarin glycoside *cis*-paratrimerin A, B và *trans*-paratrimerin A, B (**1-4**) có ái lực liên kết cao với protein ACE-2, với các giá trị ΔG là -14,70, -12,95, -11,94 và -10,69 kcal/mol, tương ứng, thấp hơn đáng kể so với MLN-4760 đối chứng dương (-9,12 kcal/mol).

KIẾN NGHỊ

Các kết quả nghiên cứu thu được về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài Xáo tam phân cho thấy:

Cần nghiên cứu sâu hơn về tác dụng và cơ chế hoạt động của hai hợp chất *cis*-paratrimerin B và *cis*-paratrimerin A và các hợp chất khác của cây Xáo tam phân trong điều trị các bệnh COVID-19 và hậu COVID-19 gây bởi virus SARS-CoV-2 và các biến thể của chúng.

CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

Nguyen Xuan Ha, Tran Thu Huong, Pham Ngoc Khanh, Nguyen Phi Hung, Vu Thanh Loc, Vu Thi Ha, Dang Thu Quynh, Do Huu Nghi, Pham The Hai, Christopher J. Scarlett, Ludger A. Wessjohann, Nguyen Manh Cuong, *In vitro* and *in silico* study of new biscoumarin glycosides from *Paramignya trimera* against Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) for preventing SARS-CoV-2 infection. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2024, 72 (6), 574-583. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00844>.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Zhou, W., Wang, W., 2021, Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines, *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), pp. 226.
- [2] Chen, Y., Liu, Q., Guo, D., 2020, Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *Journal of medical virology*, 92(4), pp. 418-423.
- [3] Peron, J. P. S., Nakaya, H., 2020, Susceptibility of the elderly to SARS-CoV-2 infection: ACE-2 overexpression, shedding, and antibody-dependent enhancement (ADE), *Clinics*, 75, pp. e1912.
- [4] Brojakowska, A., Narula, J., Shimony, R., Bander, J., 2020, Clinical implications of SARS-CoV-2 interaction with renin angiotensin system: JACC review topic of the week. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(24), pp. 3085-3095.
- [5] Morris, G. M., Lim-Wilby, M., 2008, Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*, 443, pp. 365-382.
- [6] Upreti, S., Prusty, J. S., Pandey, S. C., Kumar, A., & Samant, M., 2021, Identification of novel inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) receptor from *Urtica dioica* to combat coronavirus disease 2019 (COVID-19), *Molecular Diversity*, 25, pp. 1-15.
- [7] Khayrani, A. C., Irdiani, R., Aditama, R., Pratami, D. K., Lischer, K., Ansari, M. J., Sahlan, M., 2021, Evaluating the potency of Sulawesi propolis compounds as ACE-2 inhibitors through molecular docking for COVID-19 drug discovery preliminary study. *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), pp. 101297.
- [8] Kapoor, N., Ghorai, S. M., Khuswaha, P. K., Bandichhor, R., & Brogi, S., 2022, Butein as a potential binder of human ACE2 receptor for interfering with SARS-CoV-2 entry: A computer-aided analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 28(9), pp. 270.
- [9] Alagu Lakshmi, S., Shafreen, R. M. B., Priya, A., & Shunmugiah, K. P., 2021, Ethnomedicines of Indian origin for combating COVID-19 infection by hampering the viral replication: using structure-based drug discovery approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(13), pp. 4594-4609.
- [10] Elebeedy, D., Elkhatib, W. F., Kandeil, A., Ghanem, A., Kutkat, O., Alnajjar, R., Al-Karmalawy, A. A., 2021, Anti-SARS-CoV-2 activities of tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid, baicalein, and glycyrrhetic acid between computational and in vitro insights, *RSC advances*, 11(47), pp. 29267-29286.
- [11] Tuan Anh, H. L., Kim, D. C., Ko, W., Ha, T. M., Nhiem, N. X., Yen, P. H., Kiem, P. V., 2017, Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), pp. 1195-1201.

- [12] Cuong, N. M., Huong, T. T., Khanh, P. N., Van Tai, N., Ha, V. T., Tai, B. H., Kim, Y. H., 2015, Paratrimerins A and B, two new dimeric monoterpene-linked coumarin glycosides from the roots and stems of *Paramignya trimera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(11), pp. 945-949.
- [13] Dang, P. H., Le, T. H., Phan, P. K., Le, P. T., Nguyen, M. T., Nguyen, N. T., 2017, Two acridones and two coumarins from the roots of *Paramignya trimera*. *Tetrahedron letters*, 58(16), pp. 1553-1557.
- [14] Nguyen, M. T. T., Dang, P. H., Nguyen, T. N., Bui, L. T. T., Nguyen, H. X., Le, T. H., Nguyen, N. T. (2018). Paratrimerins G and H, two prenylated phenolic compounds from the stems of *Paramignya trimera*. *Phytochemistry letters*, 23, pp. 78-82.
- [15] Quan, K. T., Park, H. B., Yuk, H., Lee, S. J., & Na, M., 2021, Paratrimerins J–Y, dimeric coumarins isolated from the stems of *Paramignya trimera*. *Journal of Natural Products*, 84(2), pp. 310-326.
- [16] Mabberley, D. J., 1998, Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae), *Telopea*, 7(4), pp. 333-344.
- [17] Kumar, V., Niyaz, N. M., Wickramaratne, D. M., Balasubramaniam, S., 1991, Tirucallane derivatives from *Paramignya monophylla* fruits, *Phytochemistry*, 30(4), pp. 1231-1233.
- [18] Chi, V.V., Từ điển cây thuốc Việt Nam, 2023, Nhà xuất bản Y học, Tập 2.
- [19] Đức H. V., Cường N. M., Tài N. V., Khanh P. N., Hà V. T., Hường T. T., Nhật N. D., 2013, Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây Xáo tam phân họ Rutaceae, *Tạp chí Hóa học*, 51 (3), pp. 292-296.
- [20] Wattanapiromsakul, C., Waterman, P. G., 2000, Flavanone, triterpene and chromene derivatives from the stems of *Paramignya griffithii*, *Phytochemistry*, 55(3), pp. 269-273.
- [21] Kumar, V., Niyaz, N. M., Wickramaratne, D. M., 1995, Coumarins from stem bark of *Paramignya monophylla*, *Phytochemistry*, 38(3), pp. 805-806.
- [22] Duong, T. H., Phuong, T. T., Ly, H. D., Vy, N. T., Son, D. V., & Hoa, N. D. L., 2016, Coumarins and acridon alkaloids from the roots of *Paramignya trimera*. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 32(4), pp. 115-123.
- [23] Hussain, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Krohn, K., 2012, The chemistry and biology of bicoumarins. *Tetrahedron*, 68(12), pp. 2553-2578.
- [24] Bowen, I. H., & Patel, Y. N., 1998, Phytochemical analysis of the leaves and stems of *Paramignya monophylla* Wight (Rutaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, pp. 232-232.

