

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thanh Bình

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ
HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA HAI LOÀI
SÊN BIỂN *Aplysia dactylomela* VÀ *Aplysia oculifera* Ở VÙNG
BIỂN VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội – 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Phạm Thanh Bình

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ
HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA HAI LOÀI
SÊN BIỂN *Aplysia dactylomela* VÀ *Aplysia oculifera* Ở VÙNG
BIỂN VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9.44.01.14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Văn Thanh

2. TS. Nguyễn Hoài Nam

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “**Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của hai loài sên biển *Aplysia dactylomela* và *Aplysia oculifera* ở vùng biển Việt Nam**” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Phạm Thanh Bình

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài TDDLB0.05/20-22 và đề tài ĐLTE00.01/23-24. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành và sâu sắc và kính trọng tới thầy TS. Nguyễn Văn Thanh và TS. Nguyễn Hoài Nam, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong thời gian làm luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Học viện, Phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa học cùng tập thể cán bộ - các nhà khoa học của Viện đã quan tâm giúp đỡ và đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu thực hiện luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Nghiên cứu sinh vật biển - Viện Hóa học và các cộng sự đã tạo điều kiện giúp đỡ và có những lời khuyên bổ ích, những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận án.

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

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả

Phạm Thanh Bình

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	xi
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Giới thiệu về giống sên biển <i>Aplysia</i>	4
1.2. Những nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài sên thuộc giống <i>Aplysia</i>	5
1.2.1. Thành phần hóa học	5
1.2.1.1. Terpenoid	5
1.2.1.2. C-15 Acetogenin	15
1.2.1.3. Sterol	17
1.2.1.4. Alkaloid.....	18
1.2.1.5. Macrolide	19
1.2.2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học	20
1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư	20
1.2.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm	24
1.2.2.3. Một số hoạt tính khác.....	26
1.2.3. Một số nghiên cứu trong nước về loài sên thuộc giống <i>Aplysia</i>	27
1.3. Đặc điểm hai loài sên biển thuộc giống <i>Aplysia</i>	28
1.3.1. Đặc điểm loài sên biển <i>Aplysia dactylomela</i>	28
1.3.2. Đặc điểm loài sên biển <i>Aplysia oculifera</i>	29
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	31
2.1. Đối tượng nghiên cứu	31
2.1.1. Mẫu sên biển <i>Aplysia dactylomela</i> - đảo Phú Quý, Lâm Đồng	31
2.1.2. Mẫu sên biển <i>Aplysia dactylomela</i> – Đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi.....	31
2.1.3. Mẫu sên biển <i>Aplysia oculifera</i> – Lăng Cô, Huế	32
2.2. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu.....	32
2.2.1. Vật liệu và hóa chất nghiên cứu	32
2.2.2. Thiết bị nghiên cứu.....	33
2.3. Phương pháp nghiên cứu các hợp chất từ mẫu nghiên cứu	33
2.3.1. Phương pháp phân lập các hợp chất.....	33
2.3.1.1. Sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography - TLC)	34
2.3.1.2. Sắc ký cột (Column chromatography - CC)	34

2.3.1.3. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography- HPLC).....	34
2.3.2. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được	34
2.3.2.1. Độ quay cực ($[\alpha]_D$)	34
2.3.2.2. Phổ lưỡng sắc tròn (ECD).....	34
2.3.2.3. Phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS)	34
2.3.2.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)	34
2.3.2.5. Phương pháp tính toán ECD	35
2.3.2.6. Phương pháp tính toán phổ NMR	36
2.3.3. Phương pháp thử gây độc tế bào ung thư (Phương pháp MTT)	37
2.4. Thực nghiệm	38
2.4.1. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu từ đảo Phú Quý, Lâm Đồng	38
2.4.2. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu từ đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi.....	40
2.4.3. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển <i>A. oculifera</i> thu ở Lăng Cô, Huế.....	43
2.5. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được	46
2.5.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng.....	46
2.5.1.1. Hợp chất ADA1 : Dactylomelanin C (chất mới)	46
2.5.1.2. Hợp chất ADA2 : Dactylomelanin D (chất mới)	46
2.5.1.3. Hợp chất ADA3 : Dactylomelanin E (chất mới)	46
2.5.1.4. Hợp chất ADA4 : (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one	47
2.5.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu ở đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi.....	47
2.5.2.1. Hợp chất ADB1 : Elatol.....	47
2.5.2.2. Hợp chất ADB2 : Aplydactylonin I (chất mới)	47
2.5.2.3. Hợp chất ADB3 : Aplydactylonin K (chất mới).....	48
2.5.2.4. Hợp chất ADB4 : Aplydactylonin G (chất mới).....	48
2.5.2.5. Hợp chất ADB5 : Aplydactylonin H (chất mới).....	48
2.5.2.6. Hợp chất ADB6 : Aplydactylonin F (chất mới)	49
2.5.2.7. Hợp chất ADB7 : Aplydactylonin E (chất mới)	49
2.5.2.8. Hợp chất ADB8 : [3(15) <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol.....	49
2.5.2.9. Hợp chất ADB9 : Pacifidiene	50

2.5.2.10. Hợp chất ADB10 : 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon	50
2.5.2.11. Hợp chất ADB11 : Aplydactylonin D (chất mới).....	50
2.5.2.12. Hợp chất ADB12 : Thyrsiferol	50
2.5.3. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển <i>A. oculifera</i> thu ở Lăng Cô, Huế	51
2.5.2.1. Hợp chất AOB1 : Oculiferanin A (chất mới)	51
2.5.2.2. Hợp chất AOB2 : Oculiferanin B (chất mới)	51
2.5.2.3. Hợp chất AOB3 : Oculiferanin C (chất mới)	51
2.5.2.4. Hợp chất AOB4 : Oculiferanin D (chất mới)	52
2.5.2.5. Hợp chất AOB5 : Oculiferanin E (chất mới).....	52
2.5.2.6. Hợp chất AOB6 : Oculiferanin F (chất mới).....	53
2.5.2.7. Hợp chất AOB7 : Oculiferanin G (chất mới)	53
2.6. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được	53
2.6.1. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i>	53
2.6.2. Thử nghiệm thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A. oculifera</i>	54
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	55
3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được	55
3.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng	55
3.1.1.1. Hợp chất ADA1 : Dactylomelanin C (chất mới)	55
3.1.1.2. Hợp chất ADA2 : Dactylomelanin D (chất mới).....	62
3.1.1.3. Hợp chất ADA3 : Dactylomelanin E (chất mới)	64
3.1.1.4. Hợp chất ADA4 : (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one	65
3.1.2. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ mẫu sên <i>A. dactylomela</i> thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng	67
3.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> thu ở Lý Sơn, Quảng Ngãi	68
3.1.3.1. Hợp chất ADB1 : Elatol.....	68
3.1.3.2. Hợp chất ADB2 : Aplydactylonin I (chất mới)	69
3.1.3.3. Hợp chất ADB3 : Aplydactylonin K (chất mới).....	72
3.1.3.4. Hợp chất ADB4 : Aplydactylonin G (chất mới).....	74
3.1.3.5. Hợp chất ADB5 : Aplydactylonin H (chất mới).....	76

3.1.3.6. Hợp chất ADB6 : Aplydactylonin F (chất mới)	79
3.1.3.7. Hợp chất ADB7 : Aplydactylonin E (chất mới)	81
3.1.3.8. Hợp chất ADB8 : [3(15) <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>]-10,15-dibromochamigra- 3(15),4,7(14)-trien-9-ol.....	84
3.1.3.9. Hợp chất ADB9 : pacifidiene.....	86
3.1.3.10. Hợp chất ADB10 : 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon	87
3.1.3.11. Hợp chất ADB11 : aplydactylonin D (chất mới).....	89
3.1.3.12. Hợp chất ADB12 : Thyriferol	92
3.1.4. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ mẫu sên <i>A. dactylomela</i> thu ở Lý Sơn, Quảng Ngãi.....	94
3.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A.</i> <i>oculifera</i> thu ở Lăng Cô, Huế.....	96
3.1.3.1. Hợp chất AOB1 : oculiferanin A (chất mới)	96
3.1.3.2. Hợp chất AOB2 : oculiferanin B (chất mới)	103
3.1.3.3. Hợp chất AOB3 : oculiferanin C (chất mới)	106
3.1.3.4. Hợp chất AOB4 : oculiferanin D (chất mới)	110
3.1.3.5. Hợp chất AOB5 : oculiferanin E (chất mới).....	113
3.1.3.6. Hợp chất AOB6 : oculiferanin F (chất mới).....	115
3.1.3.7. Hợp chất AOB7 : oculiferanin G (chất mới)	119
3.1.4. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ loài sên biển <i>A. oculifera</i>	122
3.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được	122
3.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ mẫu sên biển <i>A. dactylomela</i> – Phú Quý, Lâm Đồng	122
3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ mẫu sên biển <i>A. dactylomela</i> – Lý Sơn, Quảng Ngãi	123
3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài sên biển <i>A. oculifera</i>	126
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	127
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	129
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	130
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	131
PHỤ LỤC.....	141

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
^{13}C NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
A-549	Human lung cancer cell line	Dòng tế bào ung thư phổi ở người
C.C	Chromatography column	Sắc ký cột
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ tương tác 2 chiều đồng hạt nhân ^1H - ^1H
CTPT		Công thức phân tử
CH_2Cl_2	Dichloromethane	Dung môi dichloromethane
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM
DMSO	Dimethylsulfoxide	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
DPPH	1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl	1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC_{50}	Effective concentration of 50%	Nồng độ hiệu quả tối đa 50% đối tượng thử nghiệm
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy	Phổ khối phun mù điện tử
EtOAc	Ethyl acetate	Dung môi ethyl acetate
EtOH	Ethanol	Dung môi ethanol
Hela	Cervical cancer	Dòng tế bào ung thư cổ tử cung
HepG-2	Human liver cell line	Dòng tế bào ung thư gan người
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HR-ESI-MS	High resolution electrospray Ionization mass spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IC_{50}	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại

KB	Human epidemic carcinoma	Dòng tế bào ung thư biểu mô miệng người
MCF-7	Human breast cancer cell line	Dòng tế bào ung thư vú ở người
Me		Nhóm methyl
MeOH	Methanol	Dung môi methanol
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MPLC	Medium Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng trung áp
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ hiệu ứng hạt nhân Overhauser
OD	Optical density	Mật độ quang
OMe		Nhóm methoxy
PC3	Human prostate carcinoma cell	Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt
ppm	Part per million	Phần triệu
PTLC	Preparation Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng điều chế
ROESY	Rotational Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ hiệu ứng Overhauser hạt nhân khung xoay
SK-LU-1	Human lung carcinoma	Dòng tế bào ung thư phổi ở người
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	(CH ₃) ₄ Si
UV	Ultraviolet	Phổ tử ngoại
δ_H , δ_C		Độ chuyển dịch hóa học của proton, carbon

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các loài sên biển thuộc giống <i>Aplysia</i>	4
Bảng 1.2. Một số hợp chất monoterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	5
Bảng 1.3. Một số hợp chất sesquiterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	7
Bảng 1.4. Một số hợp chất diterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	13
Bảng 1.5. Một số hợp chất triterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	15
Bảng 1.6. Các hợp chất C-15 Acetogenin phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	16
Bảng 1.7. Một số hợp chất steroid phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	18
Bảng 1.8. Một số hợp chất alkaloid phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	19
Bảng 1.9. Một số hợp chất macrolide phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	20
.....	
Bảng 3.1. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADA1	57
Bảng 3.2. Phổ ^1H , ^{13}C -NMR thực nghiệm và phổ tính toán cho hợp chất ADA1	61
Bảng 3.3. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADA2	62
Bảng 3.4. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADA3	64
Bảng 3.5. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADA4	66
Bảng 3.6. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB1	68
Bảng 3.7. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB2	70
Bảng 3.8. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB3	72
Bảng 3.9. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB4	75
Bảng 3.10. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB5	77
Bảng 3.11. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB6	80
Bảng 3.12. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB7	82
Bảng 3.13. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB8	85
Bảng 3.14. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB9	87
Bảng 3.15. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB10	88
Bảng 3.16. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB11	90
Bảng 3.17. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất ADB12	93
Bảng 3.18. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB1	99
Bảng 3.19. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB1 (đo trong CD_3OD)	102
Bảng 3.20. Số liệu phổ NMR của hợp chất AOB2	104
Bảng 3.21. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB3	108
Bảng 3.22. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB4	111
Bảng 3.23. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB5	115
Bảng 3.24. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB6	117
Bảng 3.25. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất AOB7	121

Bảng 3.26. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài <i>A. dactylomela</i>	123
Bảng 3.27. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài <i>A. dactylomela</i> - Lý Sơn, Quảng Ngãi.....	125
Bảng 3.28. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài <i>A. oculifera</i>	126

DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Cấu trúc một số hợp chất monoterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	7
Hình 1.2. Cấu trúc một số hợp chất chamigrane sesquiterpene phân lập từ giống <i>Aplysia</i>	11
Hình 1.3. Cấu trúc một số hợp chất chamigrane sesquiterpene (tiếp)	12
Hình 1.4. Cấu trúc một số hợp chất bisabolane sesquiterpene	12
Hình 1.5. Cấu trúc một số hợp chất laurencia sesquiterpene	12
Hình 1.6. Cấu trúc một số hợp chất brasilane và omphalane sesquiterpene	13
Hình 1.7. Cấu trúc một số hợp chất eudesmane và snyderane sesquiterpene	13
Hình 1.8. Cấu trúc một số hợp chất diterpene	14
Hình 1.9. Cấu trúc một số hợp chất triterpene	15
Hình 1.10. Cấu trúc một số hợp chất C-15 acetogenin	17
Hình 1.11. Cấu trúc một số hợp chất sterol	18
Hình 1.12. Cấu trúc một số hợp chất alkaloid	19
Hình 1.13. Cấu trúc một số hợp chất macrolide	20
Hình 1. 14. Các hợp chất phân lập từ sên biển <i>A. dactylomela</i> – Hòn Mê, Thanh Hóa	27
Hình 1. 15. Các hợp chất phân lập từ sên biển <i>A. dactylomela</i> – Phú Quý, Lâm Đồng	27
.....	
Hình 2.1. Sên biển <i>A. dactylomela</i> – Phú Quý, Lâm Đồng	31
Hình 2.2. Sên biển <i>A. dactylomela</i> – Lý Sơn, Quảng Ngãi	31
Hình 2.3. Sên biển <i>A. oculifera</i> – Lăng Cô, Huế	32
Hình 2.4. Sơ đồ các bước tính toán ECD	35
Hình 2.5. Sơ đồ tính toán NMR	36
Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ sên biển <i>A. dactylomela</i>	39
Hình 2.7. Sơ đồ chiết phân đoạn sên biển <i>A. dactylomela</i> thu từ Quảng Ngãi	40
Hình 2.8. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn chiết <i>n</i> -hexane của sên biển <i>A. dactylomela</i>	41
Hình 2. 9. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn dichloromethane của sên biển <i>A. dactylomela</i>	42
Hình 2.10. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ sên biển <i>A. oculifera</i>	44
.....	
Hình 3.1. Cấu trúc hợp chất ADA1 và chất tham khảo	55
Hình 3.2. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất ADA1	55
Hình 3.3. Phổ ¹ H-NMR của hợp chất ADA1	56
Hình 3.4. Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất ADA1	56

Hình 3.5. Phổ HSQC của hợp chất ADA1	57
Hình 3.6. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và phổ COSY (—) của hợp chất ADA1	58
Hình 3.7. Phổ HMBC của hợp chất ADA1	58
Hình 3. 8. Phổ COSY của hợp chất ADA1	58
Hình 3.9. Phổ NOESY của hợp chất ADA1	59
Hình 3.10. Tương tác phổ NOESY của hợp chất ADA1	60
Hình 3.11. Phân tích hồi quy tuyến tính của độ dịch chuyển hóa học thực nghiệm so với tính toán của 1a và 1b	60
Hình 3.12. Tính toán ECD của hợp chất ADA1	62
Hình 3.13. Cấu trúc hợp chất ADA2	62
Hình 3.14. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và phổ COSY (—) và NOESY ($\longleftrightarrow$) của hợp chất ADA2	63
Hình 3.15. Tính toán ECD của hợp chất ADA2	64
Hình 3.16. Cấu trúc hợp chất ADA3	64
Hình 3.17. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$), COSY (—) và phổ NOESY của hợp chất ADA3	65
Hình 3.18. Cấu trúc hợp chất ADA4	65
Hình 3.19. Tính toán ECD của hợp chất ADA4	67
Hình 3. 20. Cấu trúc các hợp chất từ mẫu sên <i>A. dactylomela</i> - Phú Quý, Lâm Đồng	67
Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất ADB1	68
Hình 3.22. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) của hợp chất ADB1	69
Hình 3.23. Cấu trúc của hợp chất ADB2 và chất tham khảo	69
Hình 3.24. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB2	71
Hình 3.25. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất ADB2	71
Hình 3.26. Cấu trúc của hợp chất ADB3 và chất tham khảo	72
Hình 3. 27. Tương tác phổ HMBC chính ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB3	73
Hình 3.28. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất ADB3	74
Hình 3.29. Cấu trúc của hợp chất ADB4 và chất tham khảo	74
Hình 3.30. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB4	76
Hình 3.31. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất ADB4	76
Hình 3.32. Cấu trúc của hợp chất ADB5 và chất tham khảo	76
Hình 3.33. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB5	78
Hình 3.34. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất ADB5	78
Hình 3.35. Cấu trúc hợp chất ADB6 và chất tham khảo	79
Hình 3.36. Tương tác chính HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của ADB6	81

Hình 3.37. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất ADB6	81
Hình 3.38. Cấu trúc của hợp chất ADB7 và chất tham khảo	81
Hình 3.39. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB7	83
Hình 3.40. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất ADB7	83
Hình 3.41. Quá trình acetal một hợp chất hữu cơ có nhóm aldehyde (-CHO)	84
Hình 3.42. Cấu trúc của hợp chất ADB8	84
Hình 3.43. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) của hợp chất ADB8	85
Hình 3.44. Cấu trúc của hợp chất ADB9	86
Hình 3.45. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) chính và COSY (—) của hợp chất ADB9	86
Hình 3.46. Cấu trúc của hợp chất ADB10	87
Hình 3.47. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) của hợp chất ADB10	89
Hình 3.48. Cấu trúc của hợp chất ADB11	89
Hình 3.49. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) và phổ ECD của hợp chất ADB11	91
Hình 3.50. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$) của hợp chất ADB11	92
Hình 3.51. Cấu trúc của hợp chất ADB12	92
Hình 3.52. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất ADB12	94
Hình 3.53. Cấu trúc các hợp chất từ loài sên biển <i>A. dactylomela</i> – Lý Sơn, Quảng Ngãi	95
Hình 3.54. So sánh sự giống và khác nhau các lớp chất phân lập được từ hai mẫu sên biển <i>A. dactylomela</i> thu ở hai địa điểm Lâm Đồng và Quảng Ngãi	96
Hình 3.55. Cấu trúc hợp chất AOB1	96
Hình 3.56. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất AOB1	96
Hình 3.57. Phổ ^1H -NMR của hợp chất AOB1	97
Hình 3.58. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AOB1	98
Hình 3.59. Phổ HSQC của hợp chất AOB1	98
Hình 3.60. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB1	100
Hình 3.61. Phổ HMBC của hợp chất AOB1	100
Hình 3.62. Tương tác NOESY($\longleftrightarrow$) trên hợp chất AOB1	101
Hình 3.63. Phổ NOESY của hợp chất AOB1 (dung môi CD_3OD)	101
Hình 3.64. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán theo lý thuyết của hợp chất AOB1	103
Hình 3.65. Cấu trúc hợp chất AOB2	103
Hình 3.66. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB2	105
Hình 3.67. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB2	106
Hình 3.68. Cấu trúc hợp chất AOB3	106

Hình 3.69. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất AOB3	107
Hình 3.70. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB3	109
Hình 3.71. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB3	109
Hình 3.72. Tương tác HMBC($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB4	110
Hình 3.73. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB4	112
Hình 3.74. Cấu trúc hợp chất AOB5	113
Hình 3.75. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB5	114
Hình 3.76. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB5	114
Hình 3.77. Cấu trúc của hợp chất AOB6	116
Hình 3.78. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB6	116
Hình 3.79. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB6	118
Hình 3.80. Cấu trúc hợp chất AOB7	119
Hình 3.81. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất AOB7	120
Hình 3.82. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất AOB7	120
Hình 3.83. Cấu trúc hóa học các hợp chất AOB1 - AOB7	122
Hình 3.84. So sánh cấu trúc hai hợp chất ADB4 và ADB5	124

MỞ ĐẦU

Ngày nay sự xuất hiện của bệnh ung thư đang gia tăng theo thời gian. Ung thư là thuật ngữ chung chỉ nhóm các bệnh có thể ảnh hưởng bất kỳ bộ phận nào trên cơ thể. Các thuật ngữ khác hay dùng là khối u ác tính và khối u tân sinh. Ung thư là sự hình thành nhanh chóng các tế bào bất thường, phát triển vượt ngoài ranh giới bình thường của chúng, sau đó xâm lấn đến các bộ phận khác cũng như các cơ quan khác của cơ thể (quá trình di căn). Di căn cũng là nguyên nhân gây tử vong chính do bệnh ung thư.

Theo tổ chức y tế thế giới (WHO) công bố về bệnh ung thư cho thấy có khoảng 9,7 triệu người tử vong và khoảng 20 triệu người mắc mới trong năm 2020 [1]. Ung thư là khối u ác tính được đặc trưng bởi sự xâm lấn mô tại chỗ và/hoặc các quá trình di căn xa. Ở giai đoạn đầu của quá trình phát triển ung thư, phẫu thuật hoặc phẫu thuật kết hợp với xạ trị hỗ trợ có thể chữa khỏi trong hầu hết các trường hợp. Khi ung thư đã phát triển hơn và xâm lấn các mô khác, hóa trị toàn thân (uống hoặc tiêm tĩnh mạch) được bổ sung vào phẫu thuật và xạ trị để loại bỏ các tế bào ung thư bị cô lập và/hoặc các phân nhóm tế bào ung thư chưa được loại bỏ hoặc tiêu diệt. Theo nguyên tắc chung (luôn có ngoại lệ), ung thư càng tiến triển tại thời điểm chẩn đoán thì hóa trị hỗ trợ hoặc đa hóa trị sẽ được áp dụng càng mạnh. Bởi vậy việc tìm kiếm thuốc đặc trị cũng như thuốc hỗ trợ điều trị ung thư và các tác nhân dự phòng hóa học là hết sức cần thiết và cấp bách.

Nhân loại đang gấp rút nghiên cứu, tìm kiếm để phát hiện ra những hợp chất từ thiên nhiên cũng như tổng hợp có hoạt tính tốt và điều trị thuốc phòng cũng như điều trị ung thư. Mới chỉ có 15 sản phẩm thuốc có nguồn gốc từ các loài hải miên, hải tiêu, vi sinh vật, cá và động vật thân mềm được FDA chấp thuận [2]. Các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên chiếm tỷ lệ lớn trong dược điển hiện tại, với khoảng 70% thuốc kháng sinh và thuốc chống ung thư hiện đang sử dụng có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên, chẳng hạn như thực vật và vi khuẩn [3]. Trong khi các loại thuốc có nguồn gốc từ thực vật có lịch sử ghi chép hơn 5.000 năm và các loại thuốc có nguồn gốc từ vi khuẩn đã được sử dụng trong gần một thế kỷ, thì các hoạt chất từ nguồn sinh vật biển gần đây mới được nghiên cứu như các loại thuốc mới [3]. Đến nay đã có 15 loại dược phẩm có nguồn gốc từ biển được FDA (Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ) phê duyệt lâm sàng, chủ yếu để điều trị ung thư và do NCI (Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ) tài trợ từ những năm 1960 [2].

Khoảng 39.560 hợp chất có hoạt tính sinh học được bắt nguồn từ động vật biển như Bọt biển, San hô mềm, động vật Da gai, Sên biển và các sinh vật biển khác đã được công bố [4]. Trong đó, ngành thân mềm có nhiều chủng loại rất đa dạng, phong phú và là nhóm động vật biển lớn nhất chiếm khoảng 23% tổng số các sinh vật biển đã được đặt tên. Trong các khu vực nhiệt đới, bao gồm Việt Nam, ngành này có hơn 90 nghìn loài hiện hữu, trong đó có các loài như trai, sò, ốc, hến, ngao, mực, bạch tuộc... Cùng với giá trị kinh tế, sự đa dạng phong phú đã cho thấy tiềm năng khai thác rất lớn của các loài động vật Thân mềm, đặc biệt là những loài sên biển (thỏ biển). Từ một số loài sên biển được nghiên cứu đã tìm thấy nhiều hoạt chất đáng quý, trong đó có một số hoạt chất đã được ứng dụng trong thử nghiệm lâm sàng và làm thuốc điều trị bệnh. Như hợp chất dolastatin để sản xuất thuốc Brentuximab vedotin (Adcetris®) điều trị ung thư gan, hợp chất Jorumycin tổng hợp thành thuốc (Zalypsis®) thử nghiệm lâm sàng pha II điều trị ung thư biểu mô, đa u tủy, tử cung, hợp chất kahalalide F được tổng hợp thành elisidepsin (PM02734), hợp chất này được thử nghiệm lâm sàng pha II điều trị ung thư vú và ung thư máu.

Đất nước Việt Nam có đường bờ biển dài trên 3000 km, hơn 3.000 đảo lớn nhỏ, trong đó có hai quần đảo Hoàng Sa, Trường Sa, với vùng đặc quyền kinh tế rộng khoảng 1 triệu km², gấp 3 lần diện tích đất liền theo Công ước của Liên hợp quốc về Luật Biển năm 1982 (UNCLOS). Đây là tiền đề quan trọng để Việt Nam phát triển kinh tế đa ngành, đa mục tiêu, đẩy mạnh giao thương hàng hải trong nước và quốc tế. Trong quá trình nghiên cứu, nghiên cứu sinh đã khảo sát về động vật thân mềm, cụ thể là loài sên biển *Aplysia dactylomela* và cho thấy một số chất có hoạt tính mạnh gây độc lên tế bào ung thư. Tuy nhiên, ở nước ta chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học, mới chỉ có một số nghiên cứu trong vài năm gần đây. Vì vậy để tiếp tục nghiên cứu về động vật thân mềm, cụ thể là loài sên biển nhằm phát hiện ra những hợp chất có hoạt tính sinh học cũng như có thể ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư thì tôi đã lựa chọn đề tài **“Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của hai loài sên biển *Aplysia dactylomela* và *Aplysia oculifera* ở vùng biển Việt Nam”**. Luận án gồm các mục tiêu cũng như các nội dung như sau:

- Mục tiêu của luận án:

1. Phân lập và xác định được cấu trúc hóa học các hợp chất từ hai loài sên biển *Aplysia dactylomela* và *Aplysia oculifera*.

2. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư ở người của các hợp chất phân lập được nhằm tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học, làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu y - sinh - dược học tiếp theo.

- Nội dung của luận án:

1. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *Aplysia dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng.

2. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *Aplysia dactylomela* thu ở đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi.

3. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *Aplysia oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế.

4. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư người từ [Ba dòng tế bào ung thư là: ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (A549) và ung thư vú (MCF-7)] với các hợp chất đã phân lập được từ hai mẫu sên biển *Aplysia dactylomela*.

5. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư người từ [Ba dòng tế bào ung thư là: ung thư gan (Hep-G2), ung thư cổ tử cung (Hela) và ung thư vú (MCF-7)] với các hợp chất đã phân lập được từ loài *Aplysia oculifera*.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về giống sên biển *Aplysia*

Sên biển thuộc giống *Aplysia* trên thế giới có khoảng 40 loài, thuộc họ Aplysiidae, bộ Anaspidea, lớp chân bụng Gastropoda, ngành động vật thân mềm Molluses. Sên biển thuộc giống *Aplysia* (Gastropoda: Opisthobranchia) có tuổi thọ ngắn, tốc độ tăng trưởng nhanh và sản lượng trứng cao [5]. Những con non sinh trưởng nhanh trong khoảng thời gian hai tuần đầu và từng con sên biển có thể đẻ nhiều hơn 10^8 trứng trong suốt vòng đời của chúng [5]. Sên biển cũng cho thấy sự biến đổi lớn về tốc độ tăng trưởng và kích thước cơ thể tối đa ở các quần thể cùng loài khác nhau sống ở các địa điểm hoặc thời gian khác nhau hoặc trong các điều kiện môi trường khác nhau [6, 7]. Những dữ liệu này cho thấy *Aplysia* sp. có năng suất tiềm năng cao và sống trong các điều kiện môi trường khác nhau.

Sên biển phân bố rộng khắp các châu lục, ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [8]. Ở Việt Nam, sên biển phân bố ở các vùng biển Thanh Hóa, Quảng Bình, Quảng Ngãi, Nha Trang... Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về sinh thái cũng như thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Một số hợp chất từ sên biển đã có những hoạt tính tốt và được làm thuốc chống ung thư. Lớp chất chính của chúng là terpenoid, ngoài ra còn một số lớp chất như alkaloid, sterol, macrolid...

Bảng 1.1. Danh sách các loài sên biển thuộc giống *Aplysia*

STT	Loài	STT	Loài	STT	Loài
1	<i>A. angasi</i>	15	<i>A. gigantea</i>	28	<i>A. perfata</i>
2	<i>A. brasiliana</i>	16	<i>A. gracilis</i>	29	<i>A. rehderi</i>
3	<i>A. californica</i>	17	<i>A. inca</i>	30	<i>A. reticulata</i>
4	<i>A. cedrosensis</i>	18	<i>A. juliana</i>	31	<i>A. reticulopoda</i>
5	<i>A. cervina</i>	19	<i>A. keraudreni</i>	32	<i>A. robertsi</i>
6	<i>A. corrigera</i>	20	<i>A. kurodai</i>	33	<i>A. rudmani</i>
7	<i>A. cronullae</i>	21	<i>A. maculata</i>	34	<i>A. sagamiana</i>
8	<i>A. dactylomela</i>	22	<i>A. morio</i>	35	<i>A. sowerbyi</i>
9	<i>A. denisoni</i>	23	<i>A. nigra</i>	36	<i>A. sydneyensis</i>
10	<i>A. depilans</i>	24	<i>A. oculifera</i>	37	<i>A. tanzannensis</i>
11	<i>A. dura</i>	25	<i>A. parvula</i>	38	<i>A. vaccaria</i>
12	<i>A. euchlora</i>	26	<i>A. pulmonica</i>	39	<i>A. willcoxi</i>
13	<i>A. extraordinaria</i>	27	<i>A. punctata</i>	40	<i>A. winneba</i>
14	<i>A. fasciata</i>				

1.2. Những nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài sên thuộc giống *Aplysia*

Những kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học từ loài sên biển *Aplysia* cho thấy chúng rất đa dạng và phong phú. Sên biển *Aplysia* là động vật thân mềm ăn rong, tảo... đã được chứng minh là nguồn cung cấp chất chuyển hóa thứ cấp phong phú, có nguồn gốc chủ yếu từ chế độ ăn uống. Phần lớn các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ loài sên *Aplysia* là các terpene được halogen hóa, bên cạnh đó những động vật này còn chứa các lớp chất khác như macrolide, sterol, alkaloid... Gắn liền với những hợp chất trên thường thể hiện các hoạt tính gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng vi sinh vật và kháng vi rút... Một số hợp chất tiêu biểu cho các lớp chất được phân lập từ sên *Aplysia* được thống kê sau đây.

1.2.1. Thành phần hóa học

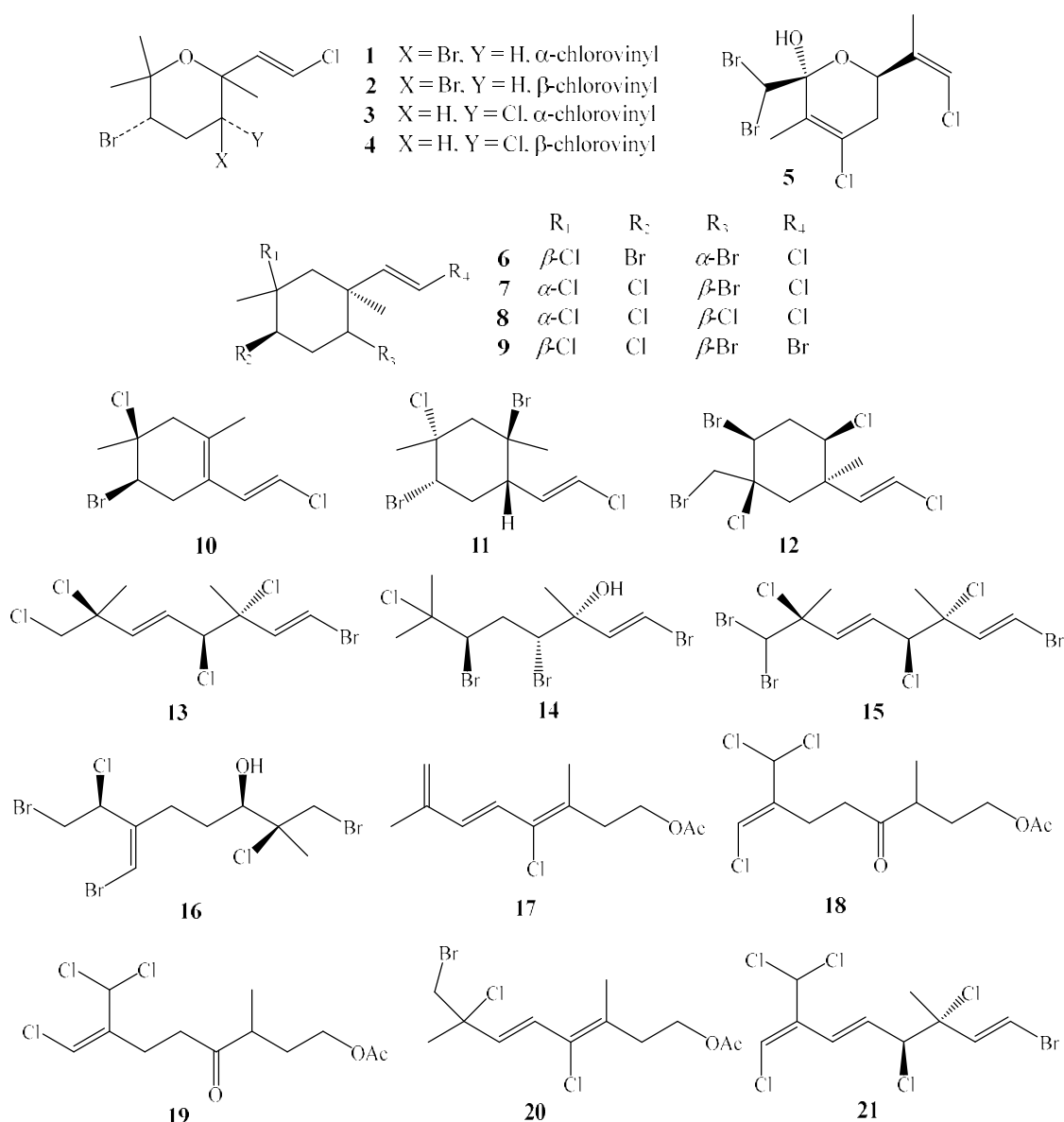
1.2.1.1. Terpenoid

Những halogen monoterpene có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng. Các loài *Aplysia* được biết đến có rất nhiều monoterpene được thể nhiều halogen, nguồn gốc của chúng cơ bản là ở tảo đỏ thuộc các chi *Laurencia* và *Plocamium* mà sên biển ăn [9].

Bảng 1.2. Một số hợp chất monoterpene phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
1	aplysiapyranoid A	<i>A. kurodai</i>	Kusumi T.	1987	[10]
2	aplysiapyranoid B				
3	aplysiapyranoid C				
4	aplysiapyranoid D				
5	costatone	<i>A. parvula</i>	Grkovic T.	2005	[11]
		<i>Plocamium costatum</i>	Kazlauskas R.	1976	[12]
6	2,4-dibromo-5-chloro-1-[(1 <i>E</i>)-2-chloroethyl]-1,5-dimethylcyclohexane	<i>A. punctata</i>	Quiñoa E.	1989	[13]
7	2-bromo-4,5-dichloro-1-[(1 <i>E</i>)-2-chloroethyl]-1,5-dimethylcyclohexane				
8	aplysiaterpenoid A	<i>A. kurodai</i>	Miyamoto T.	1988	[14]

9	2-bromo-4,5-dichloro-1-[(1 <i>E</i>)-2-bromoethyl]-1,5-dimethylcyclohexane	<i>A. punctata</i>	Quiñoa E.	1989	[13]
10	4-bromo-5-chloro-2-[(1 <i>E</i>)-2-chloroethyl]-1,5-dimethylcyclohex-1-en				
11	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,4-dibromo-5-chloro-2-[(1 <i>E</i>)-2-chloroethyl]-1,5-dimethylcyclohexane	<i>A. kurodai</i>	Miyamoto T.	1988	[14]
12	4-bromo-5-bromomethyl-2,5-dichloro-1-(<i>E</i>)chloroethyl-1-methylcyclohexane				
13	aplysiaterpenoid B				
14	7-chloro-3,7-dimethyl-1,4,6-tribromo-1-octen-3-ol	<i>A. californica</i>	Faulkner D.J.	1973	[15]
15	3,7-dimethyl-1,8,8-tribromo-3,4,7-trichloro-1,5-octadiene	<i>A. californica</i>	Faulkner D.J.	1974	[16, 17]
16	kurodainol	<i>A. kurodai</i>	Katayama A.	1982	[18]
17	(3 <i>Z</i> ,5 <i>E</i>)-1-acetoxy-4-chloro-3,7-dimethylocta-3,5,7-trien	<i>A. punctata</i>	Ortega M.J.	1997	[19]
18	(7 <i>E</i>)-1-acetoxy-8-chloro-7-(dichloromethyl)-3-methyloct-7-en-4-one				
19	(7 <i>Z</i>)-1-acetoxy-8-chloro-7-(dichloromethyl)-3-methyloct-7-en-4-one				
20	(3 <i>Z</i> ,5 <i>E</i>)-1-acetoxy-8-bromo-4,7-dichloro-3,7-dimethylocta-3,5-dien				
21	(1 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-1-bromo-7-dichloromethyl-3,4,8-trichloro-octa-1,5,7-trien	<i>A. dactylomela</i>	Wessels M.	200	[9]



Hình 1.1. Cấu trúc một số hợp chất monoterpene phân lập từ giống *Aplysia*

Các chất có khung sesquiterpene thông thường có 15 carbon. Trong khi đó khung này lại chia thành nhiều loại khung như: chamigrane sesquiterpene, bisabolane sesquiterpene, laurane sesquiterpene, brasilane và omphalane sesquiterpene, eudesmane và snyderane sesquiterpene. Các khung chất liên quan đến môi trường biển, các chất chuyển hóa thứ cấp sở hữu dạng khung này là đặc điểm của tảo đỏ thuộc chi *Laurencia* mà sên biển ăn [20].

Bảng 1.3. Một số hợp chất sesquiterpene phân lập từ giống *Aplysia*

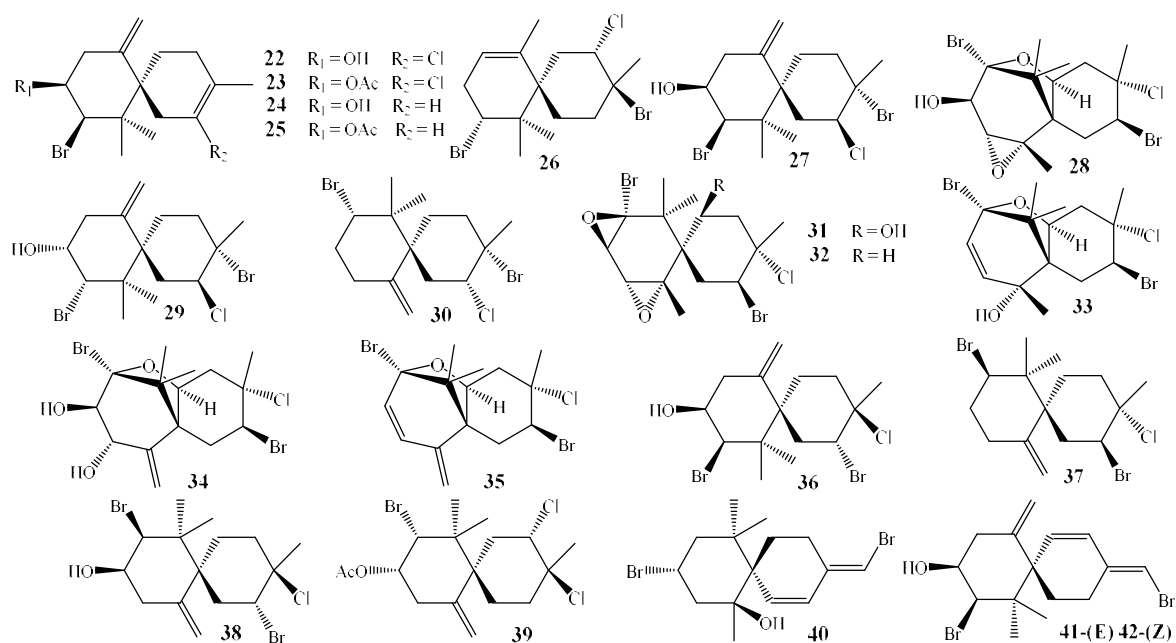
STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
<i>Chamigrane sesquiterpene</i>					
22	elatol (22)		Dias T.	2005	[21]

23	acetylatol	<i>A.</i>			
24	deschlorelatol	<i>dactylomela</i>			
25	acetyldechlorelatol				
26	(4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-4,9-dibromo-8-chloro-1,5,5,9-tetramethylspiro[5.5]undec-1-ene				
27	<i>iso</i> -obtusol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Díaz-Marrero A.-R.	2012	[22]
28	johnstonol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Pitombo L.F.	1996	[23]
29	obtusol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Díaz-Marrero A.-R.	2012	[22]
30	<i>epi</i> -obtusane	<i>A. oculifera</i>	Hegazy M.-E.F.	2014	[24]
31	prepaciferol epoxide	<i>A.</i>	Kaiser C.R.	1997	[25]
32	dehydroxyprepaciferol epoxide	<i>dactylomela</i>			
33	paciferol	<i>A.</i>	Kaiser C.R.	2001	[26]
34	pacifenediol	<i>dactylomela</i>			
35	pacifidiene				
36	rogiole	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Palaniveloo K.	2014	[20]
		<i>Laurencia</i>	Pietra F.	2002	[27]
37	nidificene	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	McPhail K.L.	1999	[28]
38	cartilagineol	<i>A.</i>	Wessels M.	2000	[9]
39	9-acetylisoobtusol	<i>dactylomela</i>			
40	9,15-dibromo-1,3(15)-chamigra-diene-11-ol				
41	(<i>E</i>)-dibromotrienol	<i>A.</i>	Schmitz	1981	[29]
42	(<i>Z</i>)-dibromotrienol	<i>dactylomela</i>	F.J.		

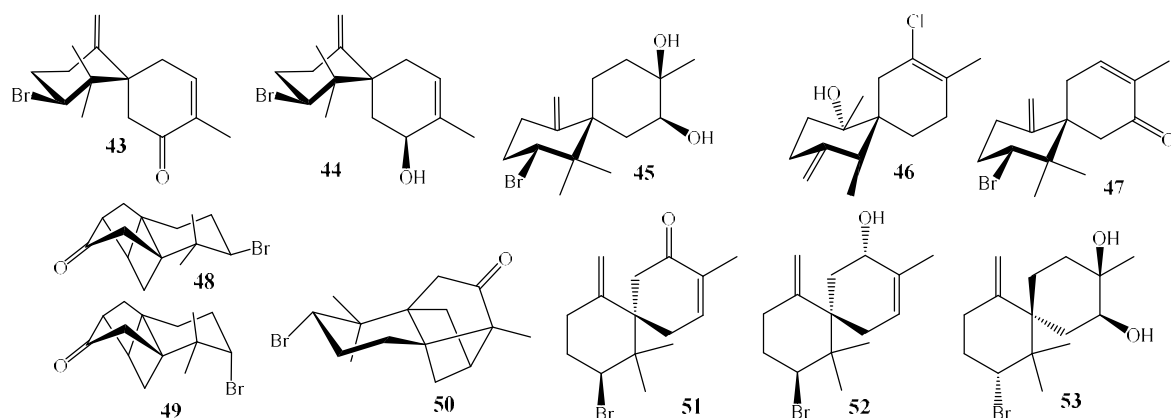
43	(6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-10-bromo-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro [5.5] undec-2-ene-4-one	<i>A. dactylomela</i>	Shubina L.K.	2007	[30]
44	(4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-10-bromo-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro [5.5] undec-2-ene-4-ol (44)				
45	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-10-bromo-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro [5.5] undecane-3,4-diol (45)				
46	(6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,11 <i>S</i>)-2-chloro-3,7,11-trimethyl-10-methylidenespiro [5.5] undec-2-ene-7-ol				
47	dactylone	<i>A. dactylomela</i>	Fedorov S.N.	2000	[31]
48	aplydactone	<i>A. dactylomela</i>	Matsuura B.S.	2017	[32]
49	10- <i>epi</i> -datylone	<i>A. dactylomela</i>	Fedorov S.N.	2000	[31]
50	8- <i>epi</i> -isoapydactone	<i>A. dactylomela</i>	Matsuura B.S.	2017	[32]
51	8- <i>epi</i> -apydactone				
52	10-bromo- β -chamingren-2-ol				
53	10-bromo- β -chamingren-2,3-diol				
<i>Bisabolane sesquiterpene</i>					
54	isodeodactol	<i>A. dactylomela</i>	Gopichand Y.	1981	[33]
55	8-deoxyisocaespitol				
56	caespitane	<i>A. dactylomela</i>	Wessels M.	2000	[9]
57	caespitol				
58	8-acetylcaespitol				
59	laucapyranoid A				
60	furocaespitane				
61	furocaespitanelactol				

62	caespitenone	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Wessels M.	2000	[9]
63	caespitenone	<i>A.</i>	Brito I.	2006	[34]
64	deschlorobromo caespitol	<i>dactylomela</i>			
65	deodactol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Hollenbeak K.H.	1979	[35]
66	aplysiadactydiol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Brito I.	2006	[34]
67	puertitol- β -aceate	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Wessels M.	2000	[9]
68	algoane	<i>A.</i>	McPhail	1999	[28]
69	1-deacetoxyalgoane	<i>dactylomela</i>	K.L.		
70	1-deacetoxy-8-algoane				
71	cupalaurenol	<i>Laurencia</i>	Vairappan C.S.	2010	[36]
		<i>A.</i>	Ichiba T.	2010	[37]
72	cupalaurenol acetate	<i>dactylomela</i>			
73	oculiferane	<i>A. oculifera</i>	Hegazy M.-E.F.	2014	[24]
<i>Laurane sesquiterpene</i>					
74	cyclolaurane	<i>A.</i>	Ichiba T.	2010	[37]
75	cyclolaurenol	<i>dactylomela</i>			
76	cyclolaurenol acetate				
77	laurinterol	<i>A. kurodai</i>	Tsukamoto S.	2005	[38]
78	laurinterol acetate				
79	debromolaurinterol				
80	Debromolaurinterol acetate				
81	aplysin	<i>A. kurodai</i>	Yamamura S.	1963	[39]
82	debromoaplysin				
83	aplysinol				
84	ibhayinol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	McPhail K.L.	1999	[28]
85	allolaurinterol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Appleton D.R.	2001	[40]
86	allolaurinterol acetate				
87	isolaurenisol				

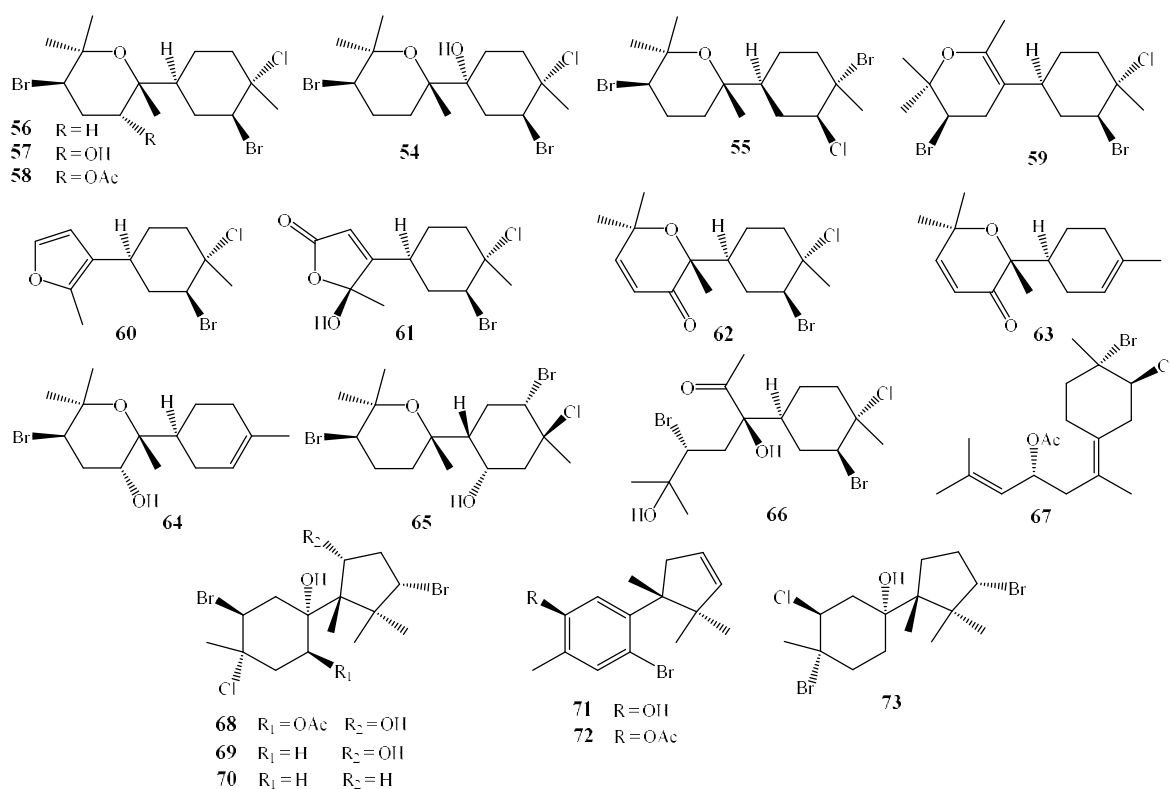
88	isolaurenisol acetate				
<i>Brasilane và omphalane sesquiterpene</i>					
89	brasilenol	<i>A.</i>	Stallard	1978	[41]
90	brasilenol acetate	<i>brasiliana</i>	M.O.		
91	<i>epi</i> -brasilenol				
92	<i>epi</i> -brasilenol acetate	<i>A. fasciata</i>	Ioannou E.	2009	[42]
93	6-hydroxy-1-brasilene				
94	dactylomelatriol	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Díaz-Marrero A.-R.	2012	[22]
<i>Eudesmane và Snyderane sesquiterpene</i>					
95	brasudol	<i>A.</i> <i>brasiliana</i>	Dieter R.K.	1979	[43]
96	isobrasudo				
97	lankalapoul A	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Baker B.	1988	[44]
98	lankalapoul B				
99	aplysistatin	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Vairappan C.S.	2007	[45]
100	palisadin A				
101	palisadin B				
102	5-acetoxypalisadin				
103	12-hydroxypalisadin				



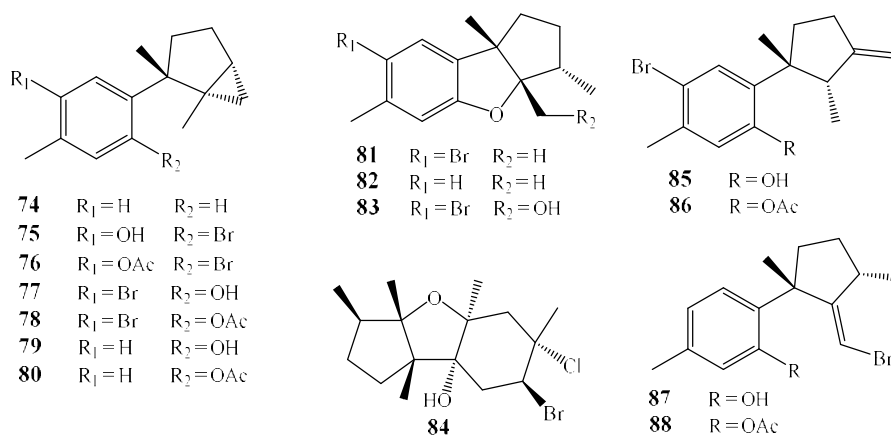
Hình 1.2. Cấu trúc một số hợp chất chamigrane sesquiterpene phân lập từ giống *Aplysia*



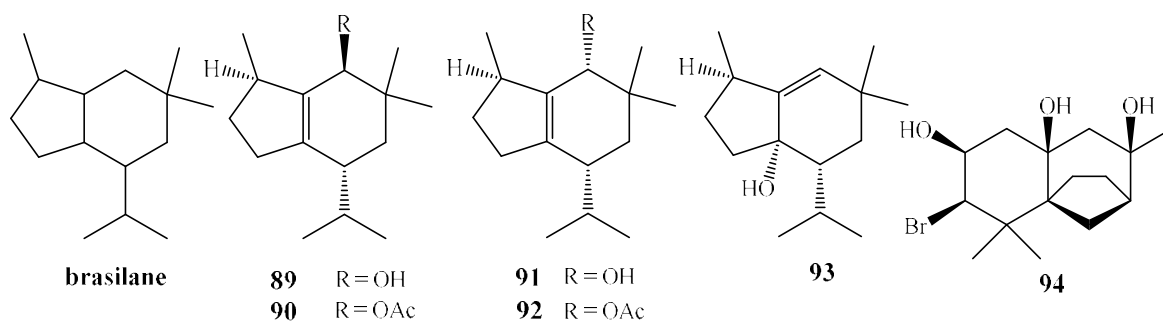
Hình 1.3. Cấu trúc một số hợp chất chamigrane sesquiterpene (tiếp)



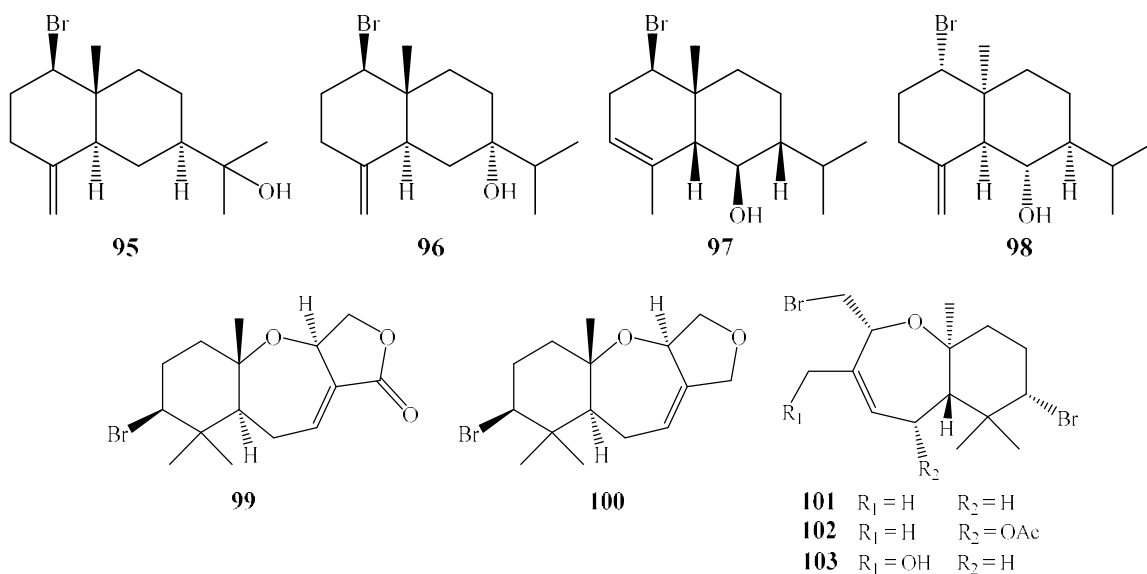
Hình 1.4. Cấu trúc một số hợp chất bisabolane sesquiterpene



Hình 1.5. Cấu trúc một số hợp chất laurencia sesquiterpene



Hình 1.6. Cấu trúc một số hợp chất brasilane và omphalane sesquiterpene



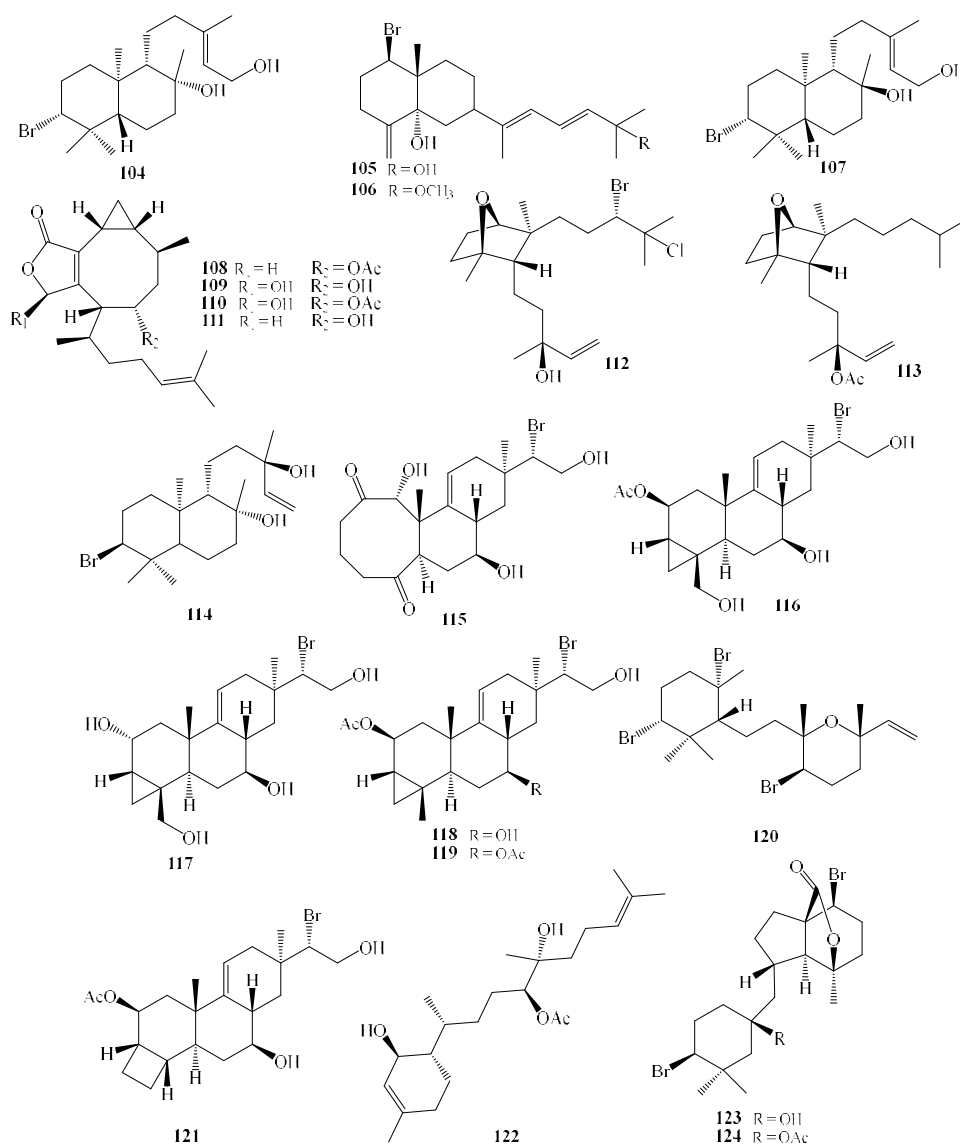
Hình 1.7. Cấu trúc một số hợp chất eudesmane và snyderane sesquiterpene

Diterpene có trong cả động vật và thực vật dưới biển. Mặc dù tảo đỏ thuộc chi *Laurencia* chủ yếu là các chất chuyển hóa có chứa brom với khung sesquiterpene, nhưng cũng có một số công bố về diterpene có chứa brom.

Bảng 1.4. Một số hợp chất diterpene phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
104	aplysin-20	<i>A. kurodai</i>	Matsuda H.	1967	[46]
105	aplysiadiol	<i>A. kurodai</i>	Ojika M.	1990	[47]
106	aplysiadiol methyl ether				
107	<i>epi</i> -aplysin-20	<i>A. kurodai</i>	Ojika M.	1992	[48]
108	acetoxycrenulide	<i>A. vaccaria</i>	Midland S.L.	1983	[49]
109	1,9-dihydroxycrenulide				
110	1-hydroxy-9-acetoxycrenulide				
111	9-hydroxycrenulide				
112	dactylomelol	<i>A. dactylomela</i>	Estrada D.M.	1989	[50]
113	punctatene acetate	<i>A. perfata</i>	Findlay J.A.	2002	[51]

114	isoconcinndiol				
115	neopargueroldione				
116	parguerol				
117	deacetyl parguerol				
118	deoxyparguerol	<i>A. dactylomela</i>	Schmitz F.J.	1982	[52]
119	deoxyparguerol acetate	<i>A. kurodai</i>	Tsukamoto S.	2004	[53]
120	punctatol	<i>A. perfata</i>	Findlay J.A.	2002	[51]
121	isoparguerol	<i>A. dactylomela</i>	Schmitz F.J.	1982	[52]
122	dactyloditerpenol acetate	<i>A. dactylomela</i>	Jiménez-Romero C.	2014	[54]
123	angasiol	<i>A. angasi</i>	Pettit G.R.	1978	[55]
124	Angasiol acetate	<i>A. juliana</i>	Atta ur R.	1991	[56]

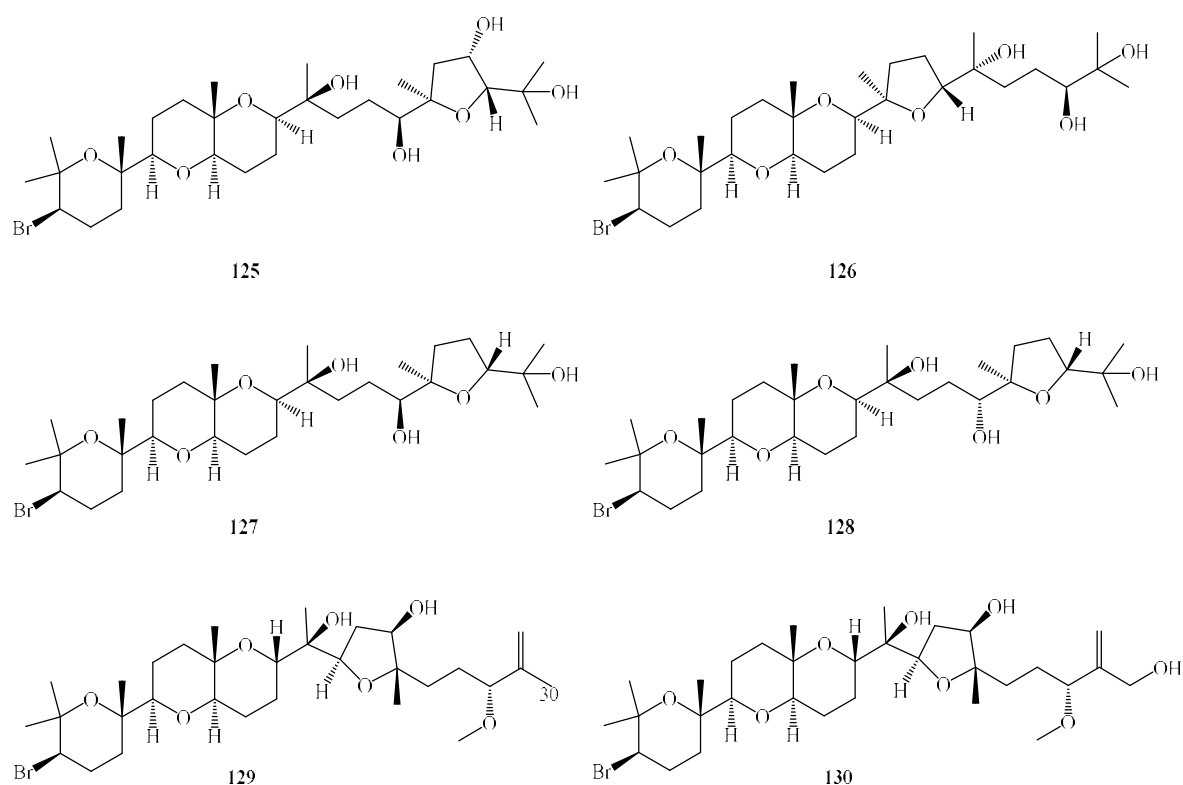


Hình 1.8. Cấu trúc một số hợp chất diterpene

Một số hợp chất triterpene đã được phân lập từ loài *A. dactylomela*.

Bảng 1.5. Một số hợp chất triterpene phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
125	aplysiol A	<i>A. dactylomela</i>	Manzo E.	2007	[57]
126	aplysiol B				
127	thyriferol				
128	venustatriol				
129	aplysqualenol A	<i>A. dactylomela</i>	Vera B.	2009	[58]
130	aplysqualenol B				



Hình 1.9. Cấu trúc một số hợp chất triterpene

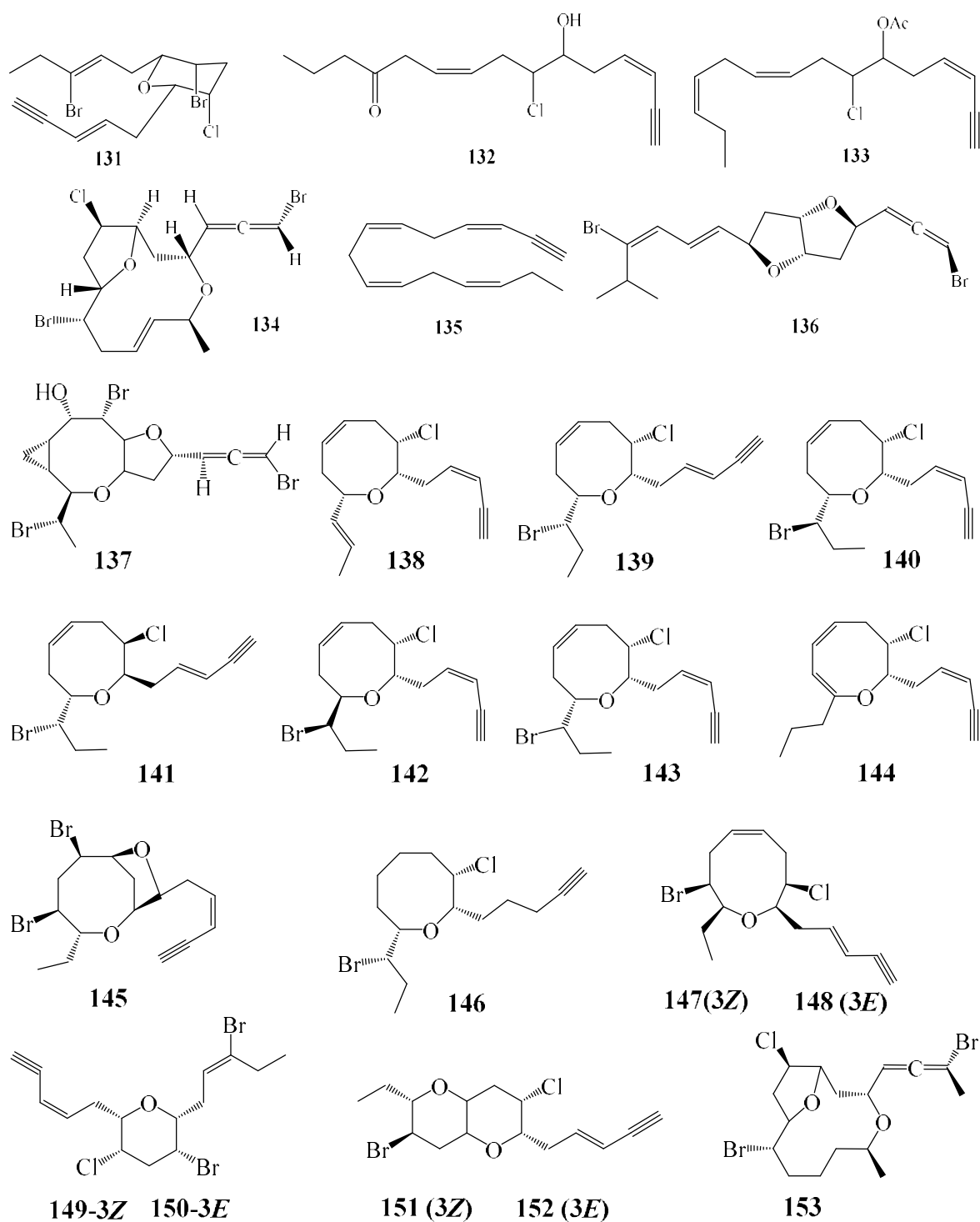
1.2.1.2. C-15 Acetogenin

Có rất nhiều acetogenin, cụ thể là mạch vòng halogen hóa C-15 đã được tìm thấy trong các loài *Aplysia* khác nhau. Hầu hết các hợp chất này đều có nguồn gốc từ tảo, đặc biệt là những loài thuộc chi *Laurencia* và *Polocamium* mà những loài sên đã ăn [16, 20].