- [25] Phan, N. H. T., Thuan, N. T. D., Ngoc, N. T., Thao, N. P., Kim, S., Koh, Y. S., Van Minh, C., 2015, Anti-inflammatory tirucallane saponins from *Paramignya scandens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(7), pp. 558-564.
- [26] Phan, N. H. T., Thuan, N. T. D., Ngoc, N. T., Huong, P. T. M., Thao, N. P., Cuong, N. X., Van Minh, C, 2014, Two tirucallane derivatives from *Paramignya scandens* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry letters*, 9, pp. 78-81.
- [27] Duong, T. H., Phuong, T. T., Ly, H. D., Vy, N. T., Son, D. V., Hoa, N. D. L., 2016, Coumarins and acridon alkaloids from the roots of *Paramignya trimera*, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 32(4), 115-123.
- [28] Phan, N. H. T., Thuần, N. T. D., Duy, N. V., Ngọc, N. T., Thanh, N. V., Cường, N. X., Minh, C. V., 2015, Nghiên cứu thành phần hóa học của cây Xáo leo *Paramignya scandens*. *Vietnam Journal of Chemistry*, 53(1), pp. 84-89.
- [29] Linh, B. T. T., Phú, Đ. H., Nhân, N. T., 2015, Khảo sát thành phần hóa học cao chloroform của thân cây Xáo tam phân-*Paramignya trimera* (Oliver.) burkill-họ Rutaceae. *Journal of Analytical Sciences*. 20(4), pp. 297-302.
- [30] Nguyen, N. T., Dang, P. H., Vu, N. X., Le, T. H., Nguyen, M. T., 2017. Quinoliniumolate and 2 H-1, 2, 3-triazole derivatives from the stems of *Paramignya trimera* and their α -glucosidase inhibitory activities: *in vitro* and *in silico* studies, *Journal of Natural Products*, 80(7), pp. 2151-2155.
- [31] Hộ, P. H., 2021, Cây cỏ Việt Nam-Quyển II.
- [32] Huong, T. T., Ha, V. T., Cuong, T. D., Son, N. T., Toan, T. Q., Anh, H. T. N., Cuong, N. M., 2019, New constituents from the roots and stems of *Paramignya trimera*. *Natural Product Communications*, 14(6), pp. 1934578X19861015.
- [33] Nguyen, M. T. T., Dang, P. H., Nguyen, H. X., Le, T. H., Van Do, T. N., Pham, P. V., Nguyen, N. T., 2021, Paratrimerin I, cytotoxic acridone alkaloid from the roots of *Paramignya trimera*, *Natural Product Research*, 35(23), pp. 5042-5047.
- [34] Trong Le, N., Viet Ho, D., Quoc Doan, T., Tuan Le, A., Raal, A., Usai, D., Donadu, M. G., 2020, Biological activities of essential oils from leaves of *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum and *Limnocitrus littoralis* (Miq.) Swingle. *Antibiotics*, 9(4), pp. 207.
- [35] Piao, X., Byun, H. S., Lee, S. R., Ju, E., Park, K. A., Sohn, K. C., Hur, G. M., 2021, 8-Geranylumbelliferone isolated from *Paramignya trimera* triggers RIPK1/RIPK3-dependent programmed cell death upon TNFR1 ligation. *Biochemical Pharmacology*, 192, pp. 114733.
- [36] Tran, T. H., Le, T. H., Nguyen, T. H. T., Binh Vong, L., Nguyen, M. T. T., Nguyen, N. T., Dang, P. H., 2023, A new apotirucallane-type protolimonoid from the leaves of *Paramignya trimera*. *Natural Product Research*, pp. 1-9.

- [37] Dang, P. H., Le, T. H., Van Do, T. N., Nguyen, H. X., Nguyen, M. T. T., & Nguyen, N. T., 2024, Paratrimerin Z, an undescribed chromene derivative from the roots of *Paramignya trimera*. *Natural Product Research*, 38(2), pp. 327-330.
- [38] Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Acton, S., 2000, A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, 87(5), pp. e1-e9.
- [39] Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A. J., 2000, A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), pp. 33238-33243.
- [40] Turner, A. J., Hooper, N. M., 2002, The angiotensin–converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, 23(4), pp. 177-183.
- [41] Camargo, S. M., Singer, D., Makrides, V., Huggel, K., Pos, K. M., Wagner, C. A., Verrey, F., 2009, Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology*, 136(3), pp. 872-882.
- [42] Liu, M., Wang, T., Zhou, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., Li, J., 2020, Potential role of ACE2 in coronavirus disease 2019 (COVID-19) prevention and management. *Journal of translational internal medicine*, 8(1), pp. 9-19.
- [43] Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Wang, X., 2020, Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor, *Nature*, 581(7807), pp. 215-220.
- [44] Towler, P., Staker, B., Prasad, S. G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Pantoliano, M. W., 2004, ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis, *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), pp. 17996-18007.
- [45] Yueniwati, Y., Syaban, M. F. R., Faratisha, I. F. D., Yunita, K. C., Kurniawan, D. B., Putra, G. F. A., Erwan, N. E., 2021, Molecular docking approach of natural compound from herbal medicine in java against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 receptor. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(A), pp. 1181-1186.
- [46] Carino, A., Moraca, F., Fiorillo, B., Marchianò, S., Sepe, V., Biagioli, M., Fiorucci, S., 2020, Hijacking SARS-CoV-2/ACE2 receptor interaction by natural and semi-synthetic steroidal agents acting on functional pockets on the receptor binding domain. *Frontiers in Chemistry*, 8, pp. 572885.
- [47] Teralı, K., Baddal, B., Gülcan, H. O., 2020, Prioritizing potential ACE2 inhibitors in the COVID-19 pandemic: Insights from a molecular mechanics-assisted

structure-based virtual screening experiment. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 100, pp. 107697.

[48] Xiao, F., & Burns, K. D. (2017). Measurement of angiotensin converting enzyme 2 activity in biological fluid (ACE2). *Hypertension: Methods and Protocols*, pp. 101-115.

[49] Pedersen, K. B., Sriramula, S., Chhabra, K. H., Xia, H., & Lazartigues, E. (2011). Species-specific inhibitor sensitivity of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its implication for ACE2 activity assays. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(5), pp. R1293-R1299.

[50] Trott, O., Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), pp. 455-461.

[51] Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), pp. 3891-3898.

[52] Takeda, M. (1976). Comparison of local anesthetic activities between cis and trans isomers of DL-1-benzoyloxy-2-dimethylamino-1, 2, 3, 4-tetrahydronaphthalene. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 26(1), pp. 13-19.

[53] Vasconcelos, D. L. M., Silva, C. B., Teixeira, A. M. R., Freire, P. T. C. (2021). Structural and spectroscopic analysis of the Cis-Trans isomers of the captopril in the gaseous and aqueous phases. *Journal of Molecular Structure*, 1243, pp. 130872.

[54] Shi, Y., Zhang, B., Chen, X. J., Xu, D. Q., Wang, Y. X., Dong, H. Y., Li, Z. C. (2013). Osthole protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by preventing down-regulation of angiotensin-converting enzyme 2. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4-5), pp. 819-824.

[55] Gumashta, J., & Gumashta, R. (2020). Role of the backbenchers of the renin-angiotensin system ACE2 and AT2 receptors in COVID-19: lessons from SARS. *Cureus*, 12(6), pp. e8411.

[56] Ito, C., Ono, T., Takemura, Y., Nakata, Y., Ten, H., Ju-Ichi, M., Furukawa, H. (1993). Structure of hassmarin, a novel biscoumarin from a Citrus plant. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 41(7), pp. 1302-1304.

[57] Tanemossu, S. A. F., Franke, K., Arnold, N., Schmidt, J., Wabo, H. K., Tane, P., & Wessjohann, L. A. (2014). Rare biscoumarin derivatives and flavonoids from *Hypericum riparium*. *Phytochemistry*, 105, pp. 171-177.

[58] Nipun, T. S., Ema, T. I., Mia, M. A. R., Hossen, M. S., Arshe, F. A., Ahmed, S. Z., Dey, D. (2021). Active site-specific quantum tunneling of hACE2 receptor to assess its complexing poses with selective bioactive compounds in co-suppressing

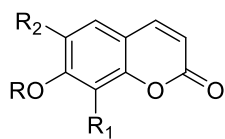
SARS-CoV-2 influx and subsequent cardiac injury. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 8(4), pp. 540.

[59] Joshi, T., Sharma, P., Mathpal, S., Pundir, H., Bhatt, V., & Chandra, S. (2020). In silico screening of natural compounds against COVID-19 by targeting Mpro and ACE2 using molecular docking. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 24(8), pp. 4529-4536.