Bảng 1.6. Các hợp chất C-15 Acetogenin phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
131	dactyllyne	<i>A. dactylomela</i>	McDonald F.J.	1975	[59]
132	(3Z,9Z)-7-chloro-6-hydroxy-12-oxo-pentadeca-3,9-dien-1-yne	<i>A. fasciata</i>	Gao L.-x.	1992	[60]
133	(3Z,9Z,12Z)-6-acetoxy-7-chloro-pentadeca-3,9,12-trien-1-yne				
134	dactylallene	<i>A. dactylomela</i>	Letizia Ciavatta M.	1997	[61]
135	laurencenune	<i>A. punctata</i>	Findlay J.A.	2002	[51]
136	apysiallene	<i>A. kurodai</i>	Okamoto Y.	2001	[62]
137	aplyparvunin	<i>A. parvula</i>	Miyamoto T.	1995	[63]
138	(+)-laurenyne	<i>A. dactylomela</i>	Manzo E.	2005	[64]
139	(+)-3 <i>E</i> -pinnatifidenyne				
140	(3Z)-13- <i>epi</i> -pinnatifidenyne	<i>A. fasciata</i>	Ioannou E.	2009	[42]
141	(-)-3 <i>E</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> -pinnnatifidenyne	<i>A. dactylomela</i>	Manzo E.	2005	[64]
142	<i>cis</i> -dihydrorhodophytin	<i>A. brasiliiana</i>	Kinnel R.B.	1979	[65]
143	<i>cis</i> -isohydrorhodophytin				
144	3Z-venustinene	<i>A. fasciata</i>	Ioannou E.	2009	[42]
145	(3Z)-bromofucin	<i>A. parvula</i>	McPhail K.L.	2005	[66]
146	(+)- <i>E</i> -pinnatifidenyne	<i>A. dactylomela</i>	Manzo E.	2005	[64]
147	(+)-3 <i>E</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> -obtusenyne				
148	(+)-3 <i>Z</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> -obtusenyne				
149	dactyllyne	<i>A. dactylomela</i>	Vanderah D.J.	1976	[67]
150	isodactyllyne				
151	(<i>Z</i>)-dactomelyne	<i>A. dactylomela</i>	Gopichand Y.	1981	[33]
152	(<i>E</i>)-dactomelyne				

153	dactylallene	<i>A.</i> <i>dactylomela</i>	Manzo E.	2005	[64]
------------	--------------	---------------------------------	----------	------	------



Hình 1.10. Cấu trúc một số hợp chất C-15 acetogenin

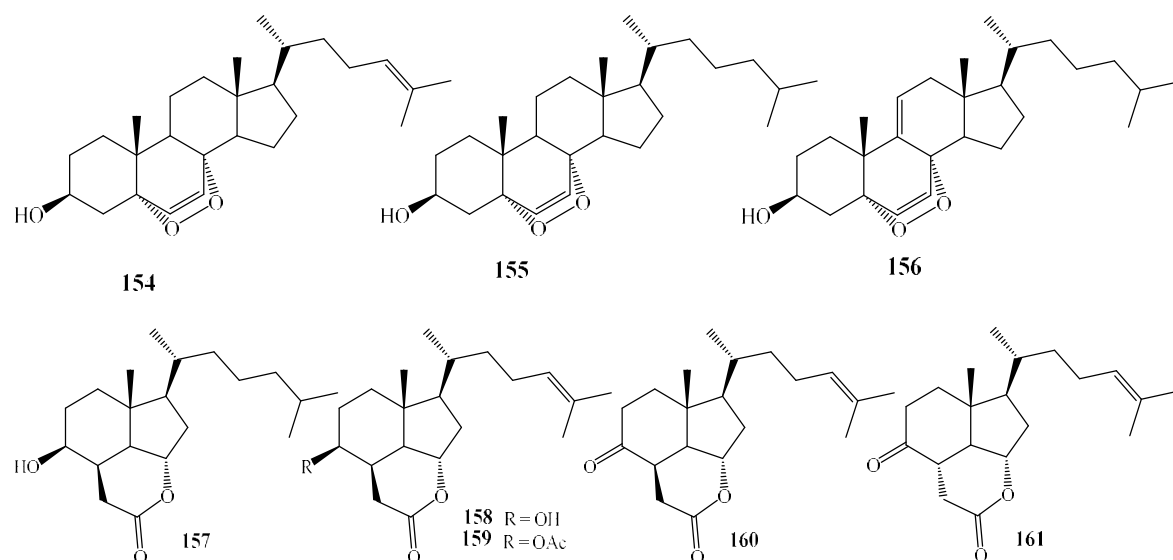
1.2.1.3. Sterol

Trong những thập kỷ gần đây, những sterol được công bố từ các sinh vật biển như nấm, tảo lớn, bọt biển, san hô và các động vật thân mềm đã cho thấy các chất có

nhieu hoạt tính sinh học. Sau đây là một số sterol được phân lập từ các loài sên biển thuộc giống *Aplysia*.

Bảng 1.7. Một số hợp chất steroid phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
154	(3 β ,5 α ,8 α)-5,8-epidioxycholesta-6,24-dien-3-ol	<i>A. depilans</i> <i>A. punctata</i>	Jiménez C.	1986	[68]
155	(3 β ,5 α ,8 α)-5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol				
156	(3 β ,5 α ,8 α)-5,8-epidioxycholesta-6,9(11)-dien-3-ol				
157	aplykurodin A	<i>A. kurodai</i>	Miyamoto T.	1986	[69]
158	aplykurodin B				
159	4-acetylaplykurodin B	<i>A. fasciata</i>	Spinella A.	1992	[70]
160	aplykurodinone B				
161	3- <i>epi</i> -aplykurodinone B	<i>A. fasciata</i>	Ortega M.J.	1997	[71]



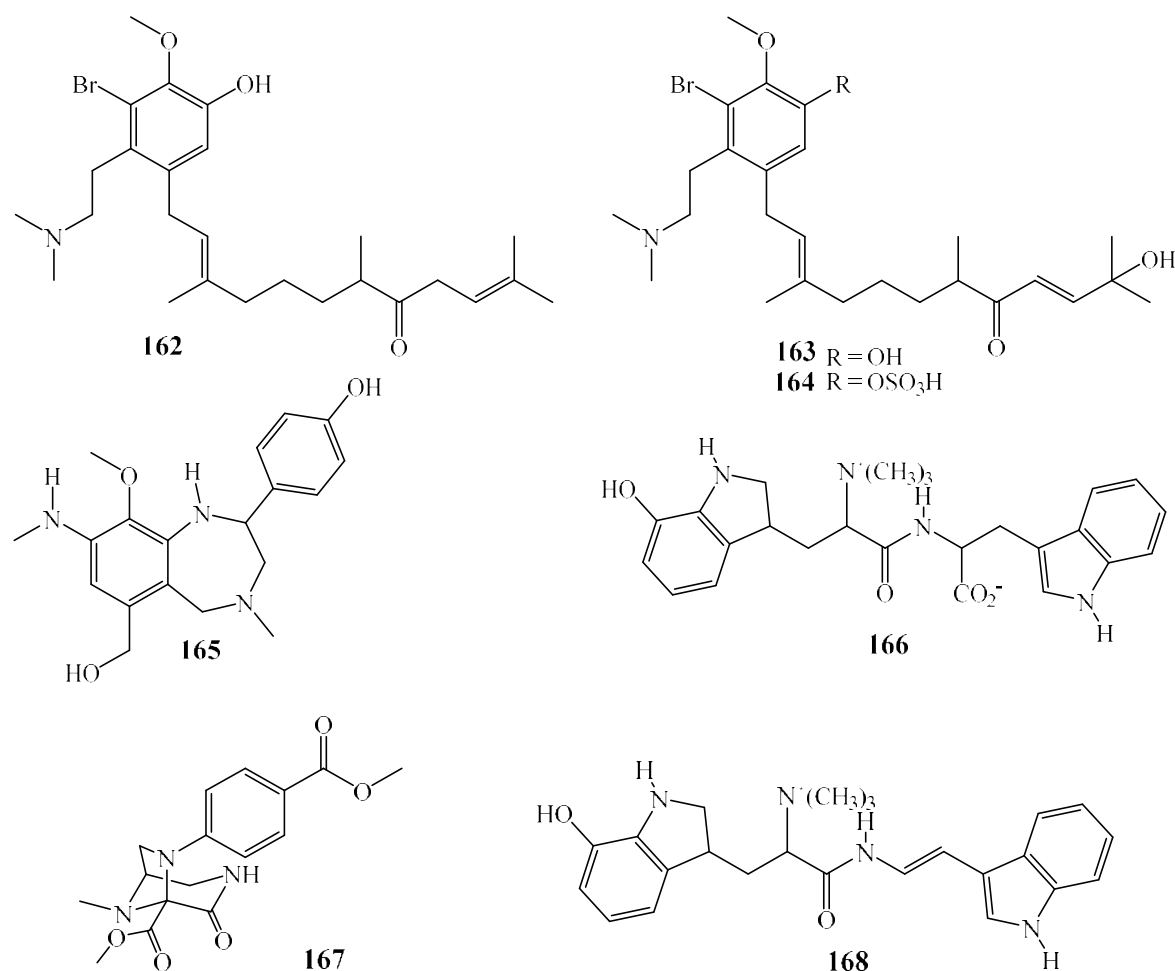
Hình 1.11. Cấu trúc một số hợp chất sterol

1.2.1.4. Alkaloid

Sự đa dạng và phong phú về thành phần hóa học của giống sên *Aplysia* cũng được làm nổi bật nhờ sự hiện diện của các alkaloid. Sau đây là một số alkaloid đã được công bố.

Bảng 1.8. Một số hợp chất alkaloid phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
162	aplaminone	<i>A. kurodai</i>	Kigoshi H.	1990	[72]
163	neoaplaminone				
164	neoaplaminone sulfate				
165	aplysepine	<i>A. kurodai</i>	Ojika M.	1993	[73]
166	dactylamides A	<i>A. dactylomela</i>	Appleton D.R.	2001	[40]
167	aplaminol	<i>A. kurodai</i>	Kuroda T.	2008	[74]
168	dactylamides B	<i>A. dactylomela</i>	Appleton D.R.	2001	[40]



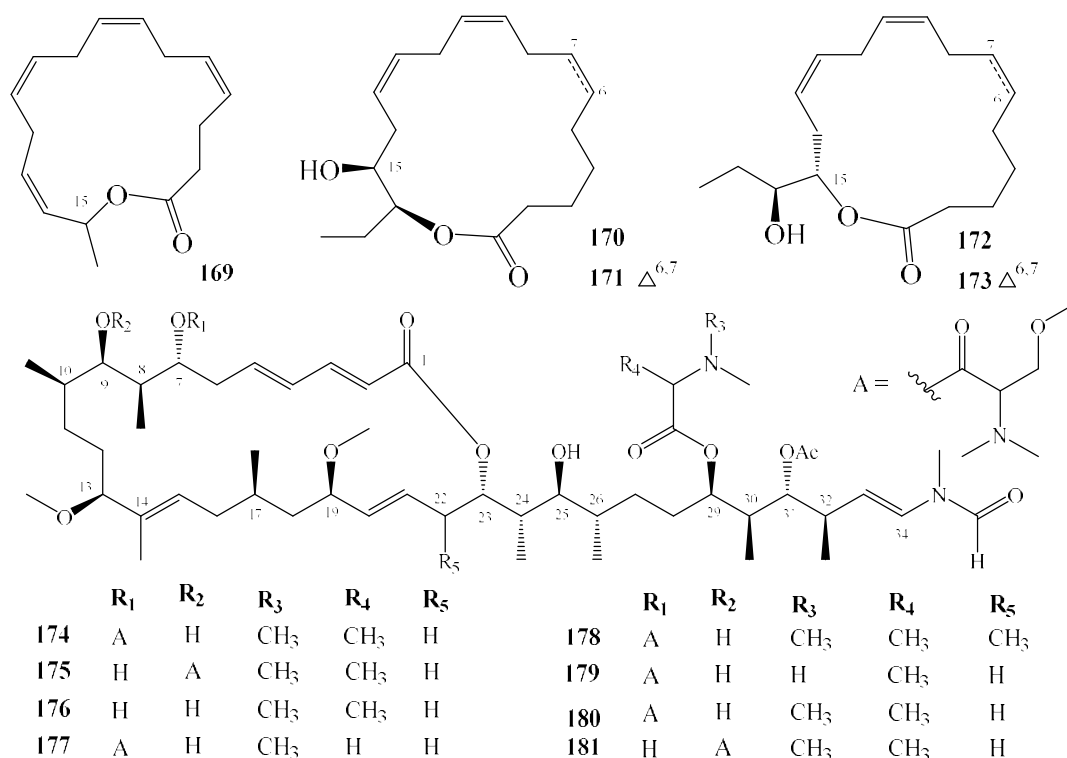
Hình 1.12. Cấu trúc một số hợp chất alkaloid

1.2.1.5. Macrolide

Hầu hết macrolide biết đến như là nhóm kháng sinh được sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn và nấm thông thường gây ra. Một số chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ biển có hợp chất chống ung thư tốt [75].

Bảng 1.9. Một số hợp chất macrolide phân lập từ giống *Aplysia*

STT	Hợp chất	Loài	Tác giả chính	Năm	TLTK
169	aplyolide A	<i>A. depilans</i>		1997	[76]
170	aplyolide B				
171	aplyolide C				
172	aplyolide D				
173	aplyolide E				
174	aplyronine A	<i>A. kurodai</i>	Yamada K.	1993	[77]
175	aplyronine B				
176	aplyronine C				
177	aplyronine D	<i>A. kurodai</i>	Ojika M.	2012	[78]
178	aplyronine E				
179	aplyronine F				
180	aplyronine G				
181	aplyronine H				



Hình 1.13. Cấu trúc một số hợp chất macrolide

1.2.2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học

1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Phần lớn các hợp chất được phân lập từ giống sên biển *Aplysia*, (hợp chất đơn giản - monoterpene đến những hợp chất phức tạp - aplyronine) có hoạt tính gây độc

tế bào ung thư với nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau. Đặc biệt lớp chất aplyronine có hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất mạnh.

Năm 1987, bốn hợp chất aplysiapyranoid A – D (**1-4**) được phân lập từ loài *A. parvula* thể hiện độc tính tế bào vừa phải đối với các dòng tế bào biểu mô thận khi Vero và các dòng tế bào thận chó Madin-Darby (MDCK) và ung thư tế bào hắc tố chuột (B16) với giá trị IC_{50} trong khoảng 19-96 $\mu\text{g/mL}$. Bên cạnh đó hợp chất **4** cho thấy hoạt động thú vị gây độc dòng tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng ở người (Moser) ($IC_{50} = 14 \mu\text{g/mL}$) [10]. Từ loài *A. parvula* (1997) bốn hợp chất monoterpene mới cũng được biết đến, bao gồm: (3Z,5E)-1-acetoxy-4-chloro-3,7-dimethylocta-3,5,7-trien (**17**), (7E)-1-acetoxy-8-chloro-7-(dichloromethyl)-3-methyloct-7-en-4-one (**18**), (7Z)-1-acetoxy-8-chloro-7-(dichloromethyl)-3-methyloct-7-en-4-one (**19**), (3Z,5E)-1-acetoxy-8-bromo-4,7-dichloro-3,7-dimethylocta-3,5-dien (**20**). Bốn hợp chất (**18-20**) thể hiện đặc tính gây độc tế bào tương đương nhau trên các dòng ung thư hạch ở chuột (P-388) ($ED_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$), ung thư biểu mô phổi ở người (A549) ($ED_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$), ung thư biểu mô ruột kết ở người (HT-29) ($ED_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$) khối u ác tính ở người (MEL-28) ($ED_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$) [19]. Một monoterpene mạch hở khác (1E,5E,7E)-1-bromo-7-dichloromethyl-3,4,8-trichloro-octa-1,5,7-trien (**21**) được phân lập từ loài *A. dactylomela*. Hợp chất này gây độc tính tế bào mạnh lên cả ba dòng tế bào (HM02, Hep G2, MCF7) với các giá trị IC_{50} tương ứng 1,1, 1,0 và 1,5 $\mu\text{g/mL}$ [9].

Hợp chất aplysiaterpenoid A (**8**) từ loài *A. kurodai* có hoạt tính gây độc tế bào nhẹ đối với các dòng tế bào khối u khác nhau, thể hiện giá trị IC_{50} là 10,0 $\mu\text{g/mL}$ đối với ung thư hạch ở chuột (L1210), 15,3 $\mu\text{g/mL}$ đối với ung thư biểu mô phổi ở người (QD-90), và 30,2 $\mu\text{g/mL}$ với ung thư vú ở người (MCF-7) [14]. Hợp chất 4-bromo-5-bromomethyl-2,5-dichloro-1-(E)-chloroethyl-1-methylcyclohexane (**12**) từ loài *A. dactylomela* (năm 2000) gây độc tế bào đối với ung thư phổi ở người (Lu1), ung thư biểu mô biểu bì ở miệng người (KB), và tế bào ung thư vú ở người (ZR-75-1) với các giá trị IC_{50} tương ứng là 12,9, 13,3 và 7,8 $\mu\text{g/mL}$.

Các hợp chất sesquiterpene được phân lập từ các loài sên biển thuộc giống *Aplysia*. Bốn hợp chất elatol (**22**), acetyelatol (**23**), deschlorelatol (**24**), acetyldeschlorelatol (**25**) phân lập từ loài sên *A. dactylomela*. Tác dụng gây độc tế bào của elatol là do nó có khả năng bắt giữ tế bào ở pha G_1 và pha sau G_1 , dẫn đến tế bào tự chết theo chương trình (apoptosis) [79]. Cả hai hợp chất **22** và **23** đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng Vero, với giá trị IC_{50} tương ứng là 25,0 và 44,6 $\mu\text{g/mL}$, trong khi hợp chất **24** và dẫn xuất acetyl của nó **25** không gây độc tính [21]. Kết quả này cho thấy mức độ liên quan của nguyên tử clo và nhóm hydroxyl tự do tại

vị trí C-3 của vòng A với độc tính tế bào đối với tế bào Vero. Năm 2012, hợp chất *iso-obtusol* (**27**) được công bố từ loài sên *A. dactylomela* [22] thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh đối với ba dòng tế bào ung thư [ung thư biểu mô dạ dày (HM02), ung thư gan (Hep G2) và ung thư vú (MCF7)] với giá trị IC_{50} tương ứng là 7,0, 1,0 và 1,5 $\mu\text{g/mL}$ [9]. Hợp chất *epi-obtusane* (**30**) được phân lập từ loài *A. oculifera* có hoạt tính gây độc tế bào đáng kể trên nhiều dòng tế bào ung thư người [ung thư tiền liệt tuyến (PC-3), ung thư phổi (A549), MCF-7 và ung thư đại trực tràng (HCT 116)] với các giá trị IC_{50} tương ứng là 3,1, 0,96, 5,9, 2,4, và 4,1 $\mu\text{g/mL}$ [24]. Hai hợp chất *cartilagineol* (**38**) và *9,15-dibromo-1,3(15)-chamigra-diene-11-ol* (**40**) từ loài *A. dactylomela* [9]. Hợp chất **38** có hoạt tính gây độc tế bào ở người với các dòng A-549, HT-29, MEL-28 và dòng P-388 (chuột) với các giá trị IC_{50} tương ứng 1,0, 0,25, 1,0 và 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất **40** thể hiện độc tính tế bào mạnh với các dòng HEP-G2, MCF-7 với giá trị IC_{50} tương ứng 1,0 và 1,0 $\mu\text{g/mL}$ [9]. Hai hợp chất (4*S*,6*S*,10*S*)-10-bromo-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro [5.5] undec-2-ene-4-ol (**44**), *dactylone* (**47**) cũng được tìm thấy từ loài *A. dactylomela* [30, 31]. Các hợp chất **44** và **47** đã được thử nghiệm độc tính tế bào đối với tế bào bạch cầu LH-60 và THP-1. Hợp chất **47** không thể hiện độc tính, còn hợp chất **44** có hoạt tính với giá trị IC_{50} lần lượt là 102,0 và 152,0 μM . Tuy nhiên hợp chất **47** gây ra apoptosis ở cả hai dòng tế bào ở nồng độ IC_{50} là 80,0 và 40,0 μM [30]. Nghiên cứu khác cho thấy hợp chất **47** gây ức chế 50% đối với hai dòng tế bào biểu bì H460+Cl41 và tế bào ung thư phổi H460 ở người ở nồng độ 45,4 μM và 92,4 μM [80]. Hợp chất *deodactol* (**65**) được phân lập từ loài sên thuộc giống *Aplysia*, hợp chất sesquiterpen này có hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư bạch cầu lymphocytic ở chuột (L-1210) với giá trị ED_{50} là 12,0 $\mu\text{g/mL}$ [35]. Những thay đổi nhỏ trong cấu trúc hóa học có thể ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính sinh học, ví dụ như nghiên cứu của Wessels và các cộng sự [9], họ thấy rằng 8-acetylcaespitol (**58**) chỉ khác caespitol (**57**) trong nhóm acetyl, hoàn toàn mất hoạt tính. Hợp chất caespitenone (**62**) là sản phẩm oxy hóa chuyển hóa từ caespitol (**57**). Hợp chất **62** có tác dụng chống lại các dòng tế bào HT-29, MCF-7 và ung thư biểu bì ở người (A-431), với giá trị IC_{50} lần lượt là 18,9, 19,7 và 21,6 $\mu\text{g/mL}$ [81].

Năm 2010, một hợp chất *oculiferane* (**73**) được phân lập từ loài sên *A. oculifera* [24], hợp chất này cho thấy độc tính tế bào *in vitro* tương tự so với hợp chất *epi-obtusane* (**30**), hoạt tính mạnh hơn đáng kể đối với dòng tế bào A549 (IC_{50} là 3,1 $\mu\text{g/mL}$) [24]. Hợp chất (**80**) đã được xác định trước đây bởi Stallard và Faulkner (năm 1974) từ loài sên *A. californica* [16, 17] và Findlay và Li (năm 2002) từ sên *A. punctata* [51] và nó được coi là chất có triển vọng để ngăn ngừa và ức chế các khối u ác tính bằng cách gây ra tế bào tự chết theo chương trình (apoptosis) với giá trị IC_{50}

là 10,0 $\mu\text{g/mL}$ [82]. Các hợp chất **77** và **79** và acetate của nó (**78**) cho thấy độc tính tế bào vừa phải đối với dòng tế bào Hela với các giá trị IC_{50} tương ứng là 18,0, 32,0 và 20,0 $\mu\text{g/mL}$ [83]. Hợp chất aplysin (**81**) phân lập từ loài *A. kurodai* [39]. Nghiên cứu của Gong và các cộng sự công bố năm 2014 cho thấy hợp chất **81** có thể tăng cường tác dụng của temozolomide (một loại thuốc hóa trị) trên tế bào ung thư thần kinh đệm bằng cách tăng mức độ biểu hiện bước đầu miR-181 (tiền thân của microRNA) [84]. Nghiên cứu gần đây cũng đã chỉ ra rằng aplysin thực sự có thể gây ra quá trình apoptosis trong tế bào u thần kinh đệm bằng cách can thiệp vào con đường HSP90/AKT [85]. Năm 2001, Applenton và các cộng sự đã phân lập được bốn sesquiterpene allolaurinterol (**85**), allolaurinterol acetate (**86**), isolaurenisol (**87**), isolaurenisol acetate (**88**) từ loài *A. dactylomela* [40]. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các hợp chất này cho thấy sesquiterpene **85** và **87** chứa các nhóm phenol tự do, thể hiện độc tính gây độc tế bào bạch cầu ở chuột (P388) vừa phải với giá trị IC_{50} tương ứng 23,4 và 17,3 μM . Mặt khác, các dẫn xuất acetate tương ứng (**86** và **88**) cho thấy độc tính trên tế bào P388 thấp hơn với cùng giá trị $\text{IC}_{50} > 74 \mu\text{M}$ [40].

Năm 1983, nhà khoa học Midland và các cộng sự đã phân lập được diterpene không halogen hóa trong tuyến tiêu hóa của loài *A. vaccaria* là acetoxycrenulide (**108**) [49]. Hợp chất **108** thể hiện hoạt tính chống lại ung thư biểu mô vòm họng ở người (KB), ung thư biểu mô phổi ở người (NSCLC-N6), (P388) và bệnh bạch cầu ở chuột biểu hiện gen đa kháng thuốc (P-388/DOX) có cùng giá trị $\text{ED}_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ và chất đối chứng dương mercaptopurine với ED_{50} là 5,4, 0,76, 0,7, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ tương ứng với các dòng tế bào trên [86].

Năm 2007, hợp chất triterpene thyrseferol (**127**) phân lập từ loài *A. dactylomela* [57]. Hợp chất **127** hoạt tính mạnh với dòng tế bào P-388, thể hiện giá trị IC_{50} là 0,01 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất cũng cho thấy độc tính tế bào trên các dòng tế bào A549 và HT29 với giá trị IC_{50} là 10,0 $\mu\text{g/mL}$ cho cả hai dòng tế bào [87]. Năm 2009, hợp chất aplysqualenol A (**129**) cũng được tìm thấy từ sên biển *A. dactylomela* [58]. Một nghiên cứu khác của Viện Ung thư Quốc gia (NCI's) cho thấy hợp chất **129** thể hiện hoạt tính mạnh ức chế chống lại tế bào ung thư vú T-47D với giá trị IC_{50} là 0,3 $\mu\text{g/mL}$ [58].

Năm 1986, hai hợp chất sterol ($3\beta,5\alpha,8\alpha$)-5,8-epidioxycholesta-6,24-dien-3-ol (**154**), ($3\beta,5\alpha,8\alpha$)-5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol (**155**), ($3\beta,5\alpha,8\alpha$)-5,8-epidioxycholesta-6,9(11)-dien-3-ol (**156**) [68] từ các loài thuộc giống *Aplysia*. Sau đó Mun và cộng sự (2015) đã đánh giá độc tính tế bào của hợp chất **154** với tế bào ung thư đại trực tràng ở người (HTC-116) với giá trị IC_{50} là 2,5 μM [88], hợp chất **155** thể hiện hoạt tính với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 [89].

Hợp chất sterol thoái biến 3-*epi*-aplykurodinone B (**161**) bởi Ortega và các cộng sự từ loài *A. fasciata* thu ở Río San Pedro, Cadiz (Tây Ban Nha) [71]. Hợp chất **161** đã được thử nghiệm hoạt tính chống lại ung thư bạch huyết ở chuột (P-388), ung thư biểu mô phổi ở người (A-549), ung thư biểu mô ruột kết ở người (HT-29) và các dòng tế bào khối u melanoma ở người (MEL-28) thể hiện độc tính nhẹ *in vitro* (ED₅₀ là 2,5 µg/mL trong mọi tế bào trên) [71].

Một số alkaloid được công bố từ sên biển giống *Aplysia*. Ba hợp chất aplaminone (**162**), neoaplaminone (**163**), neoaplaminone sulfate (**164**) được tìm thấy từ loài *A. kurodai* [72]. Các hợp chất này thử nghiệm *in vitro* có hoạt tính mạnh gây độc tế bào đối với dòng Hela S3 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,28, $1,6 \times 10^{-7}$ và 0,51 mg/mL [72, 90]. Một hợp chất aplaminal (**167**) cũng được biết đến từ loài *A. kurodai* [74]. Hợp chất **167** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào chống lại dòng Hela S3 với giá trị IC₅₀ 0,51 µg/mL [74].

Các hợp chất aplyronine cũng được phát hiện từ sên biển và có hoạt tính gây độc tế bào. Năm 1993, ba hợp chất aplyronine A (**174**), aplyronine B (**175**) và aplyronine C (**176**) thu được từ loài sên *A. kurodai*. Cả ba hợp chất aplyronine A-C thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh, với các giá trị IC₅₀ là 0,45, 2,9 và 22,0 nM với dòng ung thư biểu mô cổ tử cung ở người (Hela S3) [78]. Sau đó đến năm 2012, năm hợp chất aplyronine D-H (**177-181**) cũng được tìm thấy từ loài sên *A. kurodai*. Cả năm hợp chất này cũng có hoạt tính rất mạnh với dòng tế bào Hela S3 với giá trị IC₅₀ tương ứng lần lượt là 0,075, 0,18, 0,19, 0,12 và 9,8 nM [78].

1.2.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Hai hợp chất elatol (**22**) và deschlorelatol (**24**) từ loài sên biển *A. dactylomela* (năm 2005) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với tất cả 13 chủng vi khuẩn được thử nghiệm. Nó cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 5,5 và 10,0 mg/đĩa đối với *Clostridium cellobioparum*, *Proteus mirabilis* và *Flavobacterium helmiphilum* và 15–30 mg/đĩa đối với các loài vi khuẩn *Chromobacterium violaceum*, *Clostridium fallax*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, và *Vibrio vulnificus*. [91]. Hơn nữa hai hợp chất **22** và **24** đều thể hiện hoạt tính kháng nấm chống lại *Mycotypha microspore* và *Eurotium repens* với đường kính vòng vi khuẩn lần lượt là 2,5 cm và 2,5 cm của hợp chất **22** và hợp chất **24** thể hiện hoạt tính yếu hơn với đường kính vòng vi khuẩn tương ứng 2,0 cm và 1,8 cm [92].

Năm 2012, một hợp chất khác là *iso*-obtusol (**27**) cũng được tìm thấy từ loài sên biển *A. dactylomela* [22]. Hợp chất **27** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại

chủng *Klebsiella pneumonia* và *Salmonella* sp.. Nó cho thấy giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 1,5 và 1,0 mg/ml đối với *K. pneumonia* và *Salmonella* sp. và với cùng kết quả thu được 19-24 mm. Mức độ kháng khuẩn tương đương với các kháng sinh thương mại chống lại hai loại vi khuẩn này, bao gồm: augmentin, latamoxef, cefaclor, ceftriaxone và kanamycin [93]. Hợp chất paciferol (**33**) được phân lập từ loài *A. dactylomela* [26]. Những nghiên cứu hoạt tính sinh học cho thấy hợp chất **33** có hoạt tính chống lại vi khuẩn Gram âm *Pseudomonas aeruginosa* [94].

Năm 2010, hợp chất sesquiterpene là cupalaurenol (**71**), được phân lập từ sên *A. dactylomela* [37]. Hợp chất **71** thể hiện ức chế mạnh đối với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, và *Salmonella* sp., với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 125 µg/mL đối với tất cả các chủng [36]. Năm 2005, từ loài sên biển *A. kurodai* phát hiện được các hợp chất laurinterol (**77**), laurinterol acetate (**78**), debromolaurinterol (**79**), và debromolaurinterol acetate (**80**) [95]. Các hợp chất **77** và **79** (đường kính vòng vi khuẩn lần lượt 16 mm và 10 mm) có hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn các hợp chất acetate tương ứng **78** và **80** (có đường kính vòng vi khuẩn 7 mm và 6 mm) tại MIC là 50 µg/mL trên chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Điều này cũng giải thích được các hợp chất được hấp thụ vào sên biển và được sinh tổng hợp chuyển hóa thành các hợp chất acetate để giảm tính độc của các hợp chất ban đầu và giúp sên biển thích nghi và không ảnh hưởng đến cơ thể của sên biển. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy hai hợp chất sesquiterpene allolaurinterol (**85**), isolaurenisol (**87**) chứa các nhóm phenol tự do, có hoạt tính kháng khuẩn đáng kể chống lại *Bacillus subtilis* và hoạt tính vừa phải đối với nấm *Trichophyton mentagrophytes*. Mặt khác, các dẫn xuất acetate tương ứng allolaurinterol acetate (**86**) và isolaurenisol acetate (**88**) có hoạt tính kháng khuẩn kém hiệu quả với *B. subtilis* [40]. Hợp chất **105** thể hiện tác dụng mạnh đối với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus* sp., *S. aureus* và *Salmonella* sp. [36].

Năm 1983, hợp chất diterpene acetoxycrenulide (**108**) phát hiện từ loài *A. vaccaria* [49]. Hợp chất **108** có hoạt tính kháng khuẩn trên hai chủng vi khuẩn biển *Paracoccus* sp. và *Pseudoalteromonas* sp. với các giá trị EC₅₀ lần lượt là 69,0 µM và 82,0 µM [96].

Năm 1986, hợp chất sterol (3β,5α,8α)-5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol (**155**) được tìm thấy trong loài *A. depilans* [68]. Hợp chất **155** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với giá trị IC₅₀ là 4,9 µM đối với loài *Leishmania donovani*, nhưng không có tác dụng với loài vi khuẩn *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* [89].

1.2.2.3. Một số hoạt tính khác

Một hợp chất có khung chamigrane sesquiterpene là elatol (**22**), được phân lập từ loài sên *A. dactylomela* thể hiện hoạt tính sinh học đa dạng, ví dụ hoạt tính diệt ký sinh trùng chống lại bộ xít hút máu như *Trypanosoma cruzi* và *Leishmania amazonensis* [97], và diệt ấu trùng chống lại muỗi sốt xuất huyết *Aedes aegypti* [98].

Một nghiên cứu khác vào năm 1999, hợp chất nidificene (**37**) được tìm thấy từ loài sên biển *A. dactylomela* [28]. Hợp chất này được phát hiện có hoạt tính kháng vi rút chống lại vi rút herpes (HSV-1), nhóm exomethylene là nhân tố chính cho hoạt tính kháng vi rút [99].

Năm 1981, Gopichand và các cộng sự phân lập được hợp chất 8-deoxyisocaespitol (**55**) từ loài sên biển *A. dactylomela* [33]. Hợp chất **55** cho thấy tác dụng diệt ấu trùng và giun trong đối với *Caenorhabditis elegans* [9].

Năm 1963, Yamamura và Hirata đã phân lập từ loài sên *A. kurodai* thu được hợp chất aplysin (**81**) [39]. Một nghiên cứu khác cho thấy chất **81** có tác dụng bảo vệ đáng kể đối với tổn thương gan ở chuột được điều trị bằng ethanol bằng cách điều chỉnh con đường chuyển hóa ethanol, giảm căng thẳng, cải thiện chức năng ty thể và ức chế quá trình mao quản qua trung gian tổn thương ty thể, cuối cùng là ngăn ngừa chữa tổn thương gan do bia rượu [100].

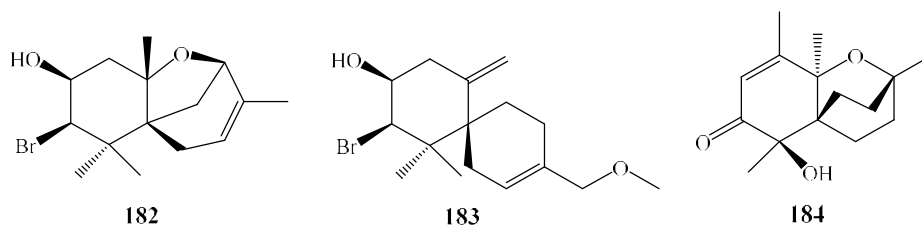
Hai hợp chất deoxyparguerol (**118**) và isoparguerol (**121**) đã được biết trước đây từ mẫu sên *A. dactylomela* [52]. Hai hợp chất **118** và **121** gây ra sự phát triển dinh dưỡng thần kinh đáng kể với tế bào tuyến thượng thận PC-12 ở các nồng độ lần lượt là 25,0 và 50,0 μM [101]. Dòng tế bào này có khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh khi được kích thích bởi yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF). PC-12 được sử dụng để nghiên cứu các quá trình như biệt hóa tế bào thần kinh, chức năng tế bào hạt, và phản ứng của tế bào đối với các yếu tố môi trường như điện từ trường (EMF), cho thấy chúng có thể được sử dụng trong điều trị các chứng rối loạn thoái hóa tế bào thần kinh khác nhau.

Năm 2009, nghiên cứu về loài sên *A. dactylomela* đã phân lập được aplysqualenol A (**129**), aplysqualenol B (**130**) [58]. Một nghiên cứu của Viện Ung thư Quốc gia (NCI) cho thấy hợp chất **129** thể hiện hoạt tính ức chế chống lại hệ thần kinh trung ương SNB-19 (CNS) với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,4 $\mu\text{g/mL}$ [58]. Hơn nữa hợp chất **129** có khả năng kháng vi rút chống lại vi rút *Herpes simplex* loại 1 (HSV-1) và loại 2 (HSV-2), vi rút *Varicella zoster* (VZV) và *Cytomegalovirus* ở người (HCMV) [58]. Về hoạt tính chống co thắt, hai hợp chất **129** và **130** cho thấy tác dụng

vừa phải với *Plasmodium falciparum* với giá trị IC_{50} là 11,0 và 18,0 $\mu\text{g/mL}$ tương ứng [58].

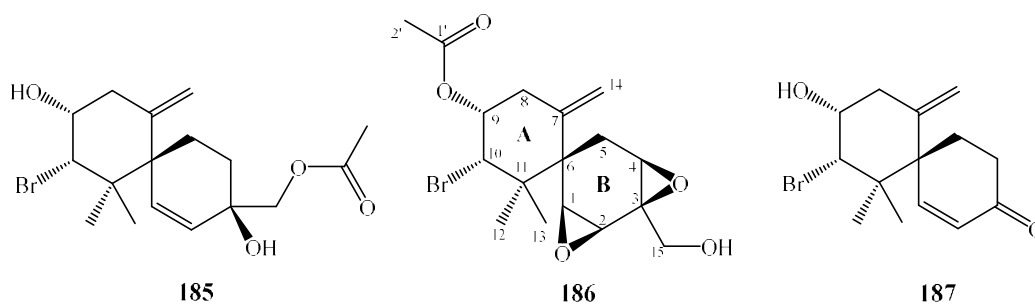
1.2.3. Một số nghiên cứu trong nước về loài sên thuộc giống *Aplysia*

Trong nước mới chỉ có hai nhóm nghiên cứu. Nhóm nghiên cứu Phạm Thị Mai Hương và các cộng sự (2021) đã nghiên cứu về loài sên *A. dactylomela* (Hòn Mê, Thanh Hóa) được ba hợp chất mới aplydactylonin A (**182**), aplydactylonin B (**183**), aplydactylonin C (**184**) [102]. Cấu trúc của 3 hợp chất trên được xác định bằng các phương pháp phổ NMR, Xray và ECD kết hợp với các phương pháp tính toán lý thuyết hóa lượng tử. Hợp chất **183** thể hiện hoạt tính độc tế bào với ba dòng tế bào HepG2, DU145 và A549 với giá trị IC_{50} tương ứng là 4,08, 38,64 và 12,33 μM . Ngoài ra, hợp chất **183** còn được chứng minh có khả năng gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) đối với dòng tế bào ung thư gan người HepG2 [102].



Hình 1. 14. Các hợp chất phân lập từ sên biển *A. dactylomela* – Hòn Mê, Thanh Hóa

Nghiên cứu thứ hai mới được công bố trong năm (2022) do nghiên cứu sinh và các cộng sự cũng nghiên cứu về loài sên trên nhưng khác vị trí địa lý (Phú Quý, Lâm Đồng) và phân lập được bốn hợp chất là dactylomelanin A (**185**), dactylomelanin B (**186**) và hai hợp chất đã biết ma'ilione (**187**) và (3 β ,5 α ,8 α)-5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol (**155**). Hai hợp chất **185** và **186** được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân, kết hợp với các phương pháp tính toán lý thuyết NMR và ECD [103].



Hình 1. 15. Các hợp chất phân lập từ sên biển *A. dactylomela* – Phú Quý, Lâm Đồng

Kết quả nghiên cứu khảo sát cho thấy từ loài sên biển *A. dactylomela* phân được lớp chất sesquiterpene và có nhiều chất mới. Điển hình chất mới aplydactylonin B (**183**) thể hiện hoạt tính độc tế bào mạnh với hai dòng tế bào HepG2 và A549 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 4,08 và 12,33 μ M. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về các loài sên biển. Nên việc cần nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học từ các loài sên ở Việt Nam là cần thiết, cần nhiều nghiên cứu hơn để tìm kiếm nhiều chất mới cũng như hoạt tính sinh học của chúng.

1.3. Đặc điểm hai loài sên biển thuộc giống *Aplysia*

1.3.1. Đặc điểm loài sên biển *Aplysia dactylomela*

Sên biển *Aplysia dactylomela* thường có màu vàng nhạt đến xanh lục, điều này thay đổi rất nhiều tùy theo thức ăn mà chúng tiêu thụ, chúng có thể có nhiều màu cam hơn nếu chế độ ăn của chúng chủ yếu là tảo đỏ. Một đặc điểm giúp phân biệt *A. dactylomela* với các loài khác trong giống của nó là các vòng đen không đều bao phủ cơ thể. Bề mặt lưng của lớp áo và parapodia được đánh dấu bằng các đốm đen không đều tạo thành các vòng không hoàn chỉnh, trong khi phần còn lại của cơ thể được đánh dấu bằng các vòng hoàn chỉnh hơn. Bàn chân rộng và phát triển tốt, đầu trước tròn, đầu sau nhọn hơn. Bàn chân có kết cấu thô ráp, trái ngược với bề mặt mềm mịn của phần còn lại của cơ thể. Parapodia là phần mở rộng của bàn chân, ở *A. dactylomela* chúng cao và mỏng, cho phép động vật bơi trong nước. Lớp vỏ thu nhỏ được bao phủ bởi lớp áo và mang nằm ở phía bên phải của lớp áo, giữa lớp vỏ và cơ parapodia bên phải [104].

Trứng của *A. dactylomela* thường được nhìn thấy ở các thảm cỏ, ở độ sâu bãi triều khoảng 3 mét, chúng xuất hiện dưới dạng một chuỗi dài có màu xanh lục hoặc nâu có nhiều màu sắc khác nhau. Số lượng lớn trứng được sản sinh ở trong sinh vật phù du trong thời gian dài một tháng. Sau giai đoạn này, ấu trùng định cư trên tảo nơi chúng phát triển. Chúng tiếp tục kiếm ăn và phát triển đến tuổi trưởng thành về mặt sinh dục. Tảo đỏ *Laurencia* đã được chứng minh là có tác dụng kích thích tới màu sắc của sên biển, và thành phần hóa học của chúng cũng có sự tương đồng với nhau [105].

Giống như tất cả các loài *Aplysia*, *A. dactylomela* là loài lưỡng tính. Cơ quan sinh dục nam nằm ngay dưới gốc xúc tua trước bên phải, nằm giữa mắt phải và miệng phải. Một rãnh có lông chuyển rõ rệt kéo dài về phía sau từ cơ quan sinh dục đực giữa cơ quan chân đến lỗ lưỡng tính, được đánh dấu bằng một vết lõm tối. Rãnh được đánh dấu bằng một đường hẹp màu đen kéo dài từ lỗ sinh dục đến ống lưỡng tính. Khi giao phối, một con *A. dactylomela*, đóng vai con đực sẽ leo một phần lên con *A.*

dactylomela thứ hai, đóng vai con cái, đưa bộ gen đực và giải phóng tinh trùng vào ống lưỡng tính của con thứ hai. Theo cách này, chúng tạo thành chuỗi gồm tối đa 12 sinh vật, mỗi sinh vật đóng vai trò đồng thời là đực và cái, sinh vật đầu tiên trong chuỗi chỉ đóng vai trò là con cái và sinh vật cuối cùng chỉ đóng vai trò là con đực [106]. *A. dactylomela* có khả năng bơi và bò. Nó tiến tới phía trước bằng cách tạo ra một cái phễu bằng cách sử dụng parapodia (phần màng, tua nhô ra khỏi cơ thể) gấp về phía trước và hướng xuống dưới, hành động này kéo nước vào. Sau đó, nó đẩy nước ra khỏi phía sau con vật bằng cách ấn các phần trước của parapodia lại với nhau, do đó đạt được chuyển động về phía trước. Phương thức di chuyển thông thường của sên biển là bò; nó bò bằng cách nhấc đầu trước của bàn chân lên, duỗi về phía trước rồi đặt xuống đất phía trước, tạo thành hình vòng cung, phần còn lại của cơ thể tuân theo kiểu uốn cong này cho đến khi chạm tới đuôi [107].

1.3.2. Đặc điểm loài sên biển *Aplysia oculifera*

Sên biển Ấn Độ-Thái Bình Dương *Aplysia oculifera* (Adams & Reeve, 1850). Loài động vật ăn cỏ quan trọng theo mùa, chủ yếu sống về đêm, ở các vùng bãi triều và cận triều của các bờ biển nhiều đá ở phía bắc Vịnh Eilat (Aqaba), Biển Đỏ. Sên biển *A. oculifera* có thể được tìm thấy ở vùng nước nông, thường sâu từ 1-10 mét, tại Đại Tây Dương. Những sinh vật này ưa thích các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, nơi nhiệt độ nước dao động từ 15-25°C, cho phép chúng phát triển mạnh trong môi trường biển. Nó xuất hiện từ tháng 12 đến tháng 5 và ăn các loài tảo xanh (*Enteromorpha intestinals* và *Ulwa* sp.). Các quan sát được thực hiện từ năm 1988 đến năm 1992 tại sáu địa điểm có khoảng cách gần nhau cho thấy sự khác biệt lớn về cả kích thước cơ thể và tốc độ sinh sản giữa các quần thể khác nhau trong cùng một mùa và giữa các năm [108]. Để sinh sống thành công trong môi trường sống không thể đoán trước, sên biển phải có khả năng sử dụng tài nguyên một cách hiệu quả bằng cách đạt năng suất cao vào những thời điểm tảo dồi dào, nhưng cũng phải có khả năng tồn tại và sinh sản khi tảo khan hiếm. Sên biển sinh con với số lượng tương quan với kích thước cơ thể, từ đó liên quan đến nguồn thức ăn sẵn có [108]. Khi thức ăn khan hiếm, chúng có thể phân bổ nguồn lực để sinh sản ở giai đoạn đầu khi có kích thước cơ thể nhỏ. Điều này sẽ dẫn đến số lượng con thấp, nhưng sẽ đảm bảo sự liên tục của quần thể trong năm tiếp theo.

Sên biển *A. oculifera* này là động vật ăn cỏ, nghĩa là chúng chủ yếu ăn các loại thực phẩm có nguồn gốc thực vật như tảo và rong biển, có thể ăn tới 50% trọng lượng cơ thể của chúng là tảo mỗi ngày. Chúng sử dụng radula, một cấu trúc giống như lưỡi với những chiếc răng nhỏ, để cạo và nghiền thức ăn, cho phép chúng tiêu thụ một

lượng lớn tảo và giúp cân bằng hệ sinh thái biển, điều này rất quan trọng đối với sự duy trì hệ sinh thái của đại dương.

Thức ăn của sên biển chủ yếu là các loại tảo như *Laurenica* sp. và *Plocamium* sp.. Do đó thành phần hóa học giữa sên biển và các loại tảo này có cấu trúc gần giống nhau. Theo chiến lược phòng vệ bằng hóa chất, sên biển dự trữ và tập trung thức ăn trong các tuyến tiêu hóa [8], và do đó, các tuyến này là nguồn cung cấp dồi dào các chất chuyển hóa độc hại bao gồm polyketide, alkaloid, peptide và terpene [109]. Ngoài các chất tiêu hóa này các tuyến là một nguồn sản phẩm tự nhiên đa dạng, các nghiên cứu trước đây đã xác định rằng các chất chuyển hóa như vậy cũng là một nguồn phong phú các thành phần có hoạt tính sinh học, từ các chất gây độc tế bào nói chung đến các chất chống ung thư nhắm vào các bệnh ung thư cụ thể. Hoạt tính sinh học như vậy đã làm cho sên biển trở thành nguồn cung cấp các sản phẩm tự nhiên mới đầy hứa hẹn có tiềm năng cao [9, 110].

Tổng quát lại cho thấy giống sên biển *Aplysia* là một nhóm động vật thân mềm sống ở vùng biển nhiệt đới và cận nhiệt đới, có khả năng hấp thu, biến đổi và tích lũy nhiều hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ tảo và vi sinh vật biển. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, nhiều loài *Aplysia* đã được phát hiện chứa các hợp chất thứ cấp đa dạng như alkaloid, terpenoid, polyketide, peptide, cùng nhiều dẫn xuất đã được chứng minh có hoạt tính sinh học đáng chú ý, đặc biệt là kháng khuẩn, kháng ung thư, chống oxy hóa và kháng viêm. Khả năng tự acetyl hóa hoặc biến đổi hóa học một số chất độc từ nguồn thức ăn để giảm độc tính và tạo ra các cấu trúc mới cũng là đặc điểm sinh học nổi bật, góp phần làm giàu thêm kho tàng hợp chất thiên nhiên có tiềm năng được học.

Do vậy, việc tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của giống sên biển *Aplysia* không chỉ góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về đa dạng sinh học và hóa học tự nhiên ở biển Việt Nam, mà còn mở ra những định hướng mới trong khai thác, sàng lọc nguồn nguyên liệu biển phục vụ phát triển thuốc và sản phẩm sinh học. Đây cũng chính là cơ sở khoa học - thực tiễn quan trọng cho định hướng nghiên cứu tiếp theo.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Mẫu sên biển *Aplysia dactylomela* - đảo Phú Quý, Lâm Đồng

Sên biển *Aplysia dactylomela* Rang, 1828 được thu thập vào tháng 5 năm 2021 tại đảo Phú Quý, Lâm Đồng với khối lượng tươi là 600 (g) do GS. Đỗ Công Thung, Viện Khoa học Công nghệ Năng Lượng và Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định bằng đặc điểm hình thái. Mẫu tiêu bản được ngâm trong cồn và lưu giữ tại Phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.1. Sên biển *A. dactylomela* – Phú Quý, Lâm Đồng

2.1.2. Mẫu sên biển *Aplysia dactylomela* – Đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi

Sên biển *Aplysia dactylomela* Rang, 1828 được thu thập tại đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi vào tháng 6 năm 2023 với khối lượng mẫu tươi 1,25 (kg) do ThS. Nguyễn Chi Mai, Phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học giám định bằng phương pháp sinh học phân tử. Mẫu tiêu bản được ngâm trong cồn và lưu giữ tại Phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.2. Sên biển *A. dactylomela* – Lý Sơn, Quảng Ngãi

2.1.3. Mẫu sên biển *Aplysia oculifera* – Lăng Cô, Huế

Sên biển *Aplysia oculifera*, được thu thập vào tháng 06 năm 2023 tại vùng biển Lăng Cô, Huế với khối lượng tươi là 9,0 (kg) do ThS. Nguyễn Chi Mai, Phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học giám định bằng phương pháp sinh học phân tử. Mẫu tiêu bản được ngâm trong cồn và lưu giữ tại Phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.3. Sên biển *A. oculifera* – Lăng Cô, Huế

2.2. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

- Các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2) và ung thư cổ tử cung (Hela) do ATCC cung cấp.

- Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) (Invitrogen), có bổ sung thêm L-glutamine (Invitrogen), sodium pyruvate (Invitrogen), NaHCO_3 , penicillin/streptomycin (Invitrogen), 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen), Trypsin-EDTA (0,05%) của Invitrogen (Hoa Kỳ).

- Đĩa 96 giếng nhựa và đĩa nuôi cấy tế bào sáu giếng nhựa (Corning, USA), pipette (Eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (BioRad).

- Kính hiển vi soi ngược (Axiovert 40 CFL); buồng đếm tế bào (Fisher); tủ ấm CO_2 (Sanyo), tủ lạnh sâu -80°C (Biobase), bình nitơ lỏng (Trung Quốc), cân phân tích (Ohaus), máy đo pH và các dụng thí nghiệm thông thường

- Chất tham khảo: camptothecin (AK Scientific).

- Các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Fisher), PBS (phosphate buffered saline) (Gibco), camptothecin, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), axit axetic (Trung Quốc) v.v.

- Các hóa chất cho sắc ký và phân lập hợp chất: silica gel pha thường 0,040-0,063 mm (240-430 mesh), pha đảo RP C-18, YMC (12 nm, S – 150 μ m, Karasuma-Gojo) và sephadex LH-20. Nhựa trao đổi ion Diaion HP-20 (Misubishi Chem. Ind. Co., Ltd.). Các hóa chất này xuất xứ từ Đức do hãng Merck cung cấp. Các dung môi hữu cơ như *n*-hexane (95%), methanol (95%), dicloromethane (95%), acetone (95%), nước, ethyl acetate (95%) và có xuất xứ từ Trung Quốc, Malaysia.

- Dung môi sắc ký lỏng như methanol (99%), acetonitril (99%), hãng Fisher cung cấp và có xuất xứ Hàn Quốc.

- Các dung môi đo phổ như: CD_3OD , CD_3Cl , Acetone- d_6 được cung cấp bởi công ty hóa chất thương mại như Scharlau.

2.2.2. Thiết bị nghiên cứu

- Máy đo độ quay cực JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hoá học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 (Agilent Technologies, Mỹ) tại phòng Nghiên cứu sinh vật biển, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Máy đo ECD ChirascanTMECDspectrometer (Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK) tại Viện Hóa học, VAST.

- Máy đo phổ khối phân giải cao đo trên máy Agilent 6530 iFunnel Q-TOF LC/MS của Viện Hóa học.

- Máy đo phổ NMR được ghi bằng máy BRUKER AVANCE 500 MHz và máy BRUKER ASCEND 600 MHz của Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Ngoài ra còn một số máy khác như máy sấy bản mỏng, máy hứng phân đoạn Fraction collecto 1200, máy cô quay chân không Eyela-N-1110...

2.3. Phương pháp nghiên cứu các hợp chất từ mẫu nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

Một số phương pháp sắc ký được sử dụng để phân lập các hợp chất thứ cấp từ sên biển như sau:

2.3.1.1. Sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography - TLC)

Sắc ký bản mỏng - TLC là phương pháp nghiên cứu hiệu quả để phân tích và xác định số lượng các nhóm chất khác nhau có trong thành phần dịch chiết sinh vật biển hoặc các phân đoạn tách ra từ đó.

2.3.1.2. Sắc ký cột (Column chromatography - CC)

Sắc ký cột là phương pháp thường quy được sử dụng để tách phân đoạn các nhóm chất khác nhau từ dịch chiết hỗn hợp ban đầu như các dịch chiết mẫu biển. Các chất có trọng lượng và kích cỡ phân tử khác nhau cũng như có cấu trúc hóa học khác nhau sẽ được phân tách thành các phân đoạn hóa học khác nhau [111].

2.3.1.3. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Sắc ký lỏng điều chế hiệu năng cao được tiến hành trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 (Agilent Technologies, Mỹ). Dựa trên thời gian lưu của các chất trên đường nền UV để xác định được tín hiệu của các chất và tinh chế được hợp chất tinh khiết.

2.3.2. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

2.3.2.1. Độ quay cực ($[\alpha]_D$)

Dựa trên độ quay cực cho gợi ý cấu trúc lập thể tương đối của một hợp chất khi có một chất có khung chất tương tự và cấu hình đã được công bố.

2.3.2.2. Phổ lưỡng sắc tròn (ECD)

Dựa trên phổ ECD thực nghiệm và sau đó dùng phương pháp tính toán ECD thì xác định được cấu hình tuyệt đối của các vị trí bất đối trong một số hợp chất cần xác định cấu hình lập thể.

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

Dựa trên phổ khối phân giải cao xác định được các píc ion giả phân tử của hợp chất cần xác định, từ đó xác định được công thức ion giả phân tử, xác định được công thức phân tử và khối lượng phân tử của hợp chất.

2.3.2.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

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

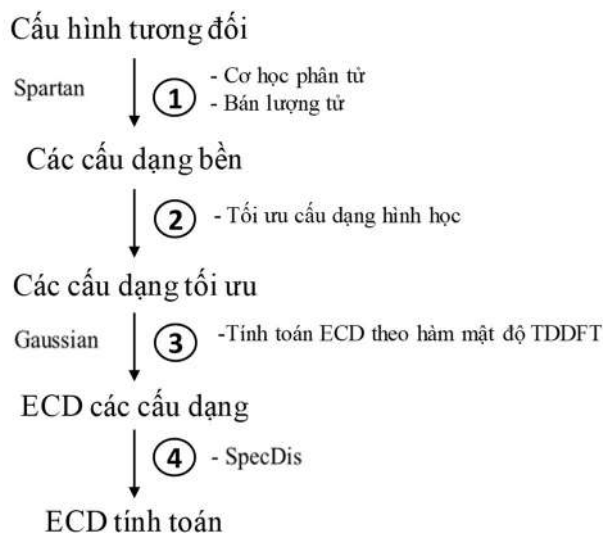
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D NMR): ^1H NMR, ^{13}C NMR và DEPT;

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (2D NMR): HSQC, HMBC, COSY và NOESY/ROESY.

Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi: acetone- d_6 , $CDCl_3$, CD_3OD , DMSO- d_6 ... Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu thử.

Dựa vào phổ 1D, 2D xác định được cấu trúc phẳng của hợp chất cũng như xác định được cấu trúc lập thể tương đối của hợp chất cần xác định cấu trúc.

2.3.2.5. Phương pháp tính toán ECD



Hình 2.4. Sơ đồ các bước tính toán ECD

- *Bước 1*: Tìm kiếm cấu dạng được thực hiện trên phần mềm Spartan 18 (Viện Hóa học). Mỗi phân tử được thực hiện theo phương pháp cơ học lượng tử MMFF (Merck molecular force field) và bán lượng tử PM3.

- *Bước 2*: Các cấu dạng nhận được có hệ số phân bố Boltzmann trên 1% sẽ được tối ưu hóa.

- *Bước 3*: Tính toán phổ ECD theo hàm mật độ phụ thuộc thời gian (Time Dependent Density Functional Theory, TDDFT) trên phần mềm Gaussian 16 (Viện Hóa học) sử dụng các mức tính toán B3LYP/6-31G(d,p), CAM-B3LYP/6-31G(d,p), hoặc wB97XD/6-31G(d,p). Ảnh hưởng của dung môi methanol được tính toán theo mô hình IEFPCM (Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model). Để xác nhận rằng mỗi cấu tử được tối ưu hóa tương ứng với một giá trị năng lượng tối thiểu thực, các phép tính tần số đã được thực hiện ở cùng mức lý thuyết.

- *Bước 4*: Các phổ ECD thu được của mỗi cấu dạng sẽ được tổng hợp lại dựa trên hệ số phân bố Boltzmann của chúng sử dụng phần mềm SpecDis 1.71 để nhận phổ ECD theo lý thuyết của mỗi hợp chất [112].

2.3.2.6. Phương pháp tính toán phổ NMR



Hình 2.5. Sơ đồ tính toán NMR

- *Bước 1:* Tìm kiếm cấu dạng bền được thực hiện trên phần mềm Spartan 18. Dựa trên lý thuyết cơ học lượng tử, bán lượng tử.

- *Bước 2:* Các cấu dạng nhận được có hệ số phân bố Boltzmann trên 1% sẽ được tối ưu hóa hình học.

- *Bước 3:* Tính toán phổ NMR sử dụng phần mềm Gaussian 16 với mức tính toán wB97XD/6-31G(d) bằng phương pháp orbital nguyên tử không chuẩn (GIAO) [113, 114].

- *Bước 4:* Các số liệu NMR thu được của mỗi cấu dạng sẽ được tổng hợp lại dựa trên hệ số phân bố Boltzmann của chúng để nhận được số liệu NMR tính toán cho mỗi hợp chất.

- *Bước 5:* Dữ liệu NMR của metanol và benzen được tính toán ở cùng một mức và được sử dụng làm tài liệu tham khảo đa chuẩn [115]. Đặc biệt, độ dịch chuyển hóa học không theo tỷ lệ (δ_u) của cacbon sp^2 được tính toán bằng cách sử dụng benzen làm tài liệu tham khảo, trong khi metanol được sử dụng để tính δ_u của cacbon sp^3 và tất cả các proton. Độ dịch chuyển hóa học theo tỷ lệ (δ_{calc}) được hiệu chỉnh bằng công thức $\delta_{calc} = (\delta_u - b)/m$, trong đó m và b lần lượt là độ dốc và điểm chắn, thu được từ biểu đồ hồi quy tuyến tính của δ_u so với độ dịch chuyển hóa học thực nghiệm (δ_{exp}). Việc so sánh độ dịch chuyển hóa học NMR thực nghiệm và tính toán được thực hiện

bằng cách sử dụng sai số tuyệt đối trung bình đã hiệu chỉnh (CMAE), độ lệch bình phương trung bình (RMSD), hệ số tương quan tuyến tính (R^2) và xác suất (DP4+).

$$CMAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\delta_{exp} - \delta_{calc}|$$

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\delta_{exp} - \delta_{calc})^2}$$

Cuối cùng, dữ liệu NMR tính toán sẽ được so sánh với dữ liệu NMR thực nghiệm bằng mô hình tính toán STS (Sorted Training Sets) [116] và xác định được cấu hình lập thể tại các vị trí carbon bất đối trong một hợp chất.

2.3.3. Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư (Phương pháp MTT)

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng gây độc tế bào ở điều kiện *in vitro*. Phương pháp này lần đầu tiên được miêu tả bởi Tim Mosmann trên tạp chí *Immunological Methods* năm 1983. Tác giả sử dụng muối tetrazolium (MTT-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)) làm thuốc thử trong phép so màu, qua đó đánh giá về sự sống sót và khả năng phát triển của tế bào. Vòng tetrazolium của thuốc thử bám chặt vào ti thể của tế bào hoạt động. Dưới tác dụng của enzym dehydrogenase trong tế bào, màu vàng của MTT biến đổi thành màu tím formazan [117]. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Chất thử (20 μ l) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ 100 μ g/ml; 20 μ g/ml; 4 μ g/ml; 0,8 μ g/ml.
- Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 μ l tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10%.
- Để đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, nuôi trong thời gian 72 giờ.
- Sau 72 giờ, 10 μ l MTT (5mg/ml) được cho vào mỗi giếng.
- Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 μ l DMSO 100%.
- Giá trị OD đo ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ.
- Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{OD(chất thử)} - \text{OD(đối chứng trắng)}}{\text{OD(DMSO)} - \text{OD(đối chứng trắng)}}$$

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \% \text{ sống sót}$$

- Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Camptothecin (Sigma) luôn được sử dụng như là chất đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 10 µg/ml; 2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,08 µg/ml.

- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt (hit compound) khi IC₅₀ ≤ 5 µM, IC₅₀ > 80 µM được coi là không có hoạt tính [118].

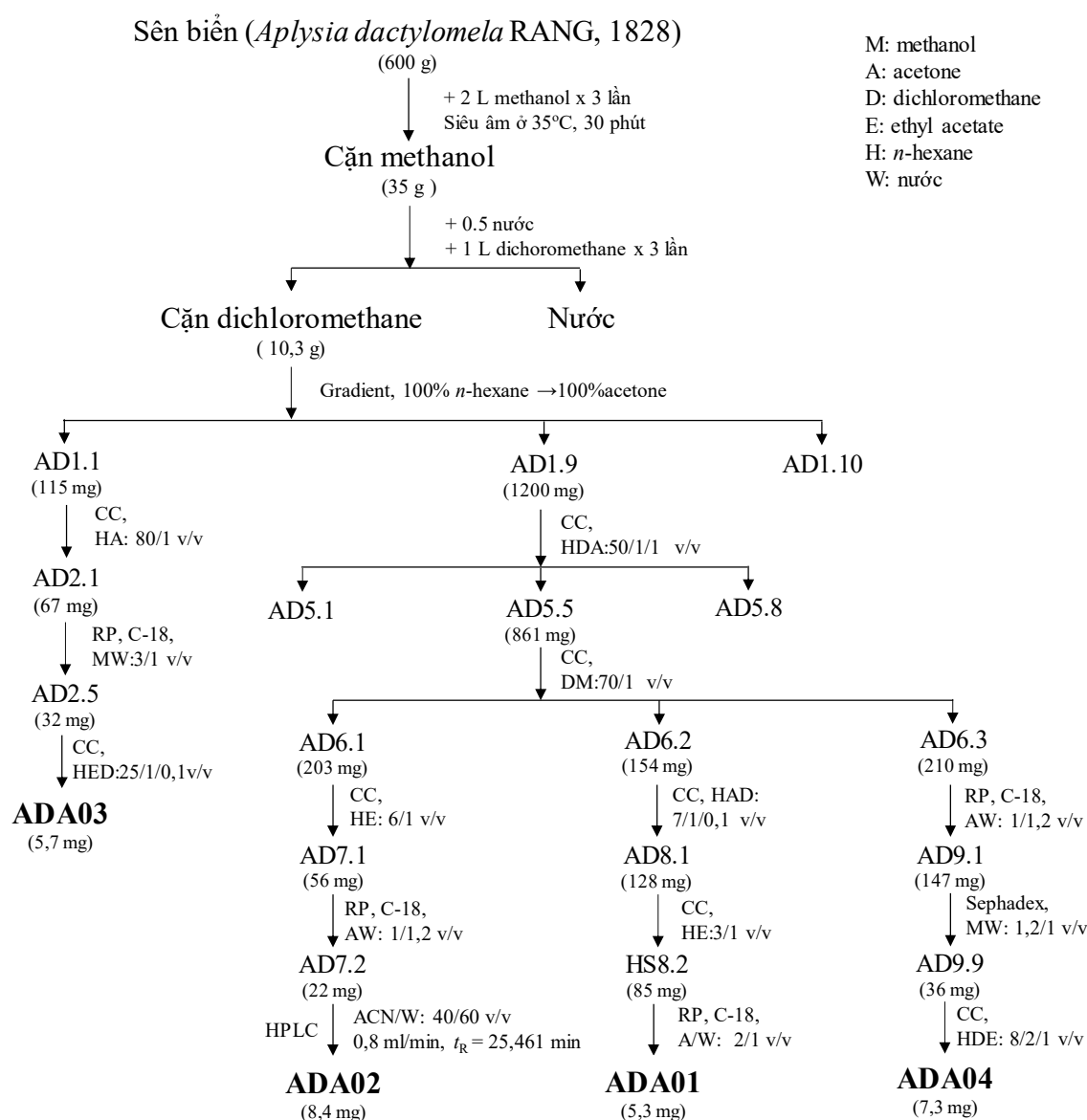
2.4. Thực nghiệm

2.4.1. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển *A. dactylomela* thu từ đảo Phú Quý, Lâm Đồng

Sên biển *A. dactylomela* (600 g) thu được ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng, sau đó xay nhuyễn và ngâm chiết với methanol (2 lít), siêu âm ở 35°C trong 30 phút, lọc dịch chiết và cô cạn trên máy cất quay dưới áp suất thấp. Lặp lại thêm hai lần chiết như trên thì thu được căn chiết methanol (35 g). Sau đó hòa tan căn này với 0,5 lít nước và chiết phân lớp với dung môi hữu cơ dichloromethane (1 lít), lắc đều, để lắng, gạn lớp dịch dichloromethane bên dưới, cô cạn dịch này trên máy cất quay. Lặp lại chiết thêm 2 lần thu được căn chiết phân đoạn dichloromethane (10,3 g). Tiến hành sắc ký căn dichloromethane trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-hexane → 100% acetone) thu được 10 phân đoạn AD1.1 → AD1.10. Từ phân đoạn AD1.1 (115 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone (80/1 v/v) thu được phân đoạn AD2.1 (67 mg), từ phân đoạn này tiếp tục sắc ký trên cột pha đảo RP-C18 cùng với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (3/1, v/v) thu được phân đoạn AD2.5 (32 mg). Từ phân đoạn AD2.5 sắc ký trên một cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/ethyl acetate/dichloromethane (25/10/0,1, v/v) thu được hợp chất sạch **ADA3** (5,7 mg).

Từ phân đoạn AD1.9 (1200 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/dichloromethane/acetone (50/1/1, v/v) thu được 8 phân đoạn

nhỏ AD5.1 → AD5.8. Từ phân đoạn AD5.5 (861 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/methanol (70/1 v/v) thu được 3 phân đoạn nhỏ AD6.1 → AD6.3. Từ phân đoạn nhỏ AD6.1 (203 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/ethyl acetate (6/1, v/v) thu được phân đoạn AD7.1 (56 mg), từ phân đoạn này tiếp tục sắc ký trên cột pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/1,2, v/v) thu được phân đoạn AD7.2 (22 mg). Từ phân đoạn AD7.2 sắc ký trên máy HPLC trên cột ZORBAX 300SB-C18, 4,5x250 mm, tốc độ dòng 0,8 ml/phút và hệ dung môi ACN/nước (40/60, v/v) thu được hợp chất sạch **ADA2** (8,4 mg, $t_R = 25,641$ phút).

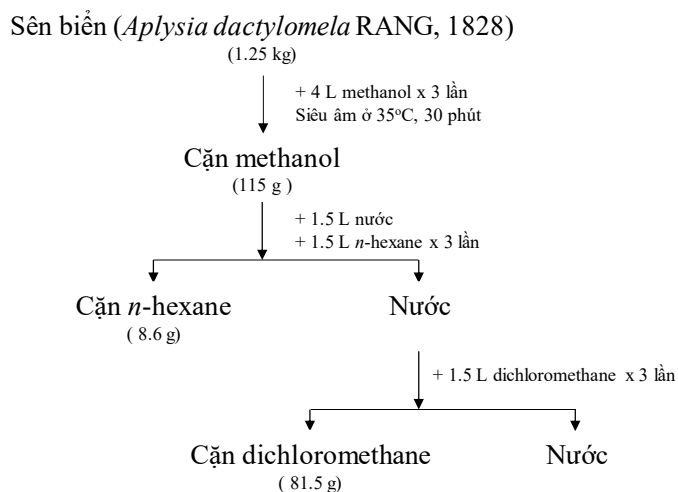


Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ sên biển *A. dactylomela*

Từ phân đoạn AD6.2 (154 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone/dichloromethane (7/1/0,1, v/v) thu được phân đoạn AD8.1 (128 mg). Từ phân đoạn AD8.1 sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-

hexane/ethyl acetate (3/1, v/v) thu được phân đoạn AD8.2 (85 mg). Từ phân đoạn AD8.2 tiếp tục sắc ký trên cột pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất sạch **ADA1** (5,3 mg). Hợp chất **ADA4** (7,3 mg) cũng thu được khi sắc ký phân đoạn AD6.3 (210 mg) trên 3 cột sắc ký cùng các hệ dung môi rửa giải thích hợp.