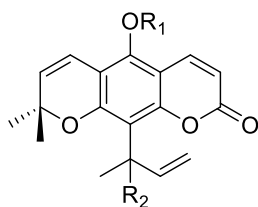
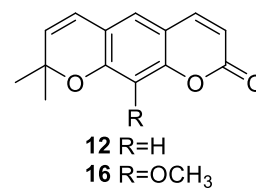
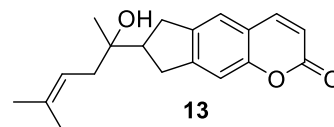
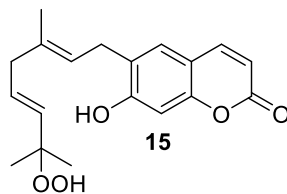
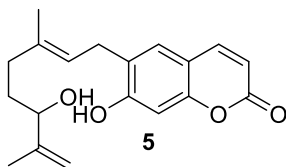
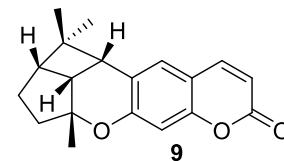
[60] Sharma, P., Joshi, T., Mathpal, S., Tamta, S., & Chandra, S. (2023). Computational approaches for drug discovery against COVID-19. In *Omicron approaches and technologies in COVID-19*. Academic Press. pp. 321-337

PHỤ LỤC

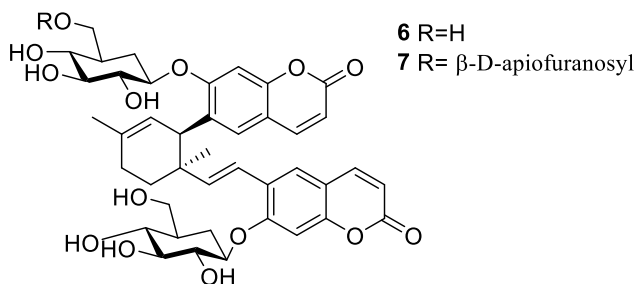
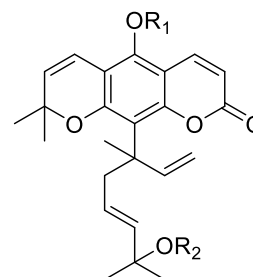
Phụ lục 1. Các hợp chất coumarin và coumarin glycoside từ chi *Paramignya*



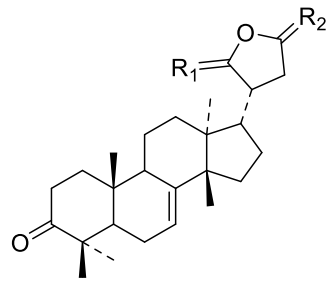
- 1** R=H, R₁=R₂=H
2 R=CH₃, R₁=R₂=H
3 R=geranyl, R₁=H, R₂=OH
4 R=geranyl, R₁=OCH₃, R₂=OH
8 R=6,7-dihydroxygeranyl, R₁=H, R₂=OH
10 R=R₁=R₂=H
11 R=R₁=H, R₂=OCH₃
14 R=H, R₁=geranyl, R₂=H



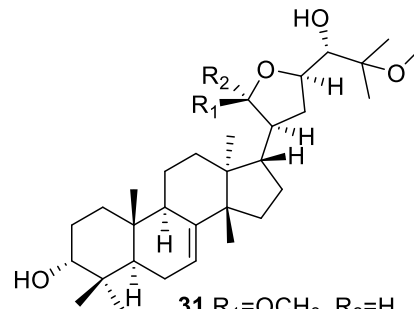
- 17** R₁=R₂=CH₃
18 R₁=H, R₂=CH₃
19 R₁=H, R₂=(CH₂)₂CH=C(CH₃)₂
20 R₁=CH₃, R₂=(CH₂)₂CH=C(CH₃)₂



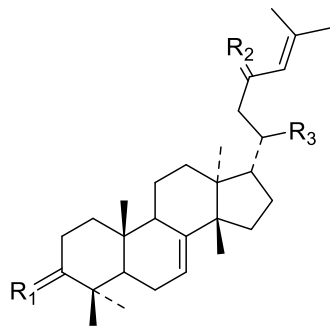
Phụ lục 2. Các hợp chất tirycallane từ chi *Paramignya*



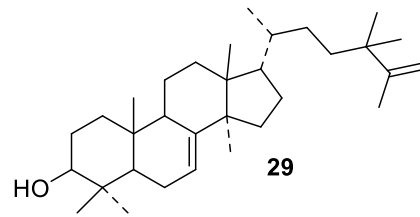
23 $R_1=H, OH; R_2=H, CHC(CH_3)_2$
24 $R_1=H, H; R_2=H, CHC(CH_3)_2$



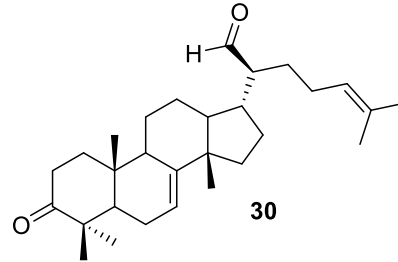
31 $R_1=OCH_3, R_2=H$
32 $R_1=H, R_2=OCH_3$



25 $R_1=\alpha H, \beta OH; R_2=OH, H, R_3=CH_3$
26 $R_1=\alpha H, \beta H; R_2=OH, H, R_3=CH_2OH$
27 $R_1=O; R_2=OH, H; R_3=CH_2OH$
28 $R_1=O; R_2=OH, H; R_3=CH_3$

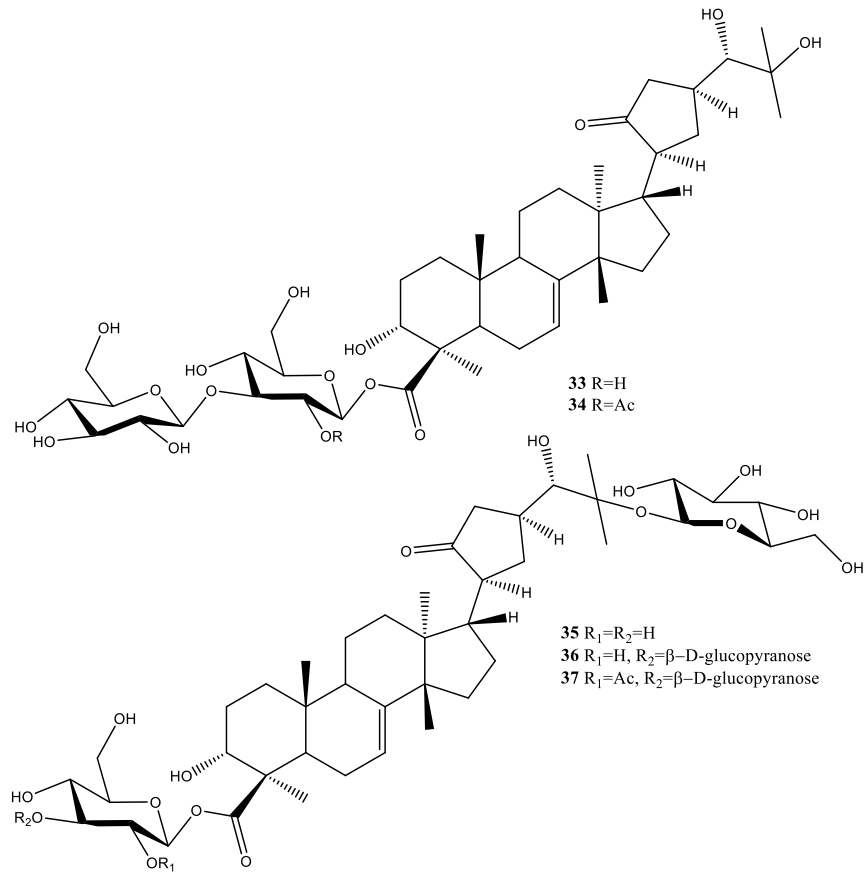


29

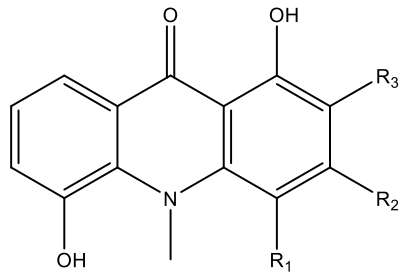


30

Phụ lục 3. Các hợp chất tirycallane saponin từ chi Paramignya



Phụ lục 4. Các hợp chất acridone alkanoid từ chi Paramignya

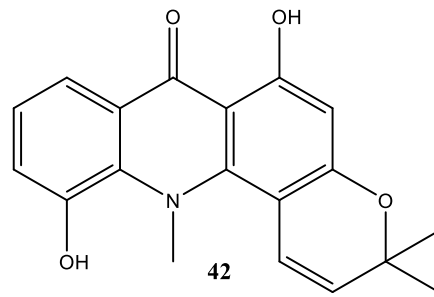


38 R₁=R₂=OCH₃, R₃=H

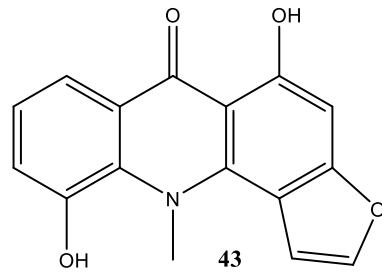
39 R₁=H, R₂=OH, R₃=geranyl

40 R₁=geranyl, R₂=OH, R₃=H

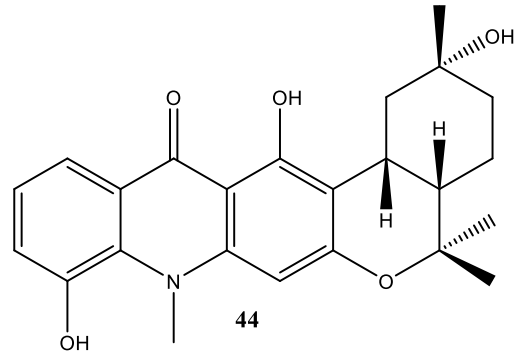
41 R₁=prenyl, R₂=OH, R₃=H



42

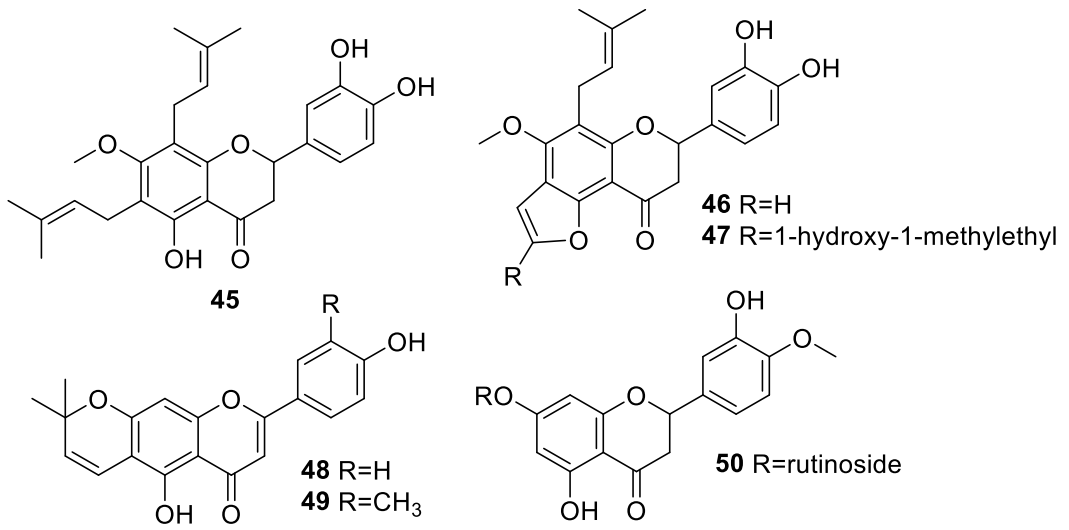


43

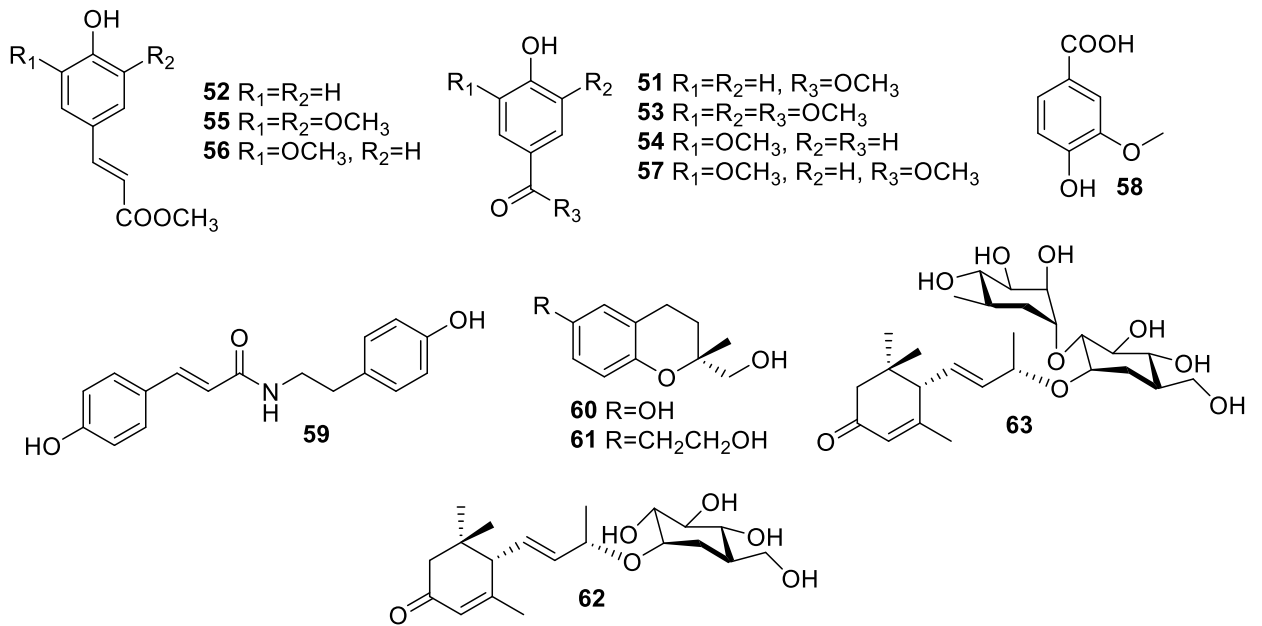


44

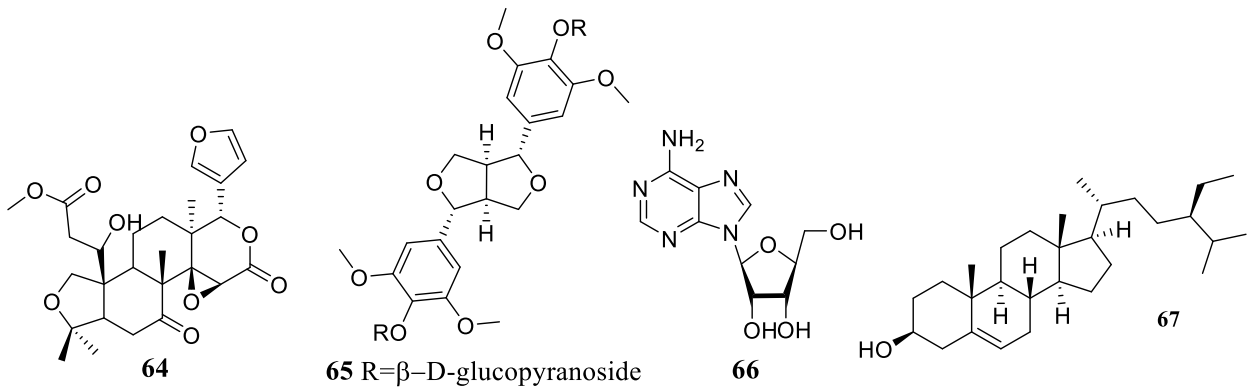
Phụ lục 5. Các hợp chất flavanone, flavone, flavanone glycoside từ chi *Paramignya*