2.4.2. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển *A. dactylomela* thu từ đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi

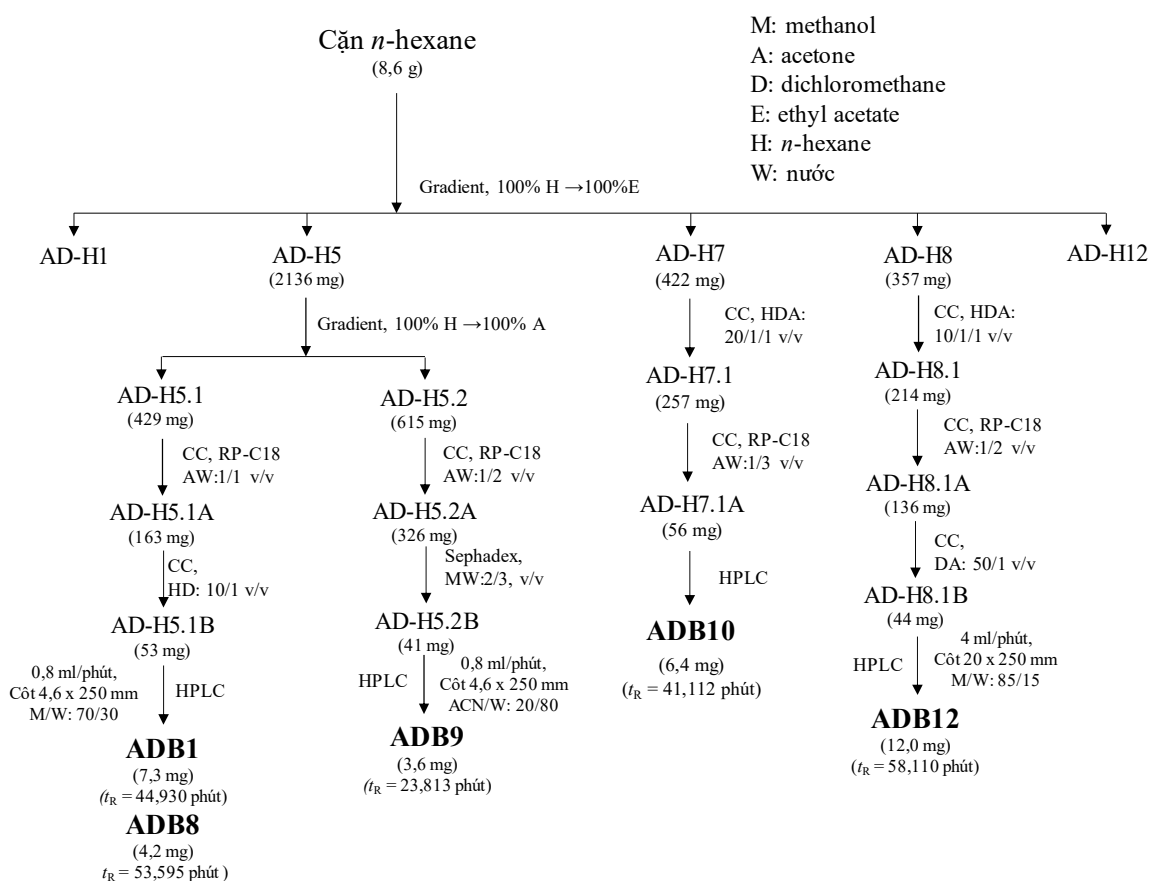


Hình 2.7. Sơ đồ chiết phân đoạn sên biển *A. dactylomela* thu từ Quảng Ngãi

Sên biển *A. dactylomale* (1,25 Kg) thu được ở Quảng Ngãi, sau đó xay nhuyễn và ngâm chiết với methanol (4 lít), siêu âm ở 35°C trong 30 phút, lọc dịch chiết và cô cạn trên máy cất quay dưới áp suất thấp ở nhiệt độ 50°C. Lặp lại thêm hai lần chiết như trên thì thu được cặn chiết methanol (115 g). Sau đó hòa tan cặn này với 1,5 lít nước và chiết phân lớp với dung môi hữu cơ *n*-hexane (1,5 lít), lắc đều, để lắng, gạn lớp dịch *n*-hexane bên trên, cô cạn dịch này trên máy cất quay áp suất giảm và ở nhiệt độ 50°C. Lặp lại chiết thêm 2 lần thu được cặn chiết *n*-hexane (8,6 g). Phần dịch nước còn lại tiếp tục tiến hành chiết với dung môi có độ phân cực hơn dichloromethane (1,5 lít), lắc đều hỗn hợp, để lắng phân lớp thành hai lớp, gạn lấy lớp dịch dichloromethane phía bên dưới, cô quay dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50°C. Lặp lại chiết thêm hai lần thu được cặn chiết dichloromethane (81,5 g).

Tiến hành sắc ký cặn *n*-hexane trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-hexane → 100% ethyl acetate) thu được 12 phân đoạn AD-H1 → AD-H12. Từ phân đoạn AD-H5 (2136 mg) sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/acetone (50/1, v/v) thu được hai phân đoạn AD-H5.1 (429 mg) và AD-H5.2 (615 mg). Phân đoạn AD-H5.1 được sắc ký trên cột silica gel pha đảo RP-C18 với hệ dung môi acetone/nước (1/1, v/v) thu được phân đoạn AD-H5.1A (163 mg), sau đó

tiếp tục sắc ký phân đoạn này trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/dichloromethane (10/1, v/v) thu được phân đoạn AD-H5.1B (53 mg). Tinh chế phân đoạn AD-H5.1B trên máy điều chế HPLC Agilent cùng với cột sắc ký (4,5 mm x 250 mm), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, hệ dung môi methanol/nước (70/30, v/v) thu được hai hợp chất sạch **ADB1** (7,3 mg, $t_R = 44,930$ phút) và **ADB8** (4,2 mg, $t_R = 53,595$ phút). Phân đoạn AD-H5.2 sắc ký trên cột silica gel pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/2, v/v) thu được phân đoạn AD-H5.2A (326 mg), phân đoạn AD-H5.2A tiếp tục được sắc ký trên cột sephadex LH-20 cùng với hệ dung môi methanol/nước (2/3, v/v) thu được phân đoạn AD-H5.2B (41 mg). Phân đoạn AD-H5.2B được tinh chế trên máy HPLC cùng với cột sắc ký (4,5 mm x 250 mm), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, hệ dung môi acetonitrile/nước (20/80, v/v) thu được hai hợp chất sạch **ADB9** (3,6 mg, $t_R = 23,813$ phút).

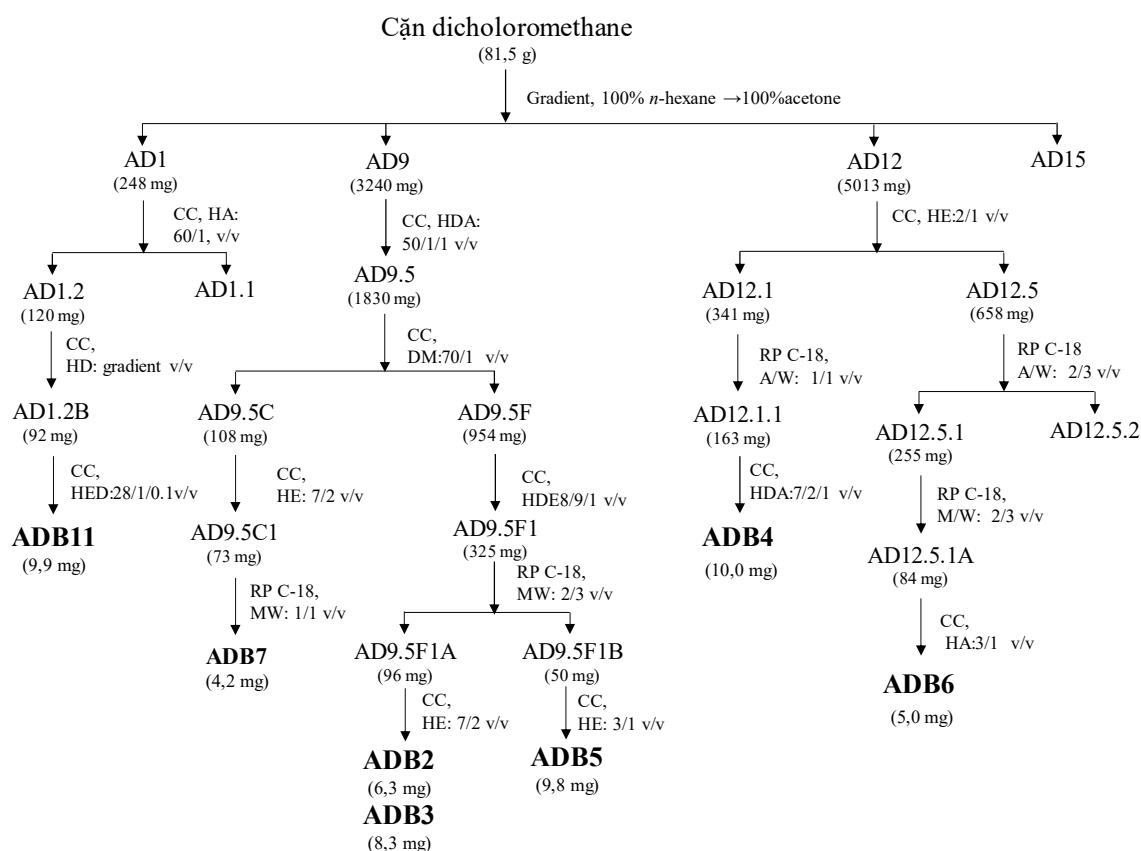


Hình 2.8. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn chiết *n*-hexane của sên biển *A. dactylomela*

Sắc ký phân đoạn AD-H7 (422 mg) trên cột silica gel với pha động bằng hệ dung môi *n*-hexane/dichloromethane/acetone (20/1/1, v/v) thu được phân đoạn AD-H7.1 (257 mg), tiếp tục sắc ký phân đoạn vừa thu được trên cột pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/3, v/v) thu được phân đoạn AD-H7.1A (56 mg). Sau đó tinh sạch phân đoạn AD-H7.1A trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

với cột sắc ký (4,6 mm x 250 mm), tốc độ dòng 0,6 ml/phút, hệ dung môi acetonitril/nước (30/70, v/v) thì thu được hợp chất sạch **ADB10** (6,4 mg, $t_R = 41,112$ phút). Phân đoạn AD-H8 (357 mg) sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/dichloromethane/acetone (10/1/1, v/v) thu được phân đoạn AD-H8.1 (214 mg), sau đó phân đoạn AD-H8.1 được sắc ký trên cột silica pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/2, v/v) thu được phân đoạn AD-H8.1A (136 mg). Phân đoạn AD-H8.1A tiếp tục sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone (50/1, v/v) thu được phân đoạn AD-H8.1B (44 mg). Sau đó phân đoạn AD-H8.1B cũng được tinh chế trên máy HPLC cùng với cột sắc ký (20 mm x 250 mm), tốc độ dòng 4 ml/phút, hệ dung môi methanol/nước (85/15, v/v) thì thu được hợp chất sạch **ADB12** (12,0 mg, $t_R = 58,110$ phút).

Cặn dichloromethane (81,5 g) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-hexane → 100 % acetone) thu được 15 phân đoạn AD1 → ADB10. Tiến hành sắc ký phân đoạn AD1 (248 mg) trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone (60/1, v/v) thu được hai phân đoạn AD1.1 và AD1.2 (120 mg). Phân đoạn AD1.2 được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-hexane → 100% dichloromethane) thu được phân đoạn AD1.2B (92 mg). Hợp chất sạch **ADB11** (9,9 mg) thu được khi tinh chế lại phân đoạn AD1.2B trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ethyl acetate/dichloromethane (28/1/0,1, v/v).



Hình 2. 9. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn dichloromethane của sên biển *A. dactylomela*

Tiến hành sắc ký phân đoạn AD9 (3240 mg) trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane /dichloromethane/acetone (50/1/1, v/v) thu được phân đoạn AD9.5 (1830 mg), phân đoạn này tiếp tục được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/methanol (70/1, v/v) thu được hai phân đoạn AD9.5C (108 mg) và AD9.5F (954 mg). Phân đoạn AD9.5C sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane /ethyl acetate (7/2, v/v) thu được phân đoạn AD9.5C1 (73 mg), phân đoạn này tiếp tục được sắc ký trên cột silica gel pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1, v/v) thu được hợp chất sạch **ADB7** (4,2 mg).

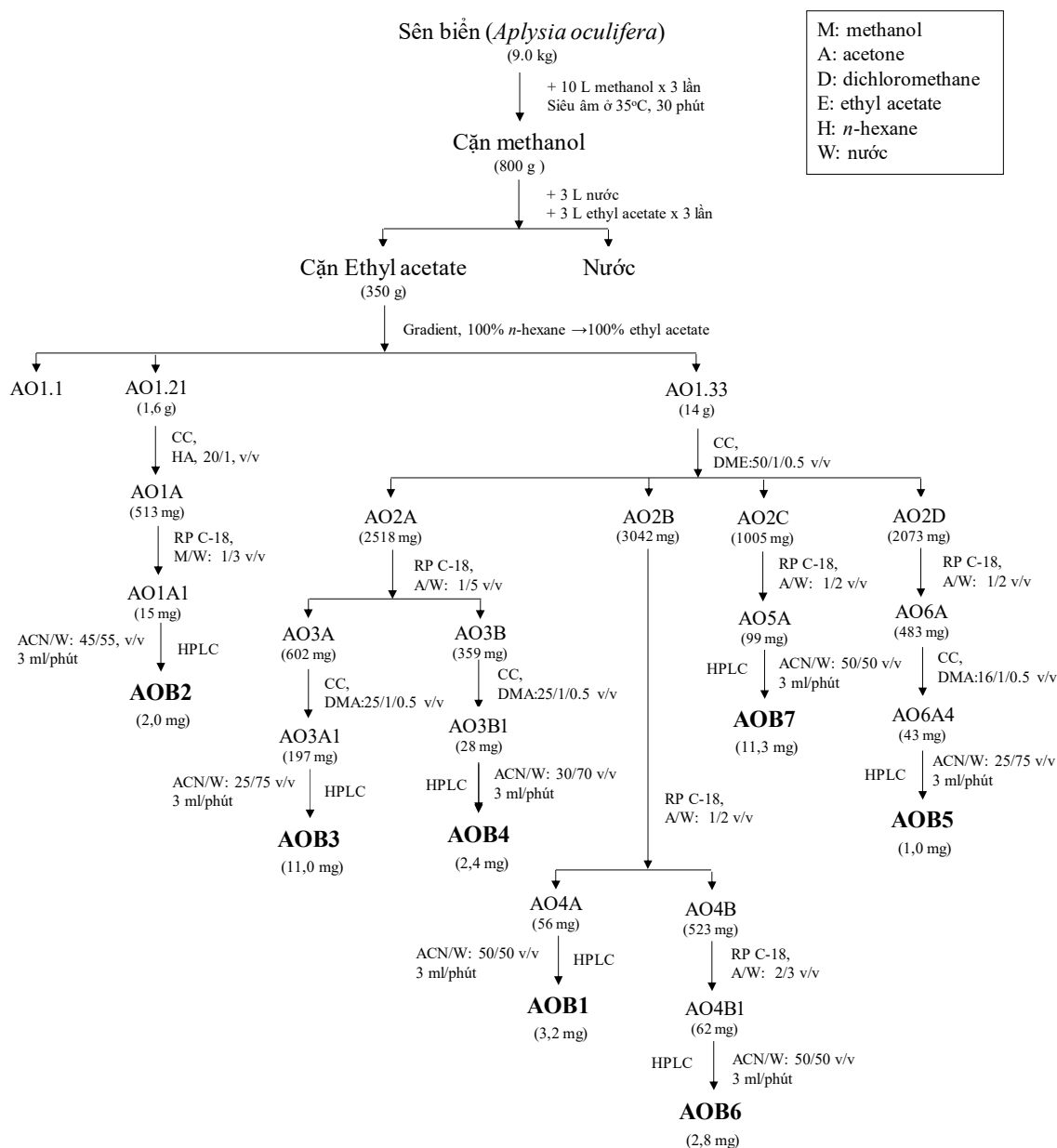
Từ phân đoạn AD9.5F tiến hành sắc ký trên cột silica gel cùng với hệ dung môi pha động *n*-hexane/dichloromethane/ethyl acetate (8/9/1, v/v) thu được phân đoạn AD9.5F1 (325 mg). Từ phân đoạn AD9.5F1 sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (2/3, v/v) thu được hai phân đoạn nhỏ AD9.5F1A (96 mg) và AD9.5F1B (50 mg). Tiếp tục sắc ký phân đoạn AD9.5F1A trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane /ethyl acetate (7/2, v/v) thu được hai hợp chất sạch **ADB2** (6,3 mg) và **ADB3** (8,3 mg). Hợp chất sạch **ADB5** (9,8 mg) cũng được tinh chế khi sắc ký phân đoạn AD9.5F1B trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ethyl acetate (3/1, v/v).

Từ phân đoạn AD12 (5013 mg) tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ethyl acetate (2/1, v/v) thu được hai phân đoạn AD12.1 (341 mg) và ADB12.5 (658 mg). Từ phân đoạn AD12.1 tiến hành sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 cùng với hệ dung môi acetone/nước (1/1, v/v) thu được phân đoạn AD12.1.1 (163 mg), và cũng từ phân đoạn này tiến hành sắc lý trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane /dichloromethane/acetone (50/1/1, v/v) thu được hợp chất sạch **ADB4** (10,0 mg). Từ phân đoạn AD12.5 tiến hành sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 cùng với hệ dung môi acetone/nước (2/3, v/v) thu được phân đoạn AD12.5.1 (255 mg) và AD12.5.2. Từ phân đoạn AD12.5.1 sắc ký trên cột pha đảo pha đảo RP C-18 cùng với hệ dung môi methanol/nước (2/3, v/v) thu được phân đoạn AD12.5.1A (84 mg) và hợp chất **ADB6** (5,0 mg) cũng thu được khi tinh chế lại phân đoạn AD12.5.1A trên bằng cột pha thường silica gel cùng với hệ dung môi *n*-hexane/acetone (3/1, v/v).

2.4.3. Phân lập các hợp chất từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế

Sên biển *A. oculifera* (9,0 Kg) xay nhuyễn và ngâm với 10 Lít methanol, ngâm trong bể siêu âm ở 35°C trong 30 phút, để lắng, gạn dịch chiết và cô cạn trên máy cô quay ở 50°C, áp suất giảm thu được cặn chiết methanol. Lặp lại thêm hai lần thì thu được cặn methanol (800 g). Cặn methanol hòa tan với nước ấm (3 Lít) và chiết phân

lớp với ethyl acetate (3 Lít), lắc đều, để lắng trên phễu chiết, gạn phần dịch chiết ethyl acetate ở phía trên và cô cạn trên máy cất quay ở 50°C dưới áp suất giảm. Tiến hành lặp lại thêm 2 lần thì thu được cặn ethyl acetate (350 g).



Hình 2.10. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ sên biển *A. oculifera*

Cặn ethyl acetate sau khi chiết phân lớp được tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-hexane → 100% ethyl acetate) thì thu được 33 phân đoạn AO1.1 → AO1.33. Tiến hành sắc ký phân đoạn AO1.21 (1,6 g) trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/acetone (20/1, v/v) thu được phân đoạn AO1A (513 mg). Phân đoạn AO1A sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/3, v/v) thu được phân đoạn AO1A1 (15 mg), và tiếp tục tinh chế phân đoạn này trên hệ thống máy điều chế lỏng cao áp Agilent 1260 [cột sắc ký JH08S04-2520WT (250 x 20 mm; S-4μm, 8 nm), tốc độ dòng 3 ml/phút, hệ dung

môi acetonitrile/nước (45/55, v/v), thời gian lưu $t_R = 37,461$ phút] thu được hợp chất sạch **AOB2** (2,0 mg.).

Tiến hành sắc ký phân đoạn AO1.33 (14 g) trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol/ethyl acetate (50/1/0,5, v/v) thu được 4 phân đoạn AO2A→AO2D. Phân đoạn AO2A (2518 mg) được sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/5, v/v) thu được hai phân đoạn AO3A (602 mg) và AO3B (359 mg). Sắc ký phân đoạn AO3A trên cột silica gel cùng với hệ dung môi dichloromethane/methanol/acetone (25/1/0,5, v/v) thu được phân đoạn AO3A1 (197 mg), phân đoạn này tiếp tục được tinh chế trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (25/75, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 38,951$ phút] thu được hợp chất sạch **AOB3** (11,0 mg). Phân đoạn AO3B được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol/acetone (25/1/0,5, v/v) thu được phân đoạn AO3B1 (28 mg). Hợp chất **AOB4** (2,4 mg) cũng thu được khi tinh chế lại phân đoạn AO3B1 trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (30/70, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 44,506$ phút]. Tiến hành sắc ký phân đoạn AO2B (3042 mg) trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/2, v/v) thu được hai phân đoạn AO4A (56 mg) và AO4B (523 mg). Tinh chế phân đoạn AO4A trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (50/50, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 22,743$ phút] thu được hợp chất sạch **AOB1** (3,2 mg). Phân đoạn AO4B được sắc ký trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (2/3, v/v) thu được phân đoạn AO4B1 (62 mg), tinh chế lại phân đoạn này trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (50/50, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 13,886$ phút] thu được hợp chất **AOB6** (2,8 mg). Sắc ký phân đoạn AO2C (1005 mg) trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/2, v/v) thu được phân đoạn AO5A (99 mg). Tinh chế phân đoạn AO5A trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (50/50, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 17,374$ phút] thu được phân hợp chất sạch **AOB7** (11,3 mg). Sắc ký phân đoạn AO2D (2073 mg) trên cột pha đảo RP C-18 với hệ dung môi rửa giải acetone/nước (1/2, v/v) thu được phân đoạn AO6A (483 mg), phân đoạn này tiếp tục được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/methanol/acetone (16/1/0,5, v/v) thì thu được phân đoạn AO6A4 (43 mg). Tinh chế lại phân đoạn AO6A4 trên máy HPLC [hệ dung môi acetonitrile/nước (25/75, v/v), tốc độ dòng 3 ml/phút và thời gian lưu $t_R = 35,522$ phút] thì thu được hợp chất sạch **AOB5** (1,0 mg).

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

2.5.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng

2.5.1.1. Hợp chất **ADA1**: Dactylomelanin C (chất mới)

Chất bột vô định hình màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +107,3$ (*c* 0,87, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{14}H_{19}BrO_2$;

Khối lượng phân tử: 298;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\log \epsilon$): 235 (3,60) nm;

Phổ ECD (*c* 3,36 mM. MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 207 (+3,10), 233 (-1,19) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 299,0657 $[M + H]^+$ và 301,0624 $[M + 2 + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{14}H_{20}BrO_2^+$, m/z 299,0641 và 301,0621);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem Bảng 3.1;

Số liệu phổ 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem Bảng 3.2.

2.5.1.2. Hợp chất **ADA2**: Dactylomelanin D (chất mới)

Chất bột vô định hình màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = -25,3$ (*c* 1,0, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{16}H_{21}BrO_3$;

Khối lượng phân tử: 340;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\log \epsilon$): 235 (3,79) nm;

Phổ ECD (*c* 2,94 mM. MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 207 (+2,38), 233 (-0,77) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 341,0747 $[M + H]^+$ và 343,0728 $[M + 2 + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{16}H_{22}BrO_3^+$, m/z 341,0747 và 343,0726);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.3.

2.5.1.3. Hợp chất **ADA3**: Dactylomelanin E (chất mới)

Chất dầu vàng;

Công thức phân tử: $C_{15}H_{18}O$;

Khối lượng phân tử: 214;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\log \epsilon$): 220 (3,59), 290 (3,01) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 215,1433 $[M + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{19}O^+$, m/z 215,1430);

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) xem Bảng 3.4.

2.5.1.4. Hợp chất *ADA4*: (2S,3R,7S,7R)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one

Chất bột vô định hình màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +40,8$ (c 0,4, MeOH);

Công thức phân tử: $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClO}_2$;

Khối lượng phân tử: 270;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 239 (3,09) nm;

Phổ ECD (c 1,85 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 293 (-4,40) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 271,1459 $[\text{M} + \text{H}]^+$ và 273,1430 $[\text{M} + 2 + \text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{ClO}_2^+$, m/z 271,1459 và 273,1430); 288,1720 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ và 290,1699 $[\text{M} + 2 + \text{NH}_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{ClNO}_2^+$, m/z 288,1725 và 290,1695); 293,1285 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ và 295,1244 $[\text{M} + 2 + \text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClNaO}_2^+$, m/z 293,1279 và 295,1249);

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) xem Bảng 3.5.

2.5.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi

2.5.2.1. Hợp chất *ADB1*: Elatol

Chất dầu không màu;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24} = +75,3$ (c 0,3, MeOH);

Nhiệt độ nóng chảy mp: 62-66°C

Công thức phân tử: $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{BrClO}$;

Khối lượng phân tử: 322;

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) xem Bảng 3.6.

2.5.2.2. Hợp chất *ADB2*: Aplydactylonin I (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +70,4$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{BrO}_2$;

Khối lượng phân tử: 314;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 217 (2,24) nm;

Phổ ECD (c 1,27 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (13,00) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 349,0576 351,0554 $[M + Cl]^-$ và 351,0554 $[M + 2 + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{23}BrO_2Cl$, m/z 349,0575 và 351,0554);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.7.

2.5.2.3. Hợp chất **ADB3**: *Aplydactylonin K* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +24,4$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{17}H_{23}BrO_2$;

Khối lượng phân tử: 356;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 217 (1,95) nm;

Phổ ECD (c 2,23 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 205 (10,82) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 391,0669 $[M + Cl]^-$ và 393,0648 $[M + 2 + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{25}BrO_3Cl$, m/z 391,0681 và 393,0661);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.8.

2.5.2.4. Hợp chất **ADB4**: *Aplydactylonin G* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +21,0$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{15}H_{23}BrO_2$;

Khối lượng phân tử: 314;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 217 (2,46) nm;

Phổ ECD (c 0,7 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (8,98) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 332,1208 $[M + NH_4]^+$ và 334,1182 $[M + 2 + NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{27}BrO_2N^+$, m/z 332,1220 và 334,1200);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.9.

2.5.2.5. Hợp chất **ADB5**: *Aplydactylonin H* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = +69,1$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{17}H_{25}BrO_3$;

Khối lượng phân tử: 356;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 217 (2,15) nm;

Phổ ECD (c 1,68 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 201 (11,54) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 379,0871 $[M + Na]^+$ và 381,0836 $[M + 2 + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{25}BrO_3Na^+$, m/z 379,0880 và 381,0859);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.10.

2.5.2.6. Hợp chất **ADB6**: *Aplydactylonin F* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = -16,7$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{15}H_{23}BrO_3$;

Khối lượng phân tử: 330;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 220 (3,06) nm;

Phổ ECD (c 0,73 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 192 (- 6,92) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 365,0517 $[M + Cl]^-$ và 367,0491 $[M + 2 + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{23}BrO_3Cl^-$, m/z 365,0525 và 367,0504);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) xem Bảng 3.11.

2.5.2.7. Hợp chất **ADB7**: *Aplydactylonin E* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = -7,3$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{17}H_{27}BrO_4$;

Khối lượng phân tử: 374;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 217 (2,27) nm;

Phổ ECD (c 1,07 mM. MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 193 (- 4,51) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 397,0996 $[M + Na]^+$ và 399,0975 $[M + 2 + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{27}BrO_4Na^+$, m/z 397,0985 và 399,0965);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem Bảng 3.13.

2.5.2.8. Hợp chất **ADB8**: *[3(15)E,4Z,6S,9S,10R]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol*

Chất dầu không màu;

Công thức phân tử: $C_{15}H_{20}Br_2O$;

Khối lượng phân tử: 374;

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem Bảng 3.14.

2.5.2.9. Hợp chất **ADB9**: *Pacifidiene*

Chất dầu không màu;

Công thức phân tử: $C_{15}H_{19}Br_2ClO$;

Khối lượng phân tử: 408;

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

xem Bảng 3.15.

2.5.2.10. Hợp chất **ADB10**: *11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon*

Chất dầu không màu;

Phổ hồng ngoại IR: 3620 (OH): 1670, 1600 ($C=C-CO$) cm^{-1} ;

Công thức phân tử: $C_{15}H_{20}O_3$;

Khối lượng phân tử: 248;

Phổ HR-ESI-MS m/z 271,1302 $[M + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{20}O_3Na^+$, m/z 271,1310);

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

xem Bảng 3.16.

2.5.2.11. Hợp chất **ADB11**: *Aplydactylonin D* (chất mới)

Chất dầu vàng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = -3,4$ (c 0,1, MeOH);

Công thức phân tử: $C_{20}H_{24}O_2$;

Khối lượng phân tử: 296;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 297,1855 $[M + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{25}O_2^+$, m/z 297,1849); 319,1679 $[M + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{25}O_2Na^+$, m/z 319,1669);

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

xem Bảng 3.17.

2.5.2.12. Hợp chất **ADB12**: *Thyrsiferol*

Chất dầu không màu;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{20} = +28$ (c 0,6, $CHCl_3$);

Công thức phân tử: $C_{30}H_{53}BrO_7$;

Khối lượng phân tử: 604;

Phổ HR-ESI-MS m/z 627,2872 $[M + Na]^+$ và 629,2870 $[M + 2 + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{30}H_{53}BrO_7Na^+$, m/z 627,28767 và 629,2846);

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) xem Bảng 3.18.

2.5.3. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế

2.5.2.1. Hợp chất **AOB1**: Oculiferanin A (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $C_{22}H_{33}BrO_5$;

Khối lượng phân tử: 456;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 479,1401 $[M + Na]^+$ và 481,1412 $[M + 2 + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{33}BrO_5Na^+$, m/z 479,1404 và 481,1383); 491,1204 và 493,1183 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{33}BrO_5Cl^-$, m/z 491,1200 và 493,1179);

Số liệu phổ 1H -NMR (acetone- d_6 , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.19.

Số liệu phổ 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) xem Bảng 3.20.

2.5.2.2. Hợp chất **AOB2**: Oculiferanin B (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $C_{24}H_{35}BrO_6$;

Khối lượng phân tử: 498;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 533,1326 $[M + Cl]^-$ và 535,1305 $[M + 2 + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{24}H_{35}BrO_6Cl^-$, m/z 533,1306 và 535,1285);

Số liệu phổ 1H -NMR (acetone- d_6 , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.21.

2.5.2.3. Hợp chất **AOB3**: Oculiferanin C (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $C_{22}H_{33}BrO_6$;

Khối lượng phân tử: 472;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 490,1792 $[M + NH_4]^+$ và 492,1775 $[M + 2 + NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{37}BrO_6N^+$, m/z 490,1799 và 492,1778); m/z 507,1153 và 509,1136 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{33}BrO_6Cl^-$, m/z 507,1149 và 509,1129);

Số liệu phổ 1H -NMR (acetone- d_6 , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.22.

2.5.2.4. Hợp chất **AOB4**: *Oculiferanin D* (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $C_{22}H_{33}BrO_5$;

Khối lượng phân tử: 456;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 474,1834 $[M + NH_4]^+$ và 476,1835 $[M + 2 + NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{37}BrO_5N^+$, m/z 474,1850 và 476,1829); m/z 491,1201 và 493,1181 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{22}H_{33}BrO_5Cl^-$, m/z 491,1200 và 493,1179);

Số liệu phổ 1H -NMR (acetone- d_6 , 600 MHz) và ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.23.

2.5.2.5. Hợp chất **AOB5**: *Oculiferanin E* (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $C_{20}H_{29}BrO_5$;

Khối lượng phân tử: 428;

Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 446,1541 $[M + NH_4]^+$ và 448,1514 $[M + 2 + NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{33}BrO_5N^+$, m/z 446,1537 và 448,1516); m/z 463,0889 và 465,0888 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{29}BrO_6Cl^-$, m/z 463,0887 và 465,0866);

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 600 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.24.

2.5.2.6. Hợp chất **AOB6**: *Oculiferanin F* (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_5$;

Khối lượng phân tử: 430;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 448,1687 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ và 450,1653 $[\text{M} + 2 + \text{NH}_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{BrO}_5\text{N}^+$, 448,1693 và 450,1673); tại m/z 465,1038 và 467,1016 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_5\text{Cl}^-$, 465,1043 và 467,1023);

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 600 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.25.

2.5.2.7. Hợp chất **AOB7**: *Oculiferanin G* (chất mới)

Chất rắn vô định hình không màu;

Công thức phân tử: $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{BrO}_6$;

Khối lượng phân tử: 472;

Phổ UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 210 (3,68), 290 (3,93) nm;

Phổ ECD (c 0,17 mM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 203 (- 6,02), 226 (0,84), 246 (0,97), 300 (2,40), 332 (0,41) nm;

Phổ HR-ESI-MS m/z 490,1792 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ và 492,1783 $[\text{M} + 2 + \text{NH}_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{BrO}_6\text{N}^+$, 490,1799 và 492,1798); tại m/z 507,1140 và 509,1123 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{BrO}_6\text{Cl}^-$, 507,1153 và 509,1136);

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 600 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 150 MHz) xem Bảng 3.26.

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

2.6.1. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. dactylomela*

Phép thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2.3. Mười sáu hợp chất sạch, trong đó 4 chất (**ADA1** đến **ADA4**) từ loài *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng và 12 hợp chất sạch (**ADB1** đến **ADB12**) từ loài *A. dactylomela* thu ở đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi được thử

hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2).

2.6.2. Thử nghiệm thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. oculifera*

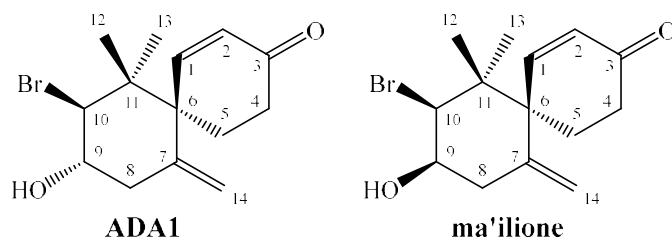
Phép thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2.3. Các hợp chất sạch từ **AOB1** đến **AOB7** phân lập được từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế được thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người: ung thư gan HepG2, ung thư cổ tử cung (Hela) và ung thư vú (MCF-7).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

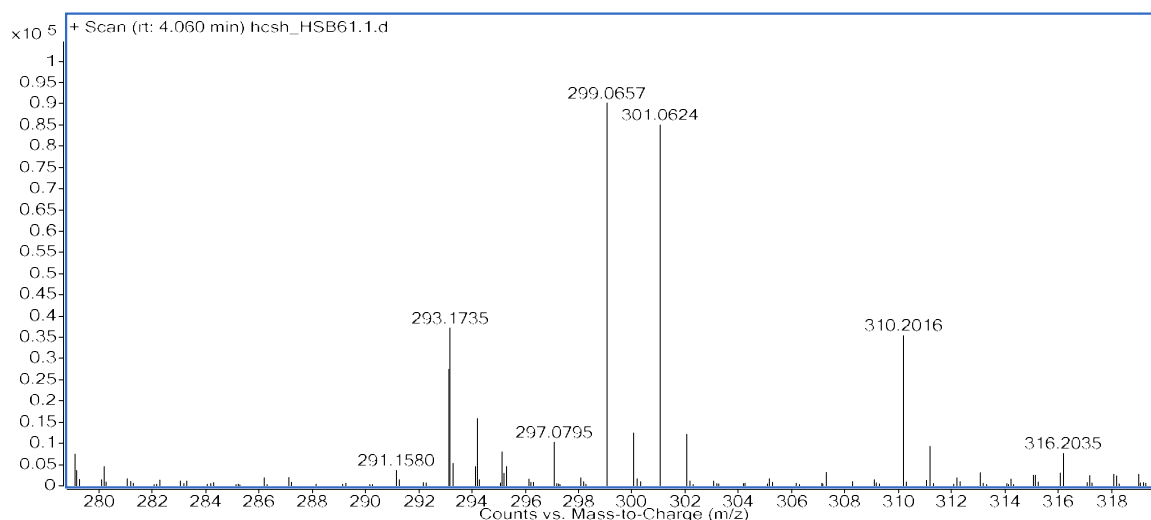
3.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng

3.1.1.1. Hợp chất **ADA1**: Dactylomelanin C (chất mới)



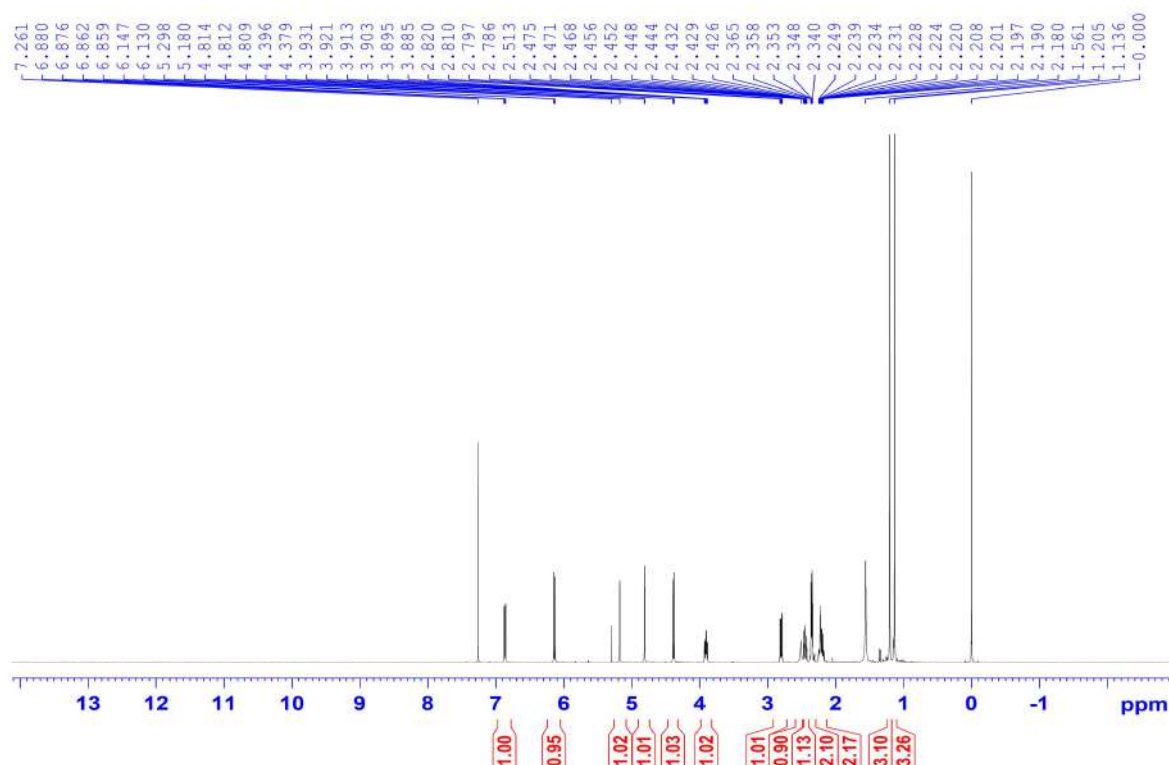
Hình 3.1. Cấu trúc hợp chất **ADA1** và chất tham khảo

Hợp chất **ADA1** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện hai pic ion giả phân tử tại m/z 299,0657 $[M + H]^+$ và 301,0624 $[M + 2 + H]^+$ với tỷ lệ 1:1, gợi ý công thức phân tử của hợp chất là $C_{14}H_{19}BrO_2$ (tính toán theo lý thuyết $C_{14}H_{20}BrO_2^+$, 299,0641 và 301,0621). Hợp chất **ADA1** có độ bất bão hòa là năm (xem hình 3.2).



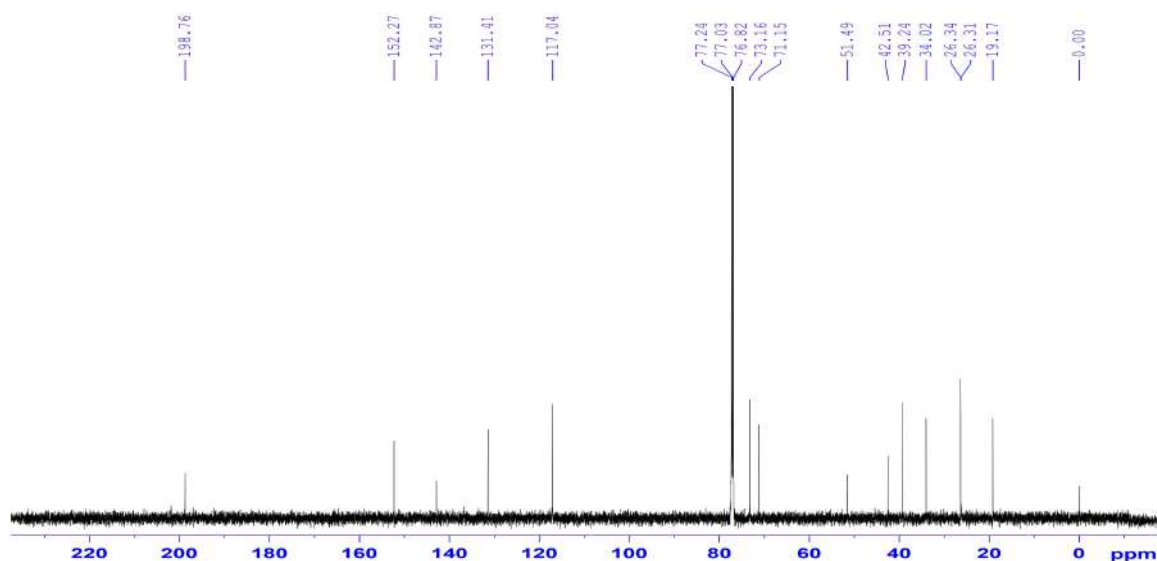
Hình 3.2. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **ADA1**

Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ HSQC của **ADA1** (Bảng 3.1 và hình 3.4) cho thấy tín hiệu của 14 nguyên tử carbon trong hợp chất, bao gồm bốn nguyên tử carbon không chứa proton, bốn nhóm methine, bốn nhóm methylene và hai nhóm methyl. Trong số này, một tín hiệu đặc trưng cho nhóm ketone (δ_C 198,8), bốn nguyên tử cacbon olefinic (δ_C 152,3, 142,9, 131,4 và 117,0), và hai methine oxy hóa hoặc halogen hóa (δ_C 73,2 và 71,2) đã được phát hiện. Hơn nữa, số lượng carbon sp^2 chiếm ba trong tổng số năm độ bất bão hòa được suy ra từ công thức phân tử, cho thấy sự tồn tại của hệ hai vòng trong **ADA1**. Hợp chất là một nor-sesquiterpene (14 carbon).

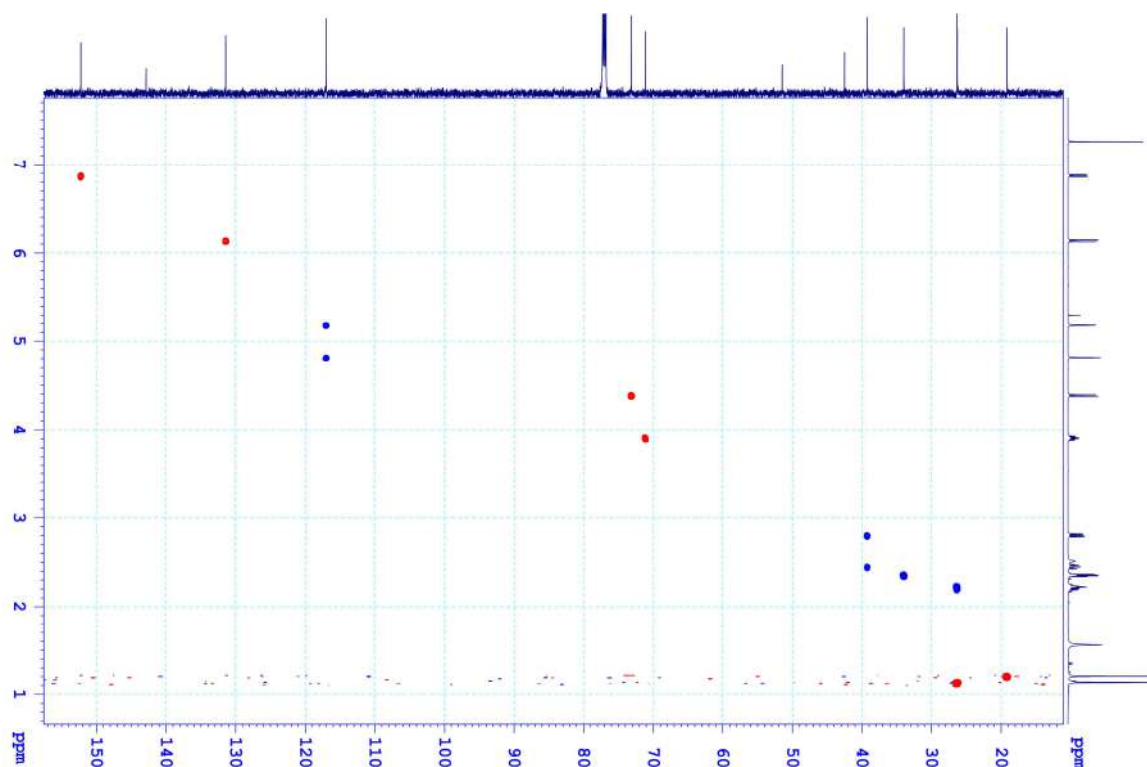


Hình 3.3. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **ADA1**

Phổ ^1H NMR cho thấy sự xuất hiện của liên kết đôi dạng $>\text{C}=\text{CH}_2$ [δ_{H} 5,18 (br s) và 4,81 (t, $J = 1,8$ Hz)]; một liên kết đôi dạng $-\text{CH}=\text{CH}-$ [δ_{H} 6,87 (dd, $J = 10,2, 1,8$ Hz) và 6,14 (d, $J = 10,2$ Hz)] và liên kết đôi có đồng phân hình học dạng (Z) do có hằng số tương tác $J_{1,2} = 10,2$ Hz; hai tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_{H} 1,20 và 1,13 ppm]. Ngoài ra, hai proton methine cộng hưởng ở δ_{H} 4,38 (d, $J = 10,5$ Hz) và δ_{H} 3,90 (ddd, $J = 10,5, 10,5, 6,0$ Hz) tương ứng của nhóm methine brom và nhóm oxymethine tương ứng [119].



Hình 3.4. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **ADA1**

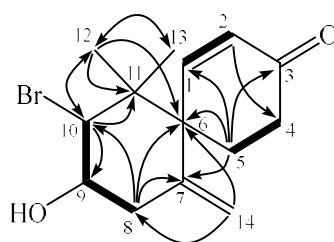


Hình 3.5. Phổ HSQC của hợp chất **ADA1**

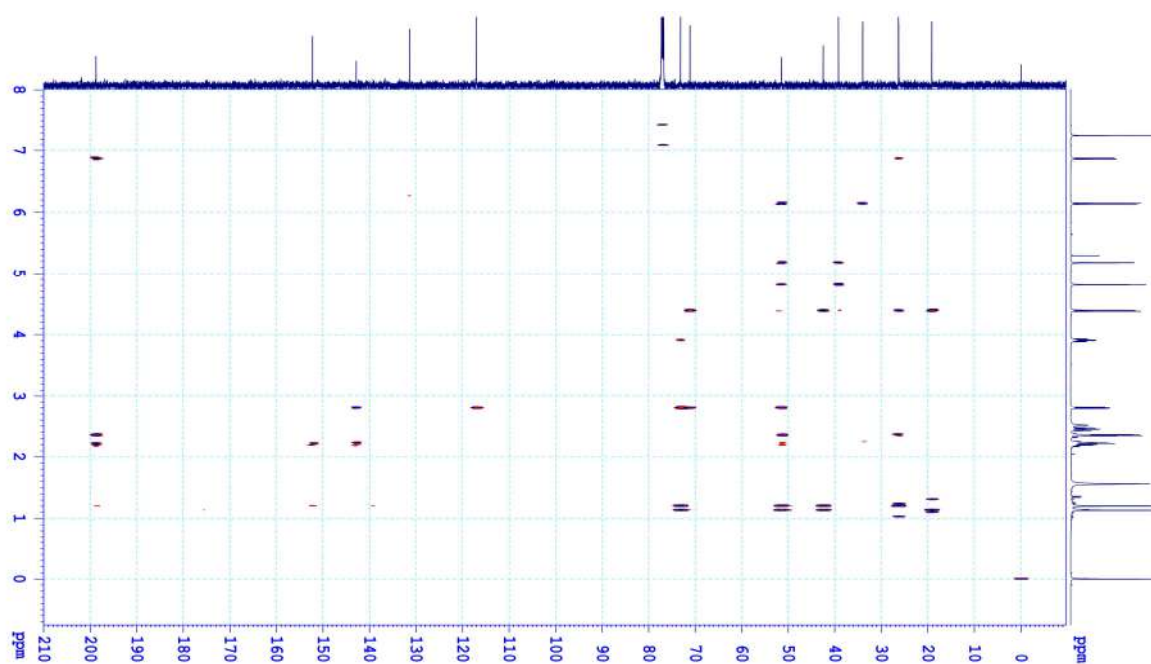
Bảng 3.1. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADA1**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	152,9	152,3	6,87 (1H, dd, 10,2, 1,8)	5
2	131,1	131,4	6,14 (1H, d, 10,2)	4, 6
3	198,7	198,8	-	-
4	34,2	34,0	2,35 (2H, m)	-
5	26,3	26,3	2,21 (2H, m)	-
6	51,8	51,5	-	-
7	141,7	142,9	-	-
8			2,80 (1H, dd, 13,8, 6,0)	6, 7, 10
	38,4	39,2	2,44 (1H, dddd, 13,8, 10,5, 2,4, 1,8)	-
9	71,7	71,2	3,90 (1H, ddd, 10,5, 10,5, 6,0)	-
10	68,8	73,2	4,38 (1H, d, 10,5)	9, 11, 12, 13
11	42,7	42,5	-	-
12	21,4	19,2	1,20 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	26,9	26,3	1,13 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14			5,18 (1H, br s)	6, 8
	117,9	117,0	4,81 (1H, br t, 1,8)	6, 8

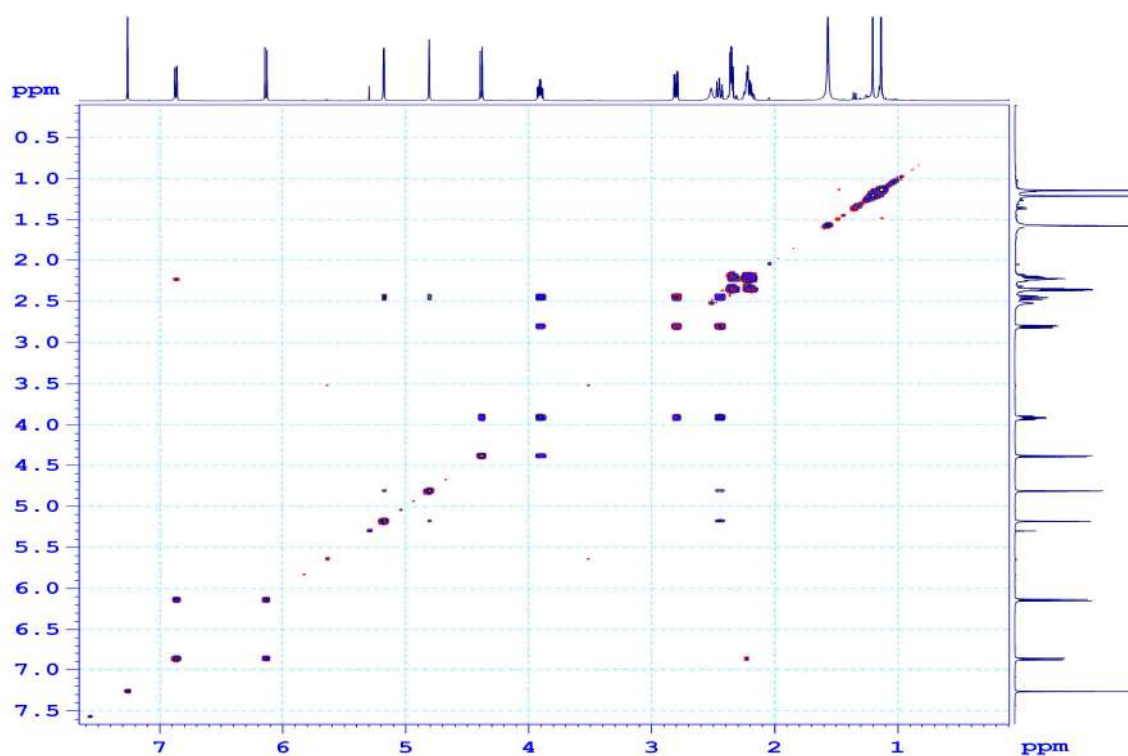
* Tài liệu tham khảo chất ma'ilione [120], ^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 50 MHz.



Hình 3.6. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và phổ COSY (—) của hợp chất **ADA1**

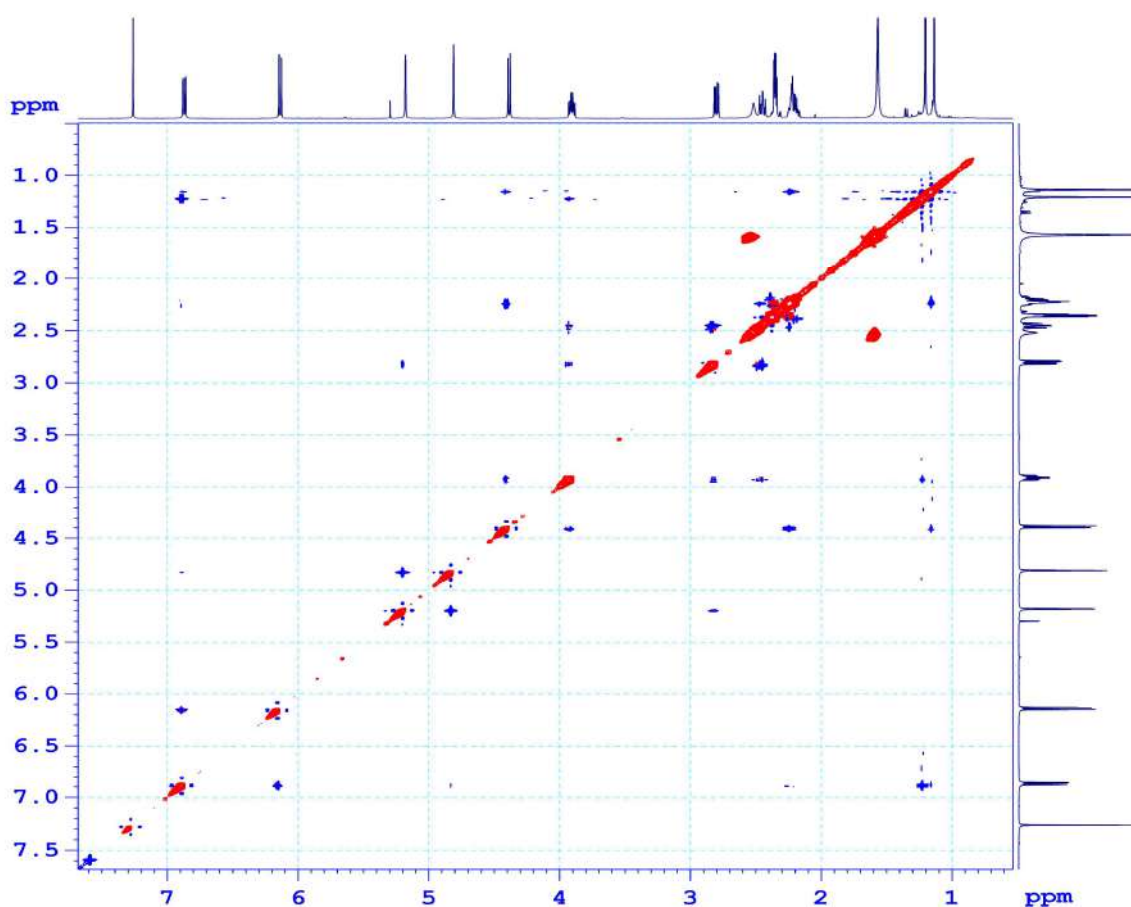


Hình 3.7. Phổ HMBC của hợp chất **ADA1**

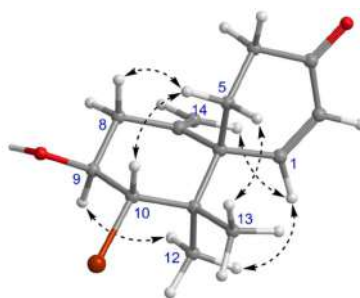


Hình 3. 8. Phổ COSY của hợp chất **ADA1**

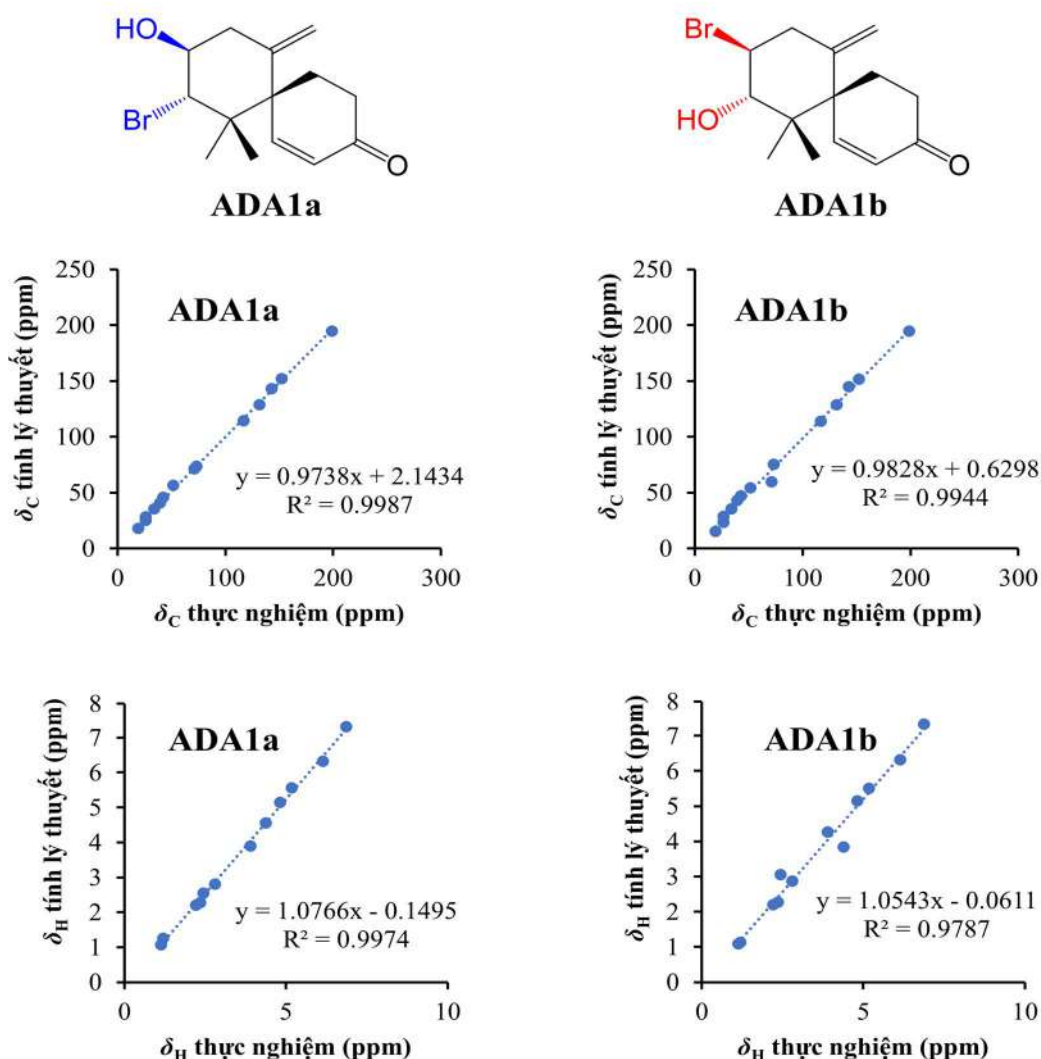
Phân tích dữ liệu trên phổ COSY và HMBC cho thấy cấu trúc phẳng của **ADA1** (Hình 3.6, hình 3.7 và hình 3.8) giống hệt với cấu trúc của ma'ilione, một loại nor-chamigrane được phân lập từ tảo đỏ *Laurencia cartilaginea* [120, 121]. Cụ thể là các tương tác trên phổ COSY của H-1/H-2 và H₂-4/H₂-5, kết hợp với các tương tác HMBC từ H₂-5 (δ_H 2,21) đến C-1 (δ_C 152,3), C-3 (δ_C 198,8) và C-6 (δ_C 51,5), và từ H-2 (δ_H 6,14) đến C-4 (δ_C 34,0) đã xác nhận cấu trúc của vòng cyclohexenone. Cấu trúc của vòng cyclohexane cũng như bộ khung chamigrane spiro[5,5] được thiết lập bởi tương tác trên phổ COSY giữa tương tác H₂-8 (δ_H 2,44/2,80)/H-9 (δ_H 3,90)/H-10 (δ_H 4,38) và phổ HMBC từ H₃-12 (δ_H 1,20) đến C-10 (δ_C 73,2), C-11 (δ_C 42,5), và C-6 (δ_C 51,5), từ H₂-14 (δ_H 4,81/5,18) đến C-8 (δ_C 39,2) và C-6 (δ_C 51,5), từ H₂-8 (δ_H 2,44/2,80) đến C-7 (δ_C 142,9) và từ H₂-5 (δ_H 2,21) đến C-7 (δ_C 142,9). Các tương tác ¹H-¹H và phổ NOESY được sử dụng để xác định cấu hình tương đối của **ADA1**. Các hằng số ghép lớn 10,5 Hz giữa H-10 và H-9, và giữa H-9 và H_b-8 thể hiện định hướng *axial* cho những proton này. Điều này còn được xác nhận thêm bởi các tương tác NOESY giữa H-10/H₂-5, H₂-5/H_b-8 và H-9/H₃-12 (Hình 3.9 và hình 3.10). Những tương tác NOESY giữa H₃-12/H-1, H-1/H_b-14 và H₂-5/H₃-13 đã xác minh cấu trúc chamigrane spiro[5,5] với cấu hình 6S*.



Hình 3.9. Phổ NOESY của hợp chất **ADA1**



Hình 3.10. Tương tác phổ NOESY của hợp chất **ADA1**



Hình 3.11. Phân tích hồi quy tuyến tính của độ dịch chuyển hóa học thực nghiệm so với tính toán của **1a** và **1b**.

Trong số các sesquiterpen bromochamigrane được phân lập từ các loài *Aplysia* và tảo đỏ biển thuộc chi *Laurencia*, hầu hết đều chứa một nguyên tử brom ở C-10, nhưng một số được báo cáo là 9-bromochamigranes bất thường [9, 122-124]. Theo đó, để xác định vị trí của nguyên tử brom trong phép tính độ dịch chuyển hóa học NMR trong **ADA1**, ^1H và ^{13}C của hai đồng phân có thể có **1a**-(6*S**,9*S**-OH,10*S**-Br) và **1b**-(6*S**,9*S**-Br, 10*S**-OH) được thực hiện bằng phương pháp quỹ đạo nguyên tử

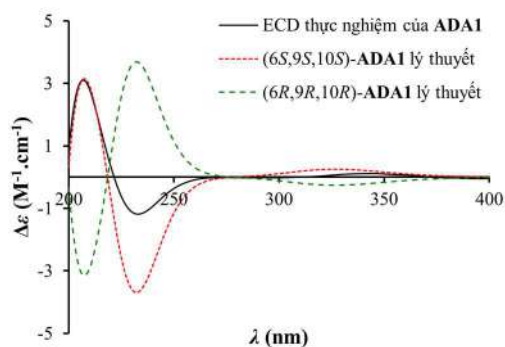
độc lập (GIAO) đo ở mức PCM-CHCl₃/mPW1PW91/6–31+G(d,p). Sau đó, dữ liệu NMR thử nghiệm và tính toán được so sánh bằng các phân tích về hệ số tương quan tuyến tính (R^2), sai số tuyệt đối trung bình đã hiệu chỉnh (CMAE), độ lệch bình phương trung bình (RMSD) và xác suất DP4+ [113]. Kết quả cho thấy độ dịch chuyển hóa học ¹H và ¹³C NMR được tính toán của C-9 và C-10 của đồng phân **1a** phù hợp với các giá trị thực nghiệm tốt hơn nhiều so với giá trị của **1b**. Hơn nữa, việc so sánh R^2 , CMAE và RMSD của hai đồng phân cho thấy rằng cả dữ liệu ¹H và ¹³C NMR của **1a** cũng chính xác hơn dữ liệu của **1b** (Bảng 3.2 và Hình 3.11). Cuối cùng, phép tính DP4+ dự đoán rằng **1a** là đồng phân chính xác với xác suất 100%.

Để xác định cấu hình tuyệt đối của **ADA1**, đồng phân **1**-(6*S*,9*S*,10*S*) và đồng phân đối quang của nó, **1'**-(6*R*,9*R*,10*R*), được tính toán ECD bằng lý thuyết hàm mật độ phụ thuộc thời gian (TDDFT) ở mức PCM-MeOH/CAM-B3LYP/cc-PVTZ. Kết quả chỉ ra rằng hiệu ứng cotton ECD được tính toán của **1**-(6*S*,9*S*,10*S*) phù hợp tốt với dữ liệu thực nghiệm (Hình 3.12). Vì vậy, cấu hình tuyệt đối của dactylomelanin C (**ADA1**) được xác định là 6*S*,9*S*,10*S*. Hợp chất **ADA1** được đặt tên là dactylomelanin C. Là một hợp chất nor-sesquiterpene mới, lần đầu tiên được công bố.

Bảng 3.2. Phổ ¹H, ¹³C-NMR thực nghiệm và phổ tính toán cho hợp chất **ADA1**

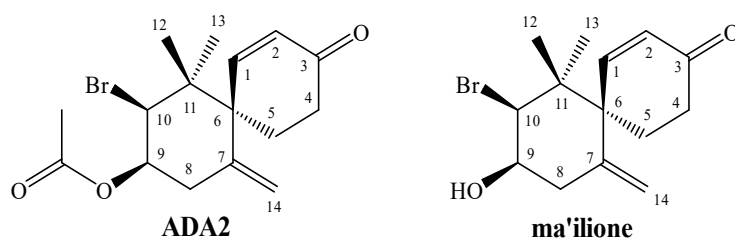
Vị trí C	Phổ thực nghiệm của 1		Tính toán của 1a		Tính toán của 1b	
	δ_C^a	δ_H^a (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C^*	δ_H^*	δ_C^*	δ_H^*
1	152,3	6,87 (1H, dd, 10,2, 1,8)	153,9	6,93	153,6	7,01
2	131,4	6,14 (1H, d, 10,2)	129,8	6,01	130,3	6,05
3	198,8	-	197,6	-	197,6	-
4	34,0	2,35 (2H, m)	34,2	2,25	35,5	2,21
5	26,3	2,21 (2H, m)	26,8	2,18	28,4	2,15
6	51,5	-	56,0	-	54,7	-
7	142,9	-	144,5	-	146,5	-
8	39,2	2,80 (1H, dd, 13,8, 6,0) 2,44 (1H, dddd, 13,8, 10,5, 2,4, 1,8)	39,6	2,75 2,51	43,2	2,78 2,96
9	71,2	3,90 (1H, ddd, 10,5, 10,5, 6,0)	70,9	3,75	60,0	4,11
10	73,2	4,38 (1H, d, 10,5)	73,2	4,37	76,1	3,71
11	42,5	-	44,6	-	47,2	-
12	19,2	1,20 (3H, s)	16,2	1,30	14,7	1,13
13	26,3	1,13 (3H, s)	23,5	1,13	22,9	1,09
14	117,0	5,18 (1H, br s) 4,81 (1H, t, 1,8)	115,1	5,30 4,92	115,4	5,28 4,94
CMAE			1,54	0,0793	3,32	0,1817
RMSD			1,98	0,0917	4,15	0,2664
DP4+			100%		0%	

^a đo trong CDCl₃



Hình 3.12. Tính toán ECD của hợp chất **ADA1**

3.1.1.2. Hợp chất **ADA2**: *Dactylomelanin D* (chất mới)



Hình 3.13. Cấu trúc hợp chất **ADA2**

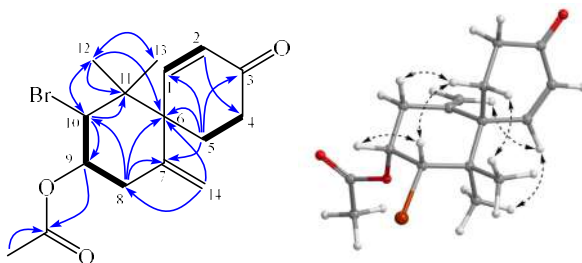
Bảng 3.3. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADA2**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	152,9	152,5	7,01 dd (10,5, 2,0)	-
2	131,1	131,3	6,12 dd (10,5, 0,5)	4
3	198,7	198,6	-	-
4	34,2	34,2	2,39 – 2,29 (2H, m)	-
5	26,3	26,4	2,26 – 2,14 (2H, m)	1, 3, 6, 7
6	51,8	51,8	-	-
7	141,7	141,4	-	-
8	38,4	37,4	2,74 (1H, m) 2,56 (1H, dd, 15,5, 2,5)	- -
9	71,7	72,8	5,32 (1H, dd, 6,25, 3,75)	1'
10	68,8	61,0	4,50 (1H, d, 3,5)	-
11	42,7	43,0	-	-
12	21,4	21,0	1,30 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	26,9	27,0	1,08 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	117,9	118,0	5,10 (1H, br s) 4,85 (1H, br s)	6, 7, 8 6, 7, 8
9-OAc				
1'		169,9	-	-
2'		21,0	2,10 (3H, s)	1'

* tài liệu tham khảo chất ma'ilione [120], ^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 50 MHz

Hợp chất **ADA2** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử $C_{16}H_{21}BrO_3$ của nó được suy ra từ các pic ion trên phổ phân giải cao HR-ESI-MS ở m/z 341,0747 $[M + H]^+$ và 343,0728 $[M + 2 + H]^+$ (tính toán theo lý thuyết $C_{16}H_{22}BrO_3^+$, m/z 341,0747 và 343,0726) (Hình D2.1). Phổ 1H -NMR vùng trường mạnh xuất hiện hai tín hiệu singlet đặc trưng của nhóm gem-dimethyl [δ_H 1,30 và 1,08 ppm]; một tín hiệu singlet đặc trưng của methyl trong nhóm acetyl tại δ_H 2,10 ppm, hai tín hiệu proton olefin trong liên kết đôi dạng $-CH=CH-$ tại δ_H 7,01 (1H, dd, 10,5, 2,0) và 6,12 (1H, dd, 10,5, 2,0); hai tín hiệu proton olefin khác dạng $-C=CH_2$ tại δ_H 5,10 và 4,85 ppm; một tín hiệu nhóm oxymethine tại δ_H 5,32 ppm; một tín hiệu nhóm brommethine tại δ_H 4,50 ppm. Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 16 tín hiệu carbon, trong đó có hai tín hiệu đặc trưng của nhóm acetyl tại δ_C 169,9 và 21,0 ppm. Còn lại 14 tín hiệu carbon của khung chất.

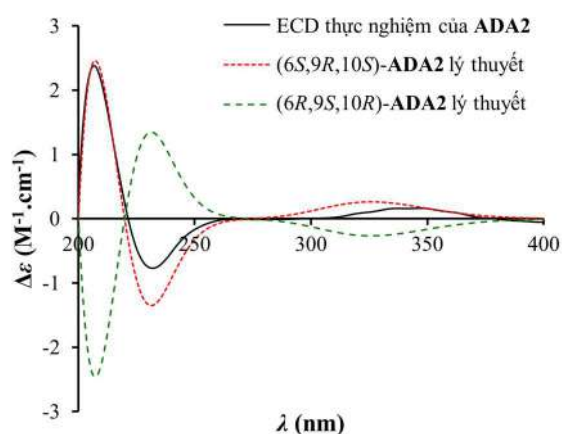
Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của **ADA2** (Bảng 3.3) gần như giống hệt với dữ liệu của hợp chất **ADA1** và ma'ilione [120, 121]. Phân tích phổ 2D NMR của **ADA2** cho thấy sự khác biệt duy nhất giữa cấu trúc phẳng của **ADA1** và **ADA2** là sự hiện diện của nhóm thế acetyl ở vị trí C-9 của **ADA2**. Điều này được xác định dựa trên phổ COSY với các tương tác với nhau H-10/H-9/H₂-8 và tương tác trên phổ HMBC từ H-9 đến C-1' và từ H-2' đến C-1' (Hình 3.14).