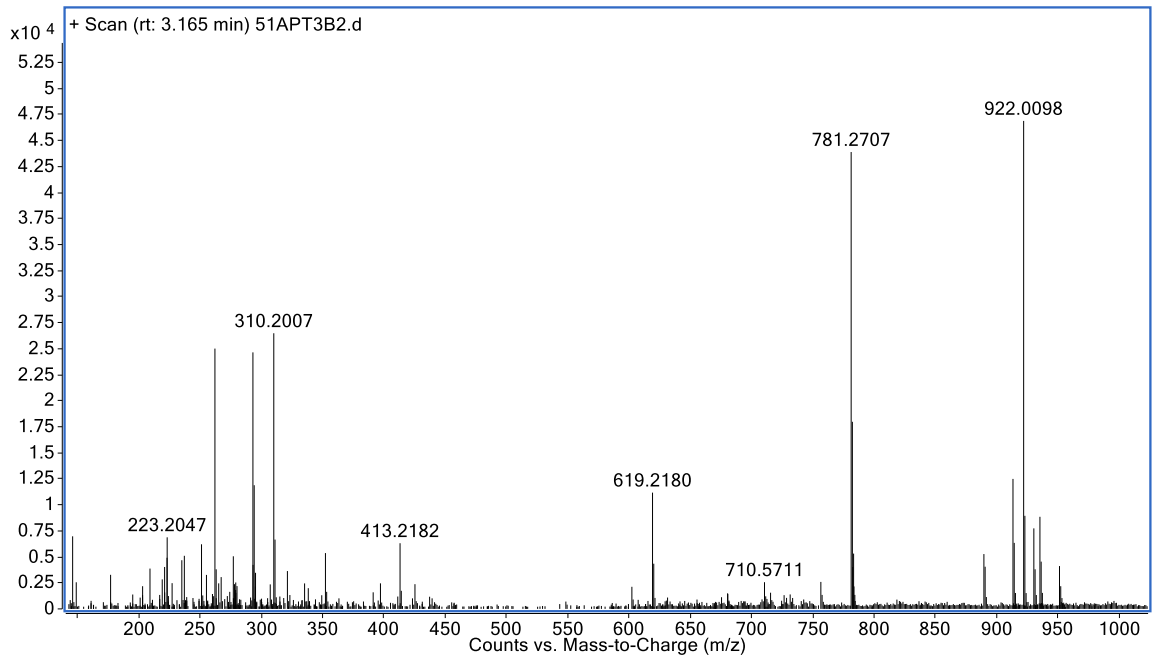
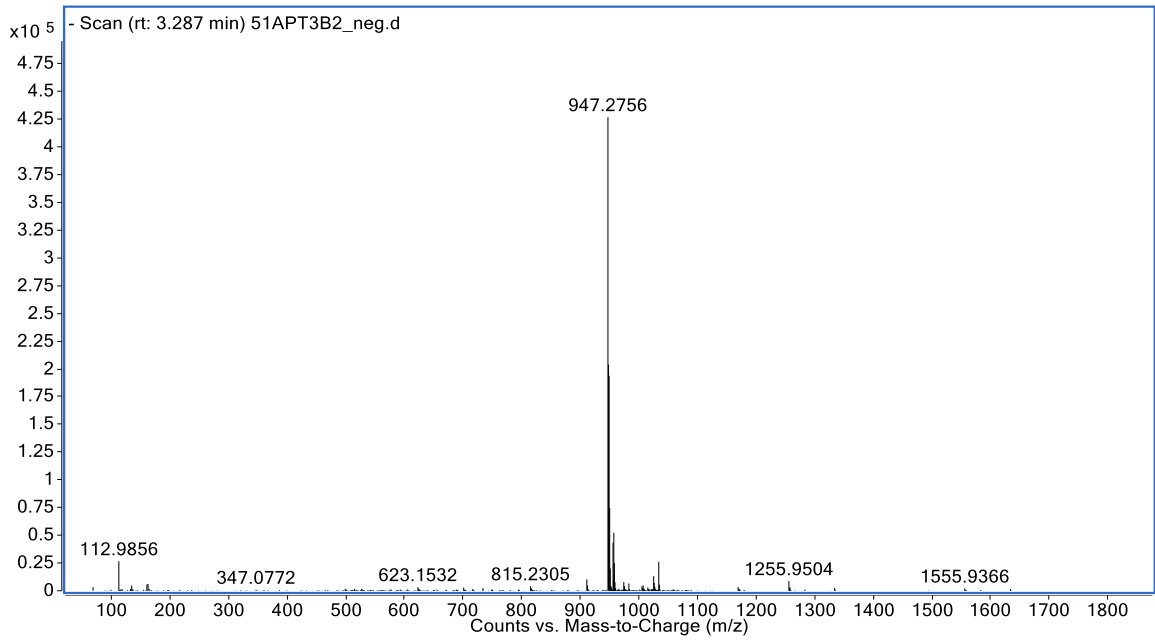
*Phụ lục 6. Các hợp chất phenol, chromene, và megastimane glycoside (52-63) từ chi *Paramignya**

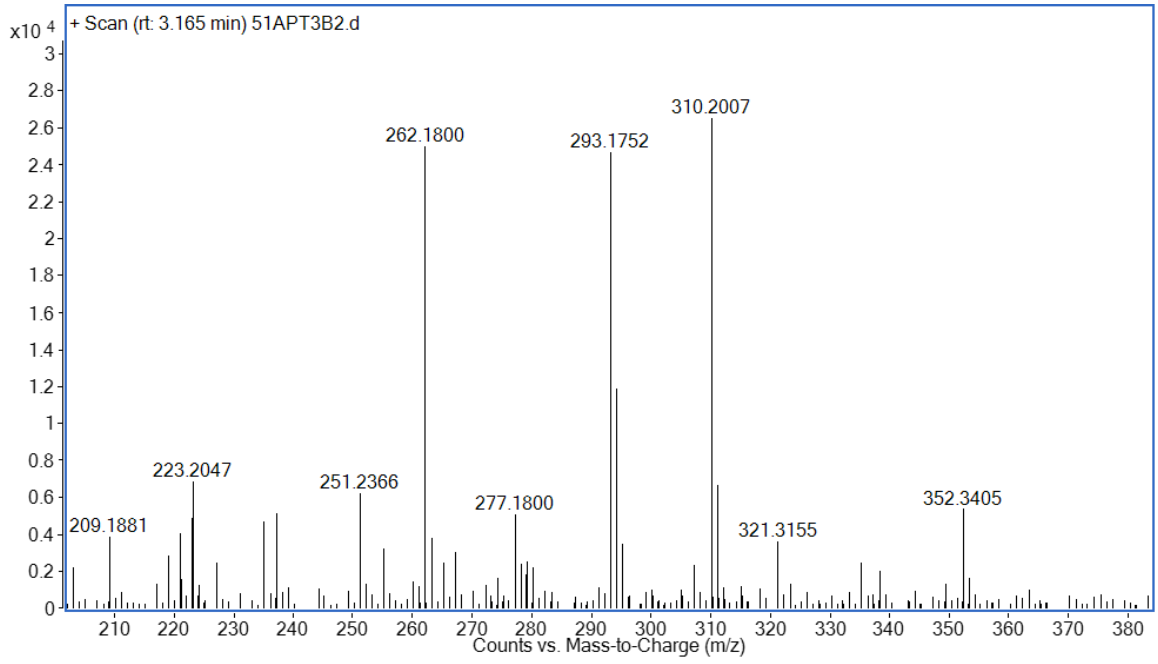


*Phụ lục 7. Limonoid, lignin glycoside, nucleoside, và sterol (64-67) từ chi
Paramignya*

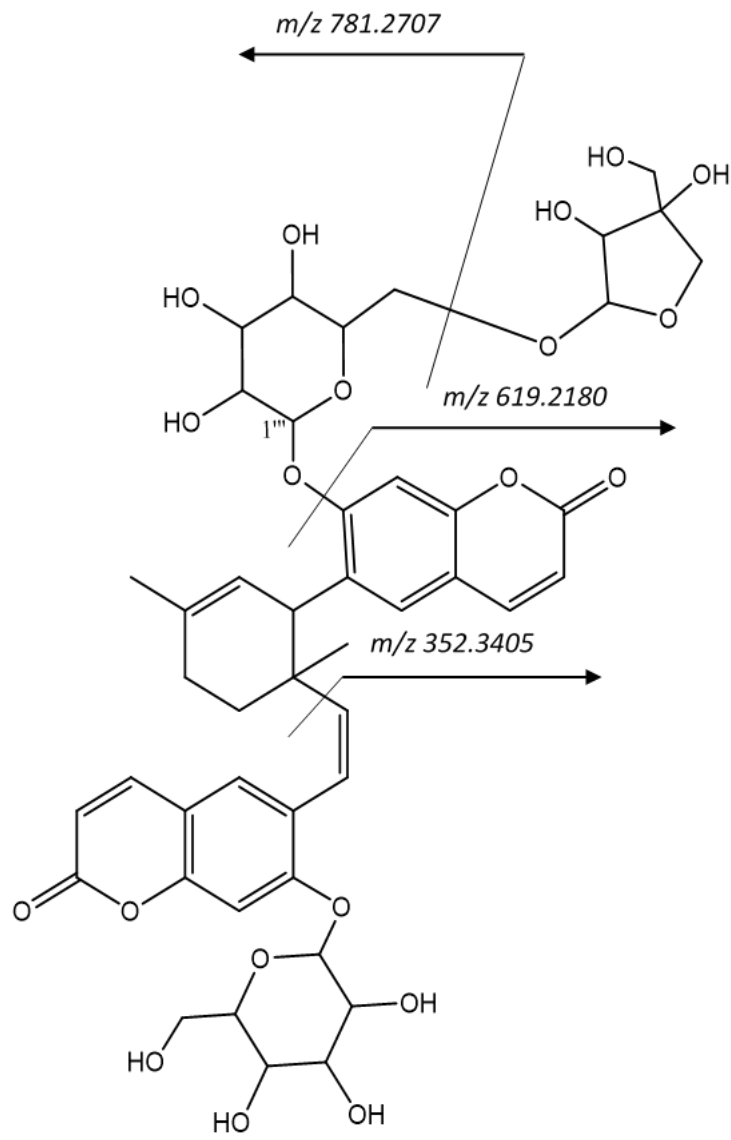


Phụ lục 8. Dữ liệu phổ HR-ESI-QTOF-MS của hợp chất 1

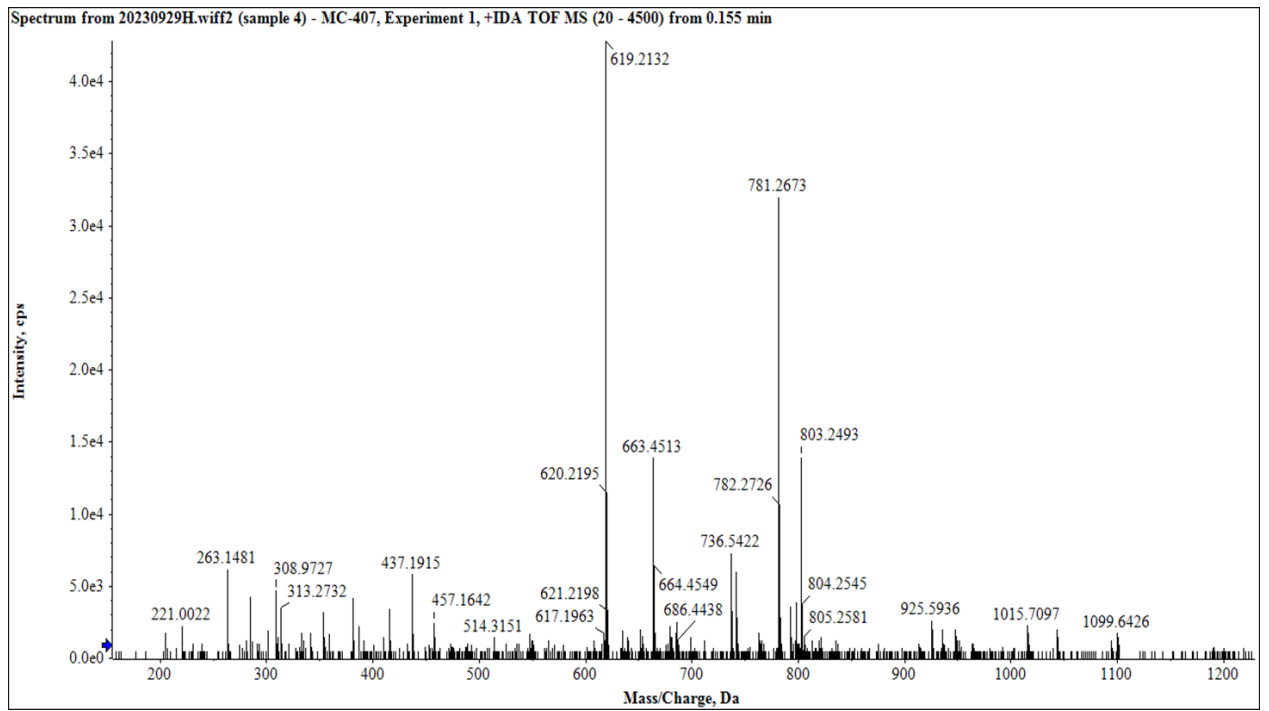




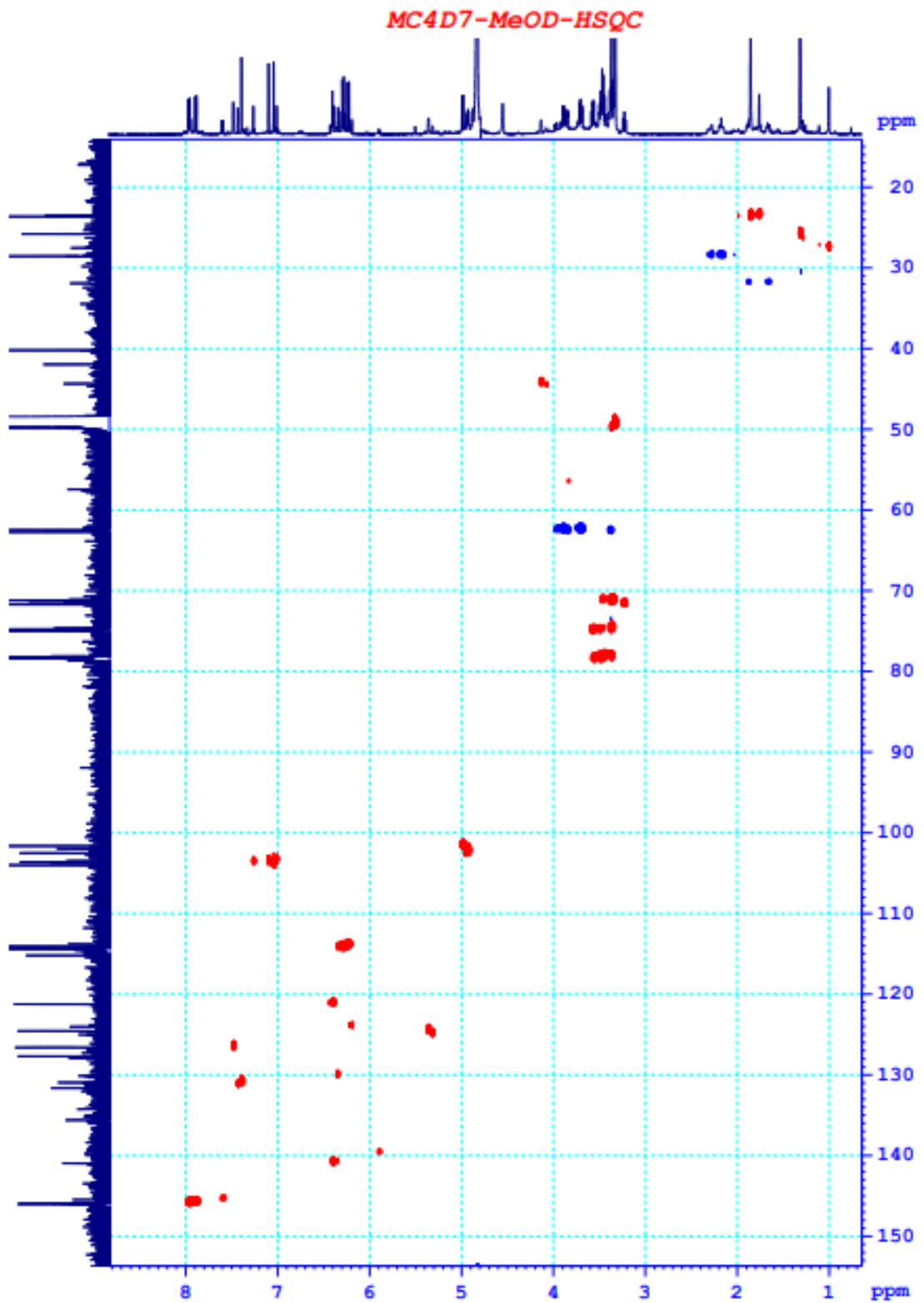
Phụ lục 9. Mảnh phân tử HR-MS-MS của hợp chất 1