Hình 3.14. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và phổ COSY ($\longrightarrow$) và NOESY ($\longleftrightarrow$) của hợp chất **ADA2**

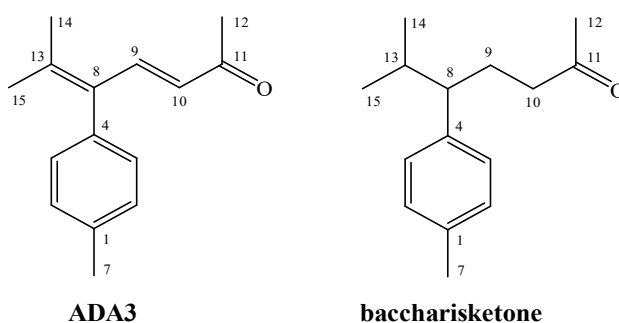
Xét tương tác trên phổ NOESY, mỗi tương quan 1,3 trực chính giữa H-10/H_b-5 và H_b-5/H-8a gợi ý cấu hình S^* cho C-10. Các giá trị nhỏ của hằng số ghép giữa H-10 và H-9 ($J_{9,10} = 3,5$ Hz) cũng như tương tác NOESY của H-9/H-10 đã khẳng định cấu hình R^* của H-9. Như trong trường hợp hợp chất **ADA1**, cấu hình $6S^*$ của hợp chất **ADA2** được xác định dựa trên phân tích dữ liệu NOESY của nó (Hình 3.14).

Cuối cùng, so sánh dựa trên phổ ECD của **ADA2** (Hình 3.15) giữa phổ thực nghiệm và tính toán khẳng định cấu hình ($6S,9R,10S$) cho **ADA2**. Từ đó hợp chất **ADA2** được đặt tên là dactylomelanin D. Là một hợp chất nor-sesquiterpene mới, lần đầu tiên được công bố.



Hình 3.15. Tính toán ECD của hợp chất **ADA2**

3.1.1.3. Hợp chất **ADA3**: *Dactylomelanin E* (chất mới)



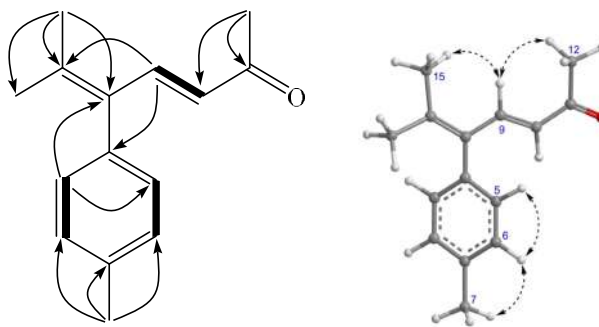
Hình 3.16. Cấu trúc hợp chất **ADA3**

Bảng 3.4. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADA3**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	135,5	136,5	-	-
2	128,9	129,1	7,17 (1H, d, 7,8)	-
3	128,3	129,5	6,90 (1H, d, 7,8)	5, 8
4	140,5	136,2	-	-
5	128,3	129,5	6,90 (1H, d, 7,8)	3, 8
6	128,9	129,1	7,17 (1H, d, 7,8)	-
7	21,0	21,2	2,37 (3H, s)	1, 2, 6
8	52,0	134,7	-	-
9	26,8	141,8	7,85 (1H, d, 15,6)	4, 13
10	42,2	128,0	5,54 (1H, d, 15,6)	-
11	209,3	199,0	-	-
12	30,0	28,0	2,20 (3H, s)	10, 11
13	33,6	144,2	-	-
14	20,8	24,0	1,67 (3H, d, 1,0)	8, 13, 15
15	20,9	20,6	2,01 (3H, s)	-

^a tham khảo hợp chất baccharisketone [125], ^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz

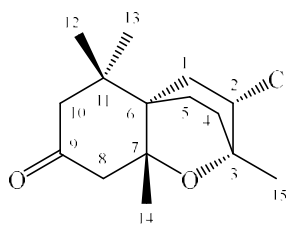
Hợp chất **ADA3**, một loại chất dầu màu vàng, có công thức phân tử $C_{15}H_{18}O$ được xác định bởi pic ion trên phổ khối lượng phân giải cao HRESIMS ở m/z 215,1433 $[M+H]^+$ (tính toán theo lý thuyết $C_{15}H_{19}O^+$, m/z 215,1430) (Phụ lục hình D3.1). Phổ ^{13}C NMR và HSQC của **ADA3** (Bảng 3.4) thể hiện tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon tương ứng với một nhóm ketone (δ_C 199,0), bốn nguyên tử carbon sp^2 không liên kết với hydro, sáu sp^2 methine và bốn nhóm methyl. Phổ 1H NMR cho thấy sự có mặt của liên kết đôi *trans* [δ_H 7,85 (d, $J = 15,6$ Hz) và 5,54 (d, $J = 15,6$ Hz)], vòng benzen thể ở vị trí 1,4 [δ_H 7,17 (2H, d, $J = 7,8$ Hz) và 6,90 (2H, d, $J = 7,8$ Hz)] và bốn nhóm methyl singlet [δ_H 2,37, 2,20, 2,10 và 1,67].



Hình 3.17. Tương tác phổ HMBC (→), COSY (—) và phổ NOESY của hợp chất **ADA3**

Phân tích chi tiết phổ COSY và HMBC cho thấy cấu trúc của **ADA3** (Hình 3.177) tương tự như cấu trúc của baccharisketone, một dẫn xuất bisabolane mới được phân lập từ lá của *Baccharis dracunculifolia* [125, 126]. Sự khác biệt chính giữa hai hợp chất này là sự thay thế hai liên kết đơn ở C-8/C-13 và C-9/C-10 trong baccharisketone bằng hai liên kết đôi liên hợp trong cấu trúc của **ADA3**. Điều này được thể hiện bằng tương tác trên phổ COSY của H-9/H-10, cùng với những tương tác HMBC từ H-9 đến C-4 và C-13, và từ H₃-15 đến C-8, C-13 và C-14. Ngoài ra, tương tác NOESY rõ ràng giữa H-5/H-6, H-6/H₃-7, H₃-12/H-9 và H-9/H₃-15 đã xác nhận khoảng cách không gian của các proton này (Hình 3.17). Như vậy, hợp chất **ADA3** được xác định là một bisabolane sesquiterpene [126] và được đặt tên là dactylomelanin E.

3.1.1.4. Hợp chất **ADA4**: (2S,3R,7S,7R)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one



ADA4

Hình 3.18. Cấu trúc hợp chất **ADA4**

Hợp chất **ADA4** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 271,1459 $[M + H]^+$ và 273,1430 $[M + 2 + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{24}ClO_2^+$, m/z 271,1459 và 273,1430); 288,1720 và 290,1699 $[M + NH_4]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{27}ClNO_2^+$, m/z 288,1725 và 290,1695); 293,1285 và 295,1244 $[M + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{23}ClNaO_2^+$, m/z 293,1279 và 295,1249). Phổ 1H -NMR xuất hiện bốn tín hiệu của các nhóm methyl singlet tại $[\delta_H$ 0,99 (6H, s), 1,21 (3H, s) và 1,36 (3H, d, 1,0)], về phía vùng trường yếu hơn xuất hiện một tín hiệu của nhóm methine liên kết với halogen tại δ_H 4,12 (1H, dd, $J = 10,5, 4,5$ Hz). Phổ ^{13}C -NMR kết hợp phổ HSQC cho thấy hợp chất chứa 15 nguyên tử carbon. Trong đó xuất hiện một tín hiệu đặc trưng của nhóm ketone cộng hưởng tại δ_C 208,1 ppm, một nhóm methine halogen tại δ_C 63,3 ppm, hai carbon liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy tại δ_C 70,9 và 79,6 (Hình D4.3 và D4.4).

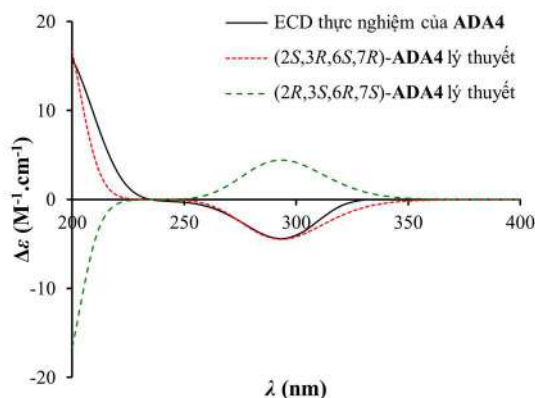
Bảng 3.5. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADA4**

Vị trí C	$^*\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1a	39,13	39,1	2,62 (1H, dd, 15,0, 10,5)	2, 3, 6, 7, 11
1b			2,42 (1H, dt, 15,0, 4,5)	5, 6, 7
2	63,24	63,3	4,12 (1H, dd, 10,5, 4,5)	-
3	70,92	70,9	-	-
4a	31,64	31,6	2,05 – 1,99 (1H, #)	-
4b			1,69 (1H, m)	5, 11
5a	21,63	21,6	1,95 (1H, m)	4
5b			1,52 (1H, ddd, 12,25, 12,25, 6,5)	6, 7, 11
6	40,80	40,8	-	-
7	79,57	79,6	-	-
8a	53,80	53,8	3,08 (1H, d, 13,5)	7, 9, 14
8b			2,49 (1H, dd, 13,5, 2,0)	6, 7, 9, 10, 14
9	208,05	208,1	-	-
10a	53,02	53,0	2,54 (1H, d, 14,0)	9, 11, 12, 13
10b			2,05 – 1,99 (1H, #)	-
11	38,31	38,3	-	-
12	26,05	26,0	0,99 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	27,33	27,3	0,99 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	29,16	29,1	1,36 (3H, d, 1,0)	6, 7, 8
15	24,45	24,4	1,21 (3H, s)	2, 3, 4

* tham khảo chất 2-chloro-3,7-epoxychamigrane-9-one [127]

^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, [#] tín hiệu chập, ^d 100 MHz

So sánh với tài liệu tham khảo về phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS thì hợp chất **ADA4** được xác định là 2-chloro-3,7-epoxychamigran-9-one [127]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào về cấu hình tuyệt đối của hợp chất này. Do đó, hợp chất **ADA4** được đo phổ ECD và cho thấy hiệu ứng cotton âm ở bước sóng 293 nm. Phổ ECD được tính toán cho đồng phân 4-(2*S*,3*R*,6*S*,7*R*) rất phù hợp với đồng phân thử nghiệm (Hình 3.19), cho phép gán cấu hình tuyệt đối của hợp chất **ADA4** là (2*S*,3*R*,6*S*,7*R*).

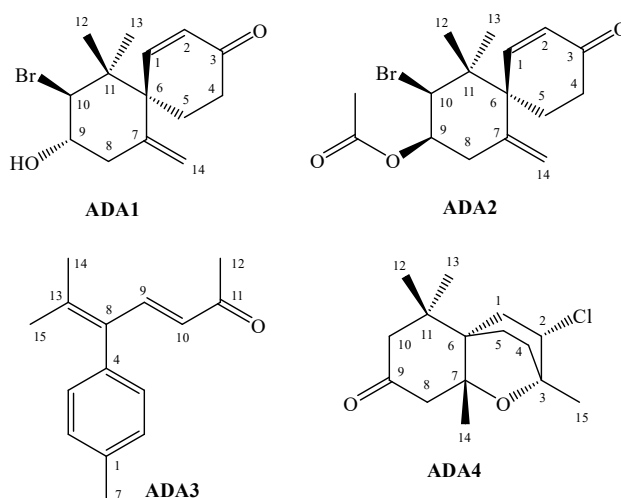


Hình 3.19. Tính toán ECD của hợp chất **ADA4**

Kết hợp những phân tích dữ liệu trên xác định được hợp chất **ADA4** là (2*S*,3*R*,7*S*,7*R*)-2-chloro-3,7-epoxychamigran-9-one.

3.1.2. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ mẫu sên *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng

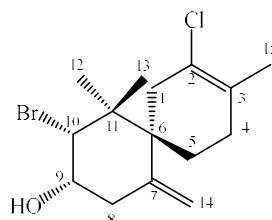
Từ mẫu sên *A. dactylomela* - Phú Quý, Lâm Đồng đã phân lập và xác định cấu trúc 4 hợp chất tinh khiết, bao gồm: dactylomelanin C (**ADA1**), dactylomelanin D (**ADA2**), dactylomelanin E (**ADA3**), (2*S*,3*R*,7*S*,7*R*)-2-chloro-3,7-epoxychamigran-9-one (**ADA4**),



Hình 3. 20. Cấu trúc các hợp chất từ mẫu sên *A. dactylomela* - Phú Quý, Lâm Đồng

3.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở Lý Sơn, Quảng Ngãi

3.1.3.1. Hợp chất **ADB1**: Elatol



Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất **ADB1**

Bảng 3.6. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB1**

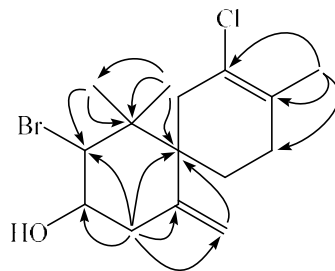
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	38,6	38,6	2,58 (1H, ddd, 1,8, 3,6, 17,4)	-
1b			2,36 (1H, dd, 1,2, 17,4)	3
2	128,0	128,1	-	-
3	124,1	124,2	-	-
4a	29,3	29,4	1,96 (1H, m)	2, 3, 6
4b			1,81 (1H, #)	2
5a	25,6	25,6	1,83 (1H, #)	-
5b			1,62 (1H, ddd, 3,0, 12,0, 12,0)	1, 4, 6, 7
6	49,1	49,2	-	-
7	140,7	140,8	-	-
8a	38,0	38,0	2,63 (1H, dt, 1,8, 14,4)	-
8b			2,50 (1H, dd, 3,0, 14,4)	6, 9, 10, 14
9	72,1	72,2	4,14 (1H, br s)	-
10	70,8	70,9	4,60 (1H, d, 3,0)	11, 12, 13
11	43,1	43,1	-	-
12	20,7	20,7	1,07 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	24,2	24,2	1,08 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14a	115,8	115,9	5,13 (1H, br s)	6, 7
14b			4,80 (1H, br s)	6, 8, 8
15	19,4	19,4	1,70 (3H, s)	2, 3, 4

* Tài liệu tham khảo chất elatol [128],

^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz. # tín hiệu chồng chéo

Hợp chất **ADB1** được phân lập dưới dạng dầu không màu. Trong phổ ^1H -NMR, xuất hiện tín hiệu đặc trưng của ba nhóm methyl singlet tại δ_{H} 1,07 (H-12), 1,08 (H-13) và 1,70 (H-15), và hai proton của liên kết đôi thể đôi dạng $>\text{CH}=\text{CH}_2$ [δ_{H} 4,80 (1H, br s) và 5,13 (1H, br s)]. Ngoài ra, hai tín hiệu cộng hưởng tại δ_{H} 4,60 (1H,

d, $J = 3,0$ Hz) và 4,14 (1H, br s) có thể gán cho nhóm methine brom và nhóm oxymethine tương ứng (Bảng 3.6).

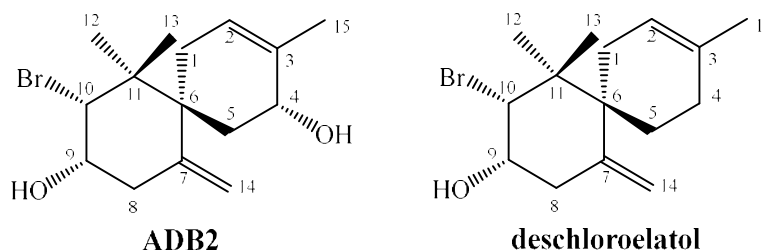


Hình 3.22. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) của hợp chất **ADB1**

Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **ADB1** cho thấy tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, bao gồm năm carbon không chứa hydro, năm nhóm methylene, hai nhóm methine và ba nhóm methyl (Phụ lục hình D5.2 và D5.3). Trong đó, có bốn carbon olefin [δ_{C} 128,1 (C-2), 124,2 (C-3), 140,8 (C-7) và 115,9 (C-14)] và hai nhóm oxymethine hoặc halogen methine [δ_{C} 72,2 (C-9) và 70,9 (C-10)]; hai tín hiệu carbon bậc bốn tại δ_{C} 49,2 và 43,1 ppm; còn lại là các tín hiệu methylene tại δ_{C} 38,6, 29,4, 25,6 và 38,0 ppm.

Các tương tác HMBC chính từ proton H-12 (δ_{H} 1,07) và H-13 (δ_{H} 1,08) đến C-6 (δ_{C} 49,2), C-10 (δ_{C} 70,9) và C-11 (δ_{C} 43,1) (Hình D5.4 và Hình 3.22), chỉ ra rằng hợp chất **ADB1** chứa nhóm gem-dimethyl. Cấu trúc của vòng A được xác nhận bằng các tương tác HMBC từ H-8 đến C-6, C-7, C-9, C-10 và C-14. Ngoài ra, một nhóm tín hiệu methyl được gán cho vị trí C-3 của hợp chất **ADB1** dựa trên cơ sở các tương tác HMBC từ H-15 đến C-2, C-3 và C-4. Cấu trúc của vòng B cũng như liên kết spiro giữa các vòng A và B cũng dựa trên các tương tác HMBC từ H-5 đến C-1, C-4, C-6 và C-7. Cuối cùng, hợp chất **ADB1** được xác định là elatol bằng cách so sánh dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR của **ADB1** với dữ liệu được công bố trong tạp chí trước đây [128]. Hợp chất này trước đây đã được phân lập từ sên biển *A. dactylomela* [9, 21] và tảo đỏ *Laurencia chondrioides* [129] và *Laurencia dendroidea* [128].

3.1.3.2. Hợp chất **ADB2**: Aplydactylonin I (chất mới)



Hình 3.23. Cấu trúc của hợp chất **ADB2** và chất tham khảo

Hợp chất **ADB2** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 349,0576 $[M + Cl]^-$ và 351,0554 $[M + 2 + Cl]^-$ (tính toán theo lý thuyết được công thức phân tử giả ion $C_{15}H_{23}BrO_2Cl^-$, 349,0575 và 351,0554), gợi ý công thức phân tử $C_{15}H_{23}BrO_2$ cho hợp chất **ADB2** (Hình D6.1). Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB2** (Bảng 3.7) cho thấy hợp chất chứa 15 carbon. Trong đó chứa ba nhóm methyl singlet [δ_H 1,03 (H-12)/ δ_C 20,2 (C-12), 1,06 (H-13)/ 24,9 (C-13) và 1,75 (H-15)/ 20,4 (C-15)]; bốn nhóm methylene, trong đó có một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_H 5,15 (H_a-14) và 4,92 (H_b-14)/ δ_C 116,6 (C-14)]; hai nhóm oxymethine [δ_H 3,87 (H-4)/ δ_C 69,3 (C-4) và 4,20 (H-9)/ 72,5 (C-9)]; một nhóm brommethine [δ_H 4,69 (H-10)/ δ_C 71,1 (C-10)]; một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_H 5,53 (H-2)/ δ_C 123,3 (C-2)]; và bốn carbon không chứa hydro. Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB2** là một chamigrane sesquiterpene.

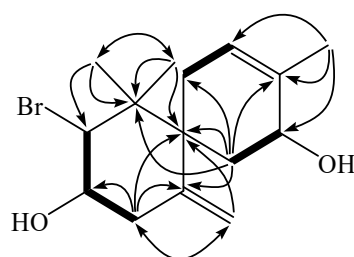
Bảng 3.7. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB2**

Vị trí C	^a $\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	30,1	30,6	2,32 (1H, m) 2,24 (1H, br d, 18,0)	5, 2, 3 2, 5, 6, 7
2	119,4	123,3	5,53 (1H, m)	-
3	132,5	133,4	-	-
4	27,6	69,3	3,87 (1H, br s)	-
5	25,8	34,5	2,41 (1H, dt, 2,0, 14,0) 1,84 (1H, dd, 4,5, 14,0)	1, 3, 4 1, 6, 7
6	47,0	45,4	-	-
7	141,1	145,9	-	-
8	37,9	39,5	3,08 (1H, dt, 2,0, 14,5) 2,58 (1H, dd, 2,5, 14,5)	- 6, 7, 9, 14
9	70,3	72,5	4,20 q (3,0)	-
10	71,8	71,1	4,69 d (3,0)	11, 12, 13
11	43,1	43,7	-	-
12	20,7	20,2	1,03 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	24,2	24,9	1,06 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	115,7	116,6	5,15 (1H, br s) 4,92 (1H, br s)	6, 8 -
15	23,0	20,4	1,75 (3H, br s)	2, 3, 4

^a Tài liệu tham khảo chất deschloroelatol [92],

^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 75.5 MHz

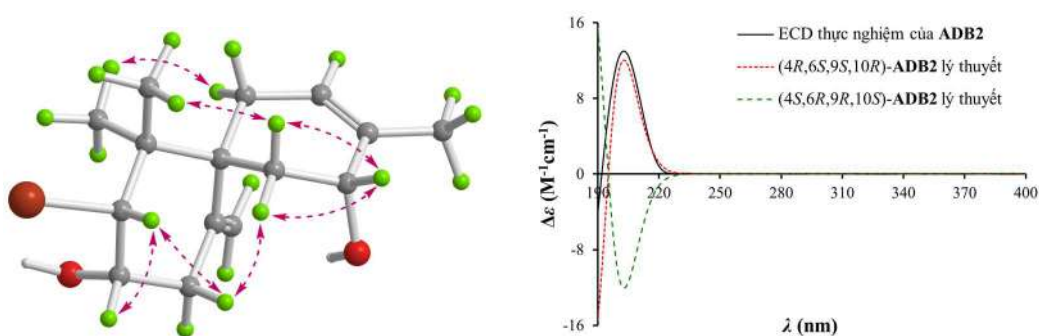
Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 và H-13 tương tác lên C-6, C-10 và C-11; H-15 lên C-2, C-3 và C-4; H_a-14 lên C-6 và C-8; H_b-8 lên C-6, C-7, C-9 và C-14 (Hình 2.24). Những tương tác này cho biết **ADB2** chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, một nhóm methyl tại C-3, hai nhóm thế -OH tại vị trí C-4 và C-9, vị trí C-10 được thế nguyên tử brom. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 4,20) tương tác với H_a-8 (δ_H 3,08) và H-10 (δ_H 4,69); H_a-1 và H_b-1 đều tương tác với H-2; H-4 tương tác với cả H_a-5 và H_b-5 (Hình 3.24). Đồng thời so sánh dữ liệu phổ NMR với hợp chất deschloroelatol cho thấy hợp chất **ADB2** chỉ khác ở vị trí C-4 có thêm nhóm thế -OH [92] và cấu trúc phẳng của hợp chất cũng được xác định.



Hình 3.24. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất **ADB2**

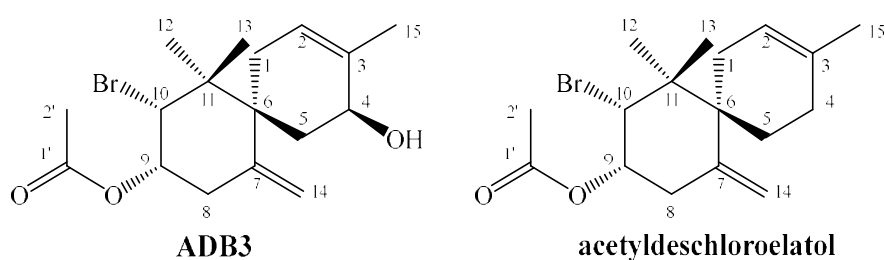
Xét trên phổ NOESY cho thấy xuất hiện tương tác giữa H-10 với H-9 và H₃-13, tương tác giữa H_b-5 với H-4 và H₃-13, tương tác giữa H₃-12 với H_a-1 và H_b-1. Bên cạnh đó giá trị nhỏ của hằng số ghép giữa H-10 và H-9 ($J_{9,10} = 3,0$ Hz) cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối $4R^*, 6S^*, 9S^*, 10R^*$ trên hợp chất **ADB2** (Hình 3.25).

Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB2** (Hình 3.25) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB2**-($4R, 6S, 9S, 10R$) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình ($4R, 6S, 9S, 10R$) cho hợp chất **ADB2**. Từ đó hợp chất **ADB2** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.23 và đặt tên là aplydactylonin I. **ADB2** là một hợp chất mới lần đầu tiên được công bố.



Hình 3.25. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất **ADB2**

3.1.3.3. Hợp chất **ADB3**: *Aplydactylonin K* (chất mới)



Hình 3.26. Cấu trúc của hợp chất **ADB3** và chất tham khảo

Bảng 3.8. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB3**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	30,2	30,4	2,28 (1H, dddd, 2,5, 2,5, 2,5, 18,0) 2,12 (1H, br d, 18,0)	- -
2	119,4	122,5	5,41 (1H, m)	-
3	132,7	134,9	-	-
4	27,8	69,2	3,73 (1H, m)	-
5	26,0	36,1	2,22 (1H, dddd, 2,5, 2,5, 2,5, 12,5) 1,61 (1H, dd, 11,0, 12,5)	1, 3, 4 1, 4, 6, 7
6	46,9	48,6	-	-
7	141,0	140,7	-	-
8	36,7	36,7	2,74 (1H, dd, 1,5, 15,0) 2,42 (1H, dd, 3,0, 15,0)	- 6, 7, 9, 10
9	74,0	73,8	5,27 (1H, q, 3,0)	-
10	64,0	63,2	4,57 (1H, d, 3,0)	9, 11, 12
11	43,5	43,5	-	-
12	20,1	19,6	1,01 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	24,3	24,4	1,10 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	115,7	115,6	4,92 (1H, br s) 4,72 (1H, br s)	6, 8 -
15	23,1	18,4	1,69 (1H, d, 1,5)	2, 3, 4
1'	170,2	170,1	-	-
2'	21,0	21,0	2,06 (3H, s)	1'

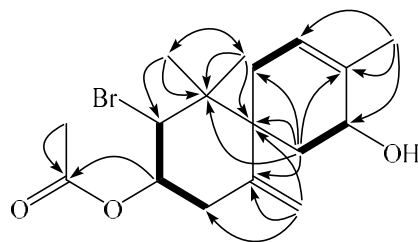
* Tài liệu tham khảo acetyldeschloroelatol [21]

^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 125.7 MHz

Hợp chất **ADB3** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 391,0669 và 393,0648 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (tính toán theo lý thuyết được công thức ion giả phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrO}_3\text{Cl}^-$, 391,0681 và 393,0661), gợi ý công thức phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrO}_3$ cho hợp chất **ADB3** (Hình D7.1). Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB3** (Bảng 3.8)

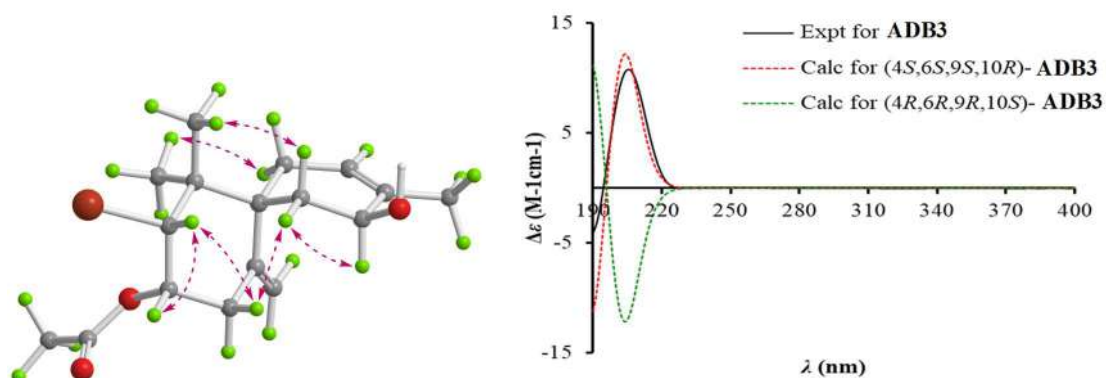
cho thấy hợp chất chứa 17 carbon. Trong đó chứa ba nhóm methyl singlet [δ_H 1,01 (H-12)/ δ_C 19,6 (C-12), 1,10 (H-13)/ δ_C 24,4 (C-13) và 1,69 (H-15)/ δ_C 18,4 (C-15)]; bốn nhóm methylene, trong đó có một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_H 4,92 (H_a -14) và 4,72 (H_b -14)/ δ_C 115,6 (C-14)]; hai nhóm oxymethine [δ_H 3,73 (H-4)/ δ_C 69,2 (C-4) và 5,27 (H-9)/ δ_C 73,8 (C-9)]; một nhóm brommethine [δ_H 4,57 (H-10)/ δ_C 63,2 (C-10)]; một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_H 5,41 (H-2)/ δ_C 122,5 (C-2)]; và bốn carbon không chứa hydro. Bên cạnh đó còn xuất hiện các tín hiệu của một nhóm acetyl [δ_C 170,1 (C-1') và δ_H 2,06 (H₃-2')/ δ_C 21,0 (C-2')]. Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB3** là một sesquiterpene chamigrane.

Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 và H-13 tương tác lên C-6, C-10 và C-11; H-15 lên C-2, C-3 và C-4; H_a -14 lên C-6 và C-8; H_b -8 lên C-6, C-7, C-9 và C-14 (Hình 3.27). Những tương tác này cho biết **ADB3** chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, một nhóm methyl tại C-3, hai nhóm thế -OH tại vị trí C-4 và C-9, vị trí C-10 được thế nguyên tử brom. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 5,27) tương tác với H_a -8 (δ_H 2,74) và H-10 (δ_H 4,57); H_a -1 và H_b -1 đều tương tác với H-2; H-4 tương tác với cả H_a -5 và H_b -5 (Hình 3.27). Đồng thời so sánh dữ liệu phổ NMR với hợp chất acetyldeschloroelatol đã công bố trước đây cho thấy hợp chất **ADB3** chỉ khác ở vị trí C-4 có thêm nhóm thế -OH [21], bên cạnh đó so sánh với hợp chất **ADB2** cho thấy hai hợp chất cũng gần giống nhau, chỉ khác ở chỗ hợp chất **ADB3** có thêm nhóm thế acetyl tại vị trí C-9 (dựa trên tương tác phổ HMBC). Từ đó cấu trúc phẳng của hợp chất **ADB3** cũng được xác định.



Hình 3. 27. Tương tác phổ HMBC chính ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) của hợp chất **ADB3**

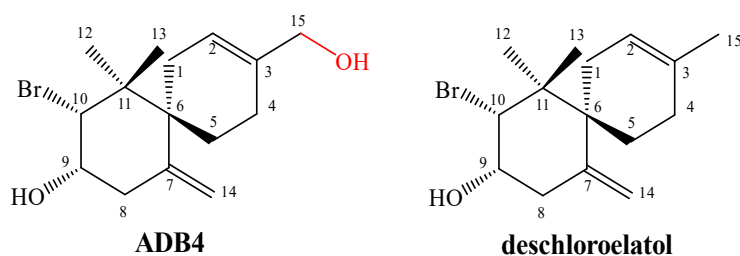
Xét tương tác trên phổ NOESY, tương tác giữa H-10 với H-9 và H₃-13, tương tác giữa H_b -5 với H₃-13, tương tác giữa H_a -5 với H-4. Bên cạnh đó giá trị nhỏ của hằng số ghép giữa H-10 và H-9 ($J_{9,10} = 3,0$ Hz) cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối ($4S^*$, $6S^*$, $9S^*$, $10R^*$) trên hợp chất **ADB3** (Hình 3.28). So sánh cấu trúc lập thể tại vị trí C-4 của **ADB3** ($4S$) ngược với hợp chất **ADB2** ($4R$).



Hình 3.28. Tương tác phổ NOESY (←-----→) và phổ ECD của hợp chất **ADB3**

Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB3** (Hình 3.28) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB3**-(4*S*,6*S*,9*S*,10*R*) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình (4*S*,6*S*,9*S*,10*R*) cho hợp chất **ADB3**. Từ đó hợp chất **ADB3** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.26 và được đặt tên là aplydactylonin K và là một hợp chất mới lần đầu tiên được công bố.

3.1.3.4. Hợp chất **ADB4**: Aplydactylonin G (chất mới)



Hình 3.29. Cấu trúc của hợp chất **ADB4** và chất tham khảo

Hợp chất **ADB4** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 332,1208 và 334,1182 $[M + NH_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết cho công thức ion giả phân tử $C_{15}H_{27}BrO_2N^+$, 332,1220 and 334,1200), gợi ý công thức phân tử $C_{15}H_{23}BrO_2$ cho hợp chất **ADB4** (Hình D8.1). Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB4** (Bảng 3.9) cho thấy hợp chất chứa 15 carbon. Trong đó chứa hai nhóm methyl singlet [δ_H 1,07 (H-12)/ δ_C 20,8 (C-12), 1,07 (H-13)/ 24,3 (C-13)]; sáu nhóm methylene, trong đó có một nhóm oxymethylene [δ_H 3,96 (H_a-15) và 3,92 (H_b-15)/ δ_C 66,9 (C-15)], một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_H 5,09 (H_a-14) và 4,78 (H_b-14)/ δ_C 115,9 (C-14)] và bốn nhóm methylene thông thường tại δ_C 29,9, 23,4, 25,7, và 38,0 ppm; một nhóm oxymethine [δ_H 4,16 (H-9)/ δ_C 72,4 (C-9)]; một nhóm brommethine [δ_H 4,69 (H-10)/ δ_C 71,5 (C-10)]; một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_H 5,61 (H-2)/ δ_C 121,6 (C-2)]; hai carbon không chứa hydro tại δ_C 136,3 và 141,4 ppm; hai tín hiệu carbon bậc

4 tại δ_C 47,4 và 43,2 ppm. Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB4** là một sesquiterpene chamigrane.

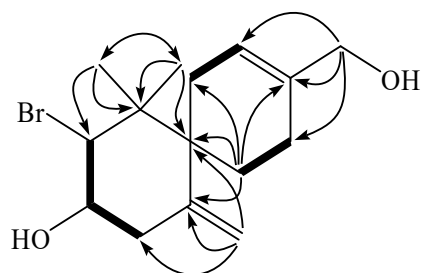
Bảng 3.9. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB4**

Vị trí C	$^*\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	30,1	29,9	2,27 (1H, m) 2,21 (1H, br d, 18,0)	- -
2	119,4	121,6	5,61 (1H, dd, 1,5, 2,5)	-
3	132,5	136,3	-	-
4	27,6	23,4	2,00 (1H, m) 1,73 (1H, #)	- -
5	25,8	25,7	1,91 (1H, m) 1,61 (1H, ddd, 4,0, 12,5, 12,5)	3 1, 4, 6, 7
6	47,0	47,4	-	-
7	141,1	141,1	-	-
8	37,9	38,0	2,70 (1H, ddd, 2,0, 2,0, 14,5) 2,49 (1H, dd, 2,5, 14,5)	7, 14 6, 7, 9, 10, 14
9	70,3	72,4	4,16 (1H, q, 3,0)	7
10	71,8	71,5	4,69 (1H, d, 3,0)	11, 12, 13
11	43,1	43,2	-	-
12	20,7	20,8	1,07 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	24,2	24,3	1,07 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	115,7	115,9	5,09 (1H, br s) 4,78 (1H, br s)	6, 8 6, 8
15	23,0	66,9	3,96 (1H, d, 12,5) 3,92 (1H, d, 12,5)	2, 3, 4 2, 3, 4

* Tài liệu tham khảo chất deschloroelatol [92]

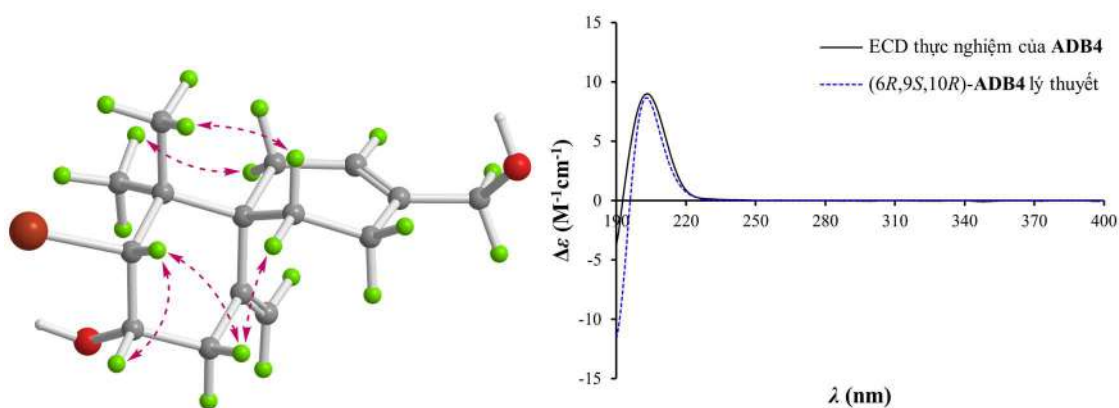
^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 75,5 MHz, # tín hiệu chồng chéo.

Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 và H-13 tương tác lên C-6, C-10 và C-11; H-15 lên C-2, C-3 và C-4; H_a-14 lên C-6 và C-8; (Hình 3.30). Những tương tác này cho biết **ADB4** chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, hai nhóm thế -OH tại vị trí C-9 và C-15, vị trí C-10 được thế nguyên tử brom. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 4,16) tương tác với H_a-8 (δ_H 2,70) và H-10 (δ_H 4,69); H_a-1 (δ_H 2,27) và H_b-1 (δ_H 2,21) đều tương tác với H-2 (δ_H 5,61); H_a-4 (δ_H 2,00) tương tác với cả H_b-5 (δ_H 1,61) (Hình 3.30). Đồng thời so sánh dữ liệu phổ NMR với hợp chất deschloroelatol đã công bố trước đây cho thấy hợp chất **ADB4** chỉ khác ở vị trí C-15 có thêm nhóm thế -OH [92]. Từ đó cấu trúc phẳng của hợp chất **ADB4** cũng được xác định.



Hình 3.30. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) của hợp chất **ADB4**

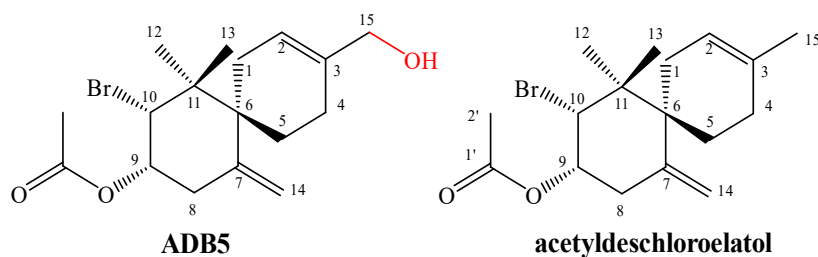
Xét tương tác trên phổ NOESY, tương tác giữa H-10 (δ_{H} 4,69) với H-9 (δ_{H} 4,16), với H_a-5 (δ_{H} 1,91) và H_a-8 (δ_{H} 2,70), tương tác giữa H_a-5 với H_a-8. Bên cạnh đó giá trị nhỏ của hằng số ghép giữa H-10 và H-9 ($J_{9,10} = 3,0$ Hz) cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối ($6S^*, 9S^*, 10R^*$) trên hợp chất **ADB4** (Hình 3.31).



Hình 3.31. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất **ADB4**

Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB4** (Hình 3.31) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB4**-($6R,9S,10R$) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình ($6R,9S,10R$) cho hợp chất **ADB4**. Từ đó hợp chất **ADB4** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể và đặt tên là aplydactylonin G.

3.1.3.5. Hợp chất **ADB5**: Aplydactylonin H (chất mới)



Hình 3.32. Cấu trúc của hợp chất **ADB5** và chất tham khảo

Bảng 3.10. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB5**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	30,2	29,9	2,29 (1H, m) 2,19 (1H, m)	- -
2	119,4	121,4	5,60 (1H, m)	-
3	132,7	136,3	-	-
4	27,8	23,4	2,00 (1H, m) 1,67 (1H, m)	6y
5	26,0	25,7	1,89 (1H, m) 1,61 (1H, m)	- 4, 6, 7
6	46,9	47,2	-	-
7	141,0	140,9	-	-
8	36,7	36,7	2,66 (1H, ddd, 2,0, 3,5, 15,5) 2,40 (1H, dd, 3,0, 15,5)	- 7, 14
9	74,0	73,9	5,27 (1H, q, 3,5)	1'
10	64,0	63,7	4,57 (1H, d, 3,5)	9, 11, 12, 13
11	43,5	43,5	-	-
12	20,1	20,2	1,05 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	24,3	24,3	1,08 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	115,7	115,7	4,95 (1H, br s) 4,74 (1H, br s)	6, 8 -
15	23,1	66,9	3,95 (1H, br d, 12,5) 3,91 (1H, br d, 12,5)	2, 3, 4 -
9-Acetyl				
1'	170,2	170,2	-	-
2'	21,0	21,1	2,06 s	1'

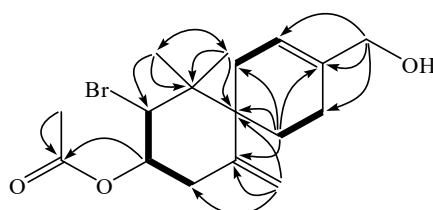
* Tài liệu tham khảo chất acetyldeschloroelatol [21],

^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 125,7 MHz.

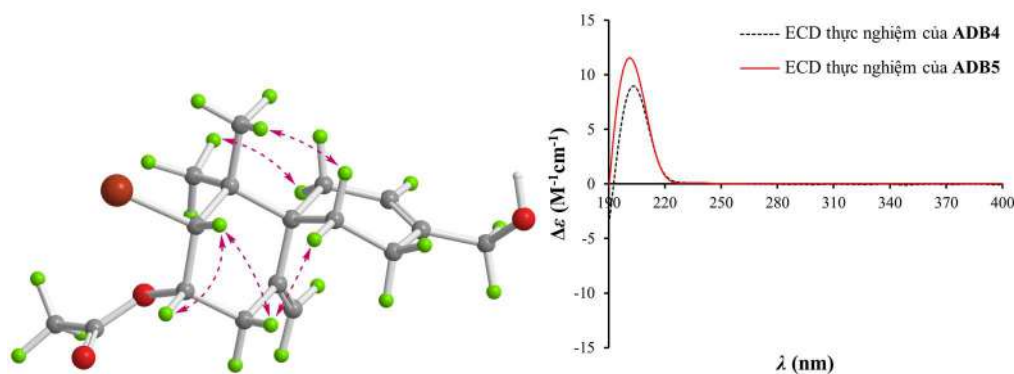
Hợp chất **ADB5** thu được dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 379,0871 và 381,0836 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (tính toán theo lý thuyết cho công thức ion giả phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrO}_3\text{Na}^+$, m/z 379,0880 và 381,0859), gợi ý công thức phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrO}_3$ cho hợp chất **ADB5** (Hình D9.1). Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB5** (Bảng 3.10) cho thấy hợp chất chứa 17 carbon. Trong đó chứa hai nhóm methyl singlet [δ_{H} 1,05 (H-12)/ δ_{C} 20,5 (C-12), 1,08 (H-13)/ 24,3 (C-13)]; sáu nhóm methylene, trong đó có một nhóm oxymethylene [δ_{H} 3,95 (H_a-15) và 3,91 (H_b-15)/ δ_{C} 66,9 (C-15)] và một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_{H} 4,95 (H_a-14) và 4,74 (H_b-14)/ δ_{C} 115,7 (C-14)]; một nhóm oxymethine [δ_{H} 5,27 (H-9)/ δ_{C} 73,9 (C-9)]; một nhóm brommethine

[δ_H 4,57 (H-10)/ δ_C 63,7 (C-10)]; một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_H 5,60 (H-2)/ δ_C 121,4 (C-2)]; và bốn carbon không chứa hydro. Bên cạnh đó còn xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một nhóm acetyl [δ_C 170,2 (C-1') và δ_H 2,06 (H-2')/ δ_C 21,1 (C-2')]. Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB5** là một sesquiterpene chamigrane và hợp chất này gần giống với hợp chất acetyldeschloroelatol, chỉ khác là hợp chất này được thế nhóm -OH tại vị trí C-15. Hợp chất **ADB5** cũng gần giống với hợp chất **ADB4** như đã phân tích bên trên, chỉ khác là hợp chất này có nhóm thế acetyl ở vị trí C-9.

Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 (δ_H 1,05) và H-13 (δ_H 1,08) tương tác lên C-6 (δ_C 47,2), C-10 (δ_C 63,7) và C-11 (δ_C 43,5); H-15 (δ_H 3,95/3,91) lên C-2 (δ_C 121,4), C-3 (δ_C 136,3) và C-4 (δ_C 23,4); H_a-14 (δ_H 4,95) lên C-6 (δ_C 47,2) và C-8 (δ_C 36,7); (Hình 3.33). Những tương tác này cho biết **ADB5** chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, một nhóm thế -OH tại C-15, vị trí C-10 được thế bởi nguyên tử brom. Một nhóm acetyl được thế vào vị trí C-9 trên phân tử dựa vào sự tương tác HMBC giữa H-9 (δ_H 5,27) với C-1' (δ_C 170,2). Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 5,27) tương tác với H_a-8 (δ_H 2,66) và H-10 (δ_H 4,57); H_a-1 (δ_H 2,29) và H_b-1 (δ_H 2,19) đều tương tác với H-2 (δ_H 5,60); H_a-4 (δ_H 2,00) tương tác với cả H_b-5 (δ_H 1,61) (Hình 3.33). Với những dữ liệu phổ này xác định được cấu trúc phẳng của hợp chất **ADB5**.



Hình 3.33. Tương tác phổ HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất **ADB5**



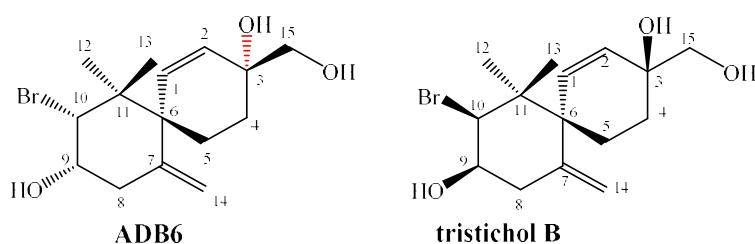
Hình 3.34. Tương tác phổ NOESY ($\leftarrow\text{-----}\rightarrow$), phổ ECD của hợp chất **ADB5**

Xét tương tác trên phổ NOESY, tương tác giữa H-10 (δ_H 4,59) với H-9 (δ_H 5,27), với H₃-13 (δ_H 1,08) và với H_a-5 (δ_H 1,89); tương tác giữa H_b-5 (δ_H 1,61) với

H₃-13; H₃-12 (δ_H 1,05) và với H_b-1 (δ_H 2,19). Bên cạnh đó giá trị nhỏ của hằng số ghép giữa H-10 và H-9 ($J_{9,10} = 3,0$ Hz) cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối ($6S^*, 9S^*, 10R^*$) trên hợp chất **ADB5** (Hình 3.34).

Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB5** (Hình 3.34) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB5**-(6*R*,9*S*,10*R*) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình (6*R*,9*S*,10*R*) cho hợp chất **ADB5**. Từ đó hợp chất **ADB5** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.32 và đặt tên là aplydactylonin H, là một hợp chất mới và lần đầu tiên được công bố.

3.1.3.6. Hợp chất **ADB6**: Aplydactylonin F (chất mới)



Hình 3.35. Cấu trúc hợp chất **ADB6** và chất tham khảo

Hợp chất **ADB6** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 365,0517 và 367,0491 $[M + Cl]^-$ (tính toán theo lý thuyết cho công thức ion giả phân tử $C_{15}H_{23}BrO_3Cl^-$, 365,0525 và 367,0504), gợi ý công thức phân tử $C_{15}H_{23}BrO_2$ cho hợp chất **ADB6** (Hình D10.1). Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB6** (Bảng 3.11) cho thấy hợp chất chứa 15 carbon. Trong đó chứa hai nhóm methyl singlet [δ_H 1,19 (H-12)/ δ_C 21,6 (C-12), 0,99 (H-13)/ 26,6 (C-13)]; năm nhóm methylene, trong đó có một nhóm oxymethylene [δ_H 3,50 (H_a-15) và 3,50 (H_b-15)/ δ_C 67,0 (C-15)] và một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_H 5,13 (H_a-14) và 4,90 (H_b-14)/ δ_C 117,1 (C-14)]; một nhóm oxymethine [δ_H 4,15 (H-9)/ δ_C 71,9 (C-9)]; một nhóm brommethine [δ_H 4,57 (H-10)/ δ_C 70,1 (C-10)]; hai nhóm methine trong một liên kết đôi [δ_H 5,88 (H-1)/ δ_C 134,0 (C-1) và δ_H 5,75 (H-2)/ δ_C 132,8 (C-2)]; và bốn carbon không chứa hydro trong đó có một carbon ($>C-OH$) tại δ_C 71,6 (C-3). Đây cũng là điểm mới của hợp chất này. Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB6** là một sesquiterpene chamigrane.

Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 và H-13 tương tác lên C-6, C-10 và C-11; H-15 lên C-2, C-3 và C-4; H_a-14 lên C-6 và C-8; (Hình 3.36). Những tương tác này cho biết **ADB6** chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, hai nhóm thế -OH tại vị trí C-9 và C-15, vị trí C-10 được thế nguyên tử brom. Bên cạnh đó hợp chất chứa liên kết đôi dạng -CH=CH- ở vị trí C-1/C-2 và tại

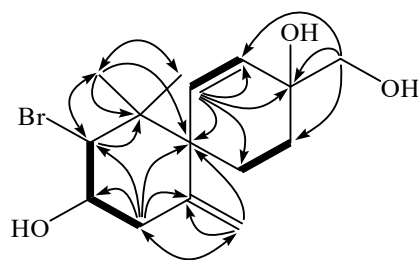
C-3 (δ_C 71,6) dựa trên tương tác HMBC giữa H-1 (δ_H 5,88) tương tác lên C-2, C-3, C-5 và C-6. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 4,15) tương tác với H_a-8 (δ_H 2,74) và H-10 (δ_H 4,57); H-1 (δ_H 5,88) tương tác với H-2 (δ_H 5,75); H_b-4 (δ_H 1,48) tương tác với cả H-5 (δ_H 1,80) (Hình 3.36). Đồng thời so sánh dữ liệu phổ NMR và cấu trúc phẳng của **AOB6** giống với hợp chất tristichol B đã công bố trước đây [130].

Bảng 3.11. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB6**

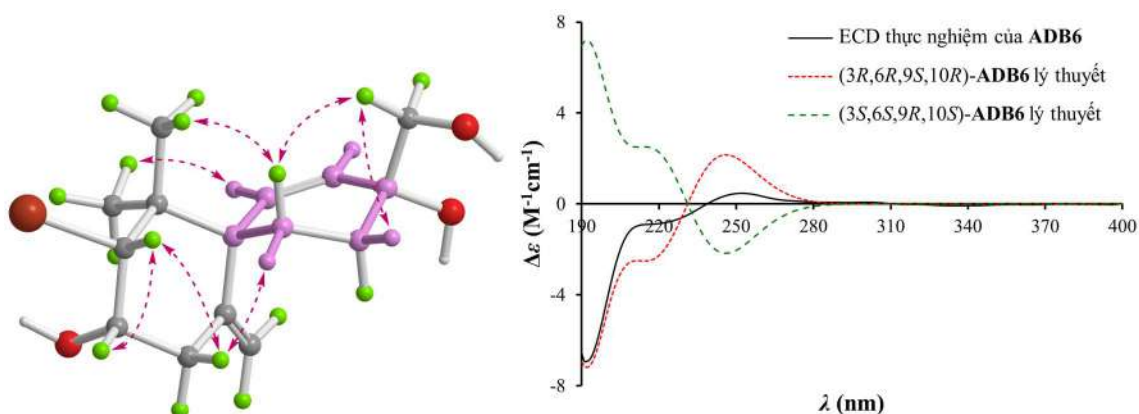
Vị trí C	$^*\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$, (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	135,3	134,0	5,88 (1H, brd, 10,5)	2, 3, 5, 6, 11
2	130,6	132,8	5,75 (1H, dd, 1,5, 10,5)	1, 4, 6
3	69,3	71,6	-	-
4	29,1	29,0	1,97 (1H, br d, 13,0) 1,48 (1H, ddd, 6,5, 10,5, 13,0)	- 3, 5, 6, 15
5	22,0	24,6	1,80 (2H, m)	1, 4, 6, 7
6	51,7	51,2	-	-
7	143,5	144,3	-	-
8	37,9	38,1	2,74 (1H, ddd, 2,0, 2,0, 15,0) 2,60 (1H, dd, 2,5, 15,0)	7, 14 6, 7, 9, 10, 14
9	72,0	71,9	4,15 (1H, q, 2,5)	-
10	70,3	70,1	4,57 (1H, d, 3,0)	11, 12, 13
11	42,7	42,7	-	-
12	21,5	21,6	1,19 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	26,7	26,6	0,99 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14	116,7	117,1	5,13 (1H, t, 1,5) 4,90 (1H, t, 1,5)	6, 8 6, 7, 8
15	70,0	67,0	3,51 (1H, d, 10,0) 3,49 (1H, d, 10,0)	2, 3, 4

^aTài liệu tham khảo chất tristichol B [130], ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 100 MHz

Xét tương tác trên phổ NOESY, tương tác giữa H-10 (δ_H 4,57) với H-9 (δ_H 4,15), với H₃-13 (δ_H 0,99) và với H₂-5 (δ_H 1,80); tương tác giữa H₂-5 với H₂-15 (δ_H 3,50); tương tác giữa H₃-12 (δ_H 1,19) và với H-1 (δ_H 5,88). Những tương tác này cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối ($3R^*$, $6R^*$, $9S^*$, $10R^*$) trên hợp chất **ADB6** (Hình 3.37). Kết hợp so sánh dữ liệu phổ ^{13}C -NMR giữa hợp chất **ADB6** với hợp chất tristichol B đã công bố cho thấy chúng khác nhau nhiều ở vị trí C-3, ở hợp chất **ADB6** (δ_C 71,6) và hợp chất tristichol B [δ_C 69,3 (C-3), $3S$] [130], vậy cũng cho dự đoán cấu hình ở vị trí C-3 của hợp chất **ADB6** có cấu hình $3R^*$.



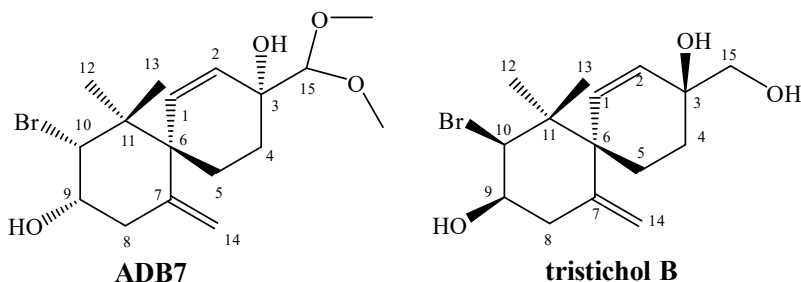
Hình 3.36. Tương tác chính HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của **ADB6**



Hình 3.37. Tương tác phổ NOESY (-----), phổ ECD của hợp chất **ADB6**

Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB6** (Hình 3.37) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB6**-($3R,6R,9S,10R$) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình ($3R,6R,9S,10R$) cho hợp chất **ADB6**. Từ đó hợp chất **ADB6** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.35 và đặt tên là aplydactylonin F, là một hợp chất mới và lần đầu tiên được công bố.

3.1.3.7. Hợp chất **ADB7**: Aplydactylonin E (chất mới)



Hình 3.38. Cấu trúc của hợp chất **ADB7** và chất tham khảo

Hợp chất **ADB7** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic tín hiệu tại m/z 397,0996 và 399,0975 $[M + Na]^+$ (tính toán theo lý thuyết tương ứng với công thức ion giả phân tử $C_{17}H_{27}BrO_4Na^+$, 397,0985 và 399,0965), gợi ý công thức phân tử $C_{17}H_{27}BrO_4$ cho hợp chất **ADB7** (Hình D11.1). Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB7** (Bảng 3.12) cho thấy hợp chất chứa 17 carbon. Trong đó chứa hai nhóm

methyl singlet [δ_{H} 1,19 (H-12)/ δ_{C} 21,7 (C-12) và 1,02 (H-13)/26,7 (C-13)]; bốn nhóm methylene, trong đó có một nhóm methylene trong liên kết đôi [δ_{H} 5,09 (H_a-14) và 4,92 (H_b-14)/ δ_{C} 116,8 (C-14)]; một nhóm oxymethine [δ_{H} 4,15 (H-9)/ δ_{C} 72,1 (C-9)]; một nhóm brommethine [δ_{H} 4,60 (H-10)/ δ_{C} 70,6 (C-10)]; hai nhóm methine trong một liên kết đôi [δ_{H} 5,93 (H-1)/ δ_{C} 134,0 (C-1) và δ_{H} 5,77 (H-2)/ δ_{C} 131,7 (C-2)]; và bốn carbon không chứa hydro trong đó có một carbon (>C-OH) tại δ_{C} 72,1 (C-3). Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB7** là một sesquiterpene chamigrane.

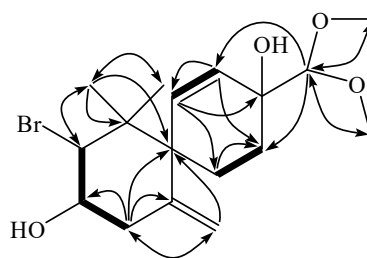
Bảng 3.12. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB7**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	135,3	134,0	5,93 (1H, dd, 10,5, 0,6)	3, 5
2	130,6	131,7	5,77 (1H, dd, 10,5, 0,6)	1, 4, 6
3	69,3	72,1	-	-
4a	29,1	28,6	1,93 (1H, br d, 13,2)	-
4b			1,54 (1H, ddd, 13,2, 13,2, 3,6)	6
5a	22,0	24,3	2,03 (1H, ddd, 13,2, 13,2, 3,0)	4
5b			1,75 (1H, dddd, 13,2, 3,6, 3,6, 1,8)	-
6	51,7	50,7	-	-
7	143,5	144,3	-	-
8a	37,9	38,2	2,73 (1H, ddd, 15,0, 2,4, 1,8)	6, 7, 9, 14
8b			2,59 (1H, dd, 15,0, 2,4)	
9	72,0	72,1	4,15 (1H, m)	-
10	70,3	70,6	4,60 (1H, d, 3,0)	12
11	42,7	42,9	-	
12	21,5	21,7	1,19 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	26,7	26,7	1,02 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14a	116,7	116,8	5,09 (1H, br s)	6, 8
14b			4,92 (1H, br s)	6, 8
15	70,0	109,3	4,13 (1H, s)	2, 4, OCH ₃
15-OCH ₃		57,8	3,53 (3H, s)	15
15-OCH ₃		57,6	3,54 (3H, s)	15

*Tài liệu tham khảo chất tristichol B [130], ^a đo trong CDCl₃, ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz

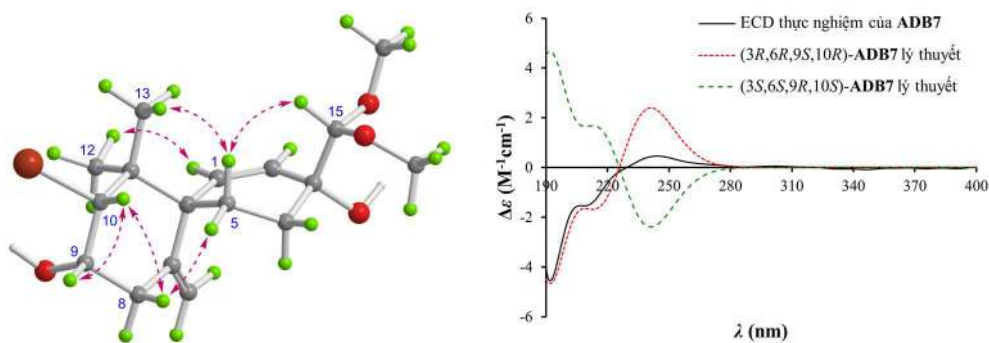
Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-12 (δ_{H} 1,19) và H-13 (δ_{H} 1,02) tương tác lên C-6 (δ_{C} 50,7), C-10 (δ_{C} 70,6) và C-11 (δ_{C} 42,9); H-15 (δ_{H} 4,13) lên C-2 (δ_{C} 131,7), C-3 (δ_{C} 72,1) và C-4 (δ_{C} 28,6); H_a-14 (δ_{H} 5,09) tương tác lên C-6 (δ_{C} 50,7) và C-8 (δ_{C} 38,2); (Hình 3.39). Những tương tác này cho biết

ADB7 chứa một nhóm gem-dimethyl tại vị trí C-11, hai nhóm thế -OH tại vị trí C-3 và C-9, một vị trí C-10 được thế bởi nguyên tử brom. Bên cạnh đó hợp chất chứa liên kết đôi dạng -CH=CH- ở vị trí C-1/C-2 và tại C-3 (δ_C 72,1) chứa nhóm thế -OH dựa trên tương tác HMBC giữa H-1 (δ_H 5,89) tương tác lên C-2, C-3, C-5 và C-6. So sánh với hợp chất tristichol B thì hợp chất **ADB7** khác ở vị trí có thể hai nhóm oxymethyl tại C-15. Điều này cũng được xác định dựa trên phổ HMBC do xuất hiện tương tác giữa H (δ_H 3,53 và δ_H 3,54) của hai nhóm OCH_3 tương tác lên C-15 (δ_C 109,3). Đây cũng chính là tính mới của hợp chất này. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-9 (δ_H 4,15) tương tác với H_a-8 (δ_H 2,73) và H-10 (δ_H 4,60); H-1 (δ_H 5,93) tương tác với H-2 (δ_H 5,77); H_b-4 (δ_H 1,54) tương tác với cả H_a-5 (δ_H 2,03) (Hình 3.39).



Hình 3.39. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) của hợp chất **ADB7**

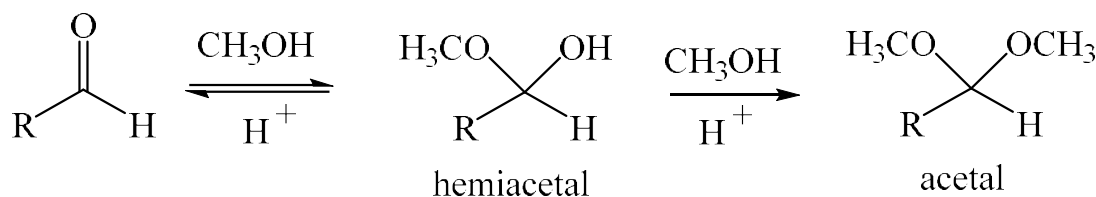
Xét tương tác trên phổ NOESY, tương tác giữa H-10 (δ_H 4,60) với H-9 (δ_H 4,15) và với H₃-13 (δ_H 1,02) và với H_a-5 (δ_H 2,03); H_a-5 tương tác với H₃-13 và H-15 (δ_H 4,13); tương tác giữa H_b-5 (δ_H 1,75) với H₃-12 (δ_H 1,19). Những tương tác này cho gợi ý xác định được cấu hình tương đối ở các vị trí bất đối ($3R^*$, $6R^*$, $9S^*$, $10R^*$) trên hợp chất **ADB7** (Hình 3.40).



Hình 3.40. Tương tác phổ NOESY ($\longleftrightarrow$), phổ ECD của hợp chất **ADB7**

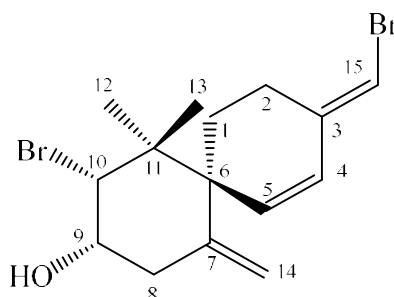
Phân tích tiếp trên phổ ECD của **ADB7** (Hình 3.40) cho hiệu ứng cotton dương trên phổ ECD được tính toán cho đồng phân **ADB7**-($3R,6R,9S,10R$) tương đồng với phổ thực nghiệm, điều đó khẳng định cấu hình ($3R,6R,9S,10R$) cho hợp chất **ADB7**. Từ đó hợp chất **ADB7** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.38 và đặt tên là aplydactylonin E - là một hợp chất mới lần đầu tiên được công bố.

Một hợp chất có hai nhóm methoxy thế vào cùng một carbon rất hiếm. Trước đây Kita M. và cộng sự (2010) đã có một nghiên cứu về cây thuộc chi kim ngân *Lonicera korolkovii* và công bố hợp chất korolkoside có chứa hai nhóm methoxy thế cùng vào một nguyên tử carbon. Nghiên cứu cho rằng hợp chất có chứa hai nhóm methoxy thế cùng vào một nguyên tử carbon do nhân tạo (artifacts), trong quá trình ngâm chiết với methanol xảy ra quá trình acetal của nhóm aldehyde (-CHO) với methanol. Quá trình acetal được diễn đạt như hình 3.41.



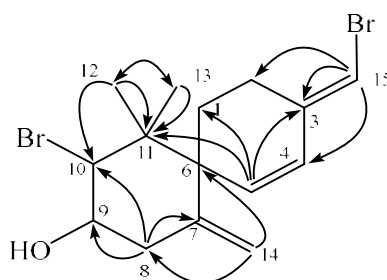
Hình 3.41. Quá trình acetal một hợp chất hữu cơ có nhóm aldehyde (-CHO)

3.1.3.8. Hợp chất **ADB8**: [3(15)E,4Z,6S,9S,10R]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol



Hình 3.42. Cấu trúc của hợp chất **ADB8**

Hợp chất **ADB8** được phân lập dưới dạng dầu không màu. Phổ ^1H -NMR và HSQC hiển thị các tín hiệu đặc trưng cho một liên kết đôi nội vòng tại δ_{H} 6,21 (1H, d, $J = 10,8$ Hz) và 5,89 (1H, d, $J = 10,8$ Hz), một liên kết đôi ngoại vòng tại δ_{H} 5,10 (1H, t, $J = 1,8$ Hz) và 4,82 (1H, dd, $J = 1,8, 1,2$ Hz), hai tín hiệu methyl singlet tại δ_{H} 1,01 (3H, s) và 1,24 (3H, s), một tín hiệu của nhóm methine brom tại δ_{H} 4,64 (1H, d, $J = 3,0$ Hz) và một tín hiệu nhóm oxymethine tại δ_{H} 4,17 (1H, m). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **ADB8** cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 15 nguyên tử carbon, bao gồm bốn nguyên tử carbon không chứa hydro, năm nhóm methine, bốn nhóm methylene và hai nhóm methyl. Trong số các nguyên tử cacbon này, có sáu nguyên tử là carbon olefin (δ_{C} 143,0, 139,5, 132,8, 129,3, 117,5 và 105,6) và hai nguyên tử liên kết với nguyên tử brom hoặc oxy (δ_{C} 72,0 và 70,3).

Hình 3.43. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) của hợp chất **ADB8**Bảng 3.13. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB8**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	24,5	25,7	1,99 (1H, #)	2, 3, 5, 6, 7, 11
1b			1,75 (1H, m)	-
2a	25,7	24,5	2,65 (1H, m)	1, 3, 4, 6, 15
2b			2,00 (1H, #)	-
3	139,5	139,5	-	-
4	132,8	129,3	6,21 (1H, d, 10,8)	2, 3, 6, 10
5	129,3	132,8	5,89 (1H, d, 10,8)	1, 3, 11
6	51,8	51,8	-	-
7	143,0	143,0	-	-
8a	38,0	38,0	2,71 (1H, ddd, 1,8, 4,2, 15,0)	-
8b			2,59 (1H, dd, 2,4, 15,0)	6, 7, 9, 10, 14
9	72,0	72,0	4,17 (1H, m)	7
10	70,3	70,3	4,64 (1H, d, 3,0)	11, 12, 13
11	42,7	42,7	-	-
12	26,6	26,6	1,01 (3H, s)	6, 10, 11, 13
13	21,5	21,5	1,24 (3H, s)	6, 10, 11, 12
14a	117,5	117,5	5,10 (1H, t, 1,8)	6, 8
14b			4,82 (1H, dd, 1,2, 1,8)	6, 8
15	105,6	105,6	6,10 (1H, d, 2,4)	2, 3, 4

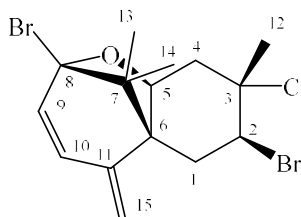
^aTài liệu tham khảo chất (2R,3S,6S,10Z)-9-[(E)-bromomethylidene]-1,1,9-trimethyl-5-methylidenespiro[5.5]undec-8-en-3-ol [129].

^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz, # tín hiệu chồng chéo.

Cấu trúc của vòng A của **ADB8** giống với cấu trúc của **ADB7**, điều này được chứng minh bằng các tương tác HMBC từ H-12 (δ_{H} 1,01) đến C-6 (δ_{C} 51,8), C-10 (δ_{C} 70,3), C-11 (δ_{C} 42,7) và C-13 (δ_{C} 21,5), và từ H_a-8 (δ_{H} 2,71) đến C-6 (δ_{C} 51,8), C-7 (δ_{C} 143,0), C-9 (δ_{C} 72,0), C-10 (δ_{C} 70,3) và C-14 (δ_{C} 117,5) (Hình 3.43). Ngoài ra, các tương tác HMBC khác từ H-5 (δ_{H} 5,89) đến C-1 (δ_{C} 25,7), C-3 (δ_{C} 139,5) và C-11 (δ_{C} 42,7), từ H-14b (δ_{H} 4,82) và H-14a (δ_{H} 5,10) đến C-6 (δ_{C} 51,8) và C-8 (δ_{C}

38,0), và từ H-15 (δ_H 6,10) đến C-2 (δ_C 24,5), C-3 (δ_C 139,5) và C-4 (δ_C 129,3), đã xác nhận rõ ràng vị trí của ba liên kết đôi tại C-4/C-5, C-7/C-14 và C-3/C-15. Với các bằng chứng trên, cấu trúc của **ADB8** được xác định là [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol [129]. Sesquiterpene này trước đây đã được báo cáo từ thảo biển *A. dactylomela* ở Puerto Rico [131], cũng như từ tảo đỏ *Laurencia dendroidea* [132], *L. chondrioides* [129] và *L. majuscula* [133].

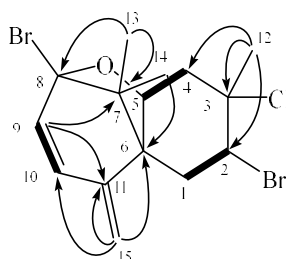
3.1.3.9. Hợp chất **ADB9**: *pacifidiene*



ADB9

Hình 3.44. Cấu trúc của hợp chất **ADB9**

Hợp chất **ADB9** thu được dưới dạng dầu không màu. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy hợp chất chứa ba nhóm methyl tại δ_H 1,81 (3H, s), 0,95 (3H, s) và 1,30 (3H, s), bốn proton olefin tại δ_H 6,07 (1H, dd, $J = 0,6, 8,4$ Hz), 6,24 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 5,25 (1H, s) và 4,97 (1H, d, $J = 1,2$ Hz), một proton nhóm oxymethine tại δ_H 3,94 (1H, dd, $J = 4,8, 13,2$ Hz), một proton nhóm methine halogen tại δ_H 4,46 (1H, dd, $J = 3,0, 13,2$ Hz). Dữ liệu $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC cho thấy **ADB9** chứa ba nhóm methyl [δ_C 31,8 (C-12), 20,1 (C-13) và 23,4 (C-14)], bốn carbon olefin [δ_C 133,6 (C-9), 131,8 (C-10), 148,8 (C-11) và 112,3 (C-15)], một nhóm methine brom [δ_C 60,4 (C-2)], một carbon clo hóa [δ_C 69,3 (C-3)], một nhóm oxymethine [δ_C 79,5 (C-5)] và một carbon brom hóa-oxy hóa [δ_C 101,3 (C-8)].



Hình 3.45. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) chính và COSY (—) của hợp chất **ADB9**

Trong phổ COSY, cho thấy một số tương tác giữa $\text{H}_a\text{-1/H-2}$, $\text{H}_b\text{-4/H-5}$ và H-9/H-10 (Hình 3.45). Vị trí của nhóm methine brom hóa và carbon clo hóa của **ADB9** lần lượt nằm ở C-2 và C-3, được xác nhận bởi tương tác HMBC từ $\text{H}_b\text{-1}$ (δ_H 2,28) đến C-2 (δ_C 60,4) và C-3 (δ_C 69,3), từ $\text{H}_3\text{-12}$ (δ_H 1,81) đến C-2 (δ_C 60,4), C-3 (δ_C 69,3) và C-4 (δ_C 46,1). Ngoài ra, các tương quan HMBC khác từ H-13 (δ_H 0,95) và H-14 (δ_H 0,95) đến C-6 (δ_C 54,9), C-7 (δ_C 50,8), C-8 (δ_C 101,3); từ H-4a (δ_H 2,58)

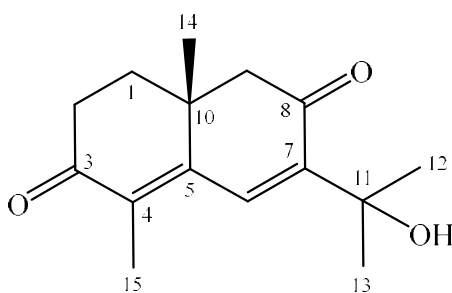
đến C-5 (δ_C 79,5), C-6 (δ_C 54,9); từ H_b-15 (δ_H 4,97) đến C-6 (δ_C 54,9), C-10 (δ_C 131,8) và C-11 (δ_C 148,8). Với những tương tác HMBC này xác định được vị trí của nhóm oxymethin tại C-5, carbon brom hóa-oxy hóa tại C-8 và hai liên kết đôi tại C-9/C-10 và C-11/C-15. Từ các bằng chứng trên, hợp chất **ADB9** được làm sáng tỏ là pacifidiene [26]. Là một halogenated sesquiterpene trước đây đã được phân lập từ cỏ biển *A. dactylomela* ở Brazil [26].

Bảng 3.14. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB9**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	32,7	33,2	2,33 (1H, dd, 13,2, 14,4)	2, 3, 5, 6, 11
1b			2,28 (1H, dd, 3,0, 14,4)	2, 3, 6, 7, 11
2	58,9	60,4	4,46 (1H, dd, 3,0, 13,2)	1, 3, 6
3	67,3	69,3	-	-
4a	45,5	46,1	2,58 (1H, dd, 4,8, 15,0)	2, 3, 5, 6
4b			2,40 (1H, dd, 13,2, 15,0)	5, 12
5	78,4	79,5	3,94 (1H, dd, 4,8, 13,2)	1, 3, 6
6	53,7	54,9	-	-
7	50,0	50,8	-	-
8	99,7	101,3	-	-
9	130,7	133,6	6,07 (1H, dd, 0,6, 8,4)	7, 11
10	132,7	131,8	6,24 (1H, d, 8,4)	6, 8, 9, 11, 15
11	147,2	148,8	-	-
12	31,5	31,8	1,81 (3H, s)	2, 3, 4
13	19,7	20,1	0,95 (3H, s)	6, 7, 8, 14
14	23,0	23,4	1,30 (3H, s)	6, 7, 8, 13
15a	111,7	112,3	5,25 (1H, s)	6, 10, 11
15b			4,97 (1H, d, 1,2)	6, 10, 11

* Tài liệu tham khảo chất pacifidiene, ^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz.

3.1.3.10. Hợp chất **ADB10**: 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon



Hình 3.46. Cấu trúc của hợp chất **ADB10**

Bảng 3.15. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB10**

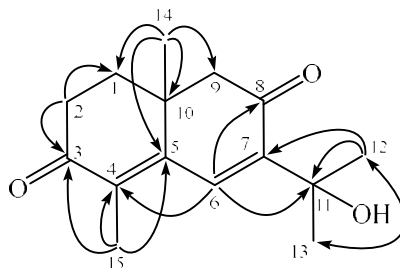
Vị trí C	$^*\delta_{\text{H}}^{\text{d,e}}$ ($J = \text{Hz}$)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	1,85 (2H, ddd)	36,2	2,05 (1H, overlapped)	-
1b			1,86 (1H, ddd, 13,2, 5,4, 2,4)	-
2a	2,60 (2H, m)	34,0	2,65 (1H, ddd, 18,0, 13,8, 4,2)	-
2b			2,43 (1H, ddd, 18,0, 4,8, 2,4)	-
3	-	197,9	-	-
4	-	134,5	-	-
5	-	152,1	-	-
6	7,43 (1H, br s)	135,2	7,77 (1H, s)	4, 7, 8, 11
7	-	148,7	-	-
8	-	198,7	-	-
9a	2,57 (1H, br d)	54,5	2,61 (1H, dd, 15,0, 0,9)	-
9b	2,44 (1H, d)		2,33 (1H, d, 15,0)	5, 7, 8, 10, 14
10	-	38,2	-	-
11	-	71,7	-	-
12	1,52 (3H, s)	30,0	1,49 (3H, s)	7, 11, 13
13	1,52 (3H, s)	29,1	1,42 (3H, s)	7, 11, 12
14	1,98 (3H, s)	23,5	1,27 (3H, s)	1, 5, 9, 10
15	1,27 (3H, s)	11,0	1,92 (3H, s)	3, 4, 5
11-OH		-	4,22 (1H, s)	7, 11, 12, 13

* Tài liệu tham khảo chất 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon [134]

^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d đo trong CDCl_3 , ^e 270 MHz.

Hợp chất **ADB10** được phân lập dưới dạng dầu không màu. Xét trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS cho thấy **ADB10** xuất hiện pic ion tại m/z 271,1302 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Hình D14.1), dẫn đến công thức phân tử tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}^+$, tại m/z 271,1310 và phù hợp công thức phân tử của hợp chất là $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ với độ bất bão hòa là sáu. Phân tích dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR chỉ ra rằng **ADB10** là một sesquiterpene, một thành phần chính của sên biển *A. dactylomela*. Phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy **ADB10** chứa 15 tín hiệu carbon, bao gồm bốn nhóm methyl [δ_{C} 30,0 (C-12), 29,1 (C-13), 23,5 (C-14) và 11,0 (C-15)], ba nhóm methylene [δ_{C} 36,2 (C-1), 34,0 (C-2) và 54,5 (C-9)], một carbon bậc bốn [δ_{C} 38,2 (C-10)], một carbon oxygenated [δ_{C} 71,7 (C-11)], bốn carbon sp^2 [δ_{C} 134,5 (C-4), 152,1 (C-5), 135,2 (C-6) và 148,7 (C-7)] và hai nhóm ketone [δ_{C} 197,9 (C-3) và 198,7 (C-8)]. Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu cho bốn nhóm methyl singlet [δ_{H} 1,49 (H-12), 1,42 (H-13), 1,27 (H-14) và 1,92 (H-15)], một tín hiệu singlet của nhóm hydroxy [δ_{H} 4,22 (11-OH)] và một proton olefin [δ_{H} 7,77 (H-6)]. Còn lại là sáu tín hiệu của ba nhóm

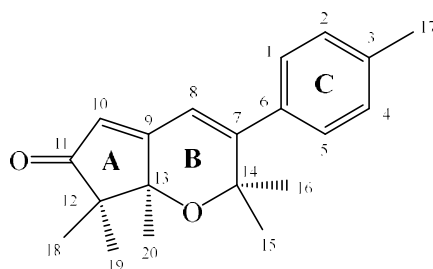
methylene [δ_H 2,05 (H_a-1)/1,86 (H_b-1), 2,65 (H_a-2)/2,43 (H_b-2), 2,61 (H_a-9)/2,33 (H_b-9). Bốn nhóm methyl singlet tại δ_H 1,49, 1,42, 1,27 và 1,92 được gán cho H-12, H-13, H-14 và H-15 của hợp chất **ADB10** dựa trên cơ sở một số tương tác HMBC (Hình 3.47).



Hình 3.47. Tương tác HMBC (→) của hợp chất **ADB10**

Các tương tác HMBC từ proton của nhóm hydroxy (δ_H 4,22) đến C-7 (δ_C 148,7) và C-11 (δ_C 71,7), cũng như sự dịch chuyển xuống vùng trường thấp của C-11 (δ_C 71,7) chỉ ra rằng nhóm hydroxy liên kết với C-11. Cuối cùng, các tương tác HMBC từ H-2 đến C-1 và C-3, và từ H-6 đến C-4, C-8 và C-11 đã xác nhận cấu trúc của **ADB10** như thể hiện trong hình 3.46. Do đó, hợp chất **ADB10** được xác định là 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon [134]. Là một dẫn xuất eudesmane được báo cáo trước đây từ loài thực vật *Isocoma wrightii* cùng với duy nhất dữ liệu phổ 1H NMR [134]. Trong luận án này, dữ liệu phổ NMR đầy đủ của 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperone được báo cáo lần đầu tiên và hợp chất này cũng được ghi nhận lần đầu tiên từ loài sên biển *A. dactylomela*.

3.1.3.11. Hợp chất **ADB11**: aplydactylonin D (chất mới)



Hình 3.48. Cấu trúc của hợp chất **ADB11**

Hợp chất **ADB11** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion tại m/z 297,1855 [$M + H$]⁺ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{20}H_{25}O_2^+$, m/z 297,1849), 319,1679 [$M + Na$]⁺ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{20}H_{24}O_2Na^+$, 319,1669) gợi ý công thức phân tử $C_{20}H_{24}O_2$ cho hợp chất **ADB11** (Hình D15.1). Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR và phổ HSQC của **ADB11** (Bảng 3.16) cho thấy hợp chất chứa 20 carbon. Trong đó chứa sáu nhóm methyl singlet [δ_H

1,37 (H-15)/ δ_C 31,2 (C-15) 1,47 (H-16)/27,8 (C-16), 2,38 (H-17)/21,2 (C-17), 1,12 (H-18)/25,1 (C-18), 1,16 (H-19)/16,8 (C-19), và 1,43 (H-20)/27,9 (C-20)]; một nguyên tử carbon bậc 4 tại δ_C 55,4 (C-12); hai nhóm carbon oxygenate tại δ_C 79,9 (C-13) và δ_C 76,2 (C-14); mười nguyên tử carbon olefin cộng hưởng trong vùng trường từ 167,3 - 118,8 ppm và còn lại là tín hiệu đặc trưng của một nhóm ketone tại δ_C 210,5 (C-11). Với những phân tích dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất **ADB11** là một diterpenenoid.

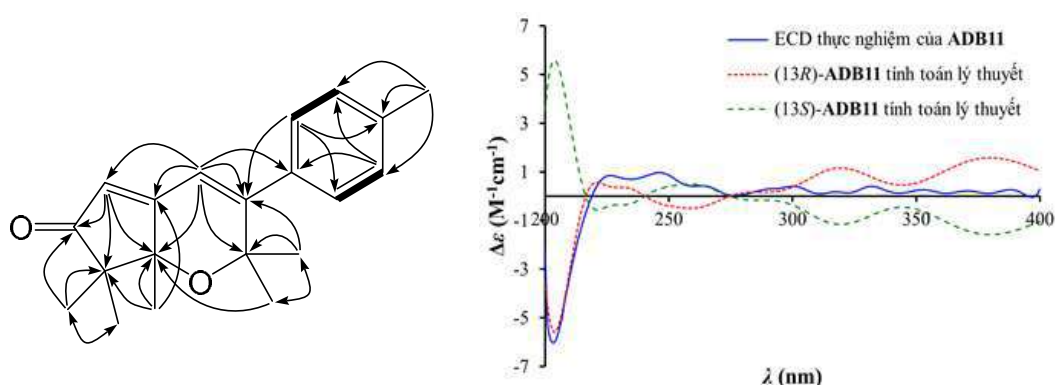
Bảng 3.16. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB11**

Vị trí C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	NOESY
1	128,1	7,16 (1H, d, 9,0)	3, 5, 7	15, 8
2	128,8	7,17 (1H, d, 9,0)	4, 6, 17	17
3	137,9	-	-	-
4	128,8	7,17 (1H, d, 9,0)	2, 6, 17	-
5	128,1	7,16 (1H, d, 9,0)	1, 3, 7	16
6	137,2	-	-	-
7	156,4	-	-	-
8	118,8	6,44 (1H, s)	6, 7, 9, 10, 13, 14	1, 10
9	167,3	-	-	-
10	119,7	5,73 (1H, s)	11, 12, 13	-
11	210,5	-	-	-
12	55,4	-	-	-
13	79,9	-	-	-
14	76,2	-	-	-
15	31,2	1,37 (3H, s)	7, 14, 16	1
16	27,8	1,47 (3H, s)	7, 14, 15	5
17	21,2	2,38 (3H, s)	2, 3, 4	-
18	25,1	1,12 (3H, s)	11, 12, 13, 19	-
19	16,8	1,16 (3H, s)	11, 12, 13, 18	20
20	27,9	1,43 (3H, s)	9, 12, 13	19

^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 100 MHz.

Phân tích trên phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-18 (δ_H 1,12) và H-19 (δ_H 1,16) cùng tương tác lên C-11 (δ_C 210,5), C-12 (δ_C 55,4), C-13 (δ_C 79,9); H-20 (δ_H 1,43) lên C-7 (δ_C 156,4), C-12 (δ_C 55,4) và C-13 (δ_C 79,9); H-10 (δ_H 5,73) tương tác lên C-11 (δ_C 210,5), C-12 (δ_C 55,4) và C-13 (δ_C 79,9), H-18 (δ_H 1,12) lên C-19 (δ_C 16,8) và ngược lại H-19 (δ_H 1,16) lên C-18 (δ_C 25,1) (Hình 3.49). Điều này cho biết hợp chất có chứa vòng 5 cạnh 5,5-dimethyl-4-methyl-2-cyclopenten-1-one

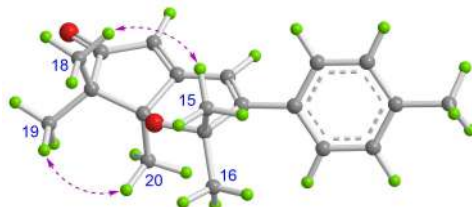
(vòng A), trong vòng có chứa một liên kết đôi, một nhóm thế ketone và một nhóm gem-dimethyl. Vòng năm cạnh này hợp nhất với vòng 6,6-dimethyl-3,6-dihydro-2H-pyran (vòng B) tại C-9 và C-13, điều này được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 6,44) lên C-6 (δ_C 137,2), C-7 (δ_C 156,4), C-9, C-10 (δ_C 119,7), C-13, C-14 (δ_C 76,2); H-15 (δ_H 1,37) và H-16 (δ_H 1,47) lên C-7 và C-14; H-1 (δ_H 7,16) tương tác với C-7. Đồng thời với những tương tác này cho biết vòng pyran và một vòng thơm thế *para* (hệ vòng thơm A2B2) liên kết giữa C-6 và C-7. Phổ COSY cũng cho biết hợp chất chứa vòng thơm hệ A2B2 dựa trên tương tác H-1 (δ_H 7,16) tương tác với H-2 (δ_H 7,17) (Hình 3.49). Do đó, cấu trúc phẳng của **ADB11** đã được xác định và bộ khung cacbon mới được đặt tên là aplydactylonane.



Hình 3.49. Tương tác HMBC (→) và COSY (—) và phổ ECD của hợp chất **ADB11**

Trên phổ NOESY, tương tác giữa H₃-20 với H₃-19 và giữa H₃-15 với H₃-18 cho thấy các nhóm Me-20 và Me-19 ở cùng một phía của mặt phẳng phân tử trên vòng A, trong khi nhóm Me-15 và Me-18 ở phía đối diện. Tương tác NOESY mạnh quan sát được giữa H-1(5) với đồng thời cả 2 nhóm Me-15 và Me-16 gợi ý cho thấy vòng thơm quay tự do xung quanh liên kết giữa C-6 và C-7 để tạo ra các đồng phân pro-atropisomer. Hơn nữa để chứng minh cấu trúc của **ADB11** cũng như khung carbon của hợp chất dựa trên việc tính toán NMR. Độ chuyển dịch hóa học ¹H và ¹³C-NMR của đồng phân 13*R**- **ADB11** được tính toán tại cấp độ mPW1PW91/6-31+G(d,p)/IEFPCM-CHCl₃ [113]. Kết quả (Bảng S8, hình S3 và S4) cho thấy hệ số tương quan (*R*²) thu được từ phân tích hồi quy tuyến tính, sai số tuyệt đối trung bình đã hiệu chỉnh (CMAE) và độ lệch căn bậc hai bình phương trung bình (RMSD) đối với dữ liệu ¹³C-NMR lần lượt là 0,9990, 1,28 và 1,79 ppm và các giá trị *R*², CMAE và RMSO với dữ liệu 0,996, 0,037 và 0,052 ppm. Những kết quả này chỉ ra rằng độ dịch chuyển hóa học được tính toán phù hợp tốt với các giá trị thực nghiệm và cung cấp thêm bằng chứng hỗ trợ xác định cấu trúc của **ADB11** [135]. Sau đó để xác định cấu hình tuyệt đối của **ADB11**, hai đồng phân quang học có thể (13*R*)-**ADB11** và

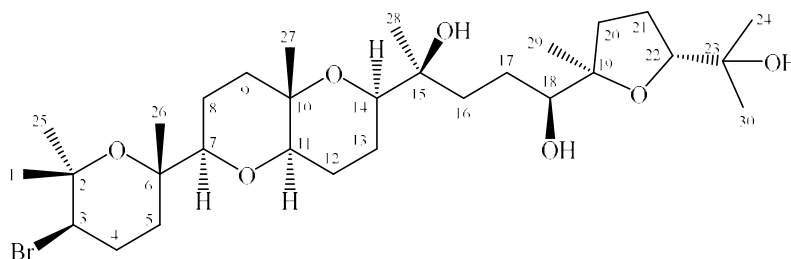
(13*R*)-**ADB11** dựa trên tính toán ECD bằng phương pháp TD-DFT ở mức B3LYP/LanL2DZ/IEFPCM-MeOH. Như thể hiện trong Hình 3.49, phổ ECD tính toán của đồng phân (13*R*)- **ADB11** phù hợp với dữ liệu thực nghiệm, trong đó cấu hình tuyệt đối của **ADB11** là 13*R*.



Hình 3.50. Tương tác phổ NOESY (←----→) của hợp chất **ADB11**

Với những phân tích dữ liệu phổ như trên thì chất **ADB11** xác định được cấu trúc phẳng cũng như cấu trúc lập thể như hình 3.47 và đặt tên là aplydactylonin D. Đây là một hợp chất có khung mới, lần đầu tiên được công bố.

3.1.3.12. Hợp chất **ADB12**: *Thyrsiferol*



Hình 3.51. Cấu trúc của hợp chất **ADB12**

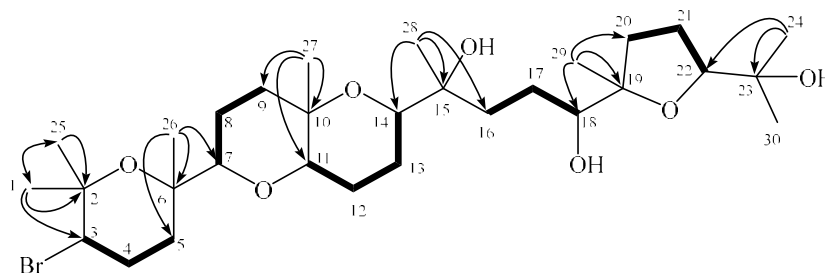
Hợp chất **ADB12** được phân lập dưới dạng dầu không màu. Công thức phân tử của nó được xác định là $C_{30}H_{53}BrO_7$ dựa trên dữ liệu phổ một chiều NMR và các píc ion giả phân tử trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 627,2872 và 629,2870 $[M + Na]^+$ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{30}H_{53}BrO_7Na^+$, m/z 627,2867 và 629,2846) (Xem hình D16.1). Phổ 1H -NMR của **ADB12** cho thấy sự có mặt của tám nhóm methyl singlet [δ_H 1,39 (3H, s, H-1), 1,12 (3H, s, H-24), 1,36 (3H, s, H-25), 1,19 (6H, s, H-26 và H-30), 1,17 (3H, s, H-27), 1,08 (3H, s, H-28), và 1,14 (3H, s, H-29)], một nhóm brommethine [δ_H 3,88 (1H, dd, $J = 3,9, 13,2$ Hz, H-3)], năm nhóm oxymethine [δ_H 3,03 (1H, dd, $J = 2,0, 12,0$ Hz, H-7), 3,56 (1H, dd, $J = 7,2, 10,8$ Hz, H-11), 3,69 (1H, dd, $J = 3,0, 12,6$ Hz, H-14), 3,44 (1H, dd, $J = 1,5, 9,9$ Hz, H-18) và 3,76 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-22)] (Hình D16.2). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **ADB12** cho thấy sự có mặt của 30 carbon sp^3 , bao gồm tám nhóm methyl, mười nhóm methylene, năm nhóm oxymethine, sáu carbon bậc bốn chứa oxy và một nhóm brommethine [δ_C 58,9 (C-3)]. Hợp chất không có bất kỳ carbon sp^2 nào, kết hợp với công thức phân tử ở trên với độ bất bão hòa là 4, hợp chất **ADB12** được dự đoán là một triterpenoid bốn vòng.

Bảng 3.17. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **ADB12**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	23,6	23,7	1,39 (3H, s)	2, 3, 25
2	74,9	74,9	-	-
3	59,0	58,9	3,88 (1H, dd, 3,9, 13,2)	1, 2, 25
4a	28,2	28,2	2,23 (1H, ddd, 3,6, 13,2, 13,2)	3, 5
4b			2,10 (1H, #)	-
5a	37,0	37,0	1,79 (1H, m)	-
5b			1,52 (1H, m)	-
6	74,3	74,3	-	-
7	86,5	86,5	3,03 (1H, dd, 2,4, 12,0)	6
8a	23,0	22,9	1,72 (1H, m)	-
8b			1,41 (1H, m)	-
9a	38,5	38,5	1,74 (1H, m)	-
9b			1,54 (1H, m)	-
10	71,9	71,8	-	-
11	76,3	76,3	3,56 (1H, dd, 7,2, 10,8)	7, 9, 10, 27
12a	21,1	21,1	1,88 (1H, m)	-
12b			1,49 (1H, m)	-
13a	25,5	25,4	1,57 (1H, m)	-
13b			1,45 (1H, m)	-
14	76,1	76,0	3,69 (1H, dd, 3,0, 12,6)	15
15	73,2	73,2	-	-
16a	33,5	33,7	1,81 (1H, m)	-
16b			1,38 (1H, m)	-
17a	20,7	20,6	1,82 (1H, m)	-
17b			1,72 (1H, m)	-
18	77,6	77,5	3,44 (1H, dd, 1,5, 9,9)	16, 19
19	86,0	86,0	-	-
20a	32,3	32,4	2,10 (1H, #)	-
20b			1,59 (1H, m)	-
21	26,6	26,7	1,82 (2H, m)	-
22	87,4	87,3	3,76 (1H, t, 7,8)	-
23	70,5	70,6	-	-
24	23,9	23,8	1,12 (3H, s)	22, 23, 30
25	31,0	31,0	1,36 (3H, s)	1, 2, 3
26	20,1	20,3	1,19 (3H, s)	5, 6, 7
27	21,4	21,4	1,17 (3H, s)	9, 10, 11
28	22,9	22,6	1,08 (3H, s)	14, 15, 16
29	23,4	23,4	1,14 (3H, s)	18, 19, 20
30	27,6	27,5	1,19 (3H, s)	22, 23, 24

* Tài liệu tham khảo chất thyrsiferol [57]

^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, [#] tín hiệu chập

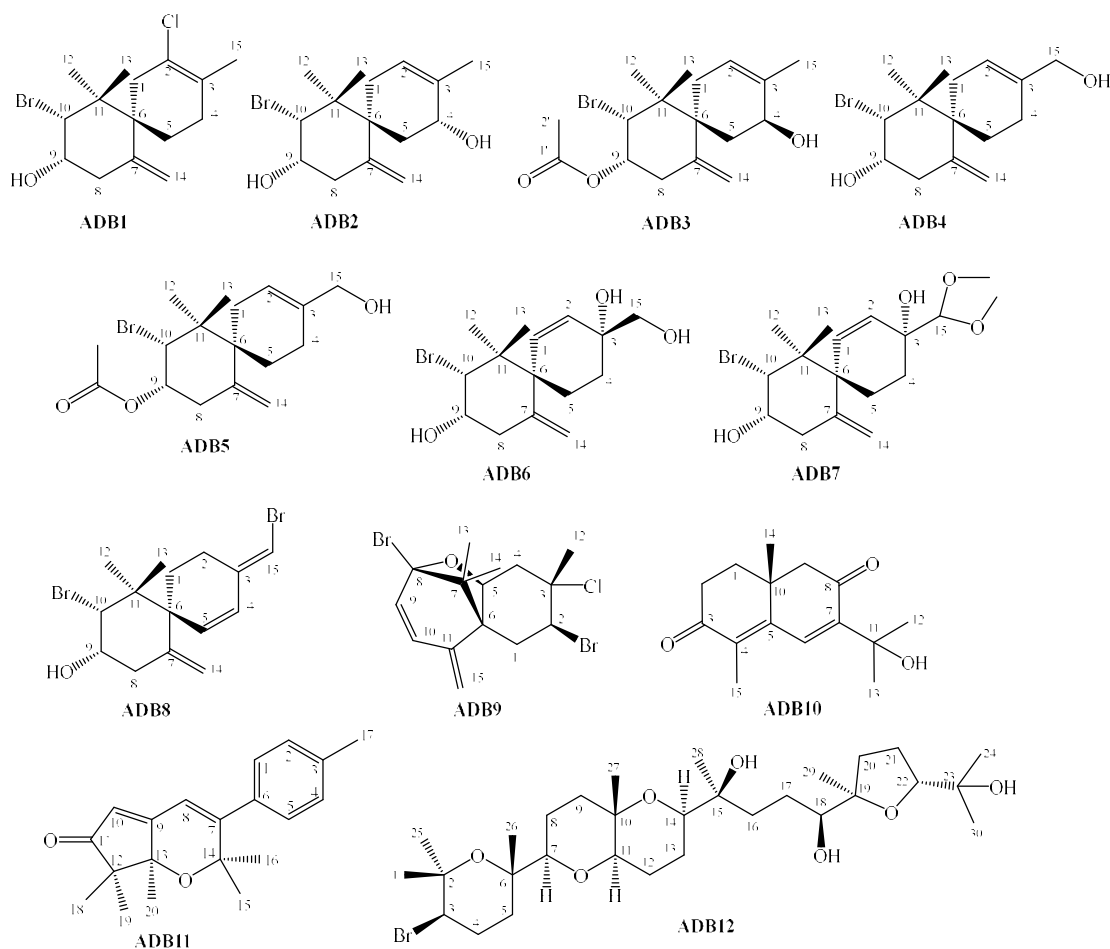


Hình 3.52. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) của hợp chất **ADB12**

Phân tích cho tiết trên phổ COSY cho thấy sự hiện diện của năm hệ spin giữa H-3/H-4/H-5, H-7/H-8/H-9, H-11/H-12/H-13/H-14, H-16/H-17/H-18 và H-20/H-21/H-22 (Hình D16.6). Những kết quả này cùng với các tương tác quan sát được trong phổ HMBC cho phép thiết lập cấu trúc phẳng của **ADB12**. Thật vậy, cấu trúc của vòng A, B và C được xác định bằng các tương tác HMBC từ H₃-1 (δ_{H} 1,39) đến C-2 (δ_{H} 74,9), C-3 (δ_{H} 58,9) và C-25 (δ_{H} 31,0), từ H₃-26 (δ_{H} 1,19) đến C-5 (δ_{H} 37,0), C-6 (δ_{H} 74,3) và C-7 (δ_{H} 86,5), và từ H₃-27 (δ_{H} 1,17) đến C-9 (δ_{H} 38,5), C-10 (δ_{H} 71,8) và C-11 (δ_{H} 76,3). Các tương tác HMBC từ H₃-28 (δ_{H} 1,08) đến C-14 (δ_{H} 76,0), C-15 (δ_{H} 73,2) và C-16 (δ_{H} 33,7), từ H₃-29 (δ_{H} 1,14) đến C-18 (δ_{H} 77,5), C-19 (δ_{H} 86,0) và C-20 (δ_{H} 32,4), và từ H₃-24 (δ_{H} 1,12) đến C-22 (δ_{H} 87,3), C-23 (δ_{H} 70,6) và C-30 (δ_{H} 27,5) đã xác nhận mảnh cấu trúc từ C-15 đến C-30. Cuối cùng, hợp chất **ADB12** được xác định là thyrsiferol dựa trên sự tương đồng của dữ liệu phổ NMR với hợp chất này, là một triterpene được báo cáo trước đây từ loài cỏ biển *Aplysia dactylomela* và tảo đỏ *Laurencia thyrsifera* cũng như *L. viridis* [57, 136, 137].

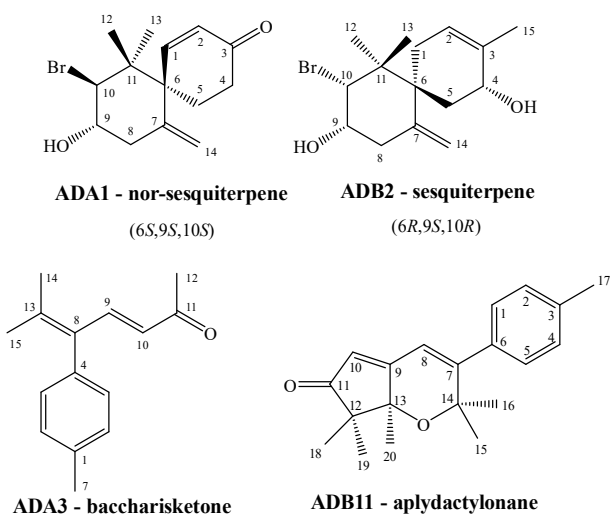
3.1.4. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ mẫu sên *A. dactylomela* thu ở Lý Sơn, Quảng Ngãi

Từ mẫu sên *A. dactylomela* – Lý Sơn, Quảng Ngãi đã phân lập và xác định cấu trúc 12 hợp chất, bao gồm: elatol (**ADB1**), aplydactylonin I (**ADB2**), aplydactylonin K (**ADB3**), aplydactylonin G (**ADB4**), aplydactylonin H (**ADB5**), aplydactylonin F (**ADB6**), aplydactylonin E (**ADB7**), [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol (**ADB8**), pacifidiene (**ADB9**), 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon (**ADB10**), aplydactylonin D (**ADB11**), thyrsiferol (**ADB12**).



Hình 3.53. Cấu trúc các hợp chất từ loài sên biển *A. dactylomela* – Lý Sơn, Quảng Ngãi

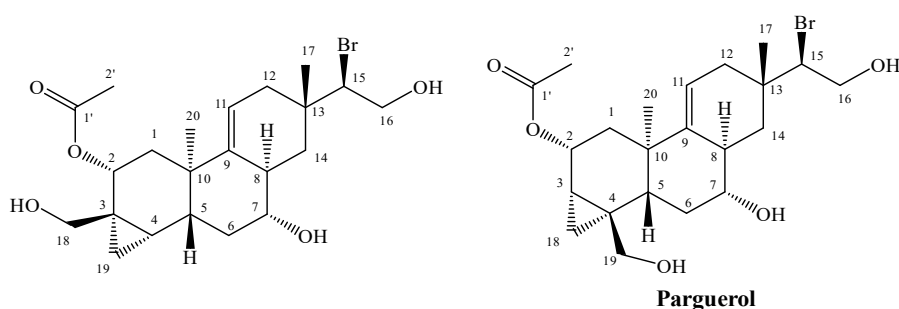
Từ kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ hai mẫu sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng và đảo Lý Sơn, Quảng Ngãi cho thấy các hợp chất thuộc lớp chất chính là sesquiterpene, diterpene và triterpene. Những hợp chất này thể hiện sự tương đồng cao về thành phần hóa học đã được các nhà nghiên cứu công bố về loài sên biển *A. dactylomela*. Tuy nhiên hai lớp chất ở hai mẫu có sự khác nhau khi thu ở hai vị trí khác nhau. Cấu hình có sự khác nhau ở nhóm chất sesquiterpene và khung chất hai diterpene ở hai mẫu cũng khác nhau. Cụ thể mẫu sên *A. dactylomela* – Lâm Đồng có nhóm chất nor-sesquiterpene và có cấu hình ở vị trí bất đối 6*S*,9*S*,10*S*, còn mẫu sên thu ở Quảng Ngãi có nhóm chất sesquiterpene và có cấu hình ở vị trí bất đối 6*R*,9*S*,10*R* (Hình 3.53). Sự khác nhau lớp chất diterpene là mẫu sên *A. dactylomela* – Lâm Đồng có khung diterpene đã biết là baccharisketone còn mẫu sên thu ở Quảng Ngãi có khung mới và được đặt tên là aplydactylonane (Hình 3.53). Ngoài ra mẫu sên thu ở Quảng Ngãi có thêm một chất triterpene trong khi đo mẫu sên ở Lâm Đồng chưa phân lập được lớp chất này.



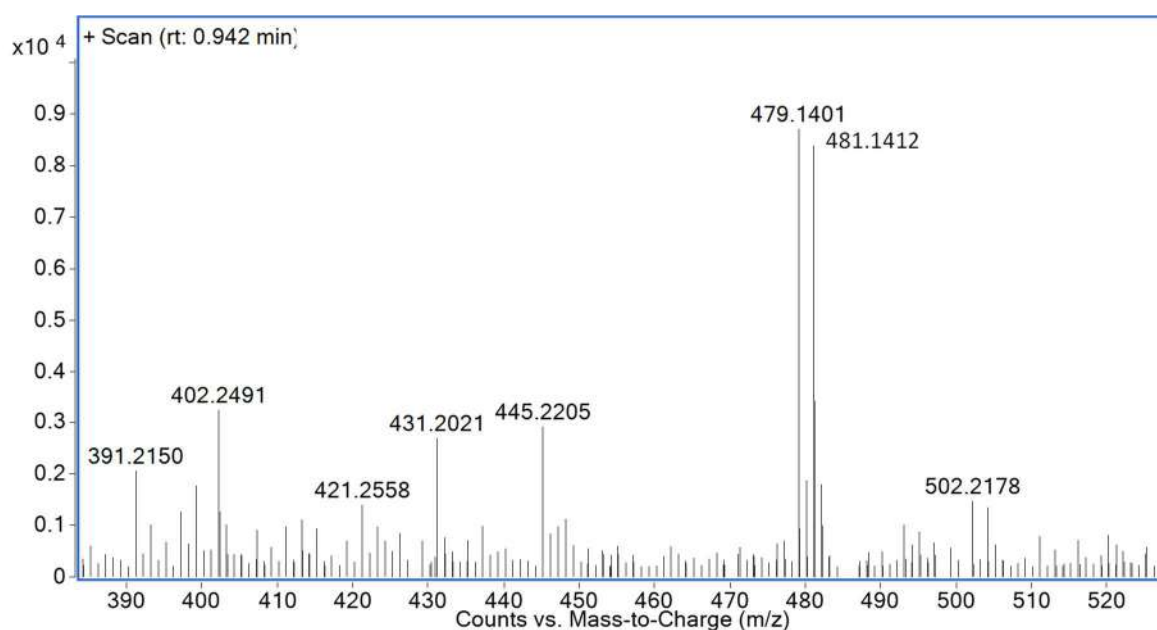
Hình 3.54. So sánh sự giống và khác nhau các lớp chất phân lập được từ hai mẫu sên biển *A. dactylomela* thu ở hai địa điểm Lâm Đồng và Quảng Ngãi.

3.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế

3.1.3.1. Hợp chất **AOB1**: oculiferanin A (chất mới)



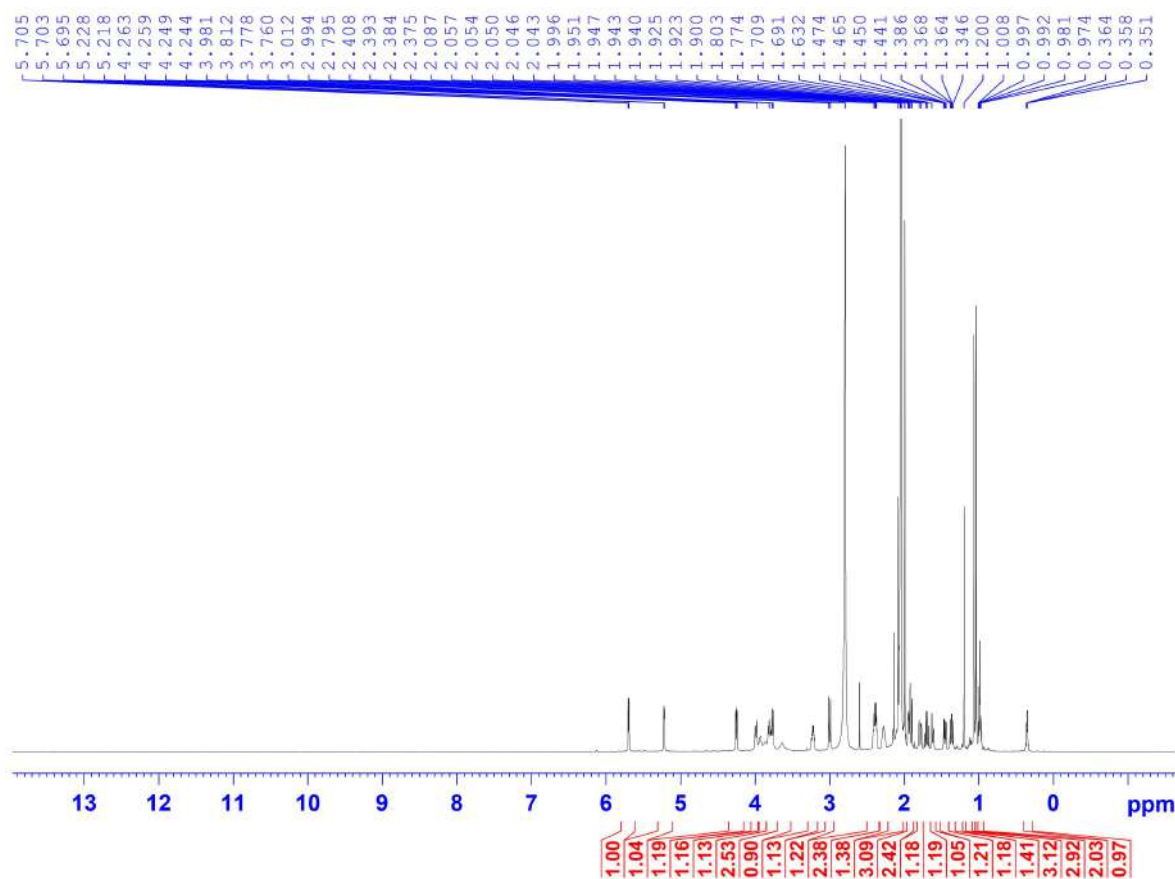
Hình 3.55. Cấu trúc hợp chất **AOB1**



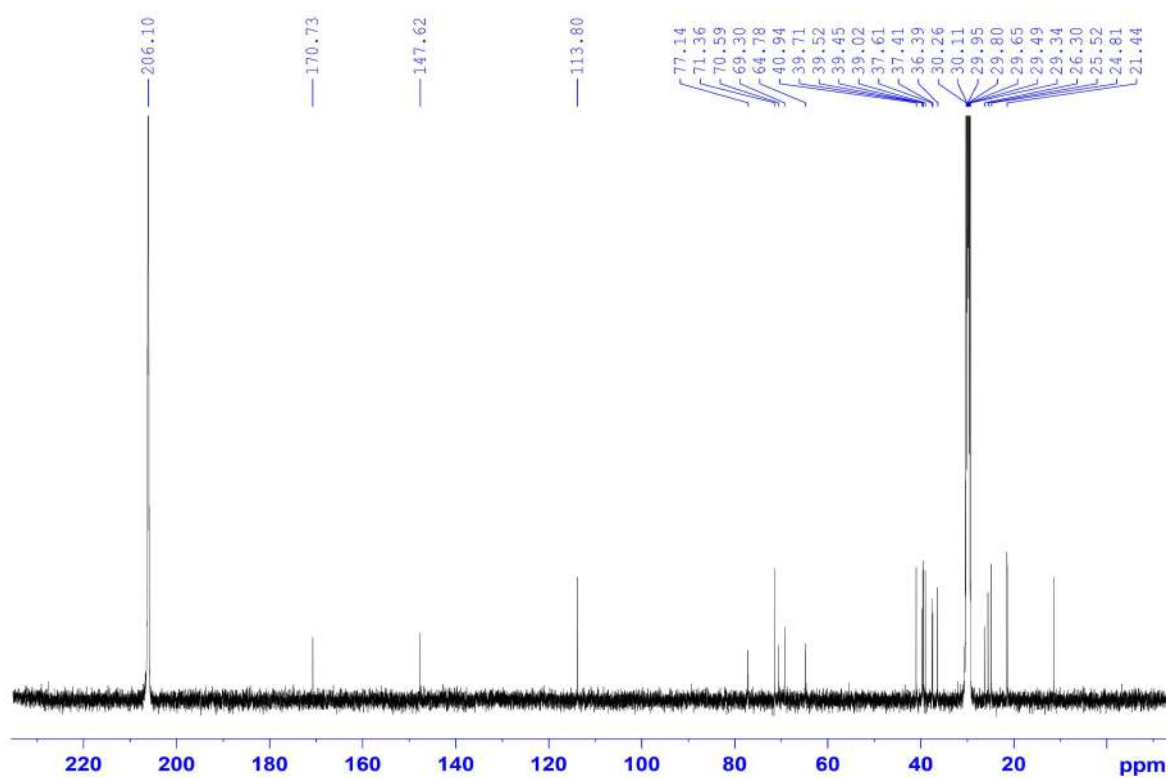
Hình 3.56. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **AOB1**

Hợp chất **AOB1** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Xét trên khối lượng phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại pic ion dương tại m/z 479,1401 $[M + Na]^+$ và 481,1412 $[M + 2 + Na]^+$ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{22}H_{33}BrO_5Na^+$, m/z 479,1404 và 481,1383) (Hình 3.56), từ đó gợi ý được hợp chất **AOB1** có công thức phân tử tương ứng $C_{22}H_{33}BrO_5$.

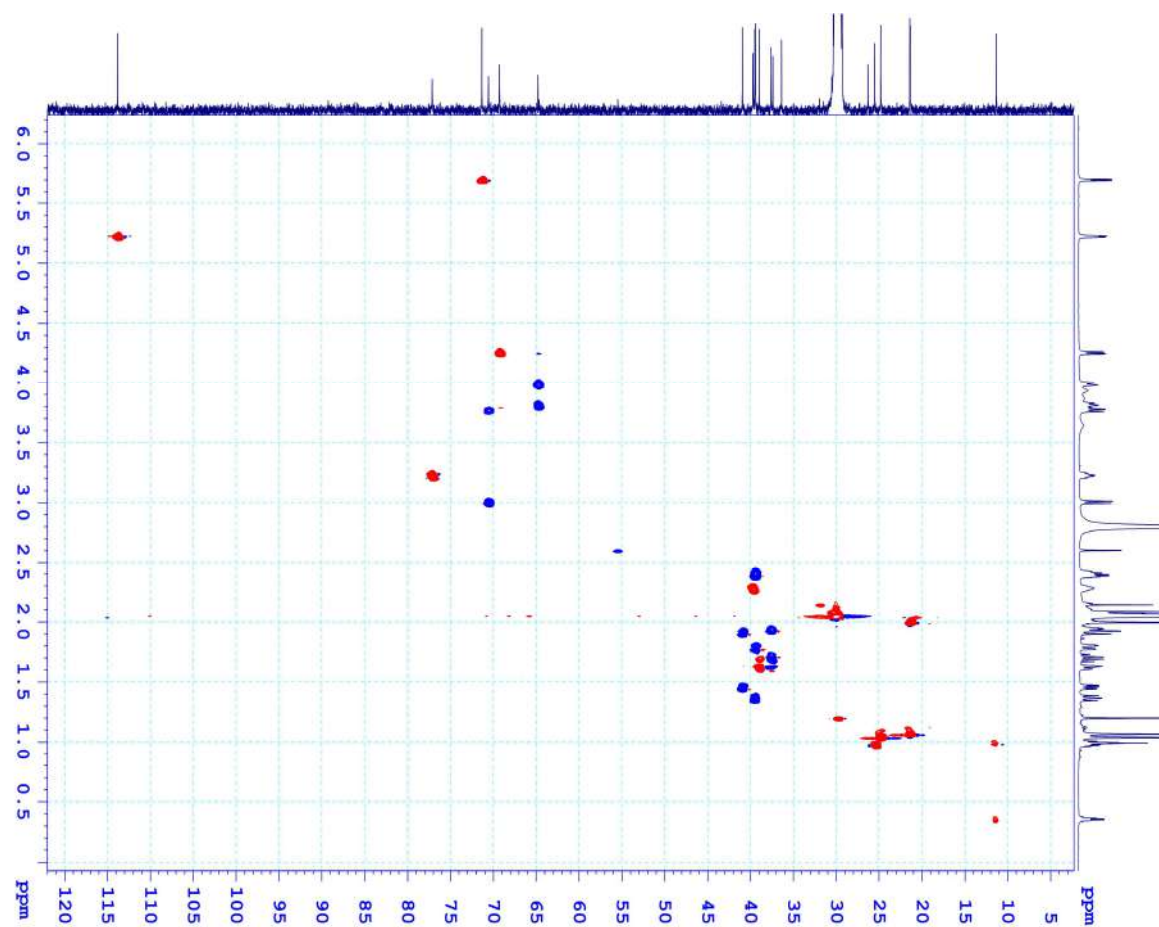
Phân tích trên phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện 2 tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_H 1,04 (3H, s, H-17) và 1,06 (3H, s, H-20), bên cạnh đó còn xuất hiện một tín hiệu singlet đặc trưng của một nhóm acetyl [δ_H 1,99 (3H, s, $-OCOCH_3$). Đặc biệt hai tín hiệu proton của nhóm methylene đặc trưng trong vòng xyclopropane cộng hưởng trên cùng trường mạnh hơn tại δ_H 0,99 và 0,35 ppm. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện hai tín hiệu nhóm oxy methine [δ_H 5,70 (1H, dd, $J = 6,0, 1,2$ Hz, H-2), 3,22 (1H, m, H-7)], hai nhóm oxy methylene [δ_H 3,99 (1H, br d, $J = 12,6$ Hz, H_a -16), δ_H 3,80 (1H, dd, $J = 12,6, 9,6$ Hz, H_b -16)] và [δ_H 3,77 (1H, br d, $J = 10,8$ Hz, H_a -18), δ_H 3,00 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H_b -18)] và một nhóm methine liên kết với brom tại δ_H 4,24 (1H, dd, $J = 8,7, 2,7$ Hz, H-15), một tín hiệu proton trong liên kết đôi tại δ_H 5,22 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11) (Hình 3.57). Những tín hiệu proton còn lại của các nhóm methine, methylene thông thường khác.



Hình 3.57. Phổ 1H -NMR của hợp chất **AOB1**



Hình 3.58. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất AOB1



Hình 3.59. Phổ HSQC của hợp chất AOB1

Bảng 3.18. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB1**

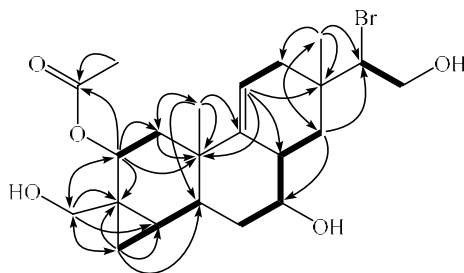
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{d,e}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	38,2	40,9	1,90 (1H, dd, 14,4, 1,2)	-
1b			1,45 (1H, dd, 14,4, 5,4)	10, 20
2	68,8	71,4	5,70 (1H, dd, 6,0, 1,2)	1, 1', 3, 10, 18, 19
3	21,6	26,3	-	-
4	24,6	25,5	0,99 (1H, $^{\#}$)	-
5	45,8	39,0	1,62 (1H, br d, 13,2)	-
6a	35,3	37,6	1,92 (1H, $^{\#}$)	-
6b			1,70 (1H, ddd, 13,2, 12,0, 10,2)	7, 8
7	76,8	77,1	3,22 (1H, ddd, 5,4, 9,6, 10,2)	-
8	39,0	39,7	2,28 (1H, m)	-
9	142,9	147,6	-	-
10	36,6	37,4	-	-
11	117,4	113,8	5,22 (1H, d, 6,0)	8, 10, 13
12a	39,0	39,4	2,40 (1H, $^{\#}$)	-
12b			1,78 (1H, dt, 17,4, 2,7)	-
13	36,6	36,4	-	-
14a	39,0	39,5	2,40 (1H, $^{\#}$)	-
14b			1,36 (1H, dd, 13,2, 10,8)	7, 12, 15, 17
15	68,6	69,3	4,24 (1H, dd, 8,7, 2,7)	16, 17
16a	64,4	64,8	3,99 (1H, br d, 12,6)	-
16b			3,80 (1H, dd, 12,6, 9,6)	-
17	24,6	24,8	1,04 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	18,3	70,6	3,77 (1H, d, 10,8)	3, 4
18b			3,00 (1H, d, 10,8)	2, 3, 4, 19
19a	68,2	11,3	0,99 (1H, $^{\#}$)	-
19b			0,35 (1H, dd, 7,8, 3,6)	3, 4, 5, 18
20	20,3	21,4	1,06 (3H, s)	1, 5, 9, 10
OAc				
1'	170,5	170,7	-	-
2'	21,8	21,4	1,99 (3H, s)	1'

* Tài liệu tham khảo chất parguerol [52]

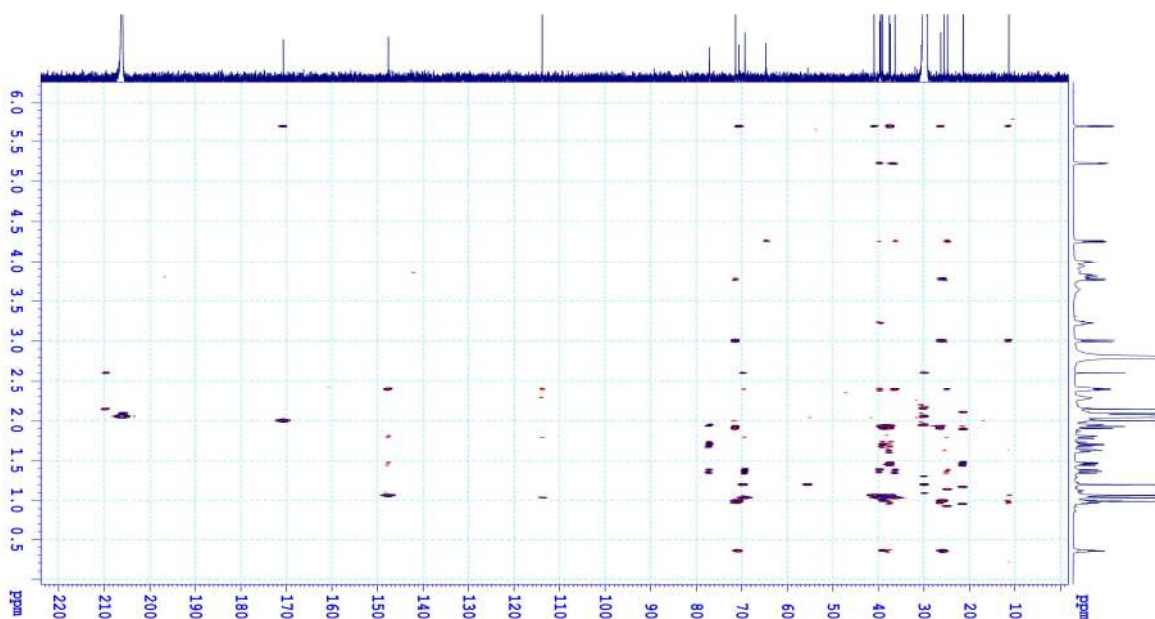
^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, [#] tín hiệu chồng chéo^d đo trong CDCl_3 , ^e 67,5 MHz

Phân tích tiếp trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy hợp chất **AOB1** chứa 22 nguyên tử carbon, trong đó có một nhóm acetyl [δ_{C} 170,7 (C-1') và 21,4 (C-2')]. Còn lại là 20 tín hiệu của khung chất chính, trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như: Hai

nhóm methyl [δ_C 24,8 (C-17) và 21,4 (C-20)], hai nhóm oxy methine [δ_C 71,4 (C-2) và 77,1 (C-7)], hai nhóm oxy methylene tại δ_C 64,8 (C-16) và δ_C 70,6 (C-18), một nhóm methine liên kết trực tiếp với halogen brom tại δ_C 69,3 (C-15), và cuối cùng là hai tín hiệu trong liên kết đôi dạng $>C=CH-$ [δ_C 147,6 (C-9)/113,8 (C-11)] (Hình 3.58 và 3.59). Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường. Với những phân tích dữ liệu bên trên cho gợi ý hợp chất là một diterpene.



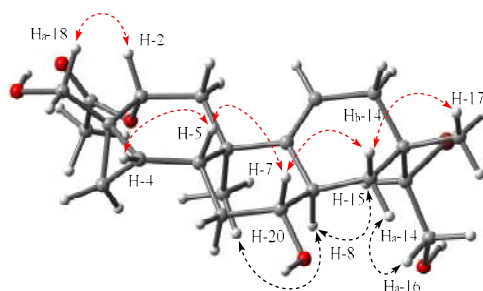
Hình 3.60. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) trên hợp chất **AOB1**



Hình 3.61. Phổ HMBC của hợp chất **AOB1**

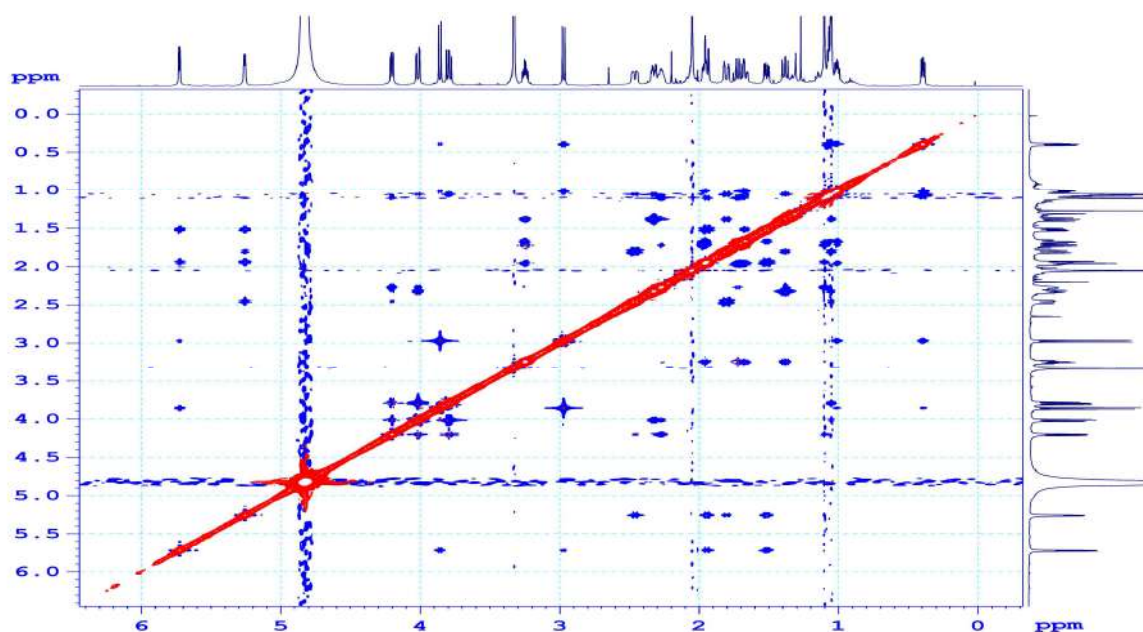
Phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-2 (δ_H 5,70) tương tác lên C-1 (δ_C 40,9), C-1' (δ_C 170,7), C-3 (δ_C 26,3), C-10 (δ_C 37,4), C-18 (δ_C 70,6), C-19 (δ_C 11,3), từ đó xác định được trên vị trí thứ 2 của khung chất diterpene có nhóm thế acetyl ($-OCOCH_3$). Tương tác giữa H_b-19 (δ_H 0,35) lên C-3 (δ_C 26,3), C-4 (δ_C 25,5), C-5 (δ_C 39,0), C-18 (δ_C 70,6) đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ 1H và ^{13}C -NMR [δ_H 0,99 (H_a-19) và 0,35 (H_b-19)/ δ_C 11,3] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác giữa H_b-18 (δ_H 3,00) lên C-2 (δ_C 71,4), C-3 (δ_C 26,3), C-4 (δ_C 25,5) cho biết nhóm

methylene hydroxy được thế tại vị trí C-3 trên khung diterpene chứ không thế tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerane (một khung chất được sắp xếp lại từ khung diterpene pimarane) [52]. Tương tác giữa H-11 (δ_H 5,22) lên C-8 (δ_C 39,7), C-10 (δ_C 37,4), C-13 (δ_C 36,4) cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Theo hình 3.60 và 3.61). Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H_b-1 (δ_H 1,45) với H-2 (δ_H 5,70), H-4 (δ_H 0,99) với H-5 (δ_H 1,62), H-4 với H_b-19, H_b-14 (δ_H 1,45) với H-8 (δ_H 2,28) với H-7 (δ_H 3,22) với H_b-6 (δ_H 1,70), H-11 (δ_H 5,22) với H_b-12 (δ_H 1,78) và H-15 (δ_H 4,24) với H_b-16 (δ_H 3,80). Từ những tương tác này xác định được một số mảnh trên phân tử của **AOB1** (Hình 3.60).



Hình 3.62. Tương tác NOESY(↔) trên hợp chất **AOB1**

Giá trị hằng số ghép lớn ($J_{H7/H6b} = 10,2$ Hz) giữa H-7 và H_b-6 cho thấy H-7 có dạng *axial* và được gán tương đối với cấu hình β như trên hình 3.62. Trên phổ NOESY xuất hiện tương tác giữa H-5 với H-7, giữa H-7 (δ_H 3,22) với H_b-14 (δ_H 1,36), H_b-14 với H₃-17 cho thấy các proton này cùng có cấu hình β . Tương tác giữa H-20 với H-8, giữa H-8 với H-15, và giữa H_a-16 với H_a-14 cho thấy H-8 và nhóm Me-20 có cấu hình α và C-15 có cấu hình R^* .



Hình 3.63. Phổ NOESY của hợp chất **AOB1** (dung môi CD₃OD)

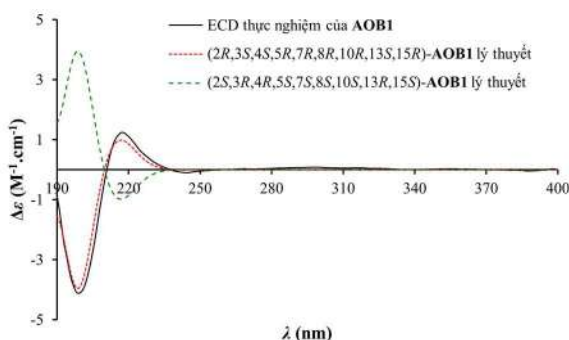
Bảng 3.19. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB1** (đo trong CD_3OD)

Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	41,22	1,95 (1H, #)	-
1b		1,51 (1H, dd, 14,7, 5,7)	10, 20
2	72,38	5,72 (1H, dd, 5,4, 1,2)	1, 1', 3, 4, 10, 19, 18
3	26,34	-	-
4	26,09	1,01 (1H, m)	18
5	39,42	1,68 (1H, m)	-
6a	37,34	1,95 (1H, #)	-
6b		1,72 (1H, #)	7, 8
7	77,65	3,24 (1H, m)	-
8	39,91	2,26 (1H, m)	-
9	147,46	-	-
10	37,72	-	-
11	114,70	5,26 (1H, d, 6,6)	8, 13
12a	39,66	2,46 (1H, dd, 17,1, 5,1)	-
12b		1,80 (1H, ddd, 17,1, 3,6, 2,1)	-
13	36,63	-	-
14a	39,66	2,32 (1H, ddd, 13,8, 6,0, 3,0)	-
14b		1,38 (1H, dd, 13,8, 10,8)	8, 12, 13
15	67,92	4,20 (1H, dd, 9,3, 2,7)	16, 17
16a	65,00	4,02 (1H, dd, 12,6, 3,0)	15
16b		3,79 (1H, dd, 12,6, 9,3)	15
17	24,72	1,05 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	71,23	3,86 (1H, d, 10,8)	3, 4, 19
18b		2,97 (1H, d, 10,8)	-
19a	11,75	1,08 (1H, #)	-
19b		0,39 (1H, dd, 9,0, 5,4)	3, 4, 5, 18
20	21,51	1,10 (3H, s)	1, 5, 9, 10
OAc			
1'	172,64	-	-
2'	21,39	2,05 (3H, s)	1'

^a đo trong CD_3OD , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, # tín hiệu chồng chéo

Để xác định cấu hình các vị trí bất đối trên vòng A, phổ NMR của **AOB1** tiếp tục được đo trong MeOD (Bảng 3.19). Kết quả cho thấy trong dung môi này đã quan sát được tương tác NOESY giữa H-5 (δ_{H} 1,68) và H-4 (δ_{H} 1,01) chứng tỏ vòng cyclopropane có định hướng α . Tiếp theo, H-2 được xác định là cấu hình β dựa trên

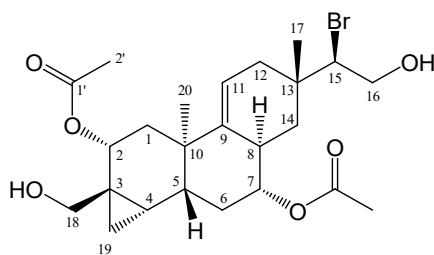
tương tác giữa H-2 (δ_H 5,72) với H_a-18 (δ_H 3,86). Cuối cùng, kết hợp phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết đã xác định được cấu hình tuyệt đối của các trung tâm bất đối trên phân tử **AOB1** là 2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,10*R*,13*S*,15*R* (Hình 3.64).



Hình 3.64. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán theo lý thuyết của hợp chất **AOB1**

Hợp chất **AOB1** là hợp chất mới, lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên, là hợp chất có khung mới, sắp xếp lại của khung diterpen parguerane. Hợp chất được đặt tên là oculiferanin A (Hình 3.55).

3.1.3.2. Hợp chất **AOB2**: oculiferanin B (chất mới)



Hình 3.65. Cấu trúc hợp chất **AOB2**

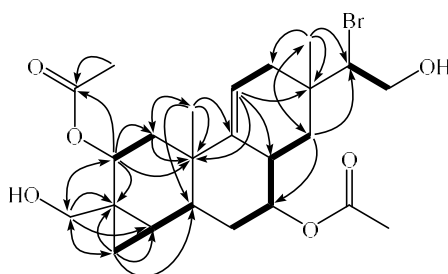
Hợp chất **AOB2** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối lượng phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 533,1326 và 535,1305 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{24}H_{35}BrO_6Cl^-$, m/z 533,1306 và 535,1285) từ đó xác định được hợp chất **AOB2** có công thức phân tử tương ứng $C_{24}H_{35}BrO_6$ (xem hình O2.1). Phân tích trên phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện 2 tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_H 1,02 (3H, s, H-17) và 1,10 (3H, s, H-20)], bên cạnh đó còn xuất hiện hai tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm acetyl [δ_H 2,00 (3H, s, 2-OCOCH₃) và δ_H 2,04 (3H, s, 7-OCOCH₃)]. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện hai tín hiệu nhóm oxymethine [δ_H 5,71 (1H, dd, $J = 5,7, 1,5$ Hz, H-2), 4,50 (1H, m, H-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_H 3,97 (1H, dd, $J = 12,0, 3,0$ Hz, H_a-16), δ_H 3,81 (1H, dd, $J = 12,0, 8,4$ Hz, H_b-16)] và [δ_H 3,78 (1H, dd, $J = 10,8, 7,8$ Hz, H_a-18), δ_H 3,00 (1H, dd, $J = 12,0, 4,2$ Hz, H_b-18)] và một nhóm methine liên kết với brom tại δ_H 4,22 (1H, dd, $J = 8,4, 3,6$ Hz, H-15), một tín hiệu proton trong liên kết đôi tại δ_H 5,32 (1H, br d, $J = 6,0$ Hz, H-11). Những tín hiệu proton còn lại của các nhóm methine, methylene thông thường khác (Bảng 3.20).

Bảng 3.20. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AOB2**

Vị trí C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	40,8	1,93 (1H, br d, 13,8)	1, 2, 10
1b		1,50 (1H, dd, 14,4, 6,0)	5, 20
2	71,2	5,71 (1H, dd, 5,7, 1,5)	2, 10, 18, 1'
3	26,4	-	-
4	25,2	1,00 (1H, #)	-
5	38,9	1,69 (1H, #)	-
6a	33,4	1,69 (1H, #)	-
6b		2,00 (1H, #)	-
7	78,7	4,50 (1H, m)	-
8	36,6	2,56 (1H, m)	-
9	146,2	-	-
10	37,4	-	-
11	115,2	5,32 (1H, br d, 6,0)	-
12a	39,2	2,41 (1H, m)	-
12b		1,83 (1H, ddd, 17,4, 2,4, 2,1)	-
13	36,3	-	-
14a	38,6	2,15 (1H, ddd, 13,8, 6,0, 3,0)	-
14b		1,33 (1H, dd, 13,8, 10,5)	-
15	68,4	4,22 (1H, dd, 8,4, 3,6)	-
16a	64,8	3,97 (1H, dd, 12,0, 3,0)	-
16b		3,81 (1H, dd, 12,0, 8,4)	-
17	24,5	1,02 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	70,5	3,78 (1H, dd, 10,8, 7,8)	-
18b		3,00 (1H, dd, 10,8, 4,2)	-
19a	11,3	1,00 (1H, #)	-
19b		0,36 (1H, q, 12,0, 7,8)	-
20	21,2	1,10 (3H, s)	1, 5, 9, 10
2-OAc			
1'	170,7	-	
2'	21,4	2,00 (3H, s)	1'
7-OAc			
1''	170,7	-	-
2''	21,1	2,04 (3H, s)	1''
16-OH	-	4,05 (1H, t, 6,0)	16
19-OH	-	3,66 (1H, dd, 7,8, 4,2)	3

^a đo trong acetone-*d*₆, ^b 150 MHz, ^c 600 MHz,

Phân tích tiếp trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy hợp chất **AOB3** chứa 24 nguyên tử carbon, trong đó có bốn tín hiệu đặc trưng của hai nhóm acetyl [δ_{C} 170,7 (C-1'), 21,4 (C-2') và 170,7 (C-1''), 21,1 (C-2'')] (Hình O2.4 và O2.5). Còn lại là 20 tín hiệu của khung chất chính, trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như: Hai nhóm methyl [δ_{C} 24,5 (C-17) và 21,2 (C-20)], hai nhóm oxymethine [δ_{C} 71,2 (C-2) và 78,7 (C-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_{C} 64,8 (C-16) và δ_{C} 70,5 (C-18)], một nhóm methine liên kết trực tiếp với halogen brom tại δ_{C} 68,4 (C-15), hai tín hiệu trong liên kết đôi dạng $>\text{C}=\text{CH}-$ [δ_{C} 146,2 (C-9)/115,2 (C-11)]. Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường (Bảng 3.20). Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene. So sánh hợp chất này với hợp chất **AOB2** cho thấy chúng chỉ khác nhau ở một vị trí tại C-7, hợp chất **AOB3** được thế bằng nhóm thế acetyl tại C-7 dựa trên phổ ^1H và ^{13}C -NMR.