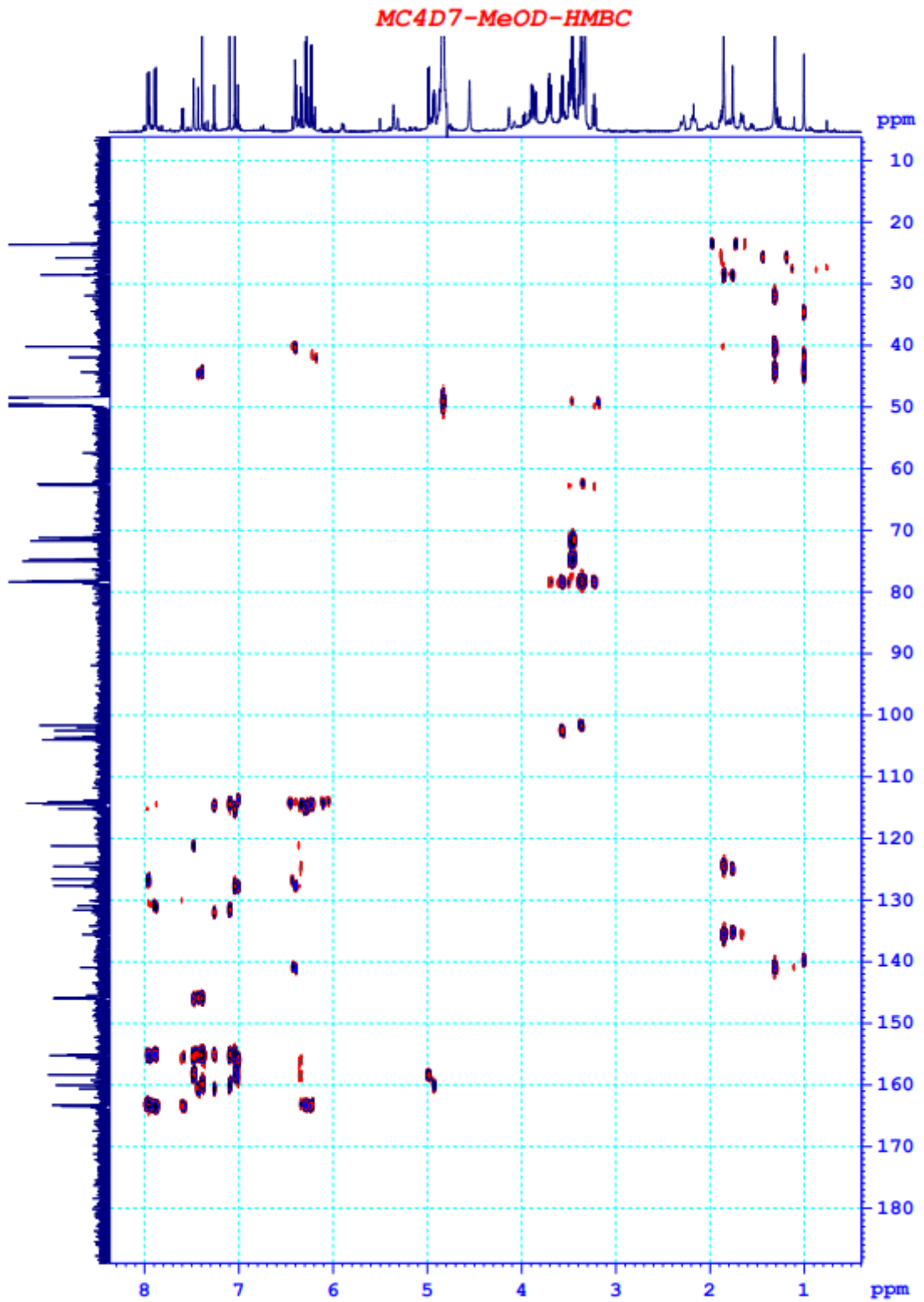
Phụ lục 10. Phổ HR-ESI-QTOF-MS của hợp chất 2