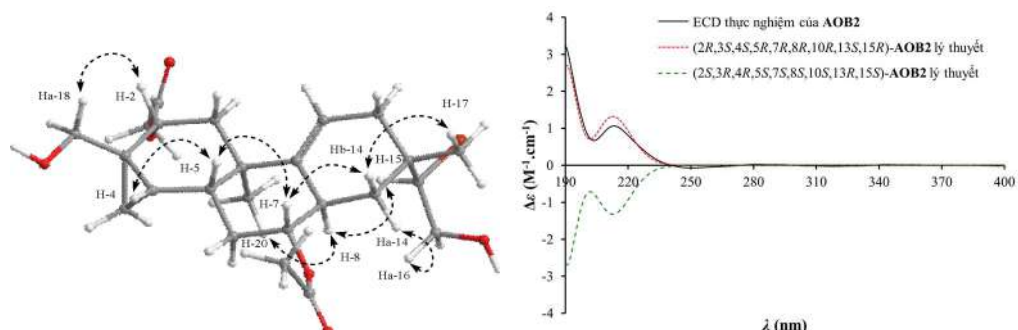


Hình 3.66. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) trên hợp chất **AOB2**

Quan sát trên phổ HMBC thấy xuất hiện tương tác: H-2 tương tác lên C-1, C-1', C-3, C-10, và C-18, từ đó xác định được trên vị trí thứ 2 của khung chất diterpene có nhóm thế $-\text{OCOCH}_3$ và cho biết nhóm methylene hydroxy được thế tại vị trí C-3 trên khung diterpene chứ không thế tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerol (một khung chất được sắp xếp lại từ khung diterpene pimarane) [52]. Tương tác giữa H_b-19 lên C-3, C-4, C-5, C-18 đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ ^1H và ^{13}C [δ_{H} 1,00 (H_a-19) và 0,36 (H_b-19)/ δ_{C} 11,3] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác HMBC giữa H-11 lên C-8, C-10, C-13 cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Hình 3.66). Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H_b-1 (δ_{H} 1,50) với H-2 (δ_{H} 5,71), H_b-19 (δ_{H} 0,36) với H-4 (δ_{H} 1,00), H-4 với H-5 (δ_{H} 1,69), H-7 (δ_{H} 4,50) với H_a-6 (δ_{H} 1,69) và H-8 (δ_{H} 2,56), H-8 với H_b-14 (δ_{H} 1,33), H-11 (δ_{H} 5,32) với H_b-12 (δ_{H} 1,83), và H-15 (δ_{H} 4,22) với H_a-16 (δ_{H} 3,97) và H_b-16 (δ_{H} 3,81). Từ những tương tác này xác định được một số mảnh trên phân tử của **AOB2** (như hình 3.66).

Hằng số ghép lớn ($J = 10,5$ Hz) giữa H_b-14 và H-8 cho thấy H_b-14 có dạng pseudo-axial và được gán tương đối cho cấu hình β (Hình 3.67). Trên phổ NOESY

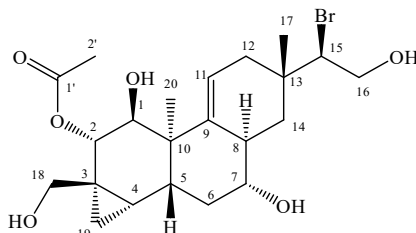
xuất hiện tương tác giữa H-5 với H-7, giữa H-7 (δ_H 4,50) với H_b-14 (δ_H 1,33), H_b-14 với H₃-17 (δ_H 1,02) cho thấy các proton này cùng có cấu hình β . Tương tác giữa H-20 với H-8, giữa H-8 với H-15, và giữa H_a-16 với H_a-14 cho thấy H-8 và nhóm Me-20 có cấu hình α và C-15 có cấu hình R^* .



Hình 3.67. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất **AOB2**

Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết đã xác định được cấu hình tuyệt đối của các trung tâm bất đối trên phân tử **AOB2** là $2R,3S,4S,5R,7R,8R,10R,13S,15R$ (Hình 3.65). Đây cũng là hợp chất có khung mới, giống với khung của hợp chất **AOB1** và được đặt tên là oculiferanin B.

3.1.3.3. Hợp chất **AOB3**: oculiferanin C (chất mới)

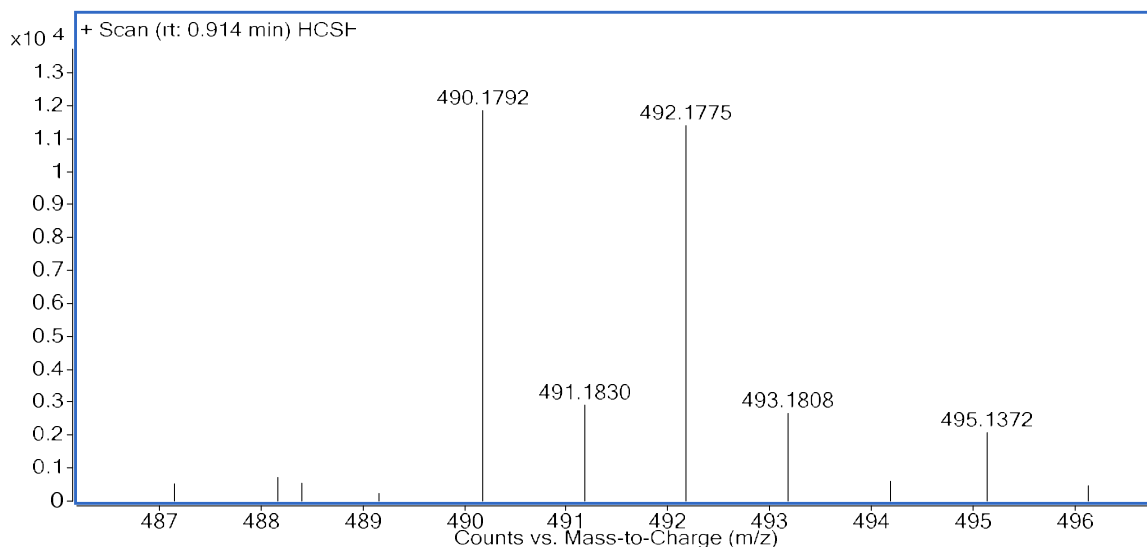


Hình 3.68. Cấu trúc hợp chất **AOB3**

Hợp chất **AOB3** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 490,1792 và 492,1775 $[M + NH_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết $C_{22}H_{37}BrO_6N^+$, m/z 490,1799 và 492,1799); m/z 507,1153 và 509,1136 $[M + Cl]^-$ (tính toán theo lý thuyết $C_{22}H_{33}BrO_6Cl^-$, m/z 507,1149 và 509,1129) từ đó xác định được hợp chất **AOB3** có công thức phân tử tương ứng $C_{22}H_{33}BrO_6$ và có độ bất bão hòa là 6 (Hình 3.69).

Phân tích trên phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện 2 tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_H 1,04 (3H, s, H-17) và 1,00 (3H, s, H-20), bên cạnh đó còn xuất hiện một tín hiệu singlet đặc trưng của một nhóm acetyl [δ_H 2,03 (3H, s, $-OCOCH_3$). Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện ba tín hiệu nhóm oxymethine [δ_H 3,81 (1H, #, H-1), 5,39 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-2), 3,29 (1H, m, H-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_H 3,97 (1H, #, H_a-16), δ_H 3,81 (1H, #, H_b-16)] và [δ_H

3,62 (1H, #, H_a-18), δ_{H} 3,18 (1H, #, H_b-18)] và một nhóm methine liên kết với brom tại δ_{H} 4,26 (1H, dd, $J = 8,7, 2,7$ Hz, H-15), một tín hiệu proton trong liên kết đôi tại δ_{H} 5,47 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11). Những tín hiệu proton còn lại của các nhóm methine, methylene thông thường khác.



Hình 3.69. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **AOB3**

Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy hợp chất **AOB3** chứa 22 nguyên tử carbon, trong đó có hai tín hiệu đặc trưng của một nhóm acetyl [δ_{C} 170,5 (C-1') và 21,2 (C-2')] (Hình O3.3 và hình O3.4). Còn lại là 20 tín hiệu của khung chất chính, trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như: Hai nhóm methyl [δ_{C} 25,1 (C-17) và 19,8 (C-20)], ba nhóm oxymethine [δ_{C} 71,3 (C-1), 75,5 (C-2) và 76,3 (C-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_{C} 64,7 (C-16) và δ_{C} 70,6 (C-18)], một nhóm methine liên kết trực tiếp với halogen brom tại δ_{C} 69,6 (C-15), và cuối cùng là hai tín hiệu trong liên kết đôi dạng $>\text{C}=\text{CH}-$ [δ_{C} 143,0 (C-9)/116,3 (C-11)]. Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường (Bảng 3.21). Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene. So sánh hợp chất này với hợp chất **AOB1** cho thấy chúng chỉ khác nhau ở một vị trí tại C-1, hợp chất **AOB3** có thêm nhóm thế -OH tại C-1 dựa trên phổ ^1H và ^{13}C -NMR [δ_{H} 3,81 (H-1)/ δ_{C} 71,3 (C-1)].

Phổ HMBC xuất hiện tương tác: H-2 tương tác lên C-1, C-1', C-3, C-4, C-10, 18, và C-19. Nhờ đặc điểm này xác định được trên vị trí thứ 2 của khung chất diterpene có nhóm thế $-\text{OCOCH}_3$ và cho biết nhóm methylene hydroxy được thế tại vị trí C-3 trên khung diterpene chứ không thế tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerol (một khung chất được sắp xếp lại từ khung diterpene pimarane) [52]. Tương tác giữa proton của nhóm 1-OH lên C-1, C-2, C-10 cho biết tại vị trí C-1 có nhóm thế hydroxy. Tương tác giữa H_b-19 lên C-2, C-3, C-4, C-5, C-18 đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ ^1H và ^{13}C

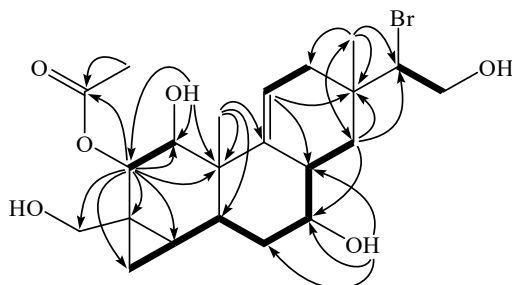
[δ_H 0,93 (H_a-19) và 0,42 (H_b-19)/ δ_C 11,1] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác giữa H-11 lên C-8, C-10, C-13 cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Hình 3.69 và hình O3.5).

Bảng 3.21. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB3**

Vị trí C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	71,3	3,81 (1H, #)	-
2	75,7	5,39 (1H, d, 2,4)	1, 1', 3, 4, 10, 18
3	24,5	-	-
4	24,5	0,98 (1H, m)	-
5	30,8	2,26 (1H, #)	-
6a	36,8	1,92 (1H, ddd, 12,6, 4,8, 2,4)	-
6b		1,68 (1H, m)	-
7	76,3	3,20 (1H, m)	-
8	39,7	2,26 (1H, #)	-
9	143,0	-	-
10	43,1	-	-
11	116,3	5,47 (1H, d, 6,0)	8, 13
12a	39,5	2,41 (1H, ddd, 17,4, 6,0, 1,8)	-
12b		1,84 (1H, ddd, 17,4, 3,6, 1,8)	-
13	36,2	-	-
14a	39,2	2,38 (1H, ddd, 13,8, 5,4, 3,6)	7, 12, 13
14b		1,34 (1H, dd, 13,8, 11,4)	7, 12, 13, 15, 17
15	69,6	4,26 (1H, dd, 8,7, 2,7)	-
16a	64,7	3,97 (1H, #)	-
16b		3,81 (1H, #)	-
17	25,1	1,04 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	70,6	3,62 (1H, #)	-
18b		3,18 (1H, #)	-
19a	11,1	0,93 (1H, t, 6,0)	2, 3, 5, 18
19b		0,42 (1H, dd, 9,0, 5,4)	2, 3, 5, 18
20	19,8	1,00 (3H, s)	1, 5, 9, 10
2-OAc			
1'	170,5	-	-
2'	21,2	2,03 (3H, s)	1'
1-OH	-	3,51 (1H, d, 4,8)	1, 2, 10
7-OH	-	3,89 (1H, d, 6,0)	6, 7, 8

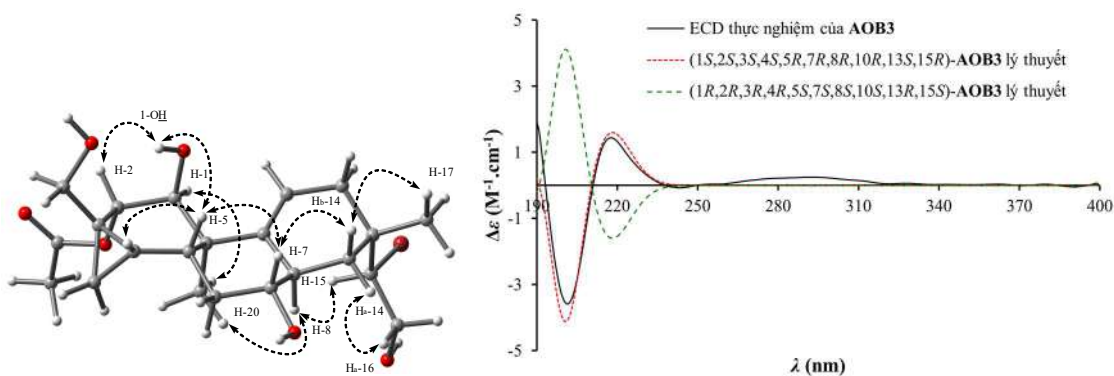
^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, # tín hiệu chồng chéo

Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-1 (δ_H 3,81) với H-2 (δ_H 5,39), H_b-14 (δ_H 1,34) với H-8 (δ_H 2,26) với H-7 (δ_H 3,20) với H_b-6 (δ_H 1,68) với H-5 (δ_H 2,26) với H_b-19 (δ_H 0,42), H-11 (δ_H 5,47) với H_b-12 (δ_H 1,84) và H-15 (δ_H 4,24) với H_b-16 (δ_H 3,80). Từ những tương tác này xác định được một số mảnh trên phân tử của **AOB3** (Hình 3.70 và hình O3.6).



Hình 3.70. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất **AOB3**

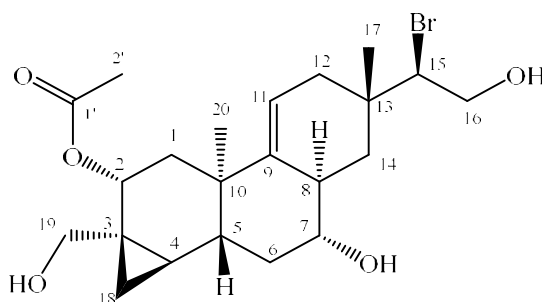
Hằng số ghép lớn ($J = 11,4$ Hz) giữa H_b-14 và H-8 cho thấy H_b-14 có dạng pseudo-axial và được gán tương đối cho cấu hình β (Hình 3.71). Phổ NOESY cho các tương tác giữa H₃-17/H_b-14, H_b-14/H-7, H-7/H-5, H-5/H-4, H-5/OH-1, OH-1/H-2 chứng tỏ H₃-17, H-7, H-5, H-4, OH-1 và H-2 có cấu hình β . Ngược lại, các tương tác NOESY giữa H-1/H₃-20, H₃-20/H-8, H-8/H-15, H_a-14/H_a-16 xác nhận cấu hình α của H₃-20, H-8 và cấu hình R^* của C-15.



Hình 3.71. Tương tác NOESY (---) và phổ ECD của hợp chất **AOB3**

Phổ ECD thực nghiệm của **AOB3** (Hình 3.71) có hiệu ứng cotton tương đồng với phổ ECD tính toán trong trường hợp các vị trí có cấu hình bất đối của **AOB3** là 2S,3S,4S,5R,7R,8R,10R,13S,15R. Đồng thời cho thấy hợp chất có cùng khung parguerane sắp xếp lại. Đây cũng là hợp chất có khung mới, giống với khung của hợp chất **AOB2**. Bên cạnh đó hợp chất này có điểm mới so với hai hợp chất **AOB1** và **AOB2** cũng như các hợp chất có khung diterpen parguerol là có thêm nhóm thế hydroxy tại vị trí C-1 [δ_H 3,81, H-1)/ δ_C 71,3 (C-1)]. Hợp chất **AOB3** được đặt tên là oculiferanin C.

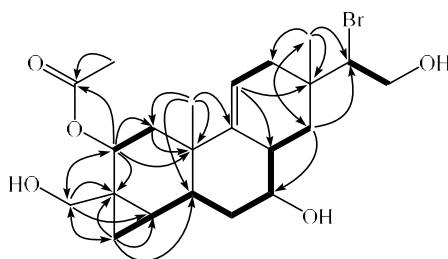
3.1.3.4. Hợp chất **AOB4**: oculiferanin D (chất mới)



Hình 3.70. Cấu trúc hợp chất **AOB4**

Hợp chất **AOB4** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 474,1834 và 476,1835 $[M+NH_4]^+$, gợi ý cho công thức ion giả phân tử ($C_{22}H_{37}BrNO_5^+$, m/z 474,1850 và 476,1829), m/z 491,1201 và 493,1181 $[M+Cl]^-$, gợi ý cho công thức ion giả phân tử ($C_{22}H_{33}BrO_5Cl^-$, m/z 491,1200 và 493,1179) (Xem hình O4.1a và O4.1b) từ đó cho gợi ý hợp chất **AOB4** có công thức phân tử tương ứng $C_{22}H_{33}BrO_5$.

Phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện 2 tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_H 1,04 (3H, s, H-17) và 1,09 (3H, s, H-20)], bên cạnh đó còn xuất hiện một tín hiệu singlet đặc trưng của một nhóm acetyl [δ_H 2,03 (3H, s, -OCOCH₃)]. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện hai tín hiệu nhóm oxymethine [δ_H 5,48 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-2), 3,13 (1H, m, H-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_H 4,00 (1H, m, H_a-16), δ_H 3,82 (1H, m, H_b-16)] và [δ_H 3,90 (1H, m, H_a-18), δ_H 3,06 (1H, m, H_b-18)] và một nhóm methine liên kết với brom tại δ_H 4,26 (1H, dd, $J = 8,7, 2,7$ Hz, H-15), một tín hiệu proton trong liên kết đôi tại δ_H 5,27 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11).



Hình 3.72. Tương tác HMBC(→) và COSY (—) trên hợp chất **AOB4**

Phân tích tiếp trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy hợp chất **AOB4** chứa 22 nguyên tử carbon (Bảng 3.22), trong đó có một nhóm acetyl [δ_C 170,5 (C-1') và 21,3 (C-2')]. Còn lại là 20 tín hiệu của khung chất chính, trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như: Hai nhóm methyl [δ_C 24,9 (C-17) và 20,0 (C-20)], hai nhóm oxymethine [δ_C 69,6 (C-2) và 76,7 (C-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_C 64,8 (C-16) và δ_C 66,9 (C-18)], một nhóm methine liên kết trực tiếp với halogen brom tại δ_C 69,3 (C-15), và

cuối cùng là hai tín hiệu trong liên kết đôi dạng $>C=CH-$ [δ_C 144,8 (C-9)/116,9 (C-11)]. Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene.

Bảng 3.22. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB4**

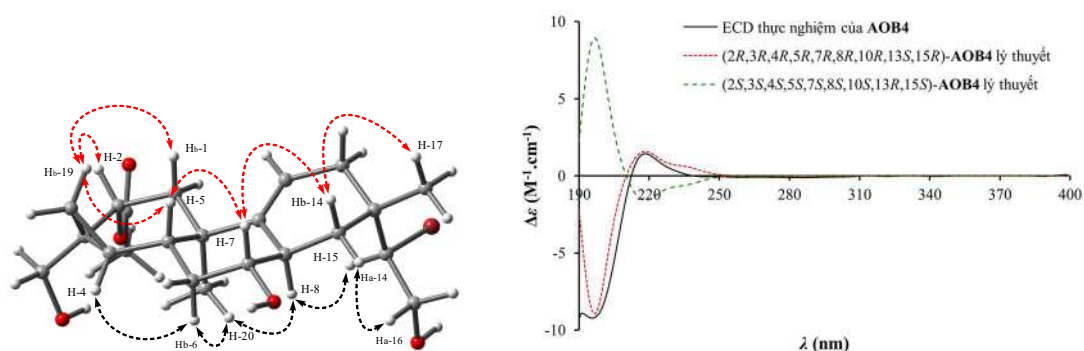
Vị trí C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1a	38,8	1,85 (1H, dd, 15,0, 1,2)	2, 3, 5, 10
1b		1,30 (1H, #)	-
2	69,6	5,48 (1H, d, 4,2)	1', 3, 4, 10, 19
3	24,4	-	-
4	20,7	0,62 (1H, m)	3, 18, 18
5	44,7	1,05 (1H, #)	-
6a	39,0	1,94 (1H, m)	4, 5, 8, 10
6b		1,67 (1H, ddd, 13,2, 13,2, 11,4)	5, 7
7	76,7	3,13 (1H, m)	6
8	39,3	2,32 (1H, m)	-
9	144,8	-	-
10	37,6	-	-
11	116,9	5,27 (1H, d, 6,0)	8, 13
12a	39,8	2,40 (1H, #)	-
12b		1,79 (1H, ddd, 17,4, 3,6, 2,4)	11
13	36,2	-	-
14a	39,4	2,40 (1H, #)	-
14b		1,33 (1H, #)	-
15	69,3	4,26 (1H, dd, 8,7, 2,7)	13, 16, 17
16a	64,8	4,00 (1H, m)	-
16b		3,82 (1H, m)	15
17	24,9	1,04 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	66,9	3,90 (1H, m)	3, 18
18b		3,06 (1H, m)	2, 4, 18
19a	18,8	0,92 (1H, dd, 8,7, 4,5)	2, 3, 4, 5, 18
19b		0,12 (1H, br t, 4,5)	2, 3, 4, 5, 18
20	20,0	1,09 (3H, s)	1, 5, 9, 10
2-OAc			
1'	170,5	-	-
2'	21,3	2,03 (3H, s)	1'

^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, # tín hiệu chồng chéo

Phổ HMBC xuất hiện một số tương tác chính: H-2 tương tác lên C-1, C-1', C-3, C-10, C-18, và C-19, từ đó xác định được trên vị trí thứ 2 của khung chất diterpene

có nhóm thế $-\text{OCOCH}_3$. Tương tác giữa $\text{H}_\text{b}-19$ lên C-3, C-4, C-5, C-18 đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ ^1H và ^{13}C -NMR [δ_H 0,92 ($\text{H}_\text{a}-19$) và 0,12 ($\text{H}_\text{b}-19$)/ δ_C 18,8] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác giữa $\text{H}_\text{b}-18$ lên C-2, C-3, C-4 cho biết nhóm methylene hydroxy được thế tại vị trí C-3 trên khung diterpene chứ không thế tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerane (một khung chất được sắp xếp lại từ khung diterpene pimarane) [52]. Tương tác giữa H-11 lên C-8, C-10, C-13 cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Hình 04.5). Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: $\text{H}_\text{a}-1$ (δ_H 1,85) với H-2 (δ_H 5,48), H-4 (δ_H 0,62) với H-5 (δ_H 1,05), H-4 với $\text{H}_\text{a}-19$ (δ_H 0,92), H-5 với $\text{H}_\text{b}-6$ (δ_H 1,67), $\text{H}_\text{b}-6$ với H-7 (δ_H 3,12), H-7 với H-8 (δ_H 2,32), H-8 với $\text{H}_\text{b}-14$ (δ_H 1,33), H-11 (δ_H 5,27) với $\text{H}_\text{b}-12$ (δ_H 1,79) và H-15 (δ_H 4,24) với $\text{H}_\text{b}-16$ (δ_H 3,82). Từ những tương tác này xác định được một số mảnh trên phân tử của **AOB4** như (Hình 04.6)

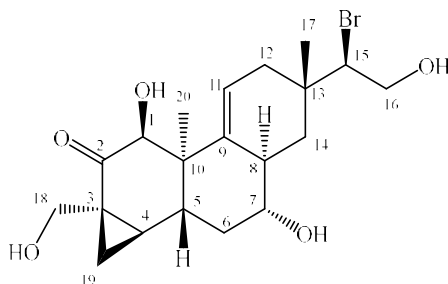
Giá trị hằng số ghép cặp lớn của $\text{H}_\text{b}-6$ với các proton lân cận cho thấy $\text{H}_\text{b}-6$ có định hướng axial và được gán tương đối với cấu hình α như trong hình 3.74. Các tương tác NOESY giữa $\text{H}_\text{b}-6/\text{H}_3-20$, $\text{H}_3-20/\text{H}-8$, $\text{H}_3-20/\text{H}-1\text{a}$, H-8/H-15, $\text{H}_\text{a}-14/\text{H}_\text{a}-16$ cho thấy H_3-20 , H-8, $\text{H}_\text{a}-1$ có cấu hình α và C-15 có cấu hình R^* . Các tương tác NOESY giữa $\text{H}_\text{b}-6/\text{H}-4$ và giữa H-5/ $\text{H}_\text{b}-19$, $\text{H}_\text{b}-19/\text{H}-1\text{b}$, $\text{H}_\text{b}-19/\text{H}-2$, H-5/H-7, H-7/ $\text{H}_\text{b}-14$, $\text{H}_\text{b}-14/\text{H}_3-17$ chứng tỏ H-2, H-5, H-7, $\text{H}_\text{b}-14$, H_3-17 và vòng cyclopropane có cấu hình β . Cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của chất mới **AOB4** được xác định là $2R,3R,4R,5R,7R,8R,10R,13S,15R$ bằng phương pháp phổ ECD thực nghiệm kết hợp với tính toán lý thuyết (Hình 3.73).



Hình 3.73. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất **AOB4**

Hợp chất **AOB4** là hợp chất mới, lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên, là hợp chất có khung mới, sắp xếp lại của khung diterpen parguerane. Hợp chất được đặt tên là oculiferanin D.

3.1.3.5. Hợp chất **AOB5**: oculiferanin E (chất mới)



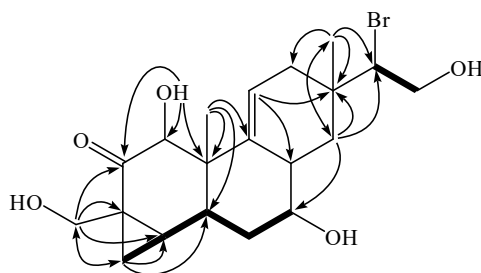
Hình 3.74. Cấu trúc hợp chất **AOB5**

Hợp chất **AOB5** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 446,1541 và 448,1514 $[M+NH_4]^+$, gợi ý cho công thức giả phân tử ($C_{20}H_{33}BrNO_5^+$, m/z 446,1537 và 448,1516), từ đó xác định được hợp chất **AOB5** có công thức phân tử tương ứng $C_{20}H_{29}BrO_5$ (Hình O5.1). Phân tích trên phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện 2 tín hiệu singlet đặc trưng của hai nhóm methyl [δ_H 1,04 (3H, s, H-17) và 0,92 (3H, s, H-20)]. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện hai tín hiệu nhóm oxymethine [δ_H 3,89 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-1), 3,20 (1H, m, H-7)], hai oxymethylene [δ_H 3,98 (1H, #, H_a-16), δ_H 3,91 (1H, m, H_b-16)] và [δ_H 3,98 (1H, #, H_a-18), δ_H 3,26 (1H, dd, $J = 11,7, 5,7$ Hz, H_b-18)] và một nhóm methine liên kết với brom tại δ_H 4,27 (1H, dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, H-15), một tín hiệu proton trong liên kết đôi tại δ_H 5,45 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11).

Phân tích tiếp trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy hợp chất **AOB5** chứa 20 nguyên tử carbon, trong đó có một nhóm ketone δ_C 170,5 (C-2), hai nhóm methyl [δ_C 25,1 (C-17) và 17,6 (C-20)], hai nhóm oxy methine [δ_C 79,3 (C-1) và 76,0 (C-7)], hai nhóm oxy methylene [δ_C 64,7 (C-16), δ_C 65,0 (C-18)], một nhóm methine liên kết trực tiếp với halogen brom tại δ_C 69,3 (C-15), hai tín hiệu trong liên kết đôi dạng $>C=CH-$ [δ_C 140,0 (C-9)/118,4 (C-11)]. Ngoài ra xuất hiện ba tín hiệu của vòng xiclopropane [δ_C 34,1 (C-3), 27,4 (C-4) và 23,4 (C-19)]; các tín hiệu của các nhóm methylene tại δ_C 37,8 (C-6), 39,7 (C-12), và 38,9 (C-14); hai tín hiệu nhóm methine tại δ_C 35,2 (C-5), 39,0 (C-8) và hai tín hiệu carbon bậc 4 tại δ_C 47,7 (C-10), 36,2 (C-8) (Bảng 3.23). Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene.

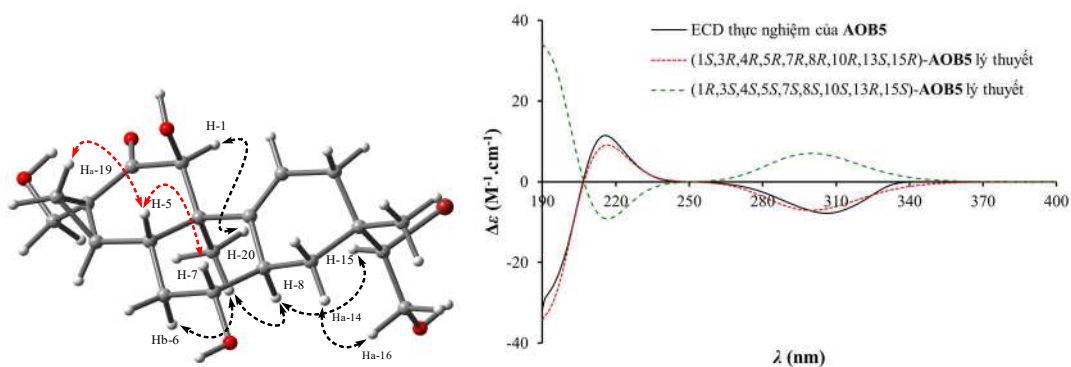
Xét trên phổ HMBC cho thấy xuất hiện một số tương tác chính: Proton 1-OH tương tác lên C-1, C-2, từ đó xác định được trên vị trí thứ 1 của khung chất diterpene có nhóm thế -OH và vị trí C-2 là một nhóm ketone. Tương tác giữa proton H_a-19 lên C-4, C-5, C-18 đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ 1H và ^{13}C [δ_H 1,63 (H_a-19) và 1,19 (H_b-19)/ δ_C 23,8] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác giữa H_b-18 lên C-2, C-3, C-4 cho biết nhóm methylene hydroxy được thế tại vị trí C-

3 trên khung diterpene chứ không thể tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerane (một khung chất được sắp xếp lại từ khung diterpene pimarane) [52]. Tương tác giữa H-11 lên C-8, C-10, C-13 cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Hình O5.5). Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: proton H-4 (δ_H 1,19) tương tác với H-5 (δ_H 2,16), H-4 với H_a-19 (δ_H 1,63), H-5 với H_b-6 (δ_H 1,73), H_b-6 với H-7 (δ_H 3,20), và H-15 (δ_H 4,27) với H_b-16 (δ_H 3,81). Từ những tương tác này xác định được một số mảnh trên phân tử của **AOB5** như hình O5.6).



Hình 3.75. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY (—) trên hợp chất **AOB5**

Với giá trị hằng số ghép cặp lớn, H_b-6 có định hướng axial và được gán tương đối với cấu hình α như trên hình 3.76. Phổ NOESY cho các tương tác giữa H_b-6/H₃-20, H₃-20/H-8, H₃-20/H-1, H-8/H-15, H_a-14/H_a-16 chứng tỏ H-1, H₃-20, H-8 có cấu hình α , C-13 và C-15 có cấu hình tương ứng là R^* và S^* . Tương tác giữa H-5/H_a-18, H-5/H-7 cho phép khẳng định cấu hình β của H-5, H-7 và vòng cyclopropane. Cuối cùng, kết hợp phổ ECD và tính toán lý thuyết xác định được cấu hình tuyệt đối của các trung tâm bất đối trên phân tử là 1*S*,3*R*,4*R*,5*R*,7*R*,8*R*,10*R*,13*S*,15*R* (Hình 3.76).



Hình 3.76. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất **AOB5**

Hợp chất **AOB5** là hợp chất mới, lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên, là hợp chất có khung mới, sắp xếp lại của khung diterpene parguerane. Hợp chất được đặt tên là oculiferanin E. **AOB5** là một chất mới, lần đầu tiên được phân lập và công bố. Cả năm hợp chất AOB phân tích trên đầu là các hợp chất có khung được sắp xếp lại và cũng lần đầu lớp chất diterpene phân lập được từ sên biển *A. oculifera*.

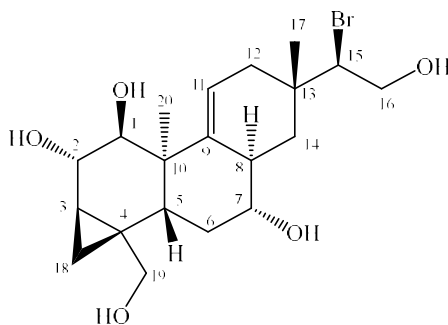
Bảng 3.23. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB5**

Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	79,3	3,89 (1H, d, 4,2)	2, 3, 5, 10
2	207,9	-	-
3	34,1	-	-
4	27,4	1,19 (1H, #)	-
5	35,2	2,16 (1H, #)	-
6a	37,8	2,11 (1H, m)	-
6b		1,73 (1H, ddd, 12,6, 12,6, 12,0)	5, 7
7	76,0	3,20 (1H, m)	14
8	39,0	2,22 (1H, m)	-
9	140,0	-	-
10	47,4	-	-
11	118,4	5,45 (1H, d, 6,0)	8, 10, 13
12a	39,7	2,42 (1H, #)	-
12b		1,84 (1H, ddd, 18,0, 3,6, 2,4)	15
13	36,2	-	-
14a	38,9	2,42 (1H, #)	-
14b		1,36 1H, dd, 13,8, 11,4)	7, 8, 12, 13, 15, 17
15	69,3	4,27 (1H, dd, 9,0, 2,4)	13, 15, 17
16a	64,7	3,98 (1H, #)	-
16b		3,81 (1H, m)	-
17	25,1	1,05 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	65,0	3,98 (1H, #)	-
18b		3,26 (1H, dd, 11,7, 5,7)	2, 3, 4
19a	23,4	1,63 (1H, dd, 5,1, 3,3)	4, 5, 18
19b		1,19 (1H, #)	-
20	17,6	0,92 (3H, s)	1, 5, 9, 10
1-OH	-	4,61 (1H, d, 4,2)	1, 2, 10

^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, # tín hiệu chồng chéo

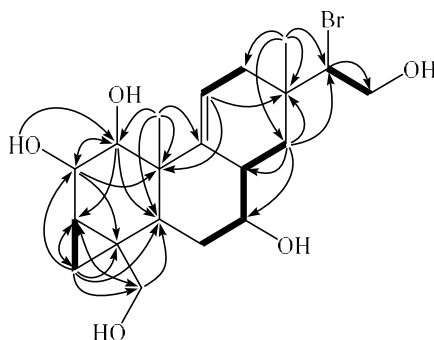
3.1.3.6. Hợp chất **AOB6**: oculiferanin F (chất mới)

Hợp chất **AOB6** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối lượng phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 448,1687 và 450,1653 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{BrO}_5\text{N}^+$, 448,1693 và 450,1673); tại m/z 465,1038 và 467,1016 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (tính toán theo lý thuyết $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_5\text{Cl}^-$, 465,1043 và 467,1023) từ đó xác định được hợp chất **AOB6** có công thức phân tử tương ứng $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_5$.



Hình 3.77. Cấu trúc của hợp chất **AOB6**

Phân tích trên phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ HSQC trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện nhóm methyl [δ_{H} 1,04 (3H, s, H-17)/ δ_{H} 25,1 (C-17) và 1,15 (3H, s, H-20)/20,1 (C-20)]. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện ba tín hiệu nhóm oxymethine [δ_{H} 3,81 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-1)/ δ_{C} 75,7 (C-1); 4,13 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-2)/71,1 (C-2); 3,08 (1H, m, H-7)/76,2 (C-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_{H} 4,01 (1H, #, H_a-16), δ_{H} 3,80 (1H, #, H_b-16)/ δ_{C} 64,7 (C-16)] và [δ_{H} 3,48 (1H, dd, $J = 10,8, 5,4$ Hz, H_a-19), δ_{H} 3,37 (1H, dd, $J = 10,8, 4,8$ Hz, H_b-19)/ δ_{C} 68,3 (C-19)] và một nhóm methine liên kết với brom [δ_{H} 4,31 (1H, dd, $J = 10,8, 3,0$ Hz, H-15)/ δ_{C} 69,6 (C-15)], một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_{H} 5,49 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11)/ δ_{C} 118,3 (C-11)]. Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường (Bảng 3.24). Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene. So sánh hợp chất này với hợp chất deacetypargurol cho thấy chúng chỉ khác nhau ở một vị trí tại C-1, hợp chất **AOB6** có thêm nhóm thế -OH tại C-1 dựa trên phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ [δ_{H} 3,81 (H-1)/ δ_{C} 75,7 (C-1)].



Hình 3.78. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) trên hợp chất **AOB6**

Phổ HMBC xuất hiện tương tác: H-17 (δ_{H} 1,04) tương tác lên C-12, C-13, C-14, C-15; H-20 (δ_{H} 1,15) tương tác lên C-1, C-5, C-9, và C-10, dựa vào tương tác này mà xác định được vị trí hai nhóm methyl tại C-10 và C-13 trong cấu trúc phân tử và cũng xác định được có nhóm -OH thế tại vị trí C-1 và vị trí C-15 có thể nguyên tử brom. Hai proton H_a-19 (δ_{H} 3,48) và H_b-19 (δ_{H} 3,37) cùng tương tác lên C-3 và C-5, điều này cho biết có nhóm oxymethylene thế tại vị trí C-4 như khung chất diterpen parguerol. Tương tác giữa proton của nhóm 2-OH lên C-1 cho biết tại vị trí C-2 có

chứa nhóm thế hydroxy. Tương tác giữa H_b-18 lên C-2, C-3, C-4, C-5, và C-19 đồng thời độ chuyển dịch của nhóm methylene này ở vùng trường khá mạnh cả trên phổ ¹H và ¹³C [δ_{H} 0,69 (H_a-18) và 0,34 (H_b-18)/ δ_{C} 17,7] cho thấy được nhóm methylene này tạo vòng ba với hai vị trí C-3 và C-4 trên khung chất. Tương tác giữa H-11 lên C-10 và C-13 cho biết liên kết đôi tại vị trí C-9/C-11 (Hình 3.78).

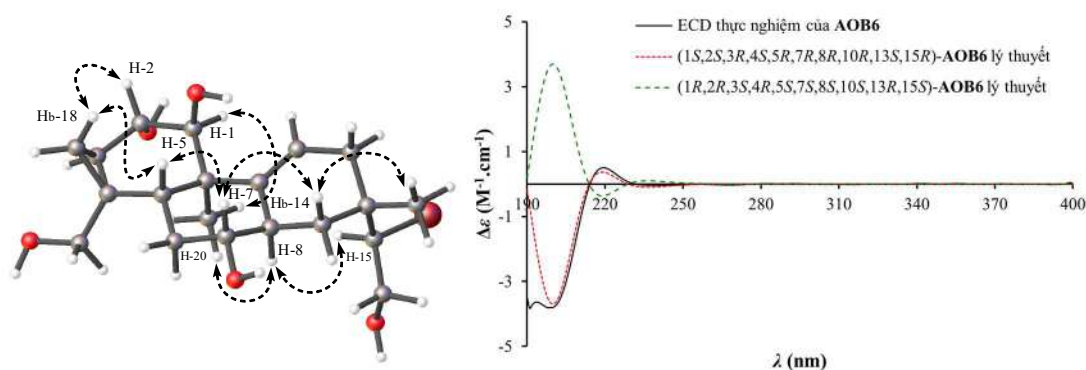
Bảng 3.24. Số liệu phổ ¹H, ¹³C-NMR của hợp chất **AOB6**

Vị trí C	[*] $\delta_{\text{C}}^{\text{d,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (H→C)
1	40,5	75,7	3,81 (1H, d, 4,8)	2, 3, 5
2	64,0	71,1	4,13 (1H, d, 2,4)	1, 4, 10
3	23,3	23,4	0,98 (1H, dd, 10,2, 6,3)	1, 18, 19
4	23,2	24,8	-	-
5	45,9	37,9	1,94 (1H, [#])	-
6a	33,1	33,8	2,34 (1H, [#])	-
6b			1,92 (1H, [#])	-
7	75,4	76,2	3,08 (1H, m)	-
8	37,7	39,5	2,23 (1H, m)	-
9	145,0	142,5	-	-
10	36,5	43,9	-	-
11	115,2	118,3	5,49 (1H, d, 6,0)	10, 13
12a	38,9	40,0	2,44 (1H, ddd, 16,8, 6,0, 1,8)	-
12b			1,86 (1H, ddd, 16,8, 3,9, 2,1)	9, 11
13	34,9	36,0	-	-
14a	37,9	38,6	2,38 (1H, [#])	-
14b			1,32 (1H, dd, 13,8, 11,4)	7, 8, 13, 15
15	69,0	69,6	4,31 (1H, dd, 10,8, 3,0)	13, 16, 17
16a	62,9	64,7	4,01 (1H, [#])	-
16b			3,80 (1H, [#])	-
17	24,2	25,1	1,04 (3H, s)	12, 13, 14, 15
18a	17,4	17,7	0,69 (1H, dd, 10,2, 3,6)	2, 3, 4, 5, 19
18b			0,34 (1H, dd, 6,3, 3,6)	2, 3, 4, 5, 19
19a	65,9	68,3	3,48 (1H, dd, 10,8, 5,4)	3, 5
19b			3,37 (1H, dd, 10,8, 4,8)	4, 5
20	20,6	20,1	1,15 (3H, s)	1, 5, 9, 10
2-OH			3,90 (1H, d, 3,0)	1

^{*} tài liệu tham khảo chất deacetylpargurol [138]

^a đo trong acetone-*d*₆, ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, [#] tín hiệu chồng chéo, ^d đo trong DMSO-*d*₆

Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-3 (δ_H 0,98) tương tác với H_a-18 (δ_H 0,69) và H_b-18 (δ_H 0,34); H-7 (δ_H 3,08) với H_b-6 (δ_H 1,98) với H-8 (δ_H 2,23); H-8 với H_b-14 (δ_H 1,32); H-11 (δ_H 5,49) với H_a-12 (δ_H 2,44) và H-15 (δ_H 4,31) với H_b-16 (δ_H 3,80). Từ những tương tác này gợi ý xác định được một số mảnh phân tử trên cấu trúc của hợp chất **AOB6** (Hình 3.77).

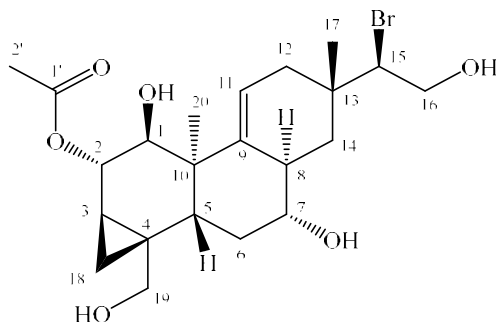


Hình 3.79. Tương tác NOESY (←.....→) và phổ ECD của hợp chất **AOB6**

Hằng số ghép lớn ($J = 11,4$ Hz) giữa H_b-14 và H-8 cho thấy H_b-14 có dạng pseudo-axial và được gán tương đối cho cấu hình β (Hình 3.80). Phổ NOESY cho các tương tác giữa H₃-17 (δ_H 1,04)/H_b-14 (δ_H 1,32), H_b-14/H-7 (δ_H 3,08), H-7/H₅ (δ_H 1,94), H-5/H_b-18 (δ_H 0,34), H_b-18/H-2 (δ_H 4,13) chứng tỏ H₃-17, H_b-14, H-7, H-5, và H-2 có cấu hình β . Ngược lại, các tương tác NOESY giữa H-1 (δ_H 3,81)/H₃-20 (δ_H 1,15), H₃-20/H-8 (δ_H 2,23), H-8/H-15 (δ_H 4,31) xác nhận cấu hình α của H₃-20, H-8, H-1 và cấu hình R^* của C-15. Bên cạnh đó khi so sánh phổ ECD giữa thực nghiệm so với tính toán lý thuyết cho thấy hợp chất **AOB6** được xác định được cấu hình tuyệt đối của các trung tâm bất đối là 2R,3S,4S,5R,7R,8R,10R,13S,15R do có hiệu ứng cotton tương đồng nhau (Hình 3.79).

Với những phân tích dữ liệu phổ như trên cho thấy hợp chất **AOB6** có khung parguerane và cấu trúc gần giống với hợp chất deacetylpargurol, chỉ khác ở vị trí C-1 có thêm nhóm thế -OH. Đây cũng là tính mới của hợp chất và cũng là lần đầu tiên phân lập được hợp chất có nhóm thế -OH tại vị trí C-1. Hợp chất **AOB6** được đặt tên là oculiferanin F.

3.1.3.7. Hợp chất **AOB7**: oculiferanin G (chất mới)



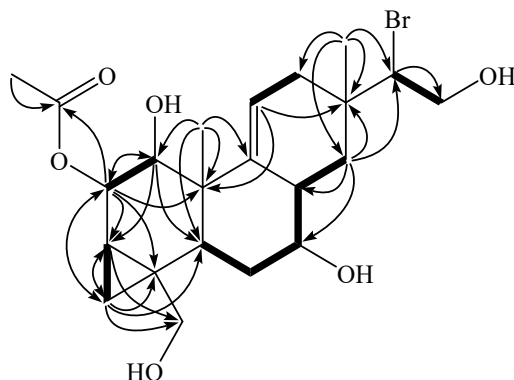
Hình 3.80. Cấu trúc hợp chất **AOB7**

Hợp chất **AOB7** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình không màu. Phổ khối phân giải cao xuất hiện tín hiệu tại m/z 490,1792 và 492,1783 $[M+NH_4]^+$ (tính toán theo lý thuyết $C_{22}H_{37}BrO_6N^+$, 490,1799 và 492,1798); tại m/z 507,1140 và 509,1123 $[M+Cl]^-$ (tính toán theo lý thuyết $C_{22}H_{33}BrO_6Cl^-$, 507,1153 và 509,1136) từ đó xác định được hợp chất **AOB7** có công thức phân tử tương ứng $C_{22}H_{33}BrO_6$.

Phân tích trên phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và phổ HSQC trên vùng trường mạnh thấy xuất hiện hai nhóm methyl [δ_H 1,04 (3H, s, H-17)/ δ_C 25,1 (C-17) và 1,12 (3H, s, H-20)/21,4 (C-20)]. Dịch về phía vùng trường trung bình xuất hiện ba tín hiệu nhóm oxymethine [δ_H 3,81 (1H, br s, H-1)/ δ_C 72,9 (C-1); 5,15 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-2)/73,1 (C-2); 3,10 (1H, m, H-7)/76,1 (C-7)], hai nhóm oxymethylene [δ_H 4,03 (1H, #, H_a-16), δ_H 3,82 (1H, #, H_b-16)/ δ_C 64,7 (C-16)] và [δ_H 3,55 (1H, #, H_a-19), δ_H 3,34 (1H, dd, $J = 12,6, 7,2$ Hz, H_b-19)/ δ_C 67,4 (C-19)] và một nhóm methine liên kết với brom [δ_H 4,29 (1H, dd, $J = 8,7, 2,7$ Hz, H-15)/ δ_C 69,5 (C-15)], một nhóm methine trong liên kết đôi [δ_H 5,46 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-11)/ δ_C 118,9 (C-11)]. Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường (Bảng 3.25). Với những phân tích bên trên xác định được hợp chất là một diterpene. So sánh hợp chất này với hợp chất deacetypargurol cho thấy chúng chỉ khác nhau ở một vị trí tại C-1, hợp chất **AOB7** có thêm nhóm thế -OH tại C-1 dựa trên phổ 1H và ^{13}C -NMR [δ_H 3,81 (H-1)/ δ_C 75,7 (C-1)] [138]; so sánh với hợp chất **AOB6** thì hợp chất này chỉ khác ở chỗ là có thêm nhóm thế acetyl tại vị trí C-2 [δ_H 2,02 (1H, s, H-2')/ δ_C 21,4 (C-2') và δ_C 170,2 (C-1')]. Điều này cũng dựa trên tương tác phổ HMBC giữa H-2 (δ_H 5,15) với C-1' (δ_C 170,2).

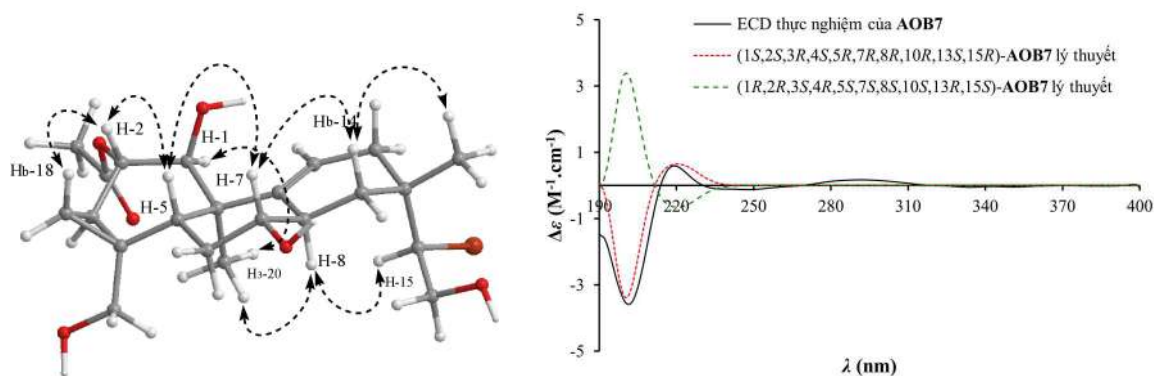
Phổ HMBC xuất hiện tương tác như hình 3.82 cho thấy hợp chất này có khung chất giống như khung chất hợp chất **AOB6** là một diterpen parguerol. Phổ COSY xuất hiện một số tương tác chính: H-1 (δ_H 3,80) tương tác với H-2 (δ_H 5,15); H-3 (δ_H 0,96) tương tác với H_a-18 (δ_H 0,76) và H_b-18 (δ_H 0,45); H-5 (δ_H 2,01) với H_b-6 (δ_H 1,92); H-7 (δ_H 3,10) với H_a-6 (δ_H 2,36) với H-8 (δ_H 2,24); H-8 với H_b-14 (δ_H 1,33);

H-11 (δ_H 5,46) với H_a-12 (δ_H 2,43) và H-15 (δ_H 4,29) với H_b-16 (δ_H 3,82). Từ những tương tác này gợi ý xác định được một số mảnh phân tử trên cấu trúc của hợp chất **AOB7** (Hình 3.81).



Hình 3.81. Tương tác HMBC ($\rightarrow$) và COSY ($\longrightarrow$) trên hợp chất **AOB7**

Hằng số ghép lớn ($J = 11,4$ Hz) giữa H_b-14 và H-8 cho thấy H_b-14 có dạng pseudo-axial và được gán tương đối cho cấu hình β (Hình 3.82). Phổ NOESY cho các tương tác giữa H₃-17 (δ_H 1,04)/H_b-14 (δ_H 1,33), H_b-14/H-7 (δ_H 3,10), H-7/H-5 (δ_H 2,01), H-5/H_b-18 (δ_H 0,45), H_b-18/H-2 (δ_H 5,15) chứng tỏ H₃-17, H_b-14, H-7, H-5, và H-2 có cấu hình β . Ngược lại, các tương tác NOESY giữa H-1 (δ_H 3,80)/H₃-20 (δ_H 1,12), H₃-20/H-8 (δ_H 2,24), H-8/H-15 (δ_H 4,29) xác nhận cấu hình α của H₃-20, H-8, H-1 và cấu hình R^* của C-15.



Hình 3.82. Tương tác NOESY ($\longleftrightarrow$) và phổ ECD của hợp chất **AOB7**

Với những phân tích dữ liệu phổ như trên cho thấy hợp chất **AOB7** có khung parguerane và cấu trúc gần giống với hợp chất deacetylpargurol, chỉ khác ở vị trí C-1 có thêm nhóm thế -OH. Đây cũng là tính mới của hợp chất và cũng là lần đầu tiên phân lập được hợp chất có nhóm thế -OH tại vị trí C-1. Bên cạnh đó khi so sánh với hợp chất **AOB6** cho thấy chúng khá giống nhau, chỉ khác nhau là hợp chất **AOB7** tại vị trí C-2 được thay nhóm thế hydroxy bằng nhóm acetyl. Hợp chất **AOB7** được đặt tên là oculiferanin G.

Bảng 3.25. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **AOB7**

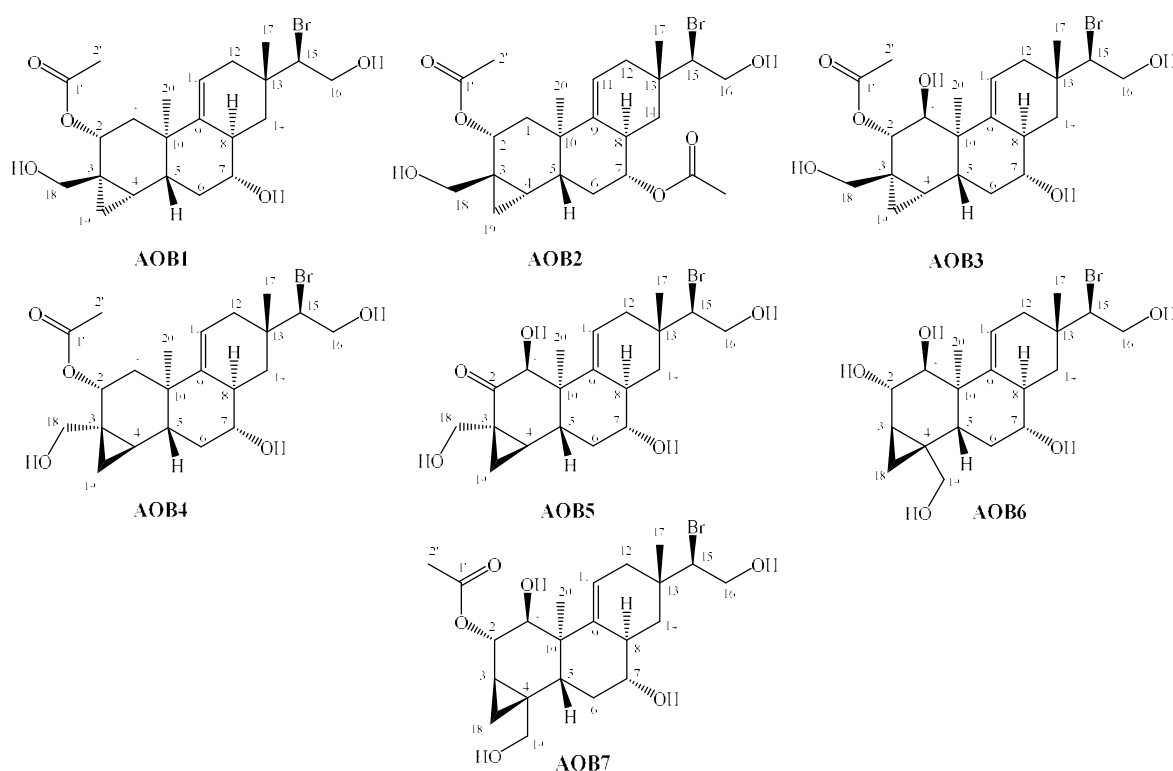
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	40,5	72,9	3,80 (1H, br s)	2, 3, 5
2	64,0	73,1	5,15 (1H, d, 1,2)	1, 3, 4, 10, 1'
3	23,3	20,2	0,96 (1H, ddd, 10,2, 6,0, 0,6)	1, 18, 19
4	23,2	24,5	-	-
5	45,9	37,5	2,01 (1H, m)	3
6a	33,1	33,6	2,36 (1H, br ddd, 12,6, 12,0, 12, 0)	-
6b			1,92 (1H, m)	6
7	75,4	76,1	3,10 (1H, m)	14
8	37,7	39,5	2,24 (1H, m)	-
9	145,0	141,5	-	-
10	36,5	43,5	-	-
11	115,2	118,9	5,46 (1H, m)	10, 13
12a	38,9	39,8	2,43 (1H, ddd, 17,4, 6,0, 3,6)	9, 11, 15
12b			1,85 (1H, ddd, 17,4, 3,9, 2,1)	
13	34,9	35,9	-	-
14a	37,9	38,6	2,39 (1H, m)	13, 14y, 16, 17
14b			1,33 (1H, dd, 13,8, 11,4)	
15	69,0	69,5	4,29 (1H, dd, 8,7, 2,7)	12,13,14,15
16a	62,9	64,7	4,03 (1H, #)	
16b			3,82 (1H, #)	
17	24,2	25,1	1,04 (3H, s)	2, 3, 4, 5, 19
18a	17,4	17,5	0,76 (1H, dd, 10,2, 3,6)	
18b			0,45 (1H, dd, 6,0, 3,6)	3, 4, 5
19a	65,9	67,4	3,55 (1H, #)	
19b			3,34 (1H, dd, 12,6, 7,2)	1, 5, 9, 10
20	20,6	19,8	1,12 (3H, s)	
OAc				
1'	-	170,2	-	-
2'	-	21,4	2,02 (3H, s)	1'
1-OH	-	-	3,42 (1H, d, 3,0)	1, 2, 10
7-OH	-	-	3,83 (1H, d, 5,4)	6y, 7, 8
16-OH	-	-	4,00 (1H, #)	16
19-OH	-	-	3,55 (1H, #)	19

* tài liệu tham khảo chất deacetylpargurol [138],

^a đo trong acetone- d_6 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, # tín hiệu chồng chéo, ^d đo trong DMSO- d_6 .

3.1.4. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ loài sên biển *A. oculifera*

Từ loài sên biển *A. oculifera* đã phân lập và xác định cấu trúc 07 hợp chất sạch: oculiferanin A (AOB1), oculiferanin B (AOB2), oculiferanin C (AOB3), oculiferanin D (AOB4), oculiferanin E (AOB5), oculiferanin F (AOB6), oculiferanin G (AOB7). Các hợp chất trên đều là các diterpene mới và cũng là lớp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài sên *A. oculifera*.



Hình 3.83. Cấu trúc hóa học các hợp chất AOB1 - AOB7

Khi so sánh thành phần hóa học hai loài sên cùng giống *Aplysia* cho thấy từ loài *A. dactylomela* thì thu được nhiều lớp chất khác nhau như sesquiterpene, diterpene, triterpene. Còn loài sên *A. oculifera* chỉ thu được lớp chất diterpene. Cho thấy hai loài thuộc giống sên *Aplysia* chứa thành phần hóa học có sự giống và khác nhau.

3.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được

3.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ mẫu sên biển *A. dactylomela* – Phú Quý, Lâm Đồng

Bốn hợp chất sạch từ ADA1 - ADA4 phân lập được từ loài sên biển *A. dactylomela* – Phú Quý, Lâm Đồng được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2) bằng phương pháp MTT. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.26.

Hợp chất dactylomelanin E (**ADA3**) thể hiện hoạt tính tốt trên cả ba dòng tế bào HepG2, A549 và MCF-7 với giá trị IC_{50} lần lượt là 27,54, 17,78 và 18,62 μM . Hợp chất dactylomelanin C (**ADA1**) thể hiện hoạt tính tốt trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và ung thư A549 với giá trị IC_{50} tương ứng là 27,35 và 19,91 μM , còn với dòng tế bào MCF-7 thể hiện hoạt tính yếu hơn với giá trị IC_{50} tương ứng là 42,661 μM . Hợp chất dactylomelanin D (**ADA2**) chỉ thể hiện hoạt tính tốt trên dòng tế bào A549 với giá trị IC_{50} là 27,86 μM , còn lại thể hiện hoạt tính yếu trên hai dòng tế bào còn lại. Hợp chất (2*S*,3*R*,7*S*,7*R*)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one (**ADA4**) còn lại không thể hiện hoạt tính ở nồng độ nghiên cứu.

Bảng 3.26. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài *A. dactylomela*

STT	Hợp chất	IC_{50} (μM)		
		HepG2	A549	MCF-7
1	ADA1	27,35 $\pm$ 1,21	19,91 $\pm$ 1,78	42,66 $\pm$ 1,73
2	ADA2	50,58 $\pm$ 1,75	27,86 $\pm$ 1,09	68,71 $\pm$ 0,99
3	ADA3	27,54 $\pm$ 1,03	17,78 $\pm$ 1,17	18,62 $\pm$ 0,92
4	ADA4	> 80	> 80	> 80
	Camptothecin	2,24 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,12

Chất đối chứng dương: camptothecin

3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được từ mẫu sên biển *A. dactylomela* – Lý Sơn, Quảng Ngãi

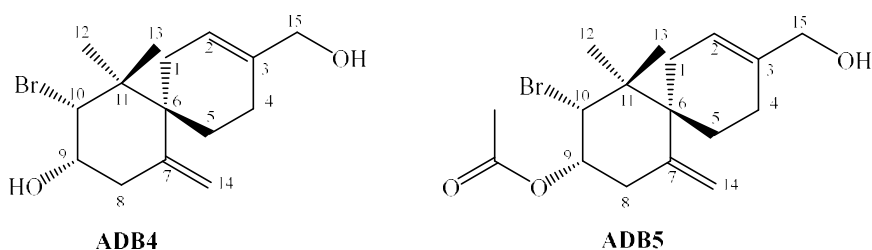
Mười hai hợp chất sạch từ **ADB1** – **ADB12** phân lập được từ loài sên biển *A. dactylomela* – Phú Quý, Lâm Đồng được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2) bằng phương pháp MTT. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.27.

Trong số 12 hợp chất thử nghiệm hoạt tính trên thì có 6 hợp chất elatol (**ADB1**), aplydactylonin K (**ADB3**), aplydactylonin G (**ADB4**), aplydactylonin H (**ADB5**), [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol (**ADB8**) và aplydactylonin D (**ADB11**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Trong đó hợp chất elatol (**ADB1**) thể hiện hoạt tính gây độc mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 6,22, 5,07 và 6,55 μM tương ứng với 3 dòng tế bào HepG2, A549 và MCF-7. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây. Hợp chất elatol (**ADB1**) có tác dụng gây độc tế bào là do nó có khả năng bắt giữ tế bào ở pha G1 và pha sau G1, dẫn đến tế bào tự chết theo chương trình (apoptosis) [79]. Hợp chất **ADB1** còn thể hiện hoạt tính gây độc tế bào với dòng tế bào Vero, thể hiện giá trị IC_{50} là 25,0 $\mu g/mL$. Ngoài hoạt tính gây độc tế bào hợp chất **ADB1** còn có một số hoạt tính khác

đã công bố. Ví dụ được sử dụng làm thuốc diệt ký sinh trùng chống lại bọ xít hút máu như *Trypanosoma cruzi* và *Leishmania amazonensis* [97], chống khối u [97], và diệt ấu trùng chống lại muỗi sốt xuất huyết *Aedes aegypti* [98]. Hợp chất **ADB1** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với tất cả 13 dòng vi khuẩn được thử nghiệm. Nó cho thấy giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 5,5 mg/đĩa đối với *Clostridium cellobioparum*, *Proteus mirabilis* và *Flavobacterium helmiphilum* và 15–30 mg/đĩa đối với các loài vi khuẩn *Chromobacterium violaceum*, *Clostridium fallax*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, và *Vibrio vulnificus*. [91].

Hợp chất elatol (**ADB1**) có hoạt tính mạnh với các dòng tế bào thử nghiệm, trong khi đó 11 hợp chất còn lại có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính. Dự đoán **ADB1** có hoạt tính mạnh do trên hợp chất có thể di tố Clo - đặc điểm này khác so với 11 hợp chất còn lại (các hợp chất chỉ thể halogen là Brom hoặc không thể halogen).

Hợp chất aplydactylonin G (**ADB4**) thể hiện hoạt tính mạnh trên một dòng tế bào ung thư A549 với giá trị IC_{50} là 8,15 μ M, gần mạnh bằng hợp chất **ADB1**. Trong khi đó hợp chất aplydactylonin H (**ADB5**) có cấu trúc gần giống với hợp chất (**ADB4**), chỉ khác **ADB5** có thêm nhóm thế acetyl (xem Hình 3.84) lại thể hiện hoạt tính gây độc tế bào A549 yếu (IC_{50} là 34,51 μ M). Điều này cũng giải thích cho việc dễ thích nghi với nguồn thức ăn phong phú từ tảo, có cả tảo độc thì sên biển vẫn hấp thụ và không ảnh hưởng tới cơ thể chúng. Bằng cách trong cơ thể sên biển diễn ra quá trình acetyl hóa các nhóm hydroxy (-OH) hoặc nhóm amino (-NH₂) trên các phân tử phân cực, có tính độc thành các nhóm acetyl (-COCH₃) làm phân tử kém phân cực, kém hoạt động hơn, ít độc tính hơn. Nhờ vậy mà các chất độc không còn tương tác mạnh với các protein/enzym trong cơ thể sên, giảm tính độc và cơ thể thích nghi được. Quá trình acetyl hóa nhờ vào enzym chính thường là acetyltransferase (acetyl-CoA). Khi đó sên biển biến chất độc từ thức ăn thành dạng chất dự trữ an toàn, tái sử dụng khi phòng thủ (một số dẫn xuất acetyl vẫn giữ hoạt tính đủ mạnh để khi sên phóng ra chất phòng thủ vẫn chống lại kẻ thù ăn thịt [139]).



Hình 3.84. So sánh cấu trúc hai hợp chất **ADB4** và **ADB5**

Hợp chất **ADB3** thể hiện hoạt tính tốt trên cả ba dòng tế bào ung thư HepG2, A549 và MCF-7 với giá trị IC_{50} tương ứng là 29,65, 25,23 và 31,19 μM . Hợp chất novel **ADB11** thể hiện hoạt tính tốt trên dòng tế bào A549 với giá trị IC_{50} là 30,83 μM , thể hiện yếu trên hai dòng còn lại và hai hợp chất **ADB5** và **ADB8** cũng thể hiện hoạt tính yếu trên các dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 34,51 đến 49,89 μM . Còn lại các hợp chất **ADB2**, **ADB6**, **ADB7**, **ADB9**, **ADB10** và **ADB12** không thể hiện hoạt tính.

Bảng 3.27. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài *A. dactylomela* - Lý Sơn, Quảng Ngãi

STT	Hợp chất	IC_{50} (μM)		
		HepG2	A549	MCF-7
1	ADB1	6,22 $\pm$ 0,65	5,07 $\pm$ 0,96	6,55 $\pm$ 0,44
2	ADB2	> 50	> 50	> 50
3	ADB3	29,65 $\pm$ 1,06	25,23 $\pm$ 0,97	31,19 $\pm$ 1,33
4	ADB4	> 50	8,15 $\pm$ 0,96	> 50
5	ADB5	45,39 $\pm$ 1,72	34,51 $\pm$ 1,45	49,20 $\pm$ 1,61
6	ADB6	> 50	> 50	> 50
7	ADB7	> 50	> 50	> 50
8	ADB8	> 50	49,89 $\pm$ 1,78	> 50
9	ADB9	> 50	> 50	> 50
10	ADB10	> 50	> 50	> 50
11	ADB11	44,87 $\pm$ 1,44	30,83 $\pm$ 1,52	> 50
12	ADB12	> 50	> 50	> 50
	Camptothecin	2,24 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,12

Chất đối chứng dương: camptothecin

Một số hợp chất đã biết trước đây từ mẫu sên gồm [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol (**ADB8**), pacifidiene (**ADB9**) và thysiferol (**ADB12**) đã được nghiên cứu về hoạt tính sinh học. Cụ thể hợp chất **ADB8** đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn trên các dòng vi khuẩn (*Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophilia*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Candida maltosa*) nhưng kết quả không thể hoạt hoạt tính kháng khuẩn [129]. Hợp chất **ADB9** thử nghiệm trên tám loại nấm (*Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, và *Aspergillus fumigatus*) và hai vi khuẩn (vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và vi khuẩn Gram âm

Pseudomonas aeruginosa kết quả cho thấy hợp chất cũng không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm [123]. Hợp chất **ADB12** thể hiện hoạt tính mạnh lên dòng tế bào P388 với giá trị IC_{50} là 0,01 $\mu\text{g/mL}$ [140].

3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài sên biển *A. oculifera*

Các hợp chất sạch từ **AOB1** đến **AOB7** phân lập được từ loài sên biển *A. oculifera* được thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người: ung thư gan HepG2, ung thư cổ tử cung (Hela) và ung thư vú (MCF-7) bằng phương pháp MTT. Kết quả thể hiện ở bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất phân lập được từ loài *A. oculifera*

STT	Hợp chất	IC_{50} (μM)		
		HepG2	Hela	MCF-7
1	AOB1	21,38 $\pm$ 0,67	23,44 $\pm$ 0,96	> 80
2	AOB2	34,94 $\pm$ 2,05	41,91 $\pm$ 2,53	35,89 $\pm$ 2,33
3	AOB3	34,67 $\pm$ 1,19	36,73 $\pm$ 1,73	> 80
4	AOB4	54,95 $\pm$ 1,21	> 80	> 80
5	AOB5	> 80	> 80	> 80
6	AOB6	> 80	> 80	> 80
7	AOB7	31,99 $\pm$ 1,42	> 80	> 80
	Camptothecin	2,24 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,12	> 80

Chất đối chứng dương: camptothecin

Với bảng kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của bốn hợp chất cho thấy: Hợp chất oculiferanin A (**AOB1**) thể hiện tác dụng trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và Hela với giá trị IC_{50} tương ứng là 21,38 và 23,44 μM . Hợp oculiferanin C (**AOB3**) cũng thể hiện ức chế trên hai dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} lần lượt là 34,67 và 36,73 μM như chất **AOB1** nhưng yếu hơn. Hợp chất oculiferanin B (**AOB2**) thể hiện ức chế trên cả ba dòng tế bào ung thư HepG2, Hela và MCF-7 với giá trị IC_{50} lần lượt 34,94, 41,91 và 35,89 μM . Hợp chất oculiferanin D (**AOB4**) và oculiferanin G (**AOB7**) với giá trị IC_{50} lần lượt là 54,95 và 31,99 μM trên cùng dòng tế bào ung thư HepG2. Hợp chất oculiferanin E (**AOB5**) và oculiferanin F (**AOB6**) không thể hiện hoạt tính trên cả ba dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

❖ KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp và các phương pháp phổ hiện đại đồng thời so sánh với dữ liệu phổ của các hợp chất đã công bố trong tài liệu tham khảo đã phân lập và xác định được cấu trúc của 23 hợp chất từ hai loài sên biển *A. dactylomela* và *A. oculifera*. Các hợp chất phân lập đã được tiến hành thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư, cụ thể như sau:

- Về thành phần hóa học:

1. Từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng đã phân lập và xác định cấu trúc bốn hợp chất. Trong đó có ba hợp chất mới là: dactylomelanin C (**ADA1**), dactylomelanin D (**ADA2**) và dactylomelanin E (**ADA3**). Một hợp chất đã biết là: (2*S*,3*R*,7*S*,7*R*)-2-chloro-3,7-epoxychamigrane-9-one (**ADA4**). Các hợp chất trên thuộc lớp chất sesquiterpene.

2. Từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở Lý Sơn, Quảng Ngãi đã phân lập và xác định cấu trúc 12 hợp chất. Trong đó có bảy hợp chất mới là: aplydactylonin I (**ADB2**), aplydactylonin K (**ADB3**), aplydactylonin G (**ADB4**), aplydactylonin H (**ADB5**), aplydactylonin F (**ADB6**), aplydactylonin E (**ADB7**) và aplydactylonin D (**ADB11**). Năm hợp chất đã biết là: elatol (**ADB1**), [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol (**ADB8**), pacifidiene (**ADB9**), 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon (**ADB10**) và thyriferol (**ADB12**).

Các hợp chất trên thuộc lớp chất terpenoid, trong đó có mười một hợp chất sesquiterpene, một hợp chất diterpene và một hợp chất triterpene. Đặc biệt hợp chất aplydactylonin D (**ADB11**) có khung mới, chưa được công bố trước đây.

3. Từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế đã phân lập và xác định cấu trúc bảy hợp chất là: oculiferanin A (**AOB1**), oculiferanin B (**AOB2**), oculiferanin C (**AOB3**), oculiferanin D (**AOB4**), oculiferanin E (**AOB5**), oculiferanin F (**AOB6**), oculiferanin G (**AOB7**). Các hợp chất trên đều thuộc lớp chất diterpene và là những hợp chất mới, trong đó có năm hợp chất có khung được sắp xếp lại từ khung parguerane và hai hợp chất có khung parguerane.

- Về hoạt tính sinh học:

Đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của 23 hợp chất sạch từ hai mẫu sên biển *A. dactylomela* - Phú Quý, Lâm Đồng và *A. dactylomela* - Lý Sơn, Quảng Ngãi và mẫu sên biển *A. oculifera* - Lăng Cô, Huế.

Bốn hợp chất từ sên biển *A. dactylomela* - Phú Quý, Lâm Đồng được thử nghiệm gây độc tế bào trên ba dòng ung thư HepG2, A549 và MCF-7 cho thấy có ba hợp chất thể hiện hoạt tính là: dactylomelanin C (**ADA1**), dactylomelanin D (**ADA2**) và dactylomelanin E (**ADA3**). Trong đó hợp chất (**ADA3**) thể hiện hoạt tính mạnh trên cả ba dòng tế bào với giá trị IC_{50} lần lượt là 27,54, 17,78 và 18,62 μ M.

Mười hai hợp chất từ mẫu sên *A. dactylomela* - Lý Sơn, Quảng Ngãi được thử nghiệm gây độc tế bào trên ba dòng ung thư HepG2, A549 và MCF-7 cho thấy có sáu hợp chất thể hiện hoạt tính là: elatol (**ADB1**), aplydactylonin K (**ADB3**), aplydactylonin G (**ADB4**), aplydactylonin H (**ADB5**), [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol (**ADB8**), aplydactylonin D (**ADB11**). Trong đó hợp chất elatol (**ADB1**) thể hiện hoạt tính gây độc mạnh nhất với giá trị IC_{50} 6,22, 5,07 và 6,55 μ M tương ứng với các dòng tế bào trên. Hợp chất mới aplydactylonin G (**ADB4**) thể hiện hoạt tính mạnh trên một dòng tế bào ung thư A549 với giá trị IC_{50} là 8,15 μ M. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính yếu hơn.

Bảy hợp chất từ sên biển *A. oculifera* - Lăng Cô, Huế thử nghiệm hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư HepG2, Hela và MCF-7 thì cho thấy có năm hợp chất có thể hiện hoạt tính là oculiferanin A (**AOB1**), oculiferanin B (**AOB2**), oculiferanin C (**AOB3**), oculiferanin D (**AOB4**), oculiferanin G (**AOB7**). Trong đó hợp chất **AOB1** thể hiện hoạt tính tốt nhất với cả hai dòng tế bào ung thư HepG2 và Hela với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 21,38 và 23,44 μ M.

❖ KIẾN NGHỊ

Hợp chất aplydactylonin G (**ADB4**) phân lập từ loài sên biển *A. dactylomela* - Lý Sơn, Quảng Ngãi thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng tế bào ung thư A540 với giá trị IC_{50} là 8,15 μ M. Cần nghiên cứu sâu hơn về hợp chất có tiềm năng này.

Những hợp chất mới được phân lập từ hai loài *A. dactylomela* và *A. oculifera* cần thử nghiệm thêm một số hoạt tính khác, ví dụ như hoạt tính kháng viêm, hoạt tính kháng khuẩn, ức chế enzym... để phát hiện được những hoạt tính tốt hơn, phục vụ cho những nghiên cứu sâu hơn sau này.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Từ loài sên biển *A. dactylomela* thu ở đảo Phú Quý, Lâm Đồng và Lý Sơn, Quảng Ngãi đã phân lập được 16 chất sạch, trong đó có tới 10 hợp chất mới: dactylomelanin C (**ADA1**), dactylomelanin D (**ADA2**), dactylomelanin E (**ADA3**), aplydactylonin I (**ADB2**), aplydactylonin K (**ADB3**), aplydactylonin G (**ADB4**), aplydactylonin H (**ADB5**), aplydactylonin F (**ADB6**), aplydactylonin E (**ADB7**), aplydactylonin D (**ADB11**).

2. Từ loài sên biển *A. oculifera* thu ở Lăng Cô, Huế đã phân lập và xác định cấu trúc 07 hợp chất: oculiferanin A (**AOB1**), oculiferanin B (**AOB2**), oculiferanin C (**AOB3**), oculiferanin D (**AOB4**), oculiferanin E (**AOB5**), oculiferanin F (**AOB6**), oculiferanin G (**AOB7**). Các hợp chất trên đều thuộc lớp chất diterpene và là những hợp chất mới, trong đó có năm hợp chất có khung được sắp xếp lại từ khung parguerane và hai hợp chất có khung parguerane.

3. Các hợp chất mới (17 chất) phân lập được từ hai loài sên biển *A. dactylomela* và *A. oculifera* đã được tiến hành thử nghiệm hoạt tính sinh học với bốn dòng tế bào ung thư (HepG2, A549, MCF-7 và Hela) cho thấy ba hợp chất dactylomelanin C (**ADA1**), dactylomelanin E (**ADA3**), aplydactylonin C (**ADB3**) thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 19,91 - 42,66 μ M. Hợp chất oculiferanin A (**AOB1**) thể hiện tác dụng trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và Hela với giá trị IC_{50} tương ứng là 21,38 và 23,44 μ M

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Pham Thanh Binh**, Duong Thu Trang, Vu Thanh Trung, Kieu Thi Phuong Linh, Nguyen Viet Phong, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Xuan Cuong, Do Cong Thung, Nguyen Hoai Nam, Nguyen Van Thanh, 2023, New nor-chamigrane and bisabolane sesquiterpenoids from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Phytochemistry Letters*, 53, pp. 92-97.
2. **Pham Thanh Binh**, Duong Thu Trang, Kieu Thi Phuong Linh, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Chi Mai, Tran My Linh, Dang Vu Luong, Nguyen Hoai Nam, Nguyen Van Thanh, 2025, A novel diterpene and six new sesquiterpene from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 23, pp. 8044-8052.
3. **Pham Thanh Binh**, Duong Thu Trang, Vu Thanh Trung, Kieu Thi Phuong Linh, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Chi Mai, Tran My Linh, Nguyen Van Thanh, 2024, Cytotoxic constituents from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*. (Đang phản biện).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A., 2015, Global cancer statistics, 2012, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), pp. 87-108.
- [2]. Marine Pharmacology. <https://www.marinepharmacology.org/>
- [3]. Newman D.J., Cragg G.M., 2020, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019, *J Nat Prod*, 83(3), pp. 770-803.
- [4]. Montuori E., Hyde C.A.C., Crea F., Golding J., Lauritano C., Marine Natural Products with Activities against Prostate Cancer: Recent Discoveries. In *International Journal of Molecular Sciences*, 2023; Vol. 24.
- [5]. Carefoot T.H., 1987, Aplysia: its biology and ecology, *Oceanography and Marine Biology*, 25, pp. 167-284.
- [6]. Audesirk T.E., 1979, A FIELD STUDY OF GROWTH AND REPRODUCTION IN APLYSIA CALIFORNICA, *The Biological Bulletin*, 157(3), pp. 407-421.
- [7]. Gev S., Achituv Y., Susswein A.J., 1984, Seasonal determinants of the life cycle in two species of Aplysia found in shallow waters along the Mediterranean coast of Israel, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 74(1), pp. 67-83.
- [8]. Carefoot T.H., 1987, Aplysia: its biology and ecology, *Oceanography and Marine Biology*, 25, pp. 167.
- [9]. Wessels M., König G.M., Wright A.D., 2000, New Natural Product Isolation and Comparison of the Secondary Metabolite Content of Three Distinct Samples of the Sea Hare Aplysia dactylomela from Tenerife, *Journal of Natural Products*, 63(7), pp. 920-928.
- [10]. Kusumi T., Uchida H., Inouye Y., Ishitsuka M., Yamamoto H., Kakisawa H., 1987, Novel cytotoxic monoterpenes having a halogenated tetrahydropyran from Aplysia kurodai, *The Journal of Organic Chemistry*, 52(20), pp. 4597-4600.
- [11]. Grkovic T., Appleton D.R., Copp B.R., 2005, Chemistry and Chemical Ecology of some of the Common Opisthobranch Molluscs Found on the Shores of NE New Zealand, *Chemistry in New Zealand*, 69, pp. 4.
- [12]. Kazlauskas R., Murphy P.T., Quinn R.J., Wells R.J., Schönhlzer P., F-Konzern J.S., Roche F.H.-L., 1976, Two polyhalogenated monoterpenes from the red alga plocamium costatum, *Tetrahedron Letters*, 17(49), pp. 4451-4454.
- [13]. quiñoa E., Castedo L., Riguera R., 1989, The halogenated monoterpenes of Aplysia punctata. A comparative study, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 92(1), pp. 99-101.
- [14]. Miyamoto T., Higuchi R., Marubayashi N., Komori T., 1988, Studies on the constituents of marine opisthobranchia, IV. Two new polyhalogenated monoterpenes from the sea hare Aplysia kurodai, *Liebigs Annalen der Chemie*, 1988(12), pp. 1191-1193.
- [15]. Faulkner D.J., Stallard M.O., 1973, 7-chloro-3,7-dimethyl-1,4,6-tribromo-1-octen-3-ol, a novel monoterpene alcohol from Aplysia californica, *Tetrahedron Letters*, 14(14), pp. 1171-1174.

- [16]. Stallard M.O., John Faulkner D., 1974, Chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*—I. Importance of diet, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49(1), pp. 25-35.
- [17]. Stallard M.O., Faulkner D.J., 1974, Chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*. II. Chemical transformations, *Comp Biochem Physiol B*, 49(1b), pp. 37-41.
- [18]. Katayama A., Ina K., Nozaki H., Nakayama M., 1982, Structural Elucidation of Kurodainol, a Novel Halogenated Monoterpene from Sea Hare (*Aplysia Kurodai*), *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(3), pp. 859-860.
- [19]. Ortega M.J., Zubía E., Salvá J., 1997, New polyhalogenated monoterpenes from the sea hare *Aplysia punctata*, *Journal of Natural Products*, 60(5), pp. 482-484.
- [20]. Palaniveloo K., Vairappan C.S., 2014, Chemical relationship between red algae genus *Laurencia* and sea hare (*Aplysia dactylomela* Rang) in the North Borneo Island, *Journal of Applied Phycology*, 26(2), pp. 1199-1205.
- [21]. Dias T., Brito I., Moujir L., Paiz N., Darias J., Cueto M., 2005, Cytotoxic Sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*, *J Nat Prod*, 68(11), pp. 1677-1679.
- [22]. Díaz-Marrero A.-R., de la Rosa J.M., Brito I., Darias J., Cueto M., 2012, Dactylomelatrilol, a Biogenetically Intriguing Omphalane-Derived Marine Sesquiterpene, *Journal of Natural Products*, 75(1), pp. 115-118.
- [23]. Pitombo L.F., Kaiser C.R., Pinto A.C., 1996, Occurrence of chamigrenes in *Aplysia dactylomela* from Brazilian waters, *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 41, pp. 4.
- [24]. Hegazy M.-E.F., Moustfa A.Y., Mohamed A.E.-H.H., Alhammady M.A., Elbehairi S.E.I., Ohta S., Paré P.W., 2014, New cytotoxic halogenated sesquiterpenes from the Egyptian sea hare, *Aplysia oculifera*, *Tetrahedron Letters*, 55(10), pp. 1711-1714.
- [25]. Kaiser C.R., Pitombo L.F., Pinto A.C., 1998, C-13 and H-1 NMR Assignments of the Chamigrenes Prepacifenol and Dehydroxyprepacifenol Epoxies, *Spectroscopy Letters*, 31(3), pp. 573-585.
- [26]. Kaiser C.R., Pitombo L.F., Pinto A.C., 2001, Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of chamigrenes from *Aplysia dactylomela*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39(3), pp. 147-149.
- [27]. Pietra F., 2002, Evolution of the secondary metabolite versus evolution of the species, *Pure and Applied Chemistry*, 74(11), pp. 2207-2221.
- [28]. McPhail K.L., Davies-Coleman M.T., Copley R.C.B., Eggleston D.S., 1999, New Halogenated Sesquiterpenes from South African Specimens of the Circumtropical Sea Hare *Aplysia dactylomela*, *Journal of Natural Products*, 62(12), pp. 1618-1623.
- [29]. Schmitz F.J., Gopichand Y., Michaud D.P., Prasad R.S., Remaley S., Hossain M.B., Rahman A., Sengupta P.K., van der Helm D., 1981, Recent developments in research on metabolites from Caribbean marine invertebrates, *Pure and Applied Chemistry*, 53(4), pp. 853-865.
- [30]. Shubina L.K., Fedorov S.N., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok A.S., Jin J.O., Song M.G., Kwak J.Y., Stonika V.A., 2007, Four new chamigrane sesquiterpenoids from the opisthobranch mollusk *Aplysia dactylomela*, *Russian Chemical Bulletin*, 56(10), pp. 2109-2114.

- [31]. Fedorov S.N., Shubina L.K., Kalinovskiy A.I., Lyakhova E.G., Stonik V.A., 2000, Structure and absolute configuration of a new rearranged chamigrane-type sesquiterpenoid from the sea hare *Aplysia* sp, *Tetrahedron Letters*, 41(12), pp. 1979-1982.
- [32]. Matsuura B.S., Kölle P., Trauner D., de Vivie-Riedle R., Meier R., 2017, Unravelling Photochemical Relationships Among Natural Products from *Aplysia dactylomela*, *ACS Central Science*, 3(1), pp. 39-46.
- [33]. Gopichand Y., Schmitz F.J., Shelley J., Rahman A., Van der Helm D., 1981, Marine natural products: halogenated acetylenic ethers from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *The Journal of Organic Chemistry*, 46(25), pp. 5192-5197.
- [34]. Brito I., Dias T., Díaz-Marrero A.R., Darias J., Cueto M., 2006, Aplysiadiol from *Aplysia dactylomela* suggested a key intermediate for a unified biogenesis of regular and irregular marine algal bisabolene-type metabolites, *Tetrahedron*, 62(41), pp. 9655-9660.
- [35]. Hollenbeak K.H., Schmitz F.J., Hossain M.B., van Der Helm D., 1979, Marine natural products: Deodactol, antineoplastic sesquiterpenoid from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 35(4), pp. 541-545.
- [36]. Vairappan C.S., Ishii T., Lee T.K., Suzuki M., Zhaoqi Z., 2010, Antibacterial Activities of a New Brominated Diterpene from Borneon *Laurencia* spp, *Marine Drugs*, 8(6), pp.
- [37]. Ichiba T., Higa T., 1986, New cuparene-derived sesquiterpenes with unprecedented oxygenation pattern from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *The Journal of Organic Chemistry*, 51(17), pp. 3364-3366.
- [38]. Tsukamoto S., Yamashita Y., Ohta T., New Cytotoxic and Antibacterial Compounds Isolated from the Sea Hare, *Aplysia kurodai*. In *Marine Drugs*, 2005; Vol. 3, pp 22-28.
- [39]. Yamamura S., Hirata Y., 1963, Structures of aplysin and aplysinol, naturally occurring bromo-compounds, *Tetrahedron*, 19(10), pp. 1485-1496.
- [40]. Appleton D.R., Babcock R.C., Copp B.R., 2001, Novel tryptophan-derived dipeptides and bioactive metabolites from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 57(51), pp. 10181-10189.
- [41]. Stallard M.O., Fenical W., Kittredge J.S., 1978, The brasilenols, rearranged sesquiterpene alcohols isolated from the marine opisthobranch *Aplysia brasiliensis*, *Tetrahedron*, 34(14), pp. 2077-2081.
- [42]. Ioannou E., Nappo M., Avila C., Vagias C., Roussis V., 2009, Metabolites from the Sea Hare *Aplysia fasciata*, *Journal of Natural Products*, 72(9), pp. 1716-1719.
- [43]. Dieter R.K., Kinnel R., Meinwald J., Eisner T., 1979, Bradudol and isobrasudol: two bromos sesquiterpenes from a sea hare (*Aplysia brasiliensis*), *Tetrahedron Letters*, 20(19), pp. 1645-1648.
- [44]. Baker B., Ratnapala L., Mahindaratne M.P.D., de Silva E.D., Tillekeratne L.M.V., Jeong J.H., Scheuer P.J., Seff K., 1988, Lankalapuol a and b: two ciseudesmanes from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 44(15), pp. 4695-4701.

- [45]. Vairappan C.S., Anangdan S.P., Lit T.K., 2007, Additional Halogenated Secondary Metabolites from the Sea Hare *Aplysia dactylomela*, *Malaysia Journal of Science*, 26(1), pp. 7.
- [46]. Matsuda H., Tomiie Y., Yamamura S., Hirata Y., 1967, The structure of aplysin-20, *Chemical Communications (London)*, (17), pp. 898b-899.
- [47]. Ojika M., Yoshida Y., Okumura M., Ieda S., Yamada K., 1990, Aplysiadiol, a New Brominated Diterpene from the Marine Mollusc *Aplysia kurodai*, *Journal of Natural Products*, 53(6), pp. 1619-1622.
- [48]. Ojika M., Kigoshi H., Yoshikawa K., Nakayama Y., Yamada K., 1992, A New Bromo Diterpene, epi-Aplysin-20, and ent-Isoconcinndiol from the Marine Mollusc *Aplysia kurodai*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 65(8), pp. 2300-2302.
- [49]. Midland S.L., Wing R.M., Sims J.J., 1983, New crenulides from the sea hare, *Aplysia vaccaria*, *The Journal of Organic Chemistry*, 48(11), pp. 1906-1909.
- [50]. Estrada D.M., Ravelo J.L., Ruiz-Pérez C., Martín J.D., Solans X., 1989, Dactylomelol, a new class of diterpene from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron Letters*, 30(45), pp. 6219-6220.
- [51]. Findlay J.A., Li G., 2002, Novel terpenoids from the Sea Hare *Aplysia punctata*, *Canadian Journal of Chemistry*, 80(12), pp. 1697-1707.
- [52]. Schmitz F.J., Michaud D.P., Schmidt P.G., 1982, Marine natural products: parguerol, deoxyparguerol, and isoparguerol. New brominated diterpenes with modified pimarane skeletons from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Journal of the American Chemical Society*, 104(23), pp. 6415-6423.
- [53]. Tsukamoto S., Yamashita Y., Yoshida T., Ohta T., 2004, Parguerol and isoparguerol isolated from the sea hare, *Aplysia kurodai*, induce neurite outgrowth in PC-12 Cells, *Marine Drugs*, 2(4), pp. 170-175.
- [54]. Jiménez-Romero C., Mayer A.M.S., Rodríguez A.D., 2014, Dactyloditerpenol acetate, a new prenylbisabolane-type diterpene from *Aplysia dactylomela* with significant in vitro anti-neuroinflammatory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), pp. 344-348.
- [55]. Pettit G.R., Herald C.L., Einck J.J., Vanell L.D., Brown P., Gust D., 1978, Isolation and structure of angasiol, *The Journal of Organic Chemistry*, 43(24), pp. 4685-4686.
- [56]. Atta ur R., Alvi K.A., Abbas S.A., Sultana T., Shameel M., Choudhary M.I., Clardy J.C., 1991, A Diterpenoid Lactone from *Aplysia juliana*, *Journal of Natural Products*, 54(3), pp. 886-888.
- [57]. Manzo E., Gavagnin M., Bifulco G., Cimino P., Di Micco S., Ciavatta M.L., Guo Y.W., Cimino G., 2007, Aplysiols A and B, squalene-derived polyethers from the mantle of the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 63(40), pp. 9970-9978.
- [58]. Vera B., Rodríguez A.D., Avilés E., Ishikawa Y., 2009, Aplysqualenols A and B: Squalene-Derived Polyethers with Antitumoral and Antiviral Activity from the Caribbean Sea Slug *Aplysia dactylomela*, *European Journal of Organic Chemistry*, 2009(31), pp. 5327-5336.
- [59]. McDonald F.J., Campbell D.C., Vanderah D.J., Schmitz F.J., Washecheck D.M., Burks J.E., Van der Helm D., 1975, Marine natural products. Dactylyne,

- an acetylenic dibromochloro ether from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *The Journal of Organic Chemistry*, 40(5), pp. 665-666.
- [60]. Gao L.-x., Murai A., 1992, Total synthesis of (–)-dactylyne and (–)-isodactylyne, *Tetrahedron Letters*, 33(30), pp. 4349-4352.
- [61]. Letizia Ciavatta M., Gavagnin M., Puliti R., Cimino G., Martínez E., Ortea J., Andrea Mattia C., 1997, Dactylallene: A novel dietary C15 bromoallene from the Atlantic anaspidean mollusc *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 53(51), pp. 17343-17350.
- [62]. Okamoto Y., Nitanda N., Ojika M., Sakagami Y., 2001, Aplysiallene, a new bromoallene as an Na, K-ATPase inhibitor from the sea hare, *Aplysia kurodai*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65(2), pp. 474-476.
- [63]. Miyamoto T., Ebisawa Y., Higuchi R., 1995, Aplyparvunin, a bioactive acetogenin from the sea hare *Aplysia parvula*, *Tetrahedron Letters*, 36(34), pp. 6073-6074.
- [64]. Manzo E., Ciavatta M.L., Gavagnin M., Puliti R., Mollo E., Guo Y.-W., Mattia C.A., Mazzarella L., Cimino G., 2005, Structure and absolute stereochemistry of novel C15-halogenated acetogenins from the anaspidean mollusc *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, 61(31), pp. 7456-7460.
- [65]. Kinnel R.B., Dieter R.K., Meinwald J., Van Engen D., Clardy J., Eisner T., Stallard M.O., Fenical W., 1979, Brasilenyne and cis-dihydrorhodophytin: antifeedant medium-ring haloethers from a sea hare (*Aplysia brasiliensis*), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(8), pp. 3576-3579.
- [66]. McPhail K.L., Davies-Coleman M.T., 2005, (3Z)-Bromofucin from a South African sea hare, *Natural Product Research*, 19(5), pp. 449-452.
- [67]. Vanderah D.J., Schmitz F.J., 1976, Marine natural products: isodactylyne, a halogenated acetylenic ether from the sea hare *Aplysia dactylomela*, *The Journal of Organic Chemistry*, 41(21), pp. 3480-3481.
- [68]. Jiménez C., Quiñoá E., Castedo L., Riguera R., 1986, Epidioxy Sterols from the Tunicates *Dendrodoa grossularia* and *Ascidella aspersa* and the Gastropoda *Aplysia depilans* and *Aplysia punctata*, *Journal of Natural Products*, 49(5), pp. 905-909.
- [69]. Miyamoto T., Higuchi R., Komori T., Fujioka T., Mihashi K., 1986, Isolation and structures of aplykurodins a and b, two new isoprenoids from the marine mollusk *Aplysia kurodai*, *Tetrahedron Letters*, 27(10), pp. 1153-1156.
- [70]. Spinella A., Gavagnin M., Crispino A., Cimino G., Martinez E., Ortea J., Sodano G., 1992, 4-Acetylaplykurodin B and Aplykurodinone B, Two Ichthyotoxic Degraded Sterols from the Mediterranean Mollusk *Aplysia fasciata*, *Journal of Natural Products*, 55(7), pp. 989-993.
- [71]. Ortega M.J., Zubía E., Salvá J., 1997, 3-epi-Aplykurodinone B, a New Degraded Sterol from *Aplysia fasciata*, *Journal of Natural Products*, 60(5), pp. 488-489.
- [72]. Kigoshi H., Imamura Y., Yoshikawa K., Yamada K., 1990, Three new cytotoxic alkaloids, aplaminone, neoaplaminone and neoaplaminone sulfate from the marine mollusc *Aplysia kurodai*, *Tetrahedron Letters*, 31(34), pp. 4911-4914.

- [73]. Ojika M., Yoshida T., Yamada K., 1993, Aplysepine, a novel 1,4-benzodiazepine alkaloid from the sea hare *Aplysia kurodai*, *Tetrahedron Letters*, 34(33), pp. 5307-5308.
- [74]. Kuroda T., Kigoshi H., 2008, Aplaminal: A Novel Cytotoxic Aminoalcohol Isolated from the Sea Hare *Aplysia kurodai*, *Organic Letters*, 10(3), pp. 489-491.
- [75]. Napolitano J.G., Daranas A.H., Norte M., Fernández J.J., 2009, Marine macrolides, a promising source of antitumor compounds, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(2), pp. 122-137.
- [76]. Spinella A., Zubía E., Martínez E., Ortea J., Cimino G., 1997, Structure and Stereochemistry of Aplyolides A–E, Lactonized Dihydroxy Fatty Acids from the Skin of the Marine Mollusk *Aplysia depilans*, *The Journal of Organic Chemistry*, 62(16), pp. 5471-5475.
- [77]. Yamada K., Ojika M., Ishigaki T., Yoshida Y., Ekimoto H., Arakawa M., 1993, Aplyronine A, a potent antitumor substance and the congeners aplyronines B and C isolated from the sea hare *Aplysia kurodai*, *Journal of the American Chemical Society*, 115(23), pp. 11020-11021.
- [78]. Ojika M., Kigoshi H., Suenaga K., Imamura Y., Yoshikawa K., Ishigaki T., Sakakura A., Mutou T., Yamada K., 2012, Aplyronines D–H from the sea hare *Aplysia kurodai*: isolation, structures, and cytotoxicity, *Tetrahedron*, 68(4), pp. 982-987.
- [79]. Campos A., Souza C.B., Lhullier C., Falkenberg M., Schenkel E.P., Ribeiro-do-Valle R.M., Siqueira J.M., 2012, Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(8), pp. 1146-1154.
- [80]. Fedorov S.N., Shubina L.K., Bode A.M., Stonik V.A., Dong Z., 2007, Dactylone Inhibits Epidermal Growth Factor–Induced Transformation and Phenotype Expression of Human Cancer Cells and Induces G1-S Arrest and Apoptosis, *Cancer Research*, 67(12), pp. 5914-5920.
- [81]. Lhullier C., Falkenberg M., Ioannou E., Quesada A., Papazafiri P., Horta P.A., Schenkel E.P., Vagias C., Roussis V., 2010, Cytotoxic Halogenated Metabolites from the Brazilian Red Alga *Laurencia catarinensis*, *Journal of Natural Products*, 73(1), pp. 27-32.
- [82]. Kim M.-M., Mendis E., Kim S.-K., 2008, *Laurencia okamurai* Extract Containing Laurinterol Induces Apoptosis in Melanoma Cells, *Journal of Medicinal Food*, 11(2), pp. 260-266.
- [83]. Tsukamoto S., Yamashita Y., Ohta T., 2005, New cytotoxic and antibacterial compounds isolated from the sea hare, *Aplysia kurodai*, *Marine Drugs*, 3(2), pp. 22-28.
- [84]. Gong A., Ge N., Yao W., Lu L., Liang H., 2014, RETRACTED ARTICLE: Aplysin enhances temozolomide sensitivity in glioma cells by increasing miR-181 level, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(3), pp. 531-538.
- [85]. Gong A.-j., Gong L.-l., Yao W.-c., Ge N., Lu L.-x., Liang H., 2014, Aplysin induces apoptosis in glioma cells through HSP90/AKT pathway, *Experimental Biology and Medicine*, 240(5), pp. 639-644.
- [86]. Bouaicha N., Pesando D., Puel D., Tringali C., 1993, Cytotoxic diterpenoids from the brown alga *Dilophus ligulatus*, *Journal of Natural Products*, 56(10), pp. 1747-1752.

- [87]. Fernández J., Souto M.L., Norte M., 1998, Evaluation of the cytotoxic activity of polyethers isolated from Laurencia, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(12), pp. 2237-2243.
- [88]. Mun B., Wang W., Kim H., Hahn D., Yang I., Won D.H., Kim E.-h., Lee J., Han C., Kim H., Ekins M., Nam S.-J., Choi H., Kang H., 2015, Cytotoxic 5 α ,8 α -epidioxy sterols from the marine sponge *Monanchora* sp, *Archives of Pharmacal Research*, 38(1), pp. 18-25.
- [89]. Clark K.E., Capper A., Della Togna G., Paul V.J., Romero L.I., Johns T., Cubilla-Rios L., Capson T.L., 2013, Ecology- and bioassay-guided drug discovery for treatments of tropical parasitic disease: 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol isolated from the mollusk *Dolabrifera dolabrifera* shows significant activity against *Leishmania donovani*, *Nat Prod Commun*, 8(11), pp. 1537-1540.
- [90]. Yamada K., Ojika M., Kigoshi H., Suenaga K., 2010, Cytotoxic substances from two species of Japanese sea hares: chemistry and bioactivity, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(3), pp. 176-189.
- [91]. Vairappan C.S., Daitoh M., Suzuki M., Abe T., Masuda M., 2001, Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian Laurencia species, *Phytochemistry*, 58(2), pp. 291-297.
- [92]. König G.M., Wright A.D., 1997, Laurencia rigida: Chemical Investigations of Its Antifouling Dichloromethane Extract, *Journal of Natural Products*, 60(10), pp. 967-970.
- [93]. Vairappan C.S., 2003, Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, Laurencia majuscula (Rhodomelaceae, Ceramiales), *Biomolecular Engineering*, 20(4), pp. 255-259.
- [94]. J. J., A.J. B., B.W. S., A.H. W., 2002, Chemical Relationships between the Sea Hare *Aplysia parvula* and the Red Seaweed Laurencia filiformis from Tasmania, *Australian journal of chemistry*, 55(4), pp. 275-280.
- [95]. Tsukamoto S., Yamashita Y., Ohta T., 2005, New Cytotoxic and Antibacterial Compounds Isolated from the Sea Hare, *Aplysia kurodai*, *Marine Drugs*, 3(2), pp.
- [96]. Othmani A., Bouzidi N., Viano Y., Alliche Z., Seridi H., Blache Y., El Hattab M., Briand J.-F., Culioli G., 2014, Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean Dictyota spp, *Journal of Applied Phycology*, 26(3), pp. 1573-1584.
- [97]. Santos A.O.d., Veiga-Santos P., Ueda-Nakamura T., Filho B.P.D., Sudatti D.B., Bianco É.M., Pereira R.C., Nakamura C.V., 2010, Effect of Elatol, Isolated from Red Seaweed Laurencia dendroidea, on *Leishmania amazonensis*, *Marine Drugs*, 8(11), pp. 2733-2743.
- [98]. Bianco E.M., Pires L., Santos G.K.N., Dutra K.A., Reis T.N.V., Vasconcelos E.R.T.P.P., Cocentino A.L.M., Navarro D.M.A.F., 2013, Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*), *Industrial Crops and Products*, 43, pp. 270-275.
- [99]. Kimura J., Kamada N., Tsujimoto Y., 1999, Fourteen Chamigrane Derivatives from a Red Alga, Laurencia nidifica, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 72(2), pp. 289-292.

- [100]. Ge N., Liang H., Liu Y., Ma A.-g., Han L., 2013, Protective effect of Aplysin on hepatic injury in ethanol-treated rats, *Food and Chemical Toxicology*, 62, pp. 361-372.
- [101]. Tsukamoto S., Yamashita Y., Yoshida T., Ohta T., 2004, Parguerol and Isoparguerol Isolated from the Sea Hare, *Aplysia kurodai*, Induce Neurite Outgrowth in PC-12 Cells, *Marine Drugs*, 2(4), pp.
- [102]. Huong P.T.M., Phong N.V., Huong N.T., Trang D.T., Thao D.T., Cuong N.X., Nam N.H., Van Thanh N., 2022, Aplydactylonins A-C, three new sesquiterpenes from the Vietnamese sea hare *Aplysia dactylomela* and their cytotoxicity, *Journal of Natural Medicines*, 76(1), pp. 210-219.
- [103]. Binh P.T., Trang D.T., Thao N.P., Mai N.C., Cuong N.X., Nam N.H., Van Thanh N., 2022, Structure elucidation of new brominated sesquiterpenes from the sea hare *Aplysia dactylomela* by experimental and DFT computational methods, *Journal of Molecular Structure*, pp. 132744.
- [104]. Borradaile, Potts L.F., 1932, The Invertebrata, *A Manual for the Use of Students. London: Cambridge University Press*, pp.
- [105]. E. T.T., Brown G.H., 1984, Biology of Opisthobranch Molluscs *British Museum of Natural History, London*, 2, pp.
- [106]. MacFarland F., 1909, The Opisthobranchiate Mollusca of the Branner-Agassiz expedition to Brazil, *Stanford University, California*, pp.
- [107]. Farmer W., 1970, Swimming gastropods (opisthobranchia and prosobranchia), *The Veliger*, 13(1), pp. 73-89.
- [108]. Plaut I., 1993, Ecology and ecophysiology of the sea hare *Aplysia oculifera* (Adams and Reeve, 1850) in the Gulf of Eilat (Aqaba), *Ph. D, thesis, Hebrew University, Jerusalem (in Hebrew with English abstract)*, pp.
- [109]. Faulkner D.J., 1984, Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs, *Natural Product Reports*, 1(3), pp. 251-280.
- [110]. Ortega M.J., Zubía E., Salvá J., 1997, A New Cladiellane Diterpenoid from *Eunicella labiata*, *Journal of Natural Products*, 60(5), pp. 485-487.
- [111]. Cannell R.J.P. *Natural products isolation*, Springer Science & Business Media, 1998.
- [112]. Pescitelli G., Bruhn T., 2016, Good computational practice in the assignment of absolute configurations by TDDFT calculations of ECD spectra, *Chirality*, 28(6), pp. 466-474.
- [113]. Zanardi M.M., Sarotti A.M., 2021, Sensitivity analysis of DP4+ with the probability distribution terms: Development of a universal and customizable method, *The Journal of Organic Chemistry*, 86(12), pp. 8544-8548.
- [114]. Grimblat N., Zanardi M.M., Sarotti A.M., 2015, Beyond DP4: An improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts, *The Journal of Organic Chemistry*, 80(24), pp. 12526-12534.
- [115]. Sarotti A.M., Pellegrinet S.C., 2009, A multi-standard approach for GIAO 13C NMR calculations, *The Journal of Organic Chemistry*, 74(19), pp. 7254-7260.
- [116]. Li J., Liu J.-K., Wang W.-X., 2020, GIAO 13C NMR Calculation with Sorted Training Sets Improves Accuracy and Reliability for Structural Assignment, *J. Org. Chem.*, 85(17), pp. 11350-11358.

- [117]. Scudiero D., Shoemaker R., Paull K., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M., Seniff D., Boyd M., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer research*, 48 17, pp. 4827-4833.
- [118]. Mbaveng A.T., Damen F., Simo Mpetga J.D., Awouafack M.D., Tane P., Kuete V., Efferth T., 2019, Cytotoxicity of Crude Extract and Isolated Constituents of the *Dichrostachys cinerea* Bark towards Multifactorial Drug-Resistant Cancer Cells, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, pp. 8450158.
- [119]. Davyt D., Fernandez R., Suescun L., Mombrú A.W., Saldaña J., Domínguez L., Coll J., Fujii M.T., Manta E., 2001, New Sesquiterpene Derivatives from the Red Alga *Laurencia scoparia*. Isolation, Structure Determination, and Anthelmintic Activity, *Journal of Natural Products*, 64(12), pp. 1552-1555.
- [120]. Francisco M.E.Y., Turnbull M.M., Erickson K.L., 1998, Cartilagineol, the fourth lineage of *Laurencia*-derived polyhalogenated chamigrene, *Tetrahedron Letters*, 39(30), pp. 5289-5292.
- [121]. Juagdan E.G., Kalidindi R., Scheuer P., 1997, Two new chamigranes from an hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*, *Tetrahedron*, 53(2), pp. 521-528.
- [122]. Gonzalez A.G., Martín J.D., Norte M., P´erez R., Weyler V., Perales A., Fayos J., 1983, New halogenated constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron Letters*, 24, pp. 847-848.
- [123]. Hu Z.-B., Yu X.-Q., Wang B., Liu A.-H., Zhao T.-S., Guo Y.-W., Huang H.-L., Mao S.-C., 2020, Structurally diverse halosesquiterpenoids from the red alga *Laurencia composita* Yamada, *Fitoterapia*, 146, pp. 104716.
- [124]. Li X.-D., Miao F.-P., Liang X.-R., Wang B.-G., Ji N.-Y., 2013, Two halosesquiterpenes from *Laurencia composita*, *RSC Advances*, 3(6), pp. 1953-1956.
- [125]. Fukuda M., Ohkoshi E., Makino M., Fujimoto Y., 2006, Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(10), pp. 1465-1468.
- [126]. Fraga B.M., 2007, Natural sesquiterpenoids, *Natural Product Reports*, 24(6), pp. 1350-1381.
- [127]. Brennan M.R., Erickson K.L., Minott D.A., Pascoe K.O., 1987, Chamigrane metabolites from a Jamaican variety of *Laurencia obtusa*, *Phytochemistry*, 26(4), pp. 1053-1057.
- [128]. Veiga-Santos P., Pelizzaro-Rocha K.J., Santos A.O., Ueda-Nakamura T., Filho B.P.D., Silva S.O., Sudatti D.B., Bianco E.M., Pereira R.C., Nakamura C.V., 2010, In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, *Parasitology*, 137(11), pp. 1661-1670.
- [129]. Bansemir A., Just N., Michalik M., Lindequist U., Lalk M., 2004, Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria, *Chemistry & biodiversity*, 1(3), pp. 463-467.

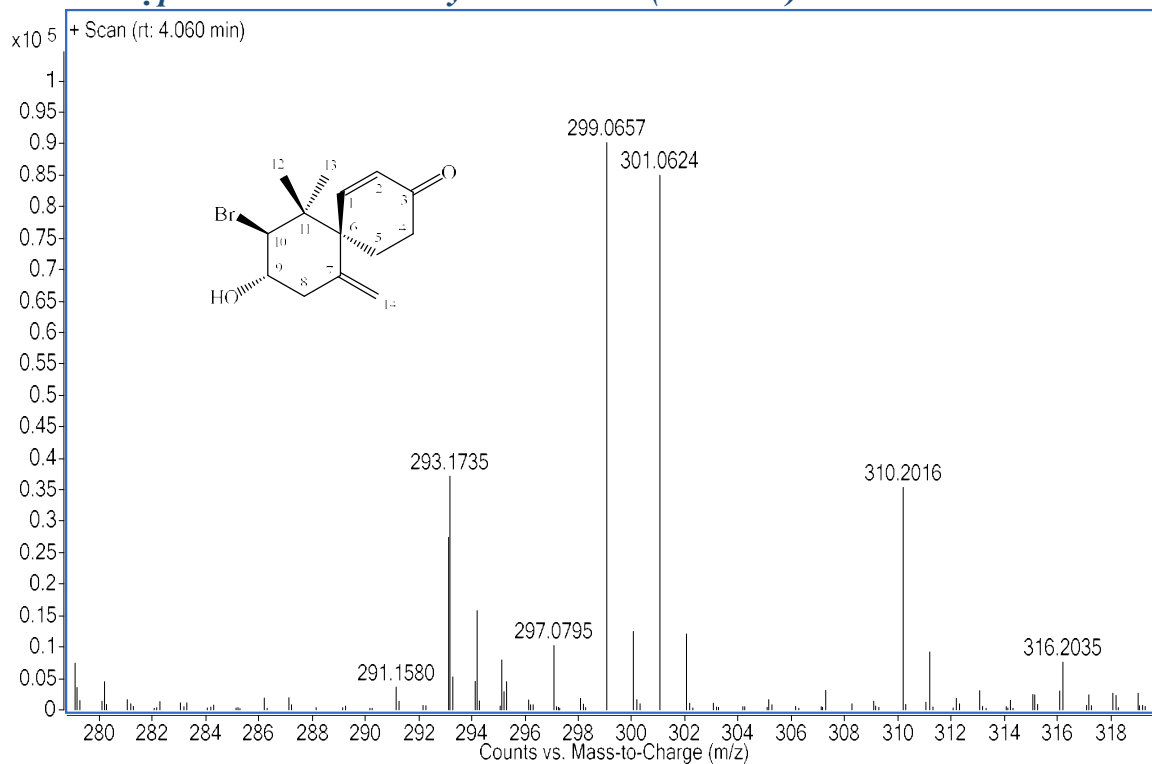
- [130]. Chen J.Y., Huang C.Y., Lin Y.S., Hwang T.L., Wang W.L., Chiou S.F., Sheu J.H., 2016, Halogenated Sesquiterpenoids from the Red Alga *Laurencia tristicha* Collected in Taiwan, *J Nat Prod*, 79(9), pp. 2315-2323.
- [131]. Schmitz F.J., Gopichand Y., Michaud D.P., Prasad R.S., Remaley S., Hossain M.B., Rahman A., Sengupta P.K., Helm D.v.d., 1981, Recent developments in research on metabolites from Caribbean marine invertebrates, *Pure and Applied Chemistry*, 53(4), pp. 853-865.
- [132]. Nocchi N., Soares A.R., Souto M.L., Fernández J.J., Martin M.N., Pereira R.C., 2017, Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliana*, *PLoS One*, 12(11), pp. e0187126.
- [133]. Coll J., Wright A., 1989, Tropical Marine Algae. III. New Sesquiterpenes From *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae), *Australian Journal of Chemistry*, 42(9), pp. 1591-1603.
- [134]. Bohlmann F., Zdero C., 1976, Neue eudesman-derivate aus *Isocoma wrightii*, *Phytochemistry*, 15(6), pp. 1075-1076.
- [135]. Lodewyk M.W., Siebert M.R., Tantillo D.J., 2012, Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry, *Chemical Reviews*, 112(3), pp. 1839-1862.
- [136]. Blunt J.W., Hartshorn M.P., McLennan T.J., Munro M.H.G., Robinson W.T., Yorke S.C., 1978, Thysiferol: a squalene-derived metabolite of *laurencia thysifera*, *Tetrahedron Lett*, 19(1), pp. 69-72.
- [137]. Cen-Pacheco F., Mollinedo F., Villa-Pulgarín J.A., Norte M., Fernández J.J., Hernández Daranas A., 2012, Saiyacenols A and B: the key to solve the controversy about the configuration of aplysiols, *Tetrahedron*, 68(36), pp. 7275-7279.
- [138]. Bian W.-T., You Z.-J., Wang C.-Y., Shao C.-L., 2014, Brominated Pimarane Diterpenoids from the sea Hare *Aplysia pulmonica* from the South China Sea, *Chemistry of Natural Compounds*, 50(3), pp. 557-559.
- [139]. Dias T., Brito I., Moujir L., Paiz N., Darias J., Cueto M., 2005, Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*, *J Nat Prod*, 68(11), pp. 1677-1679.
- [140]. Little R.D., Nishiguchi G.A., 2008, Synthetic efforts toward, and biological activity of, thysiferol and structurally-related analogues, *Studies in natural products chemistry*, 35, pp. 3-56.

PHỤ LỤC

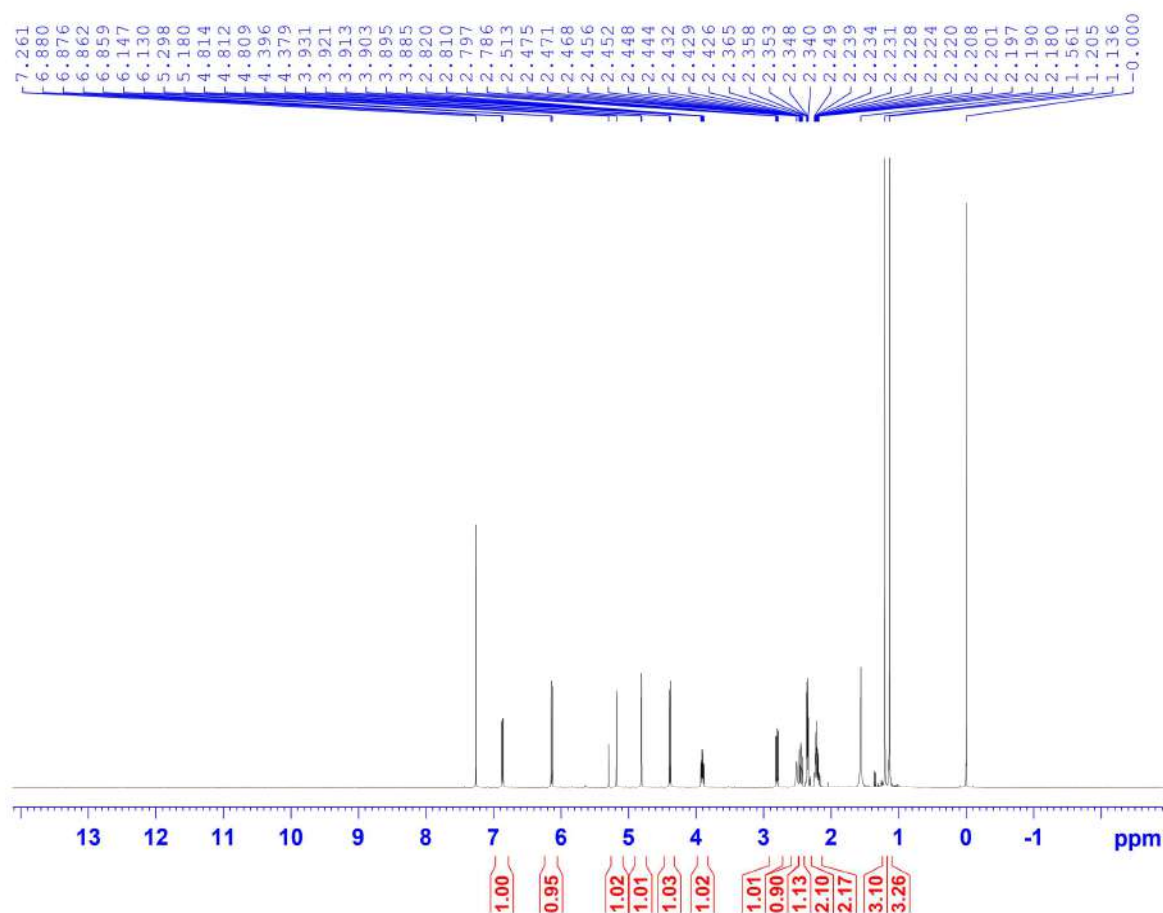
1. Bộ phổ của 16 chất phân lập từ mẫu sên <i>A. dactylomela</i>	2
1.1. Phổ hợp chất ADA01: Dactylomelanin C (chất mới)	2
1.2. Phổ hợp chất ADA02: Dactylomelanin D (chất mới)	5
1.3. Phổ hợp chất ADA03: Dactylomelanin E (chất mới)	9
1.4. Phổ hợp chất ADA04: (2S,3R,7S,7R)-2-chloro-3,7-epoxyhamigrane-9-one	12
1.5. Phổ hợp chất ADB01: Elatol	14
1.6. Phổ hợp chất ADB02: Aplydactylonin I (chất mới)	16
1.7. Phổ hợp chất ADB04: Aplydactylonin K (chất mới)	20
1.8. Phổ hợp chất ADB04: Aplydactylonin G (chất mới)	23
1.9. Phổ hợp chất ADB05: Aplydactylonin H (chất mới)	27
1.10. Phổ hợp chất ADB06: Aplydactylonin F (chất mới)	30
1.11. Phổ hợp chất ADB07: Aplydactylonin E (chất mới)	34
1.12. Phổ hợp chất ADB08: [3(15)E,4Z,6S,9S,10R]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol	37
1.13. Phổ hợp chất ADB09: Pacifidiene	39
1.14. Phổ hợp chất ADB10: 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon	42
1.15. Phổ hợp chất ADB11: Aplydactylonin D (chất mới)	46
1.16. Phổ hợp chất ADB12: Thysiferol	49
2. Bộ phổ các chất phân lập từ mẫu sên <i>A. oculifera</i>	52
2.1. Phổ hợp chất AOB01: Oculiferanin A (chất mới)	52
2.2. Phổ hợp chất AOB02: Oculiferanin B (chất mới)	59
2.3. Phổ hợp chất AOB03: Oculiferanin C (chất mới)	63
2.4. Phổ hợp chất AOB04: Oculiferanin D (chất mới)	67
2.5. Phổ hợp chất AOB05: Oculiferanin E (chất mới)	71
2.6. Phổ hợp chất AOB06: Oculiferanin F (chất mới)	74
2.7. Phổ hợp chất AOB07: Oculiferanin G (chất mới)	78
3. Kết quả tính toán NMR và ECD của hợp chất ADB11	82

1. Bộ phổ của 16 chất phân lập từ mẫu sên *A. dactylomela*

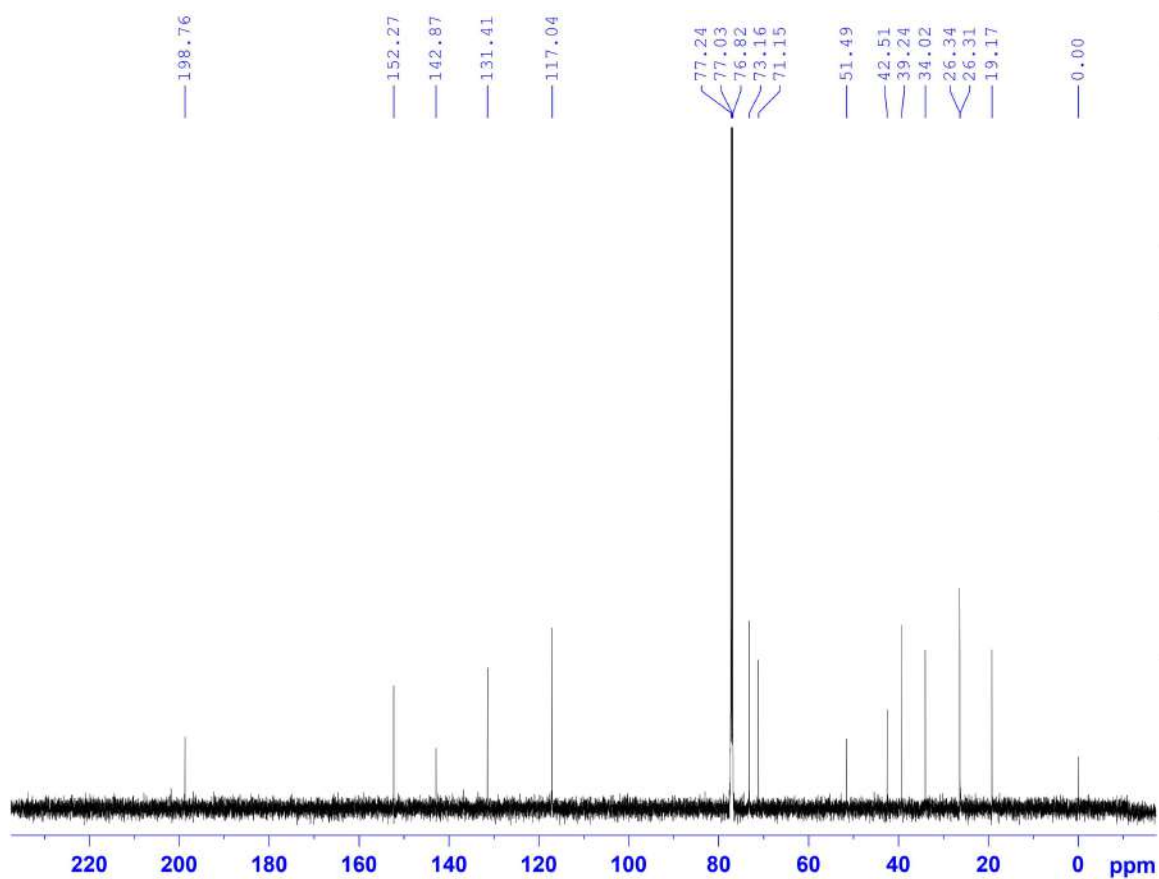
1.1. Phổ hợp chất ADA01: Dactylomelanin C (**chất mới**)



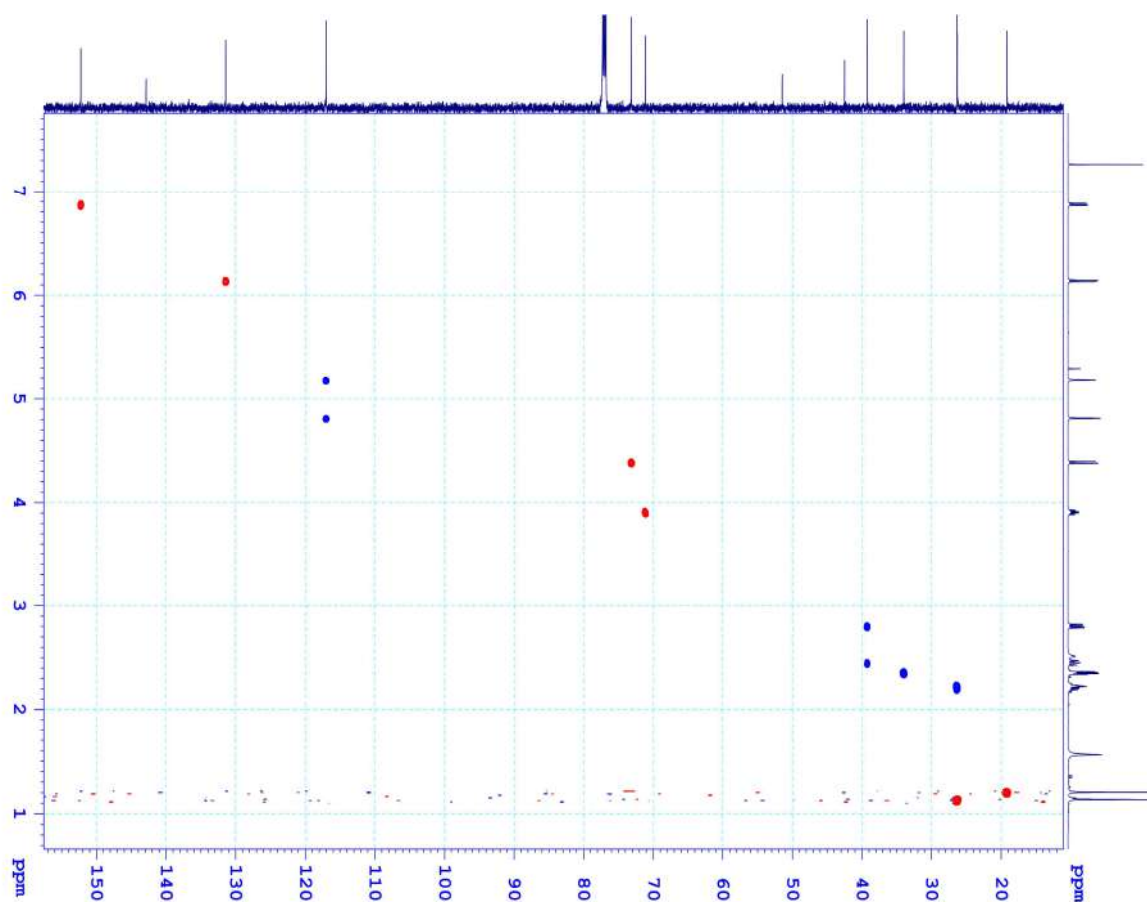
Hình D1.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



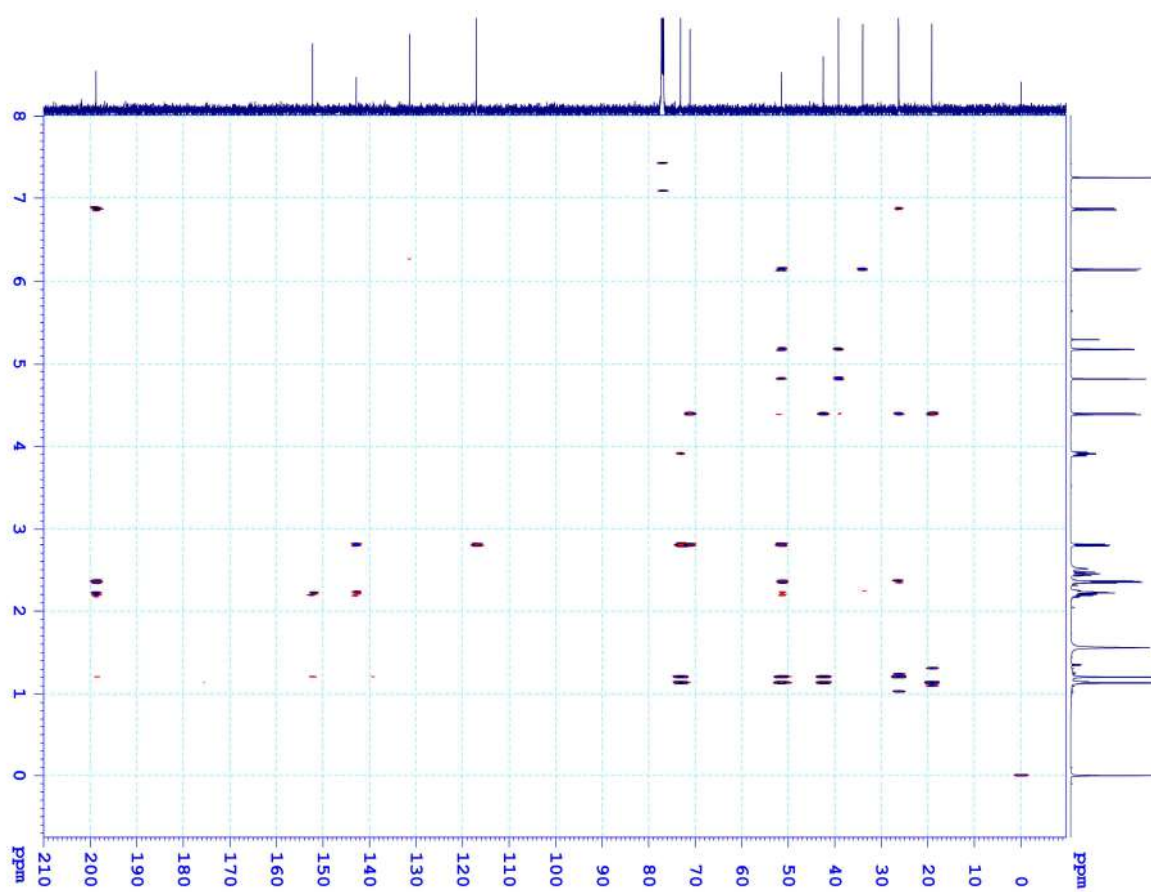
Hình D1.2. Phổ ¹H-NMR



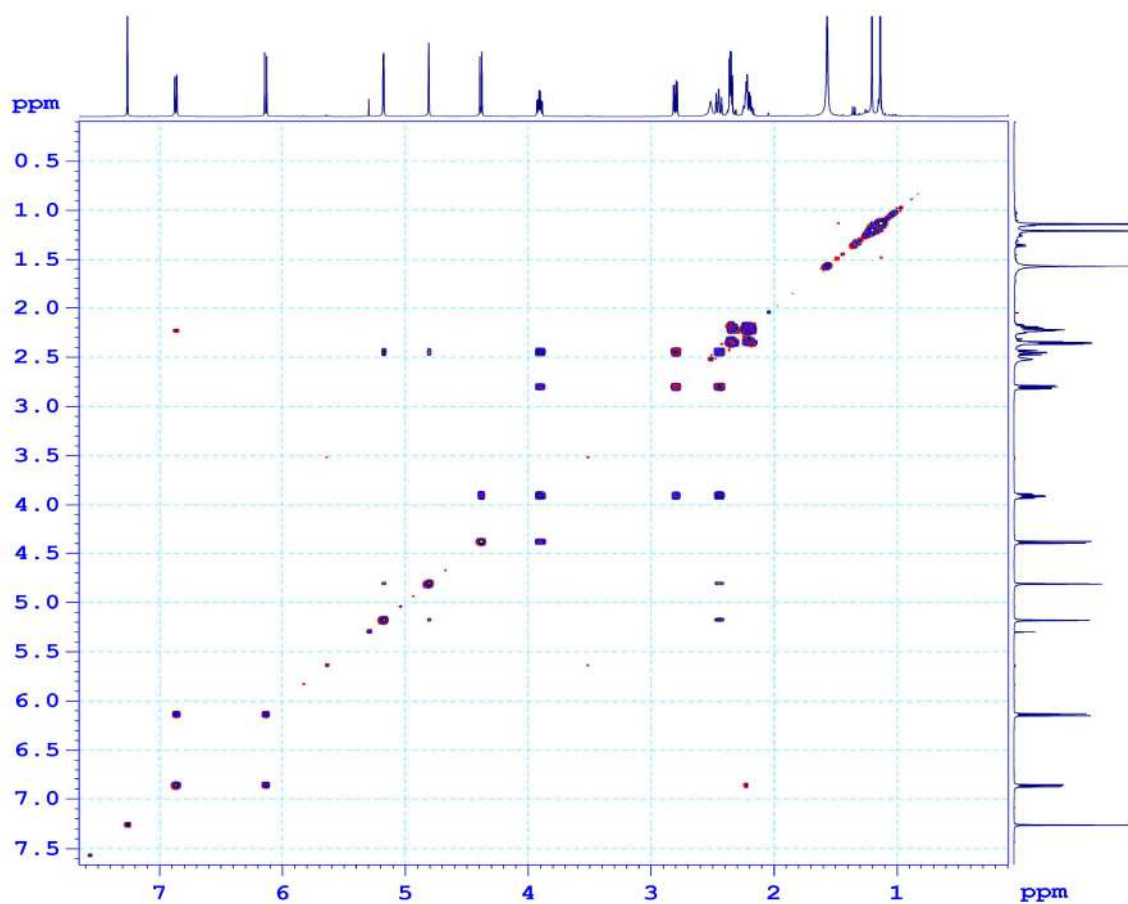
Hình D1.3. Phổ ^{13}C -NMR



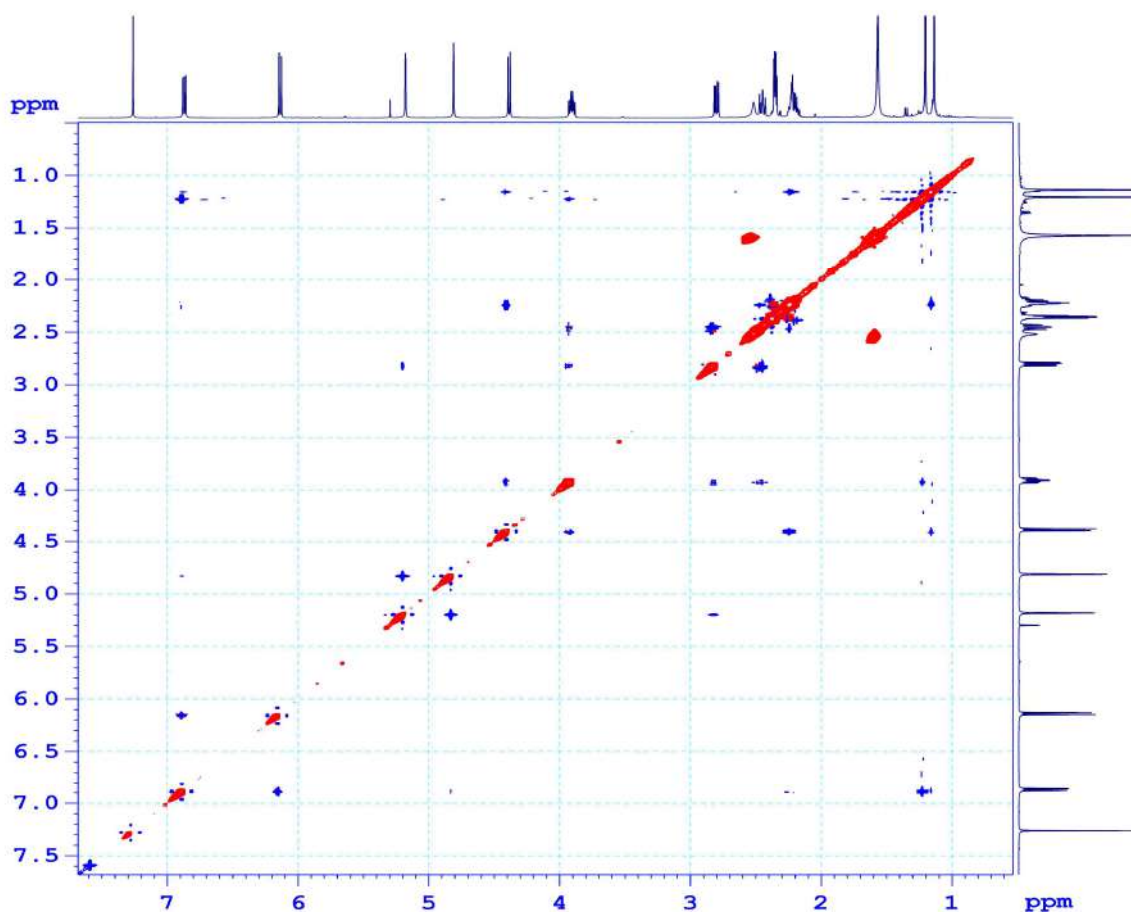
Hình D1.4. Phổ HSQC



Hình D1.5. Phổ HMBC

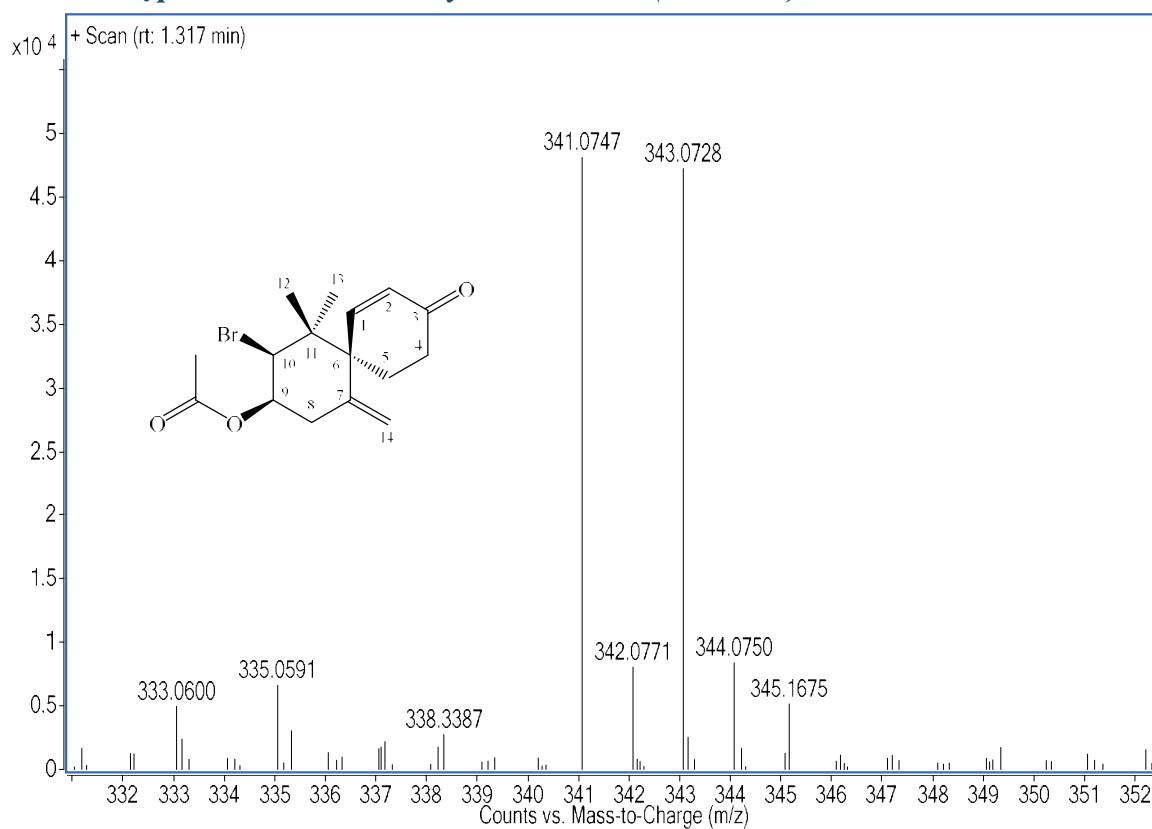


Hình D1.6. Phổ COSY

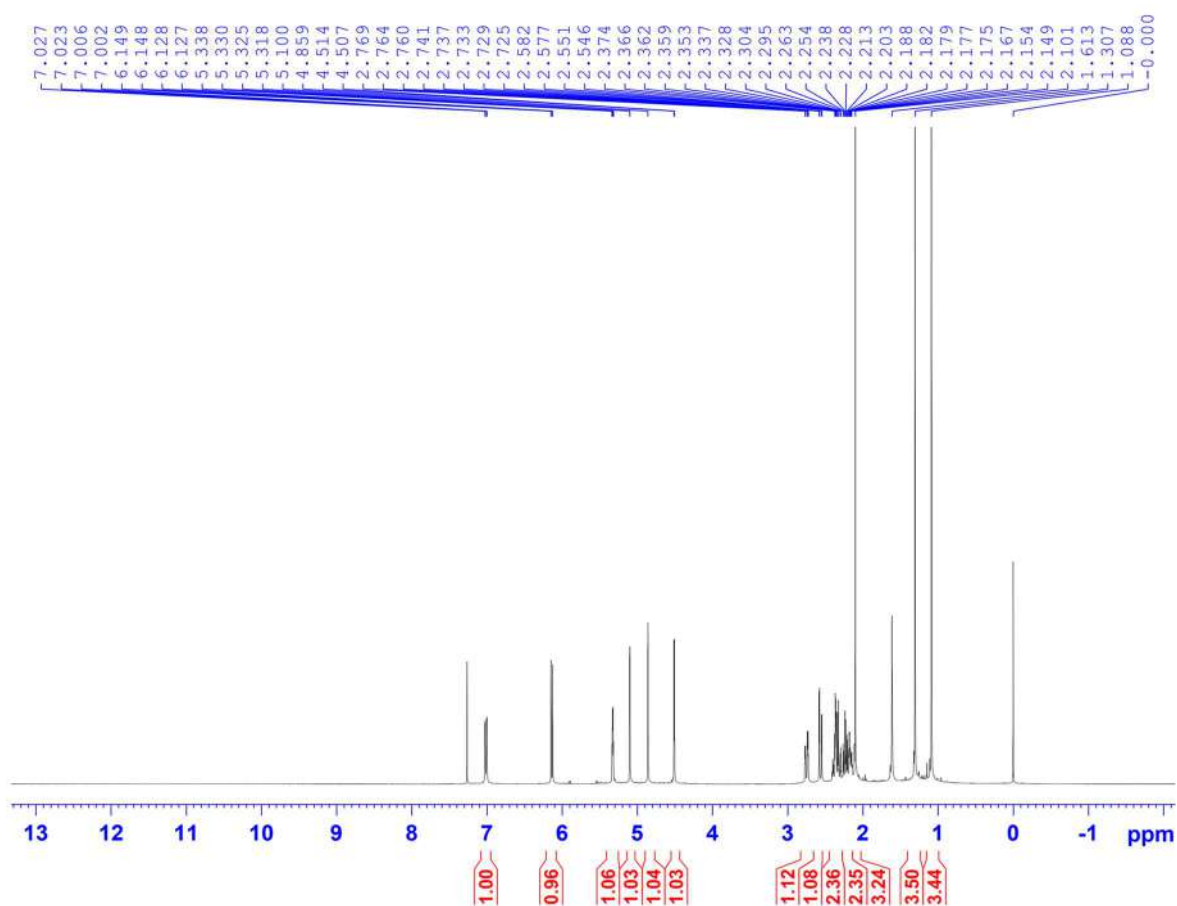


Hình D1.7. Phổ NOESY

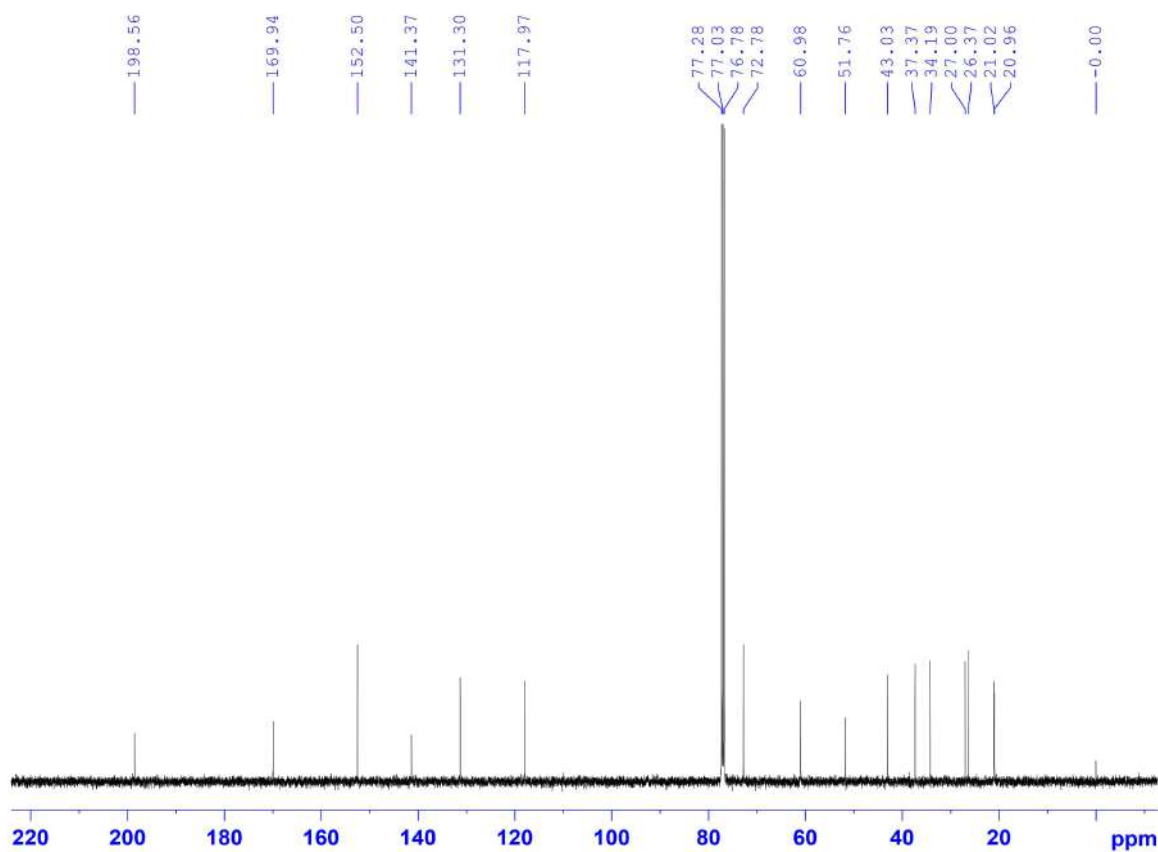
1.2. Phổ hợp chất ADA02: Dactylomelanin D (chất mới)