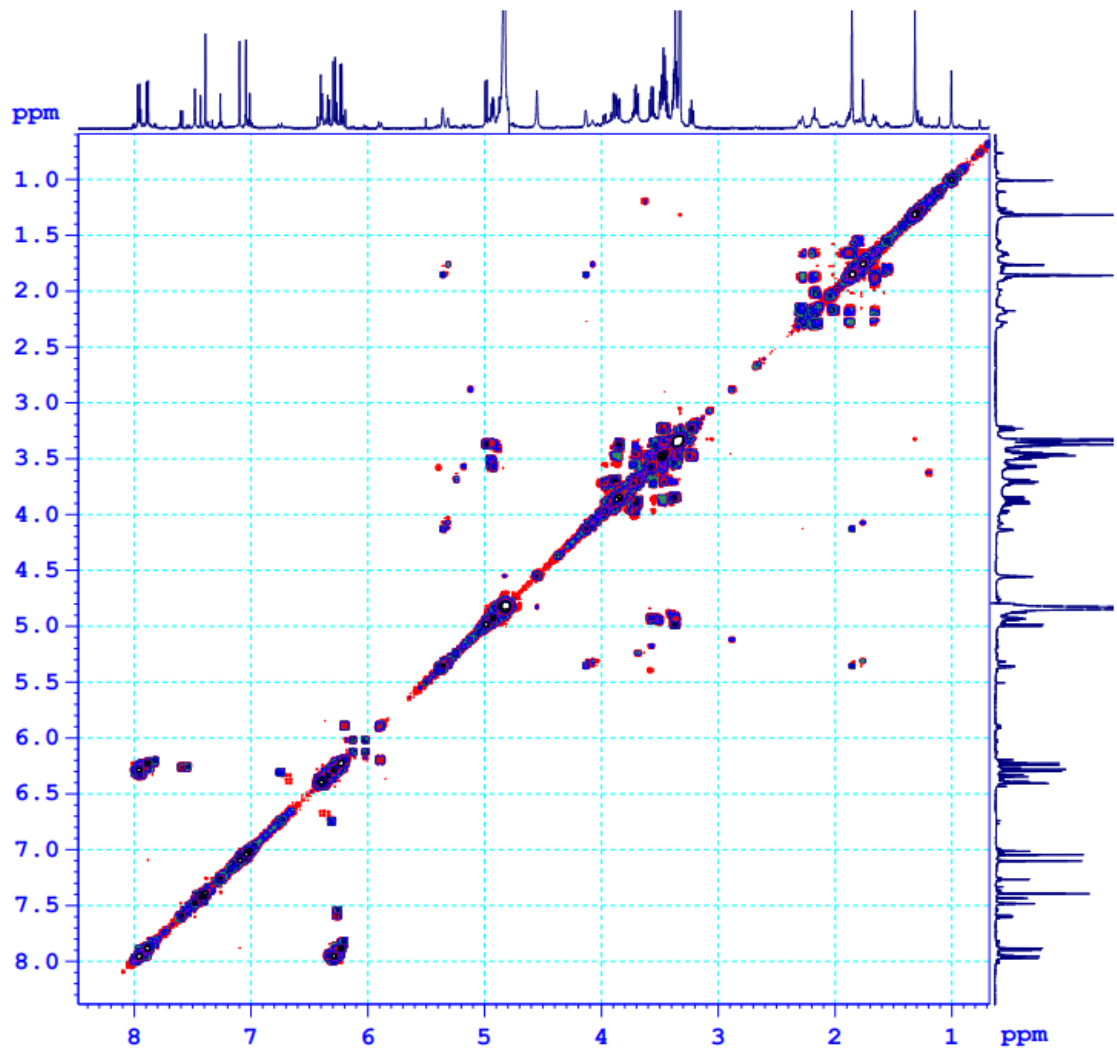
Phụ lục 11. Phổ HSQC của hợp chất 2



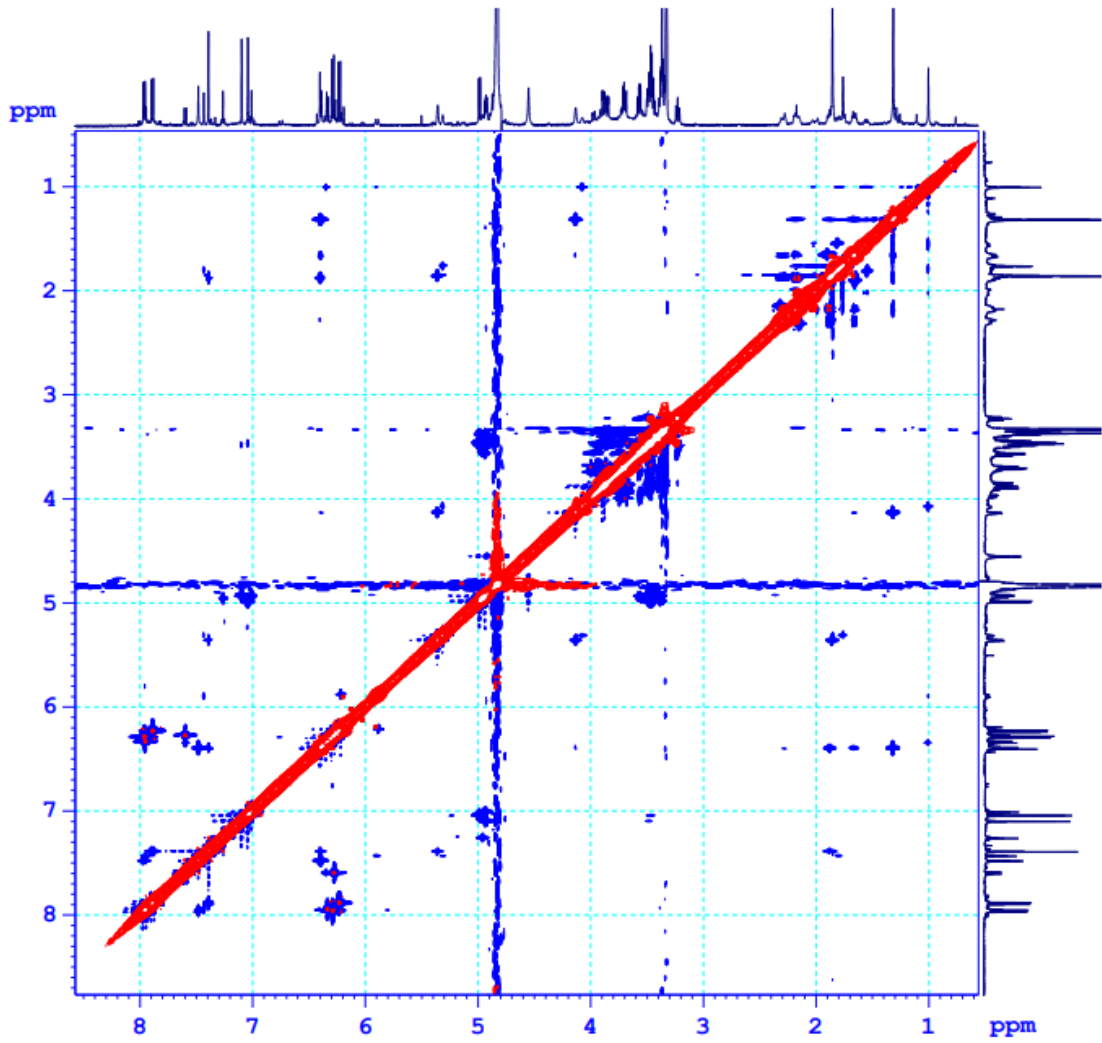
Phụ lục 12. Phổ HMBC của hợp chất 2



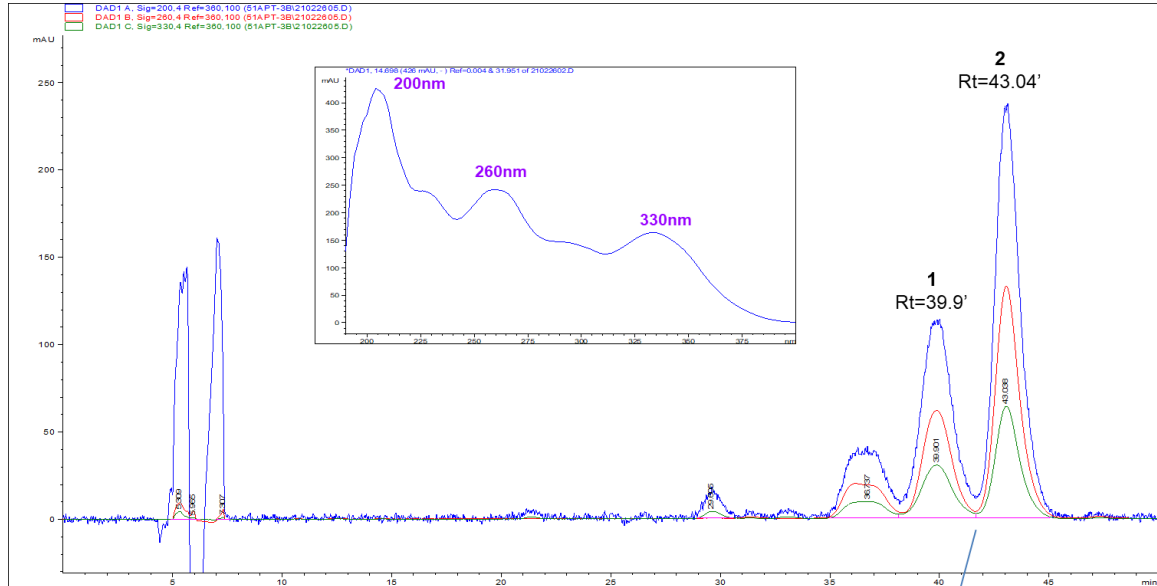
Phụ lục 13. Phổ COSY của hợp chất 2

MC4D7-MeOD-COSYGP

Phụ lục 14. Phổ NOESY của hợp chất 2

MC4D7-MeOD-NOESY

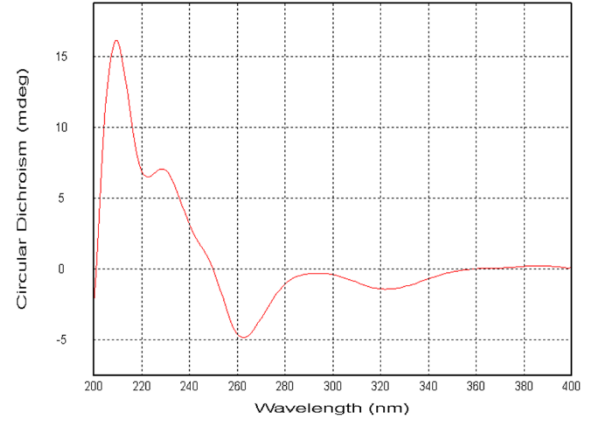
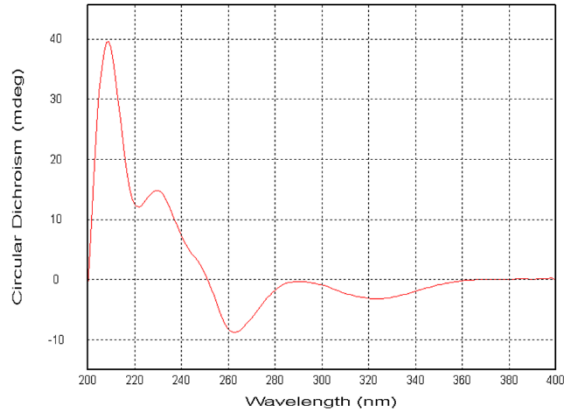
Phụ lục 15. Phổ đồ HPLC tách các hợp chất 1 và 2



HPLC condition: Agilent HPLC 1200
 Column: OptimaPak-C18 (10 x 250 mm, 10 μ m)
 Mobile phase: **ACN – H₂O+0,1%Fa = 26-74**
 Stop time: 50 min;
 Flow rate: 2 mL/min; Pressure: 143 bar
 UV spectrum: 200, 260, 330 nm

Pure compounds:
 51A-PT-3B1: 2,9 + 23,4 mg
 51A-PT-3B2: 13,6 + 24,2 mg

Phụ lục 16. Phổ CD của hai hợp chất 1 và 2



Phụ lục 17. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế ACE-2 của hai hợp chất 1 và 2 theo dải nồng độ

Hợp chất	Nồng độ $\mu\text{g/mL}$	Tỷ lệ ức chế ACE2 (%)
1	100	$103,11 \pm 0,42$
	50	$66,32 \pm 1,01$
	25	$47,33 \pm 0,89$
2	100	$74,67 \pm 0,35$
	50	$48,56 \pm 0,92$
	25	$33,01 \pm 1,35$