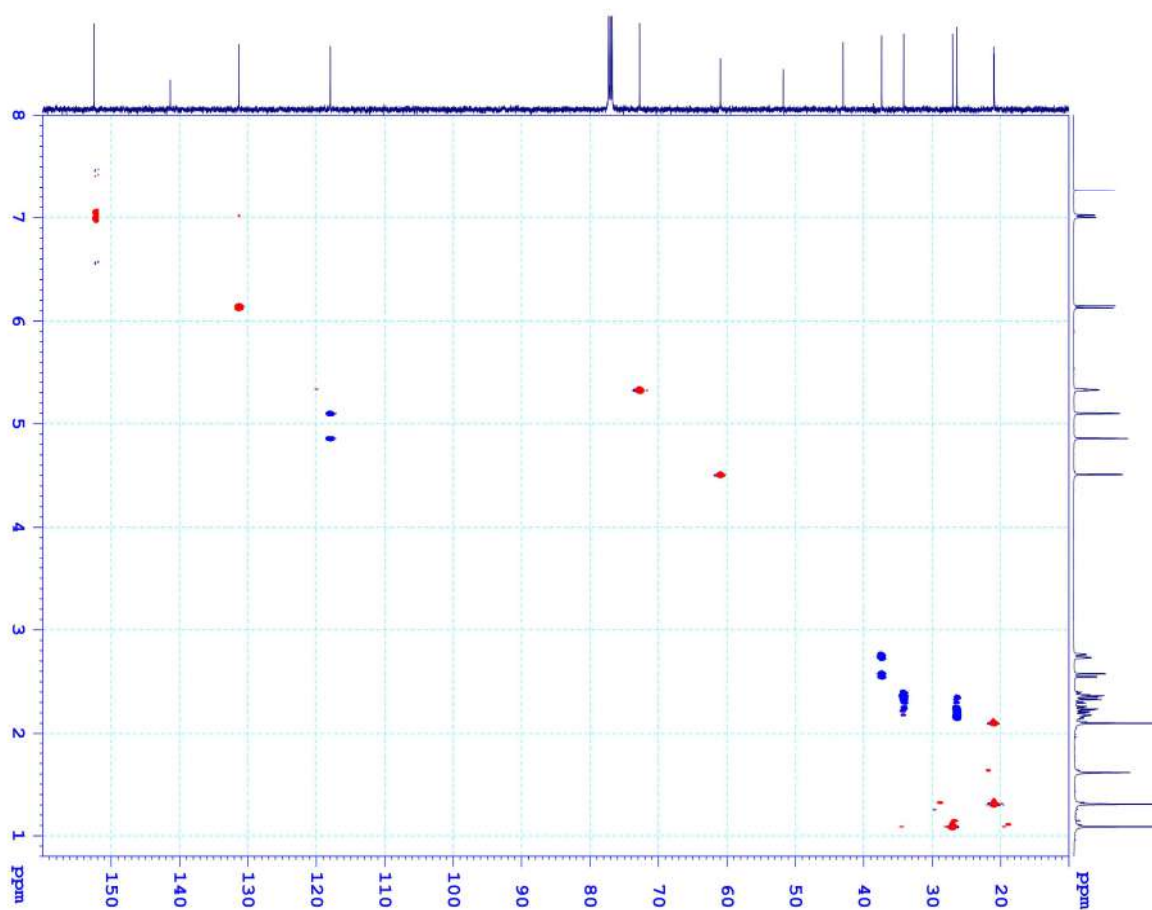
Hình D2.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



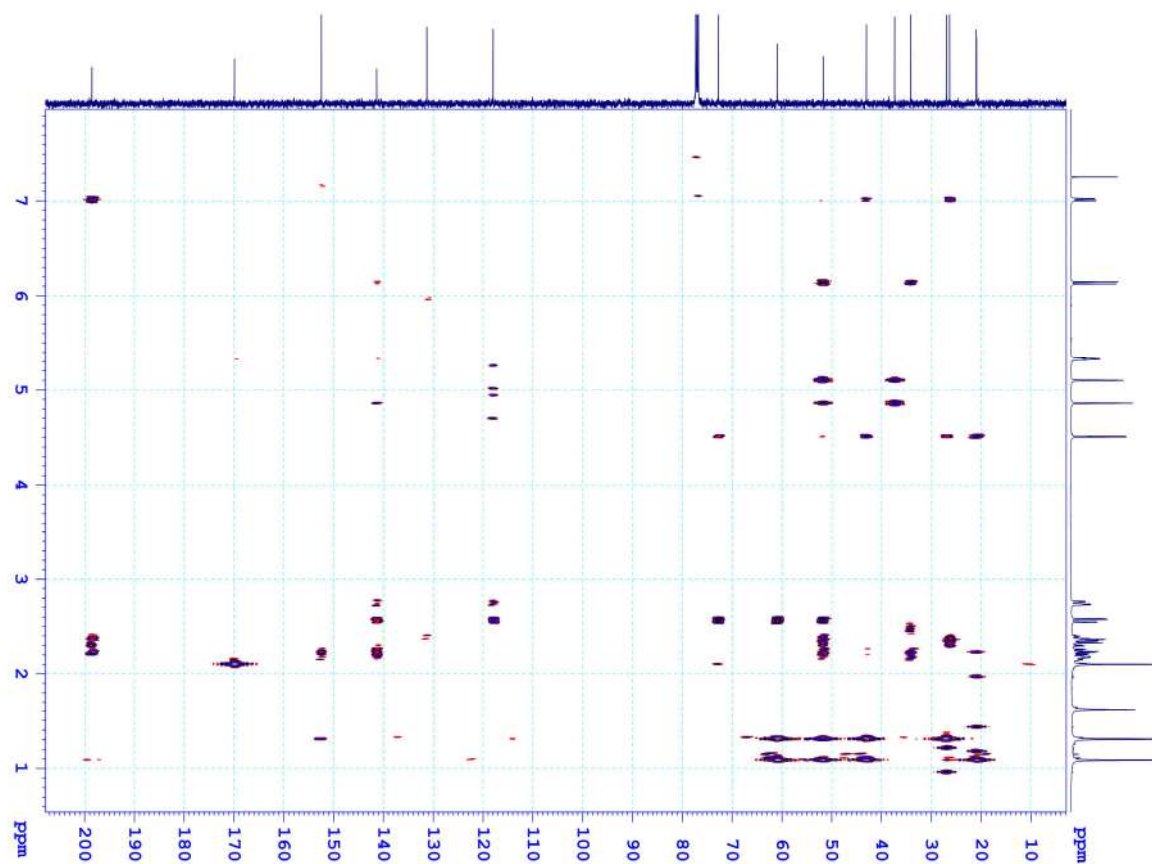
Hình D2.2. Phổ ^1H -NMR



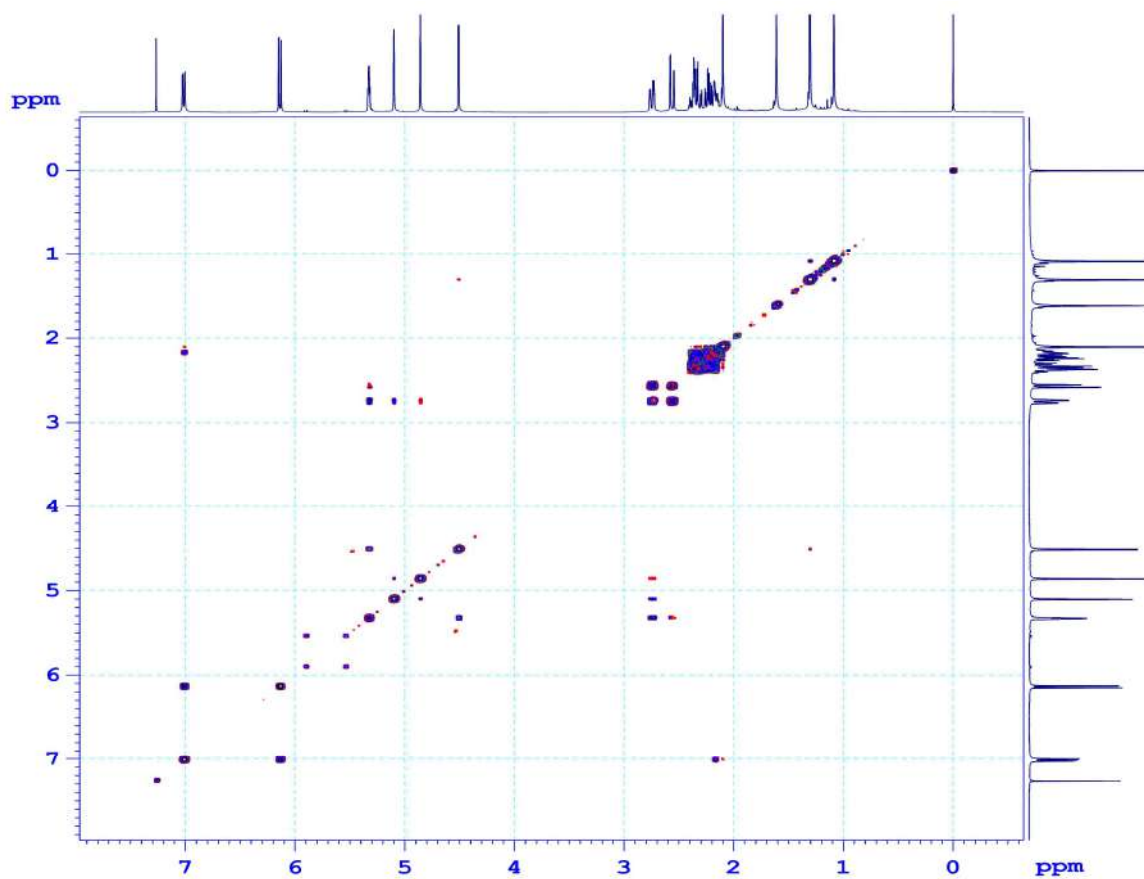
Hình D2.3. Phổ ^{13}C -NMR



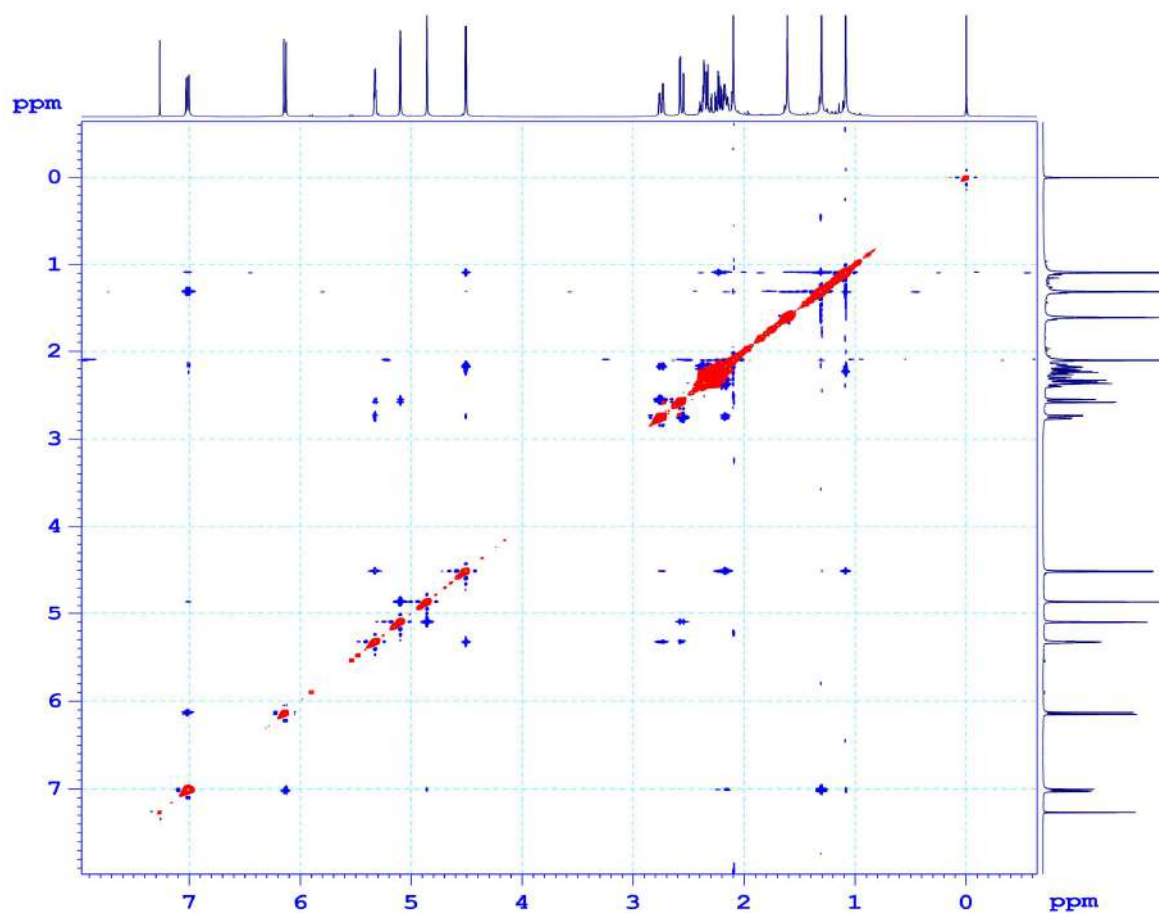
Hình D2.4. Phổ HSQC



Hình D2.5. Phổ HMBC

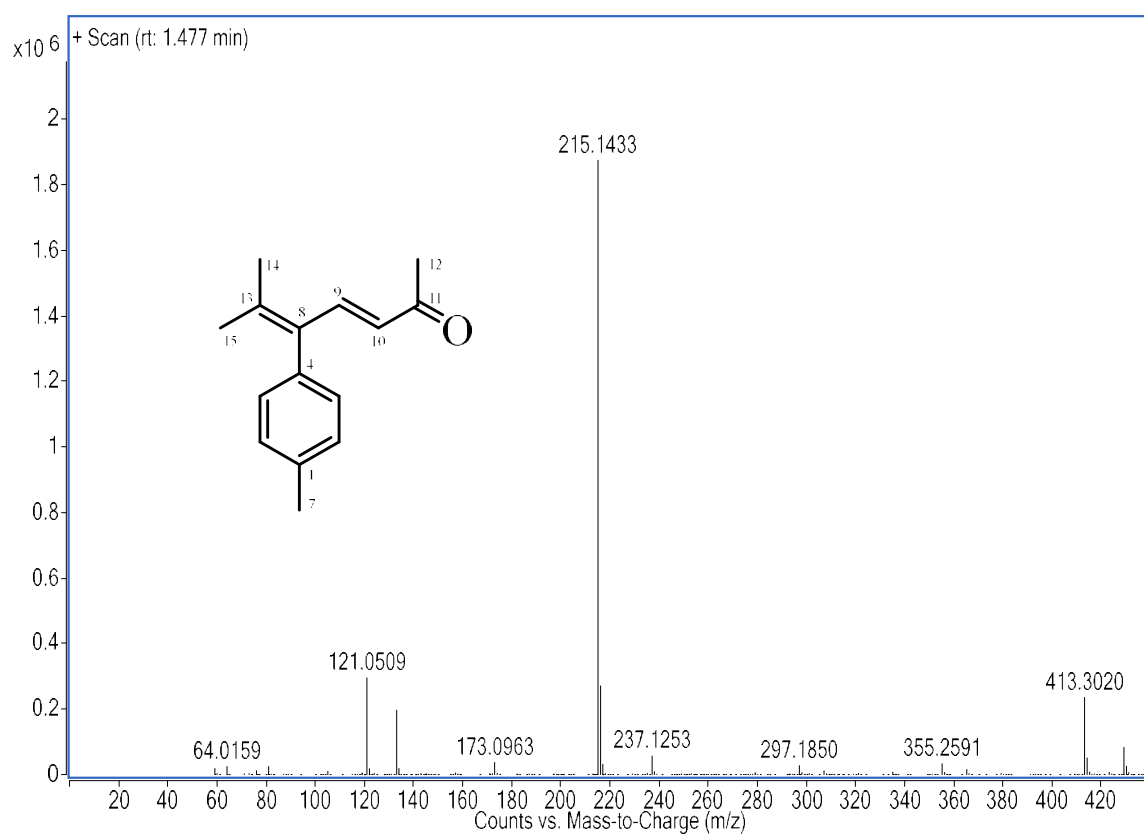


Hình D2.6. Phổ COSY

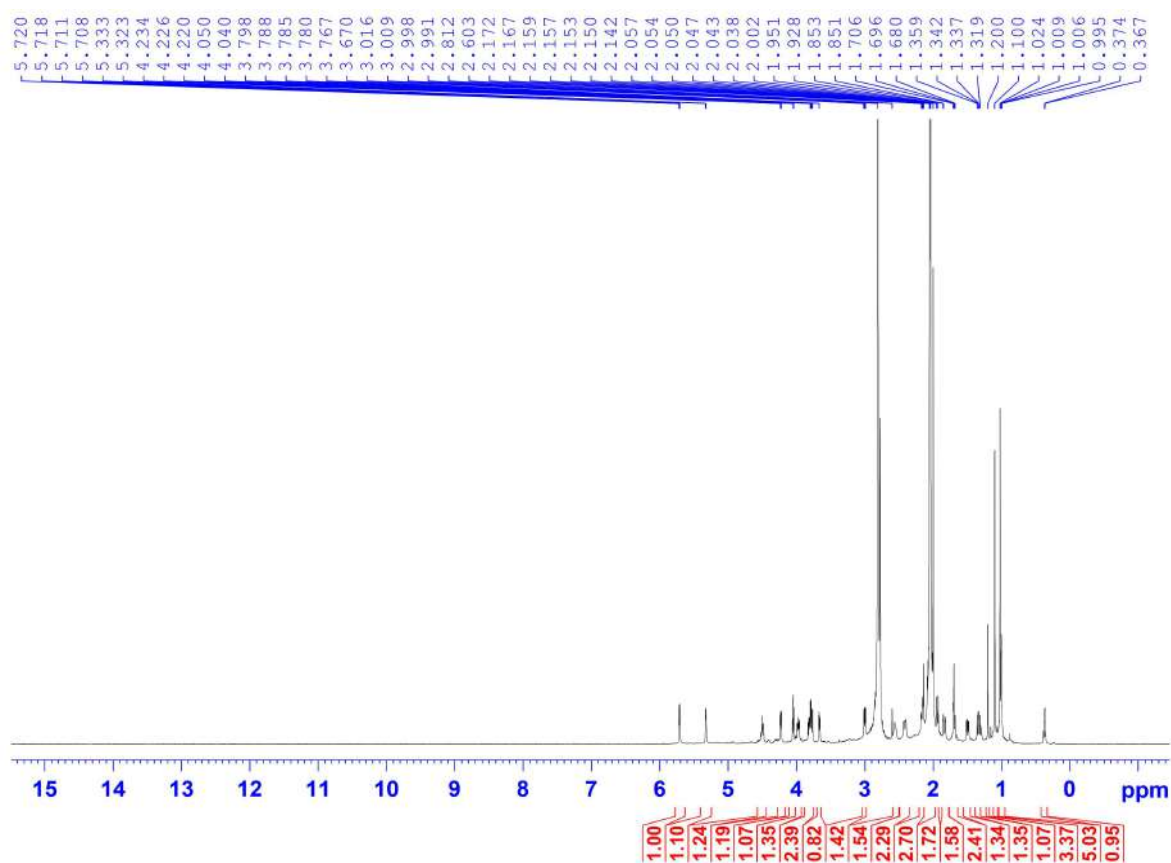


Hình D2.7. Phổ NOESY

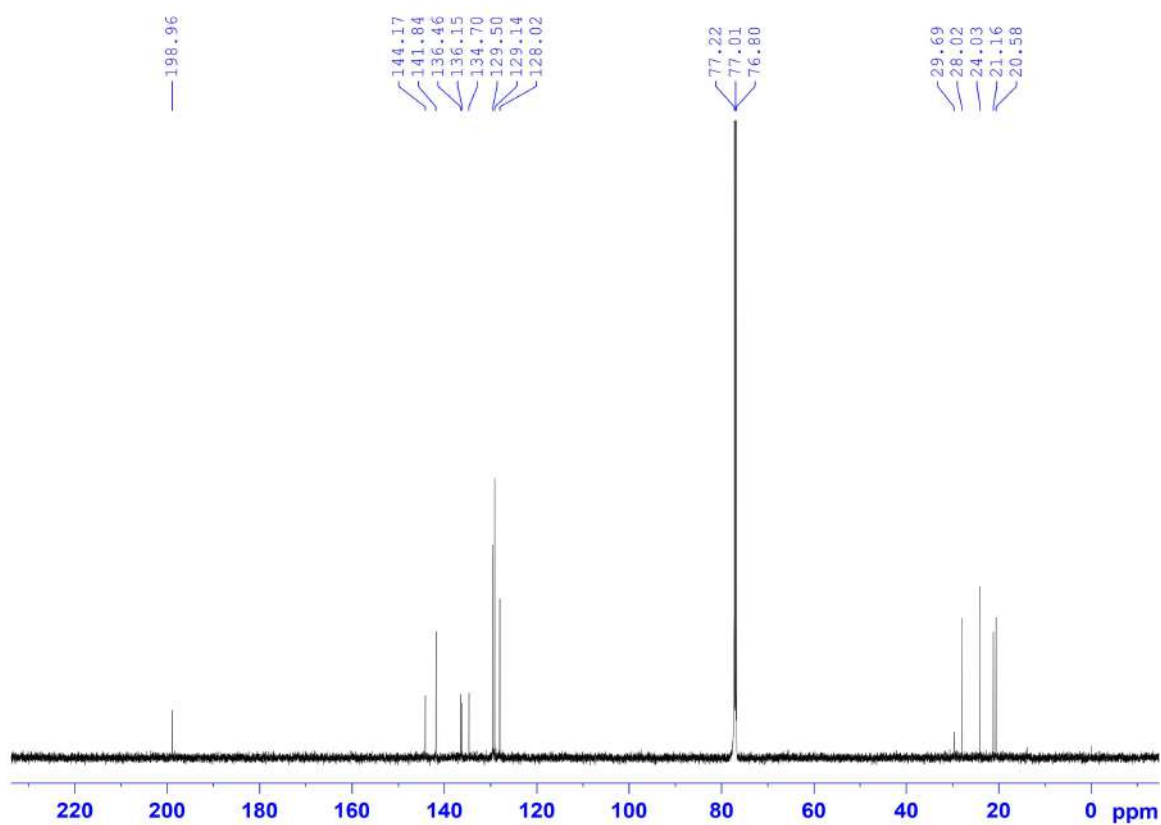
1.3. Phổ hợp chất ADA03: Dactylomelanin E (chất mới)



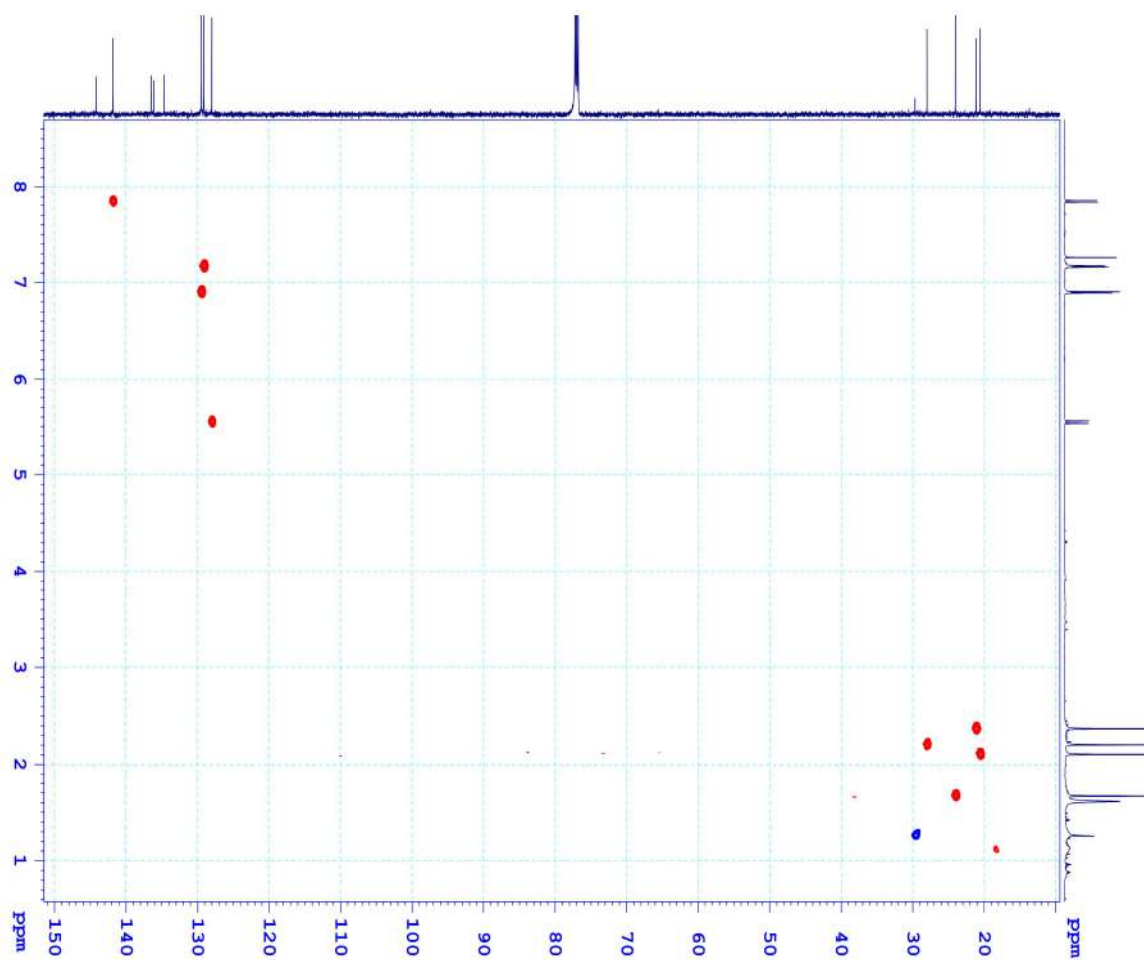
Hình D3.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



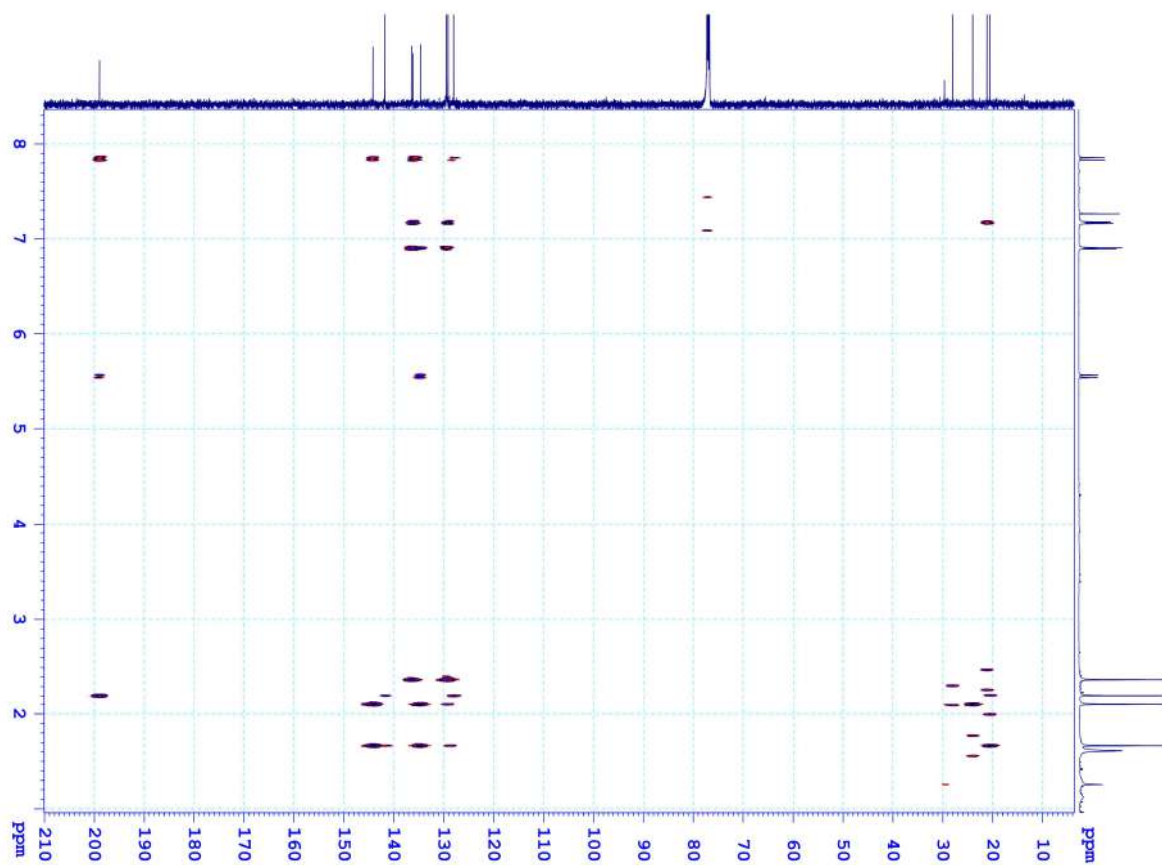
Hình D3.2. Phổ ¹H-NMR



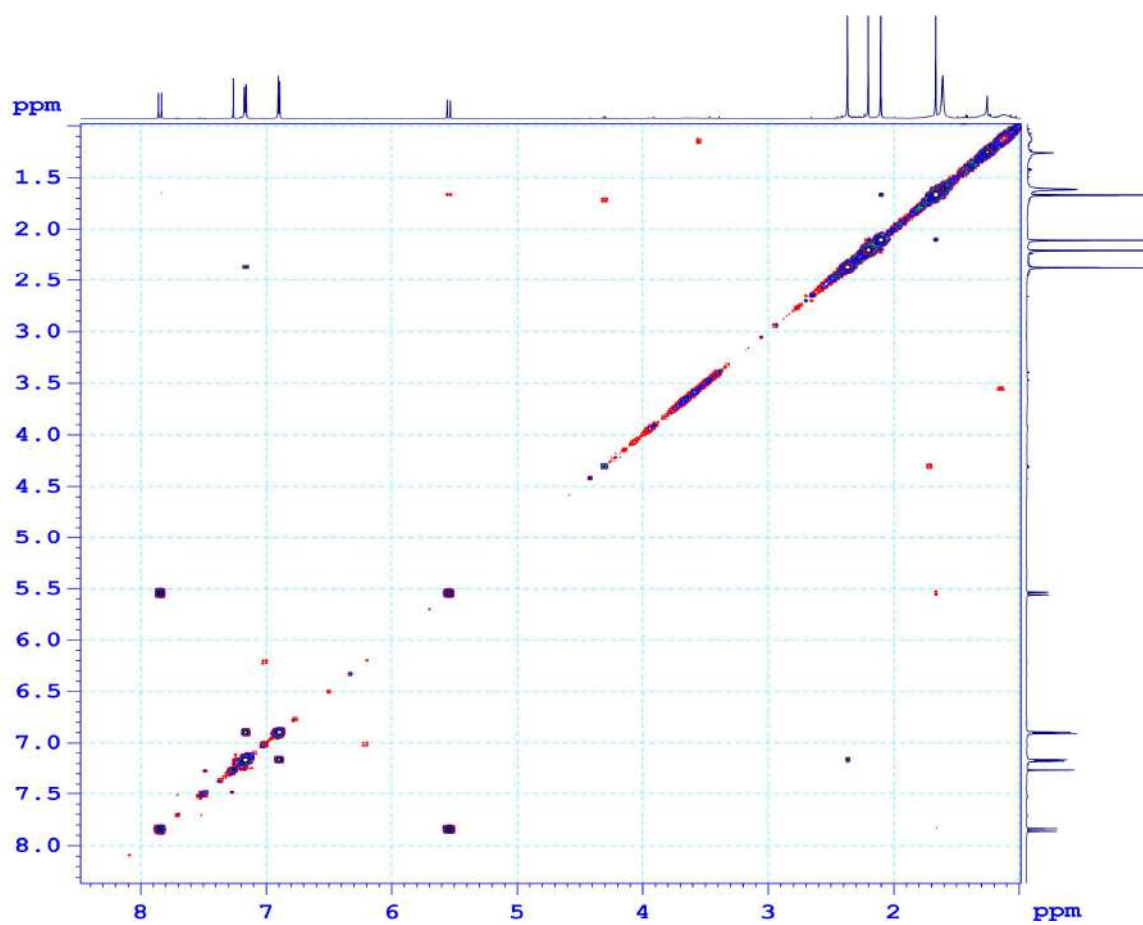
Hình D3.3. Phổ ^{13}C -NMR



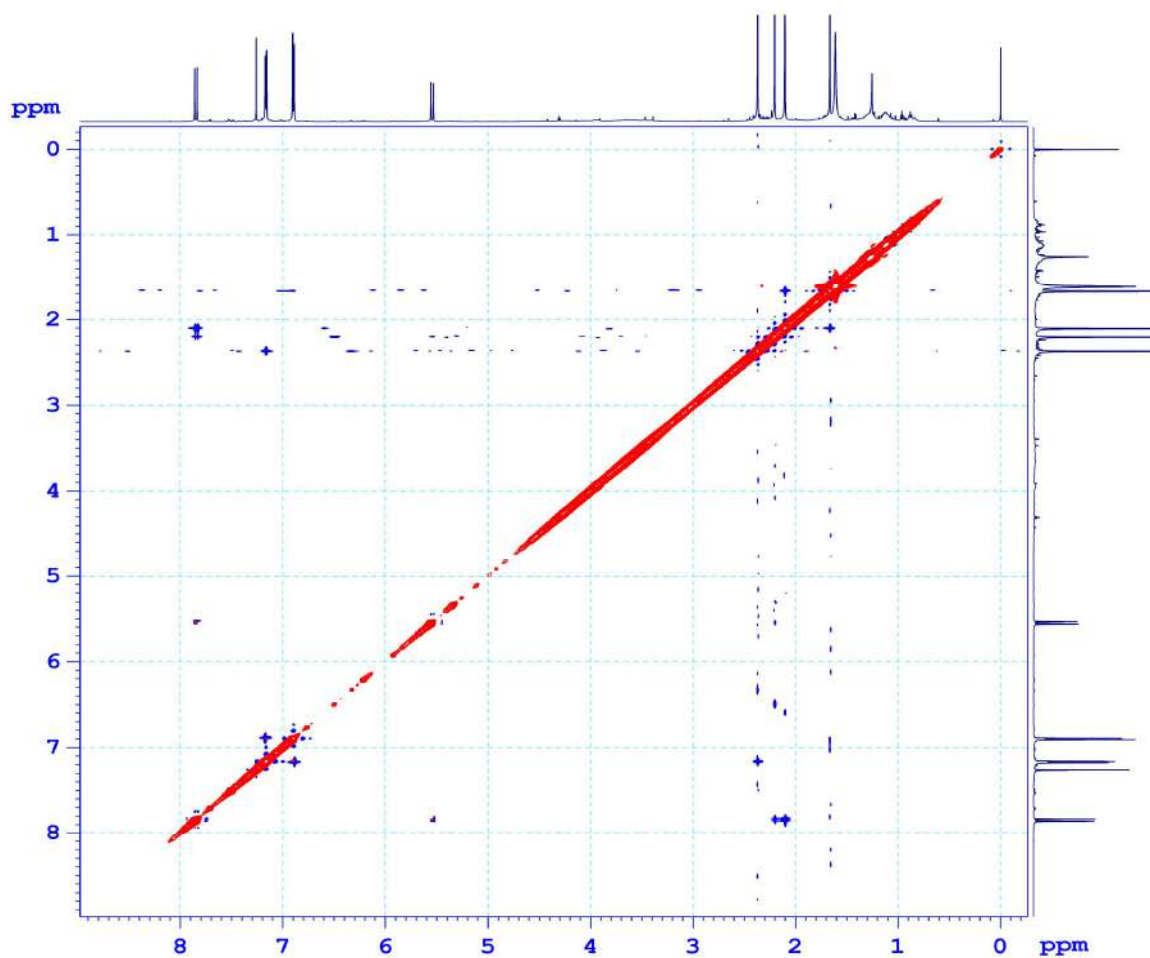
Hình D3.4. Phổ HSQC



Hình D3.5. Phổ HMBC

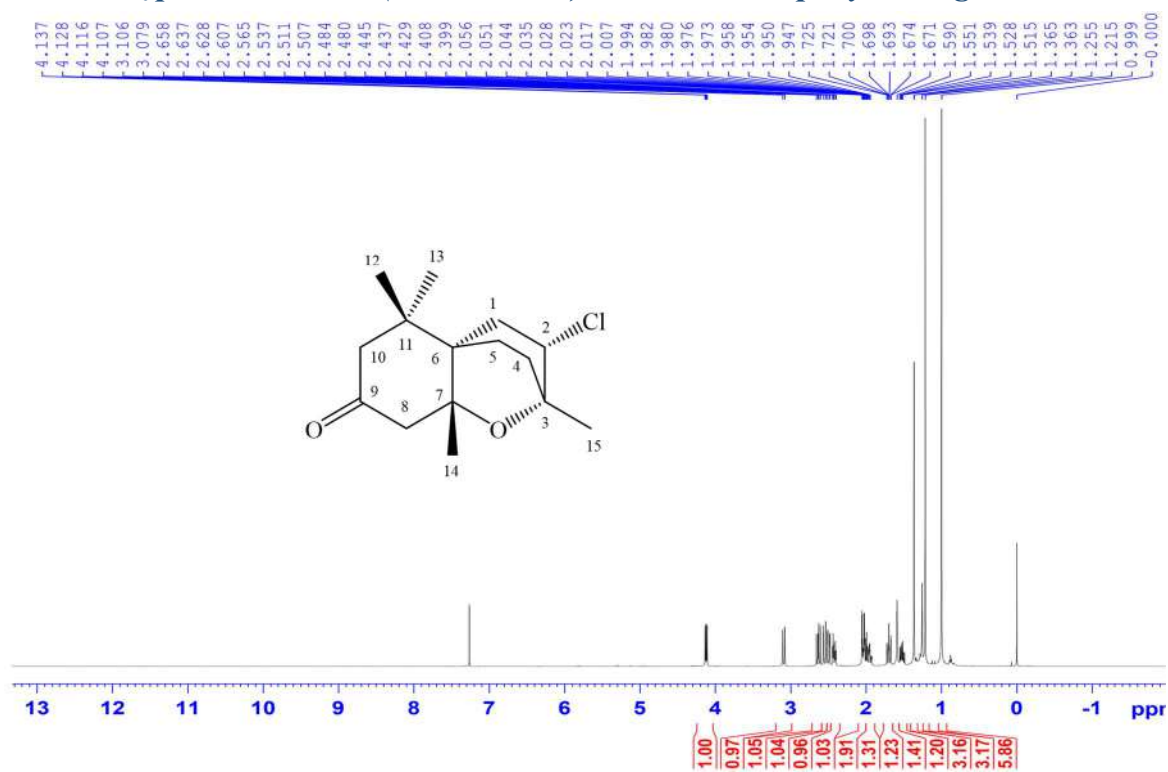


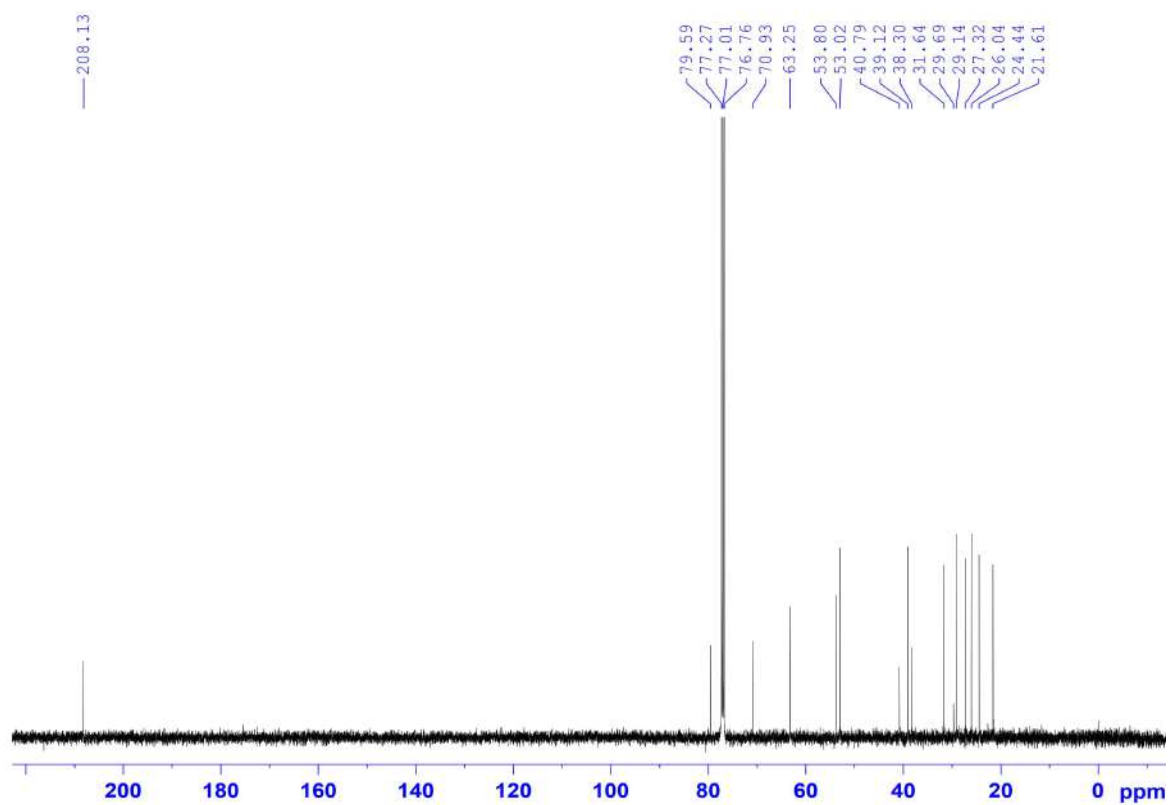
Hình D3.6. Phổ COSY



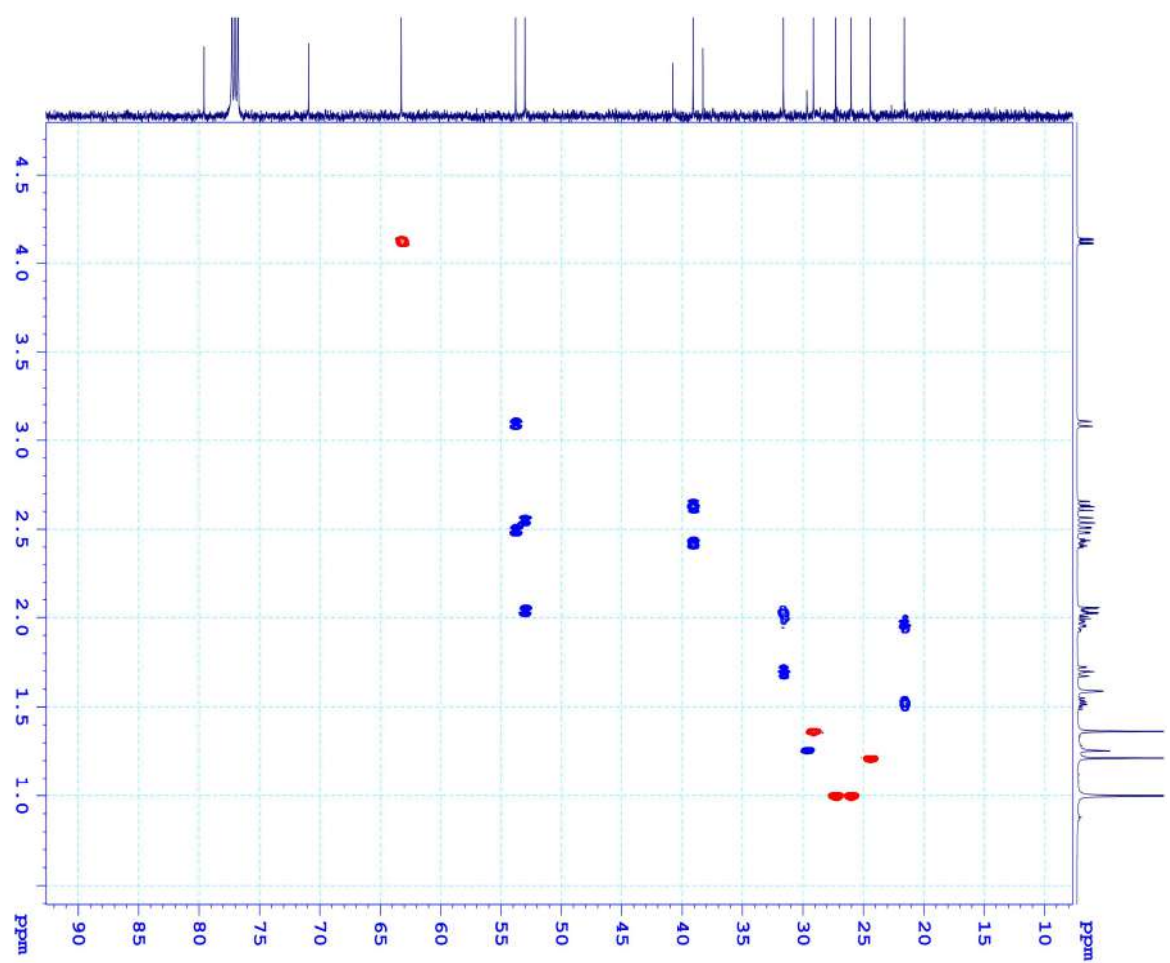
Hình D3.7. Phổ NOESY

1.4. Phổ hợp chất ADA04: (2S,3R,7S,7R)-2-chloro-3,7-epoxychamigrane-9-one

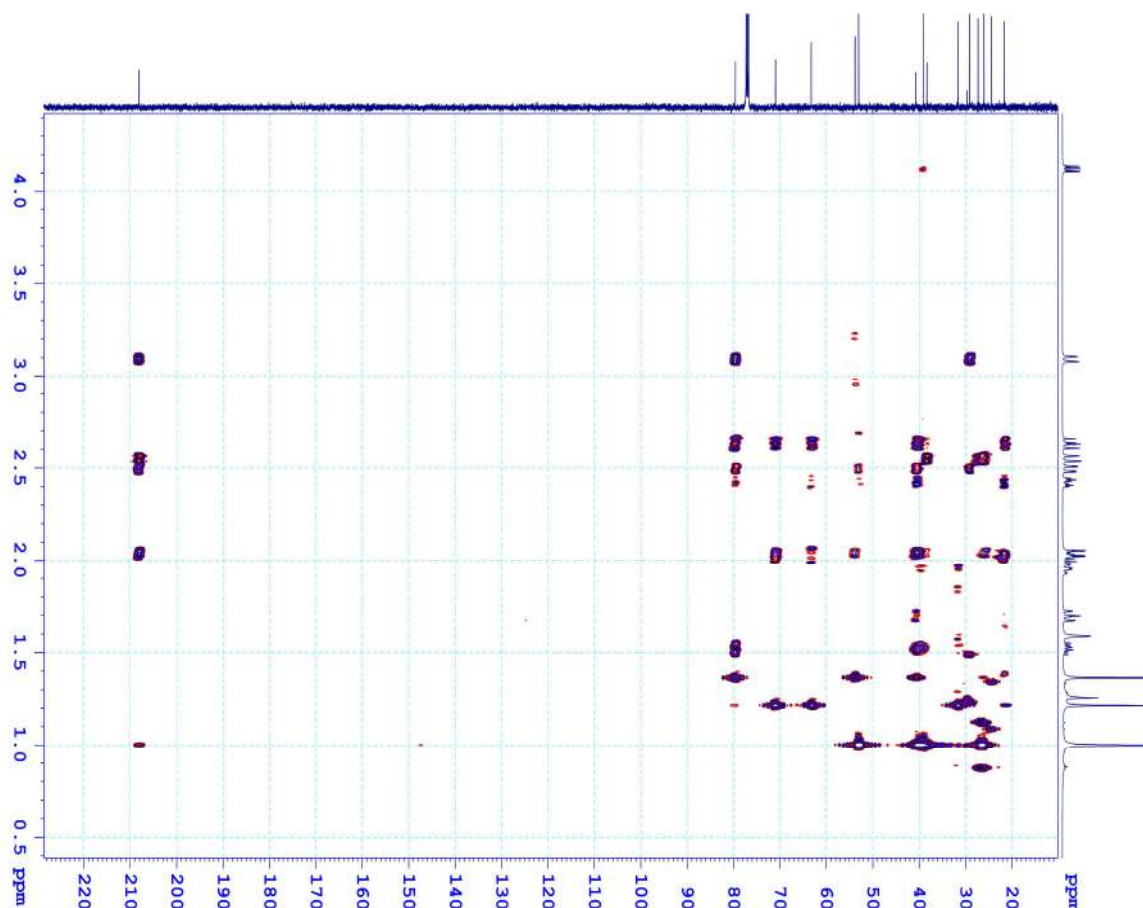
Hình D4.1. Phổ ^1H -NMR



Hình D4.2. Phổ ^{13}C -NMR

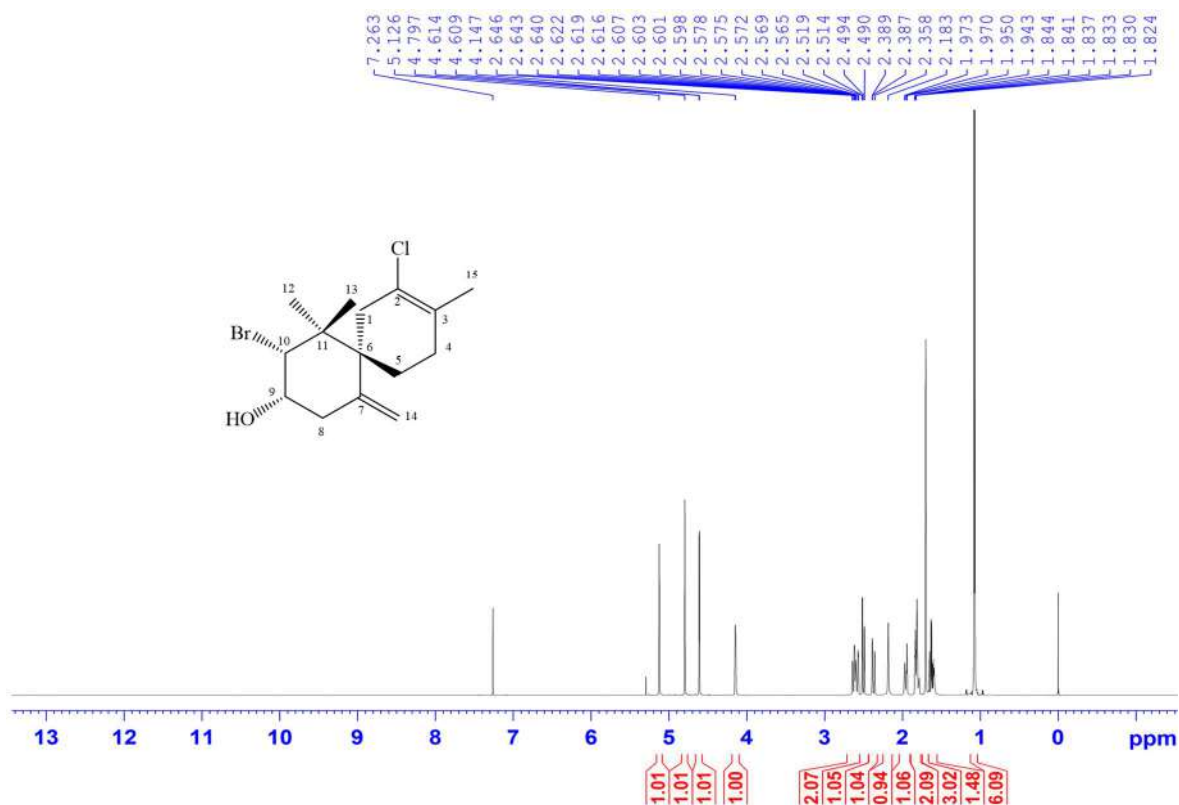


Hình D4.3. Phổ HSQC

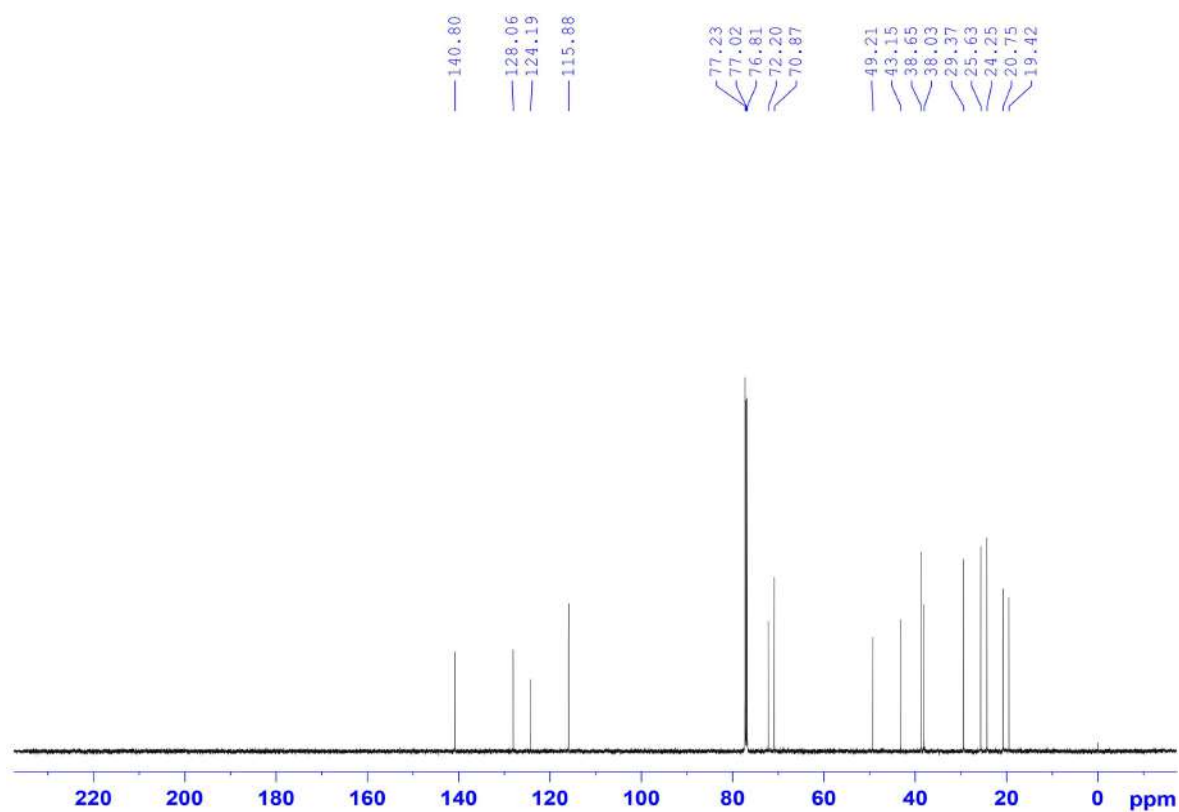


Hình D4.4. Phổ HMBC

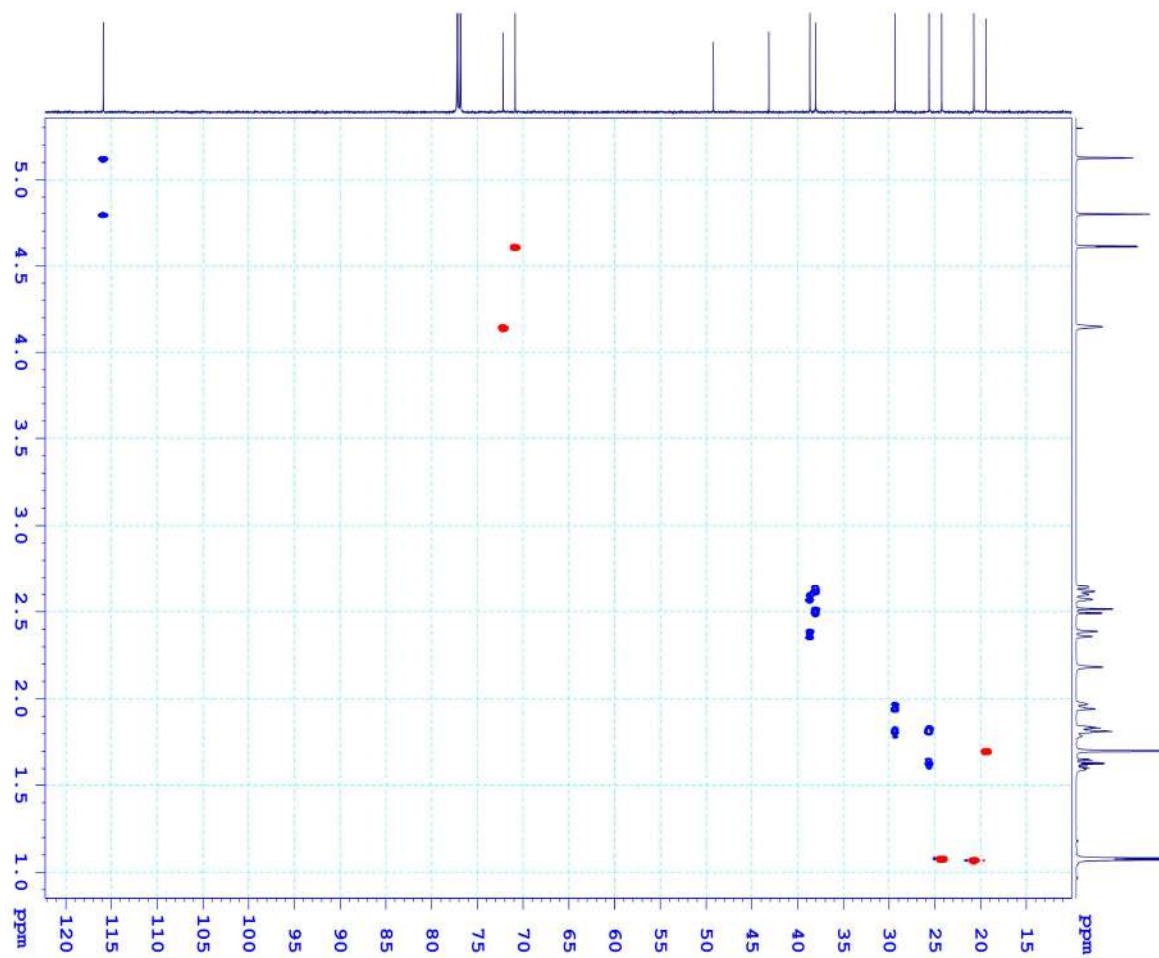
1.5. Phổ hợp chất ADB01: Elatol



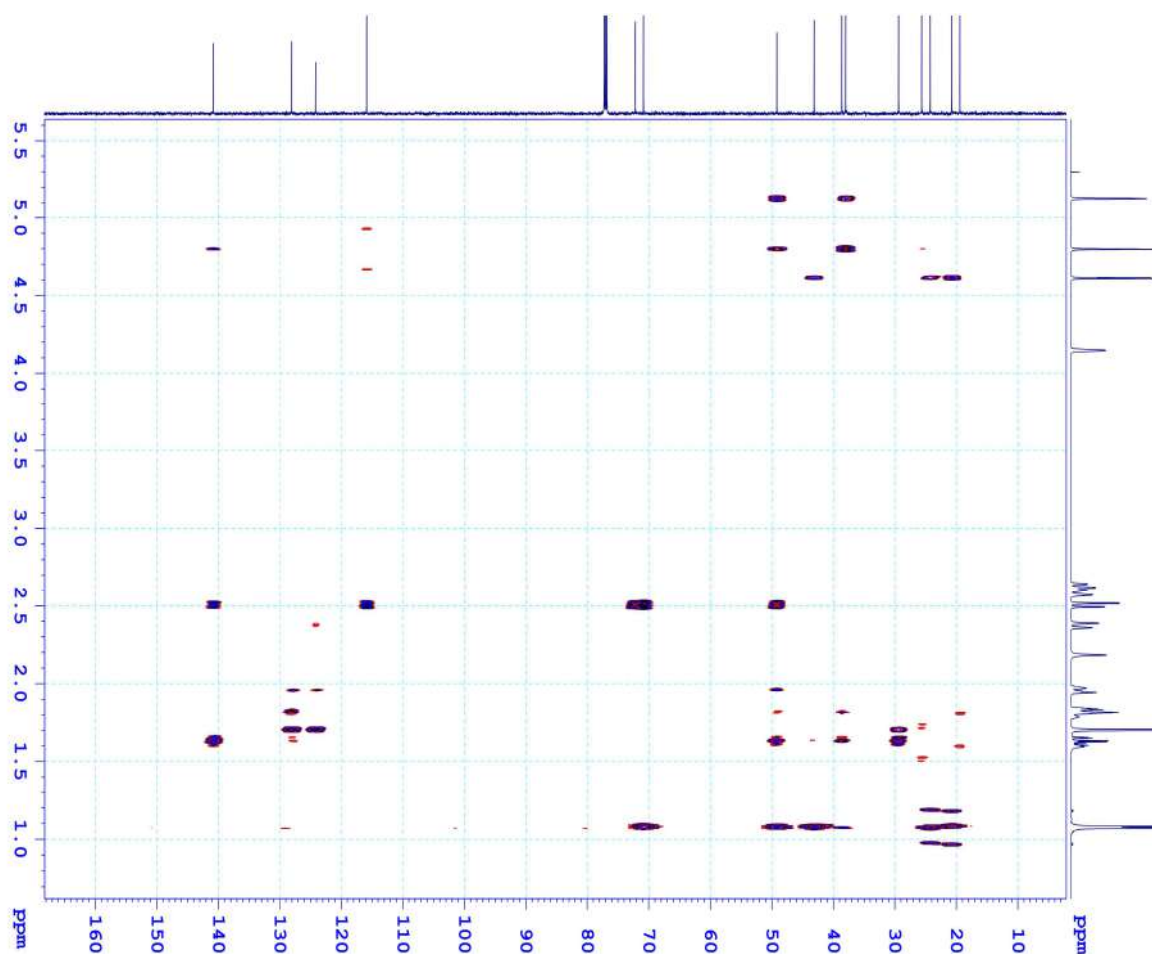
Hình D5.1. Phổ ^1H -NMR



Hình D5.2. Phổ ^{13}C -NMR

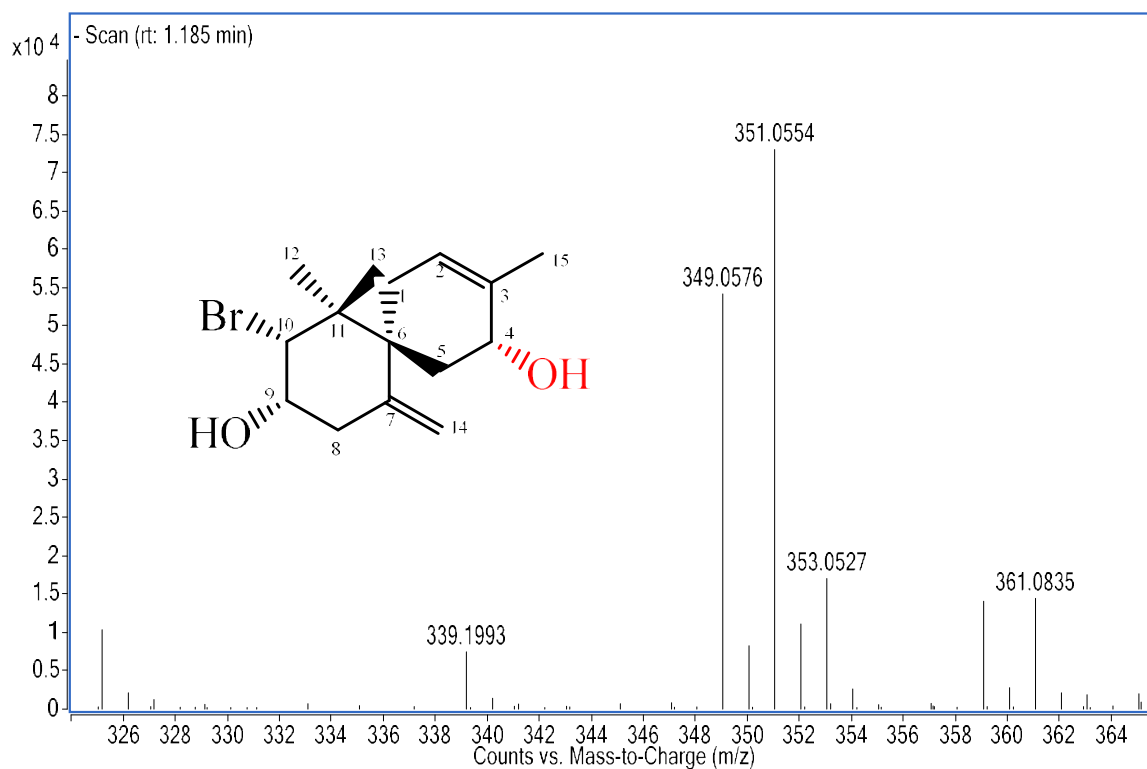


Hình D5.3. Phổ HSQC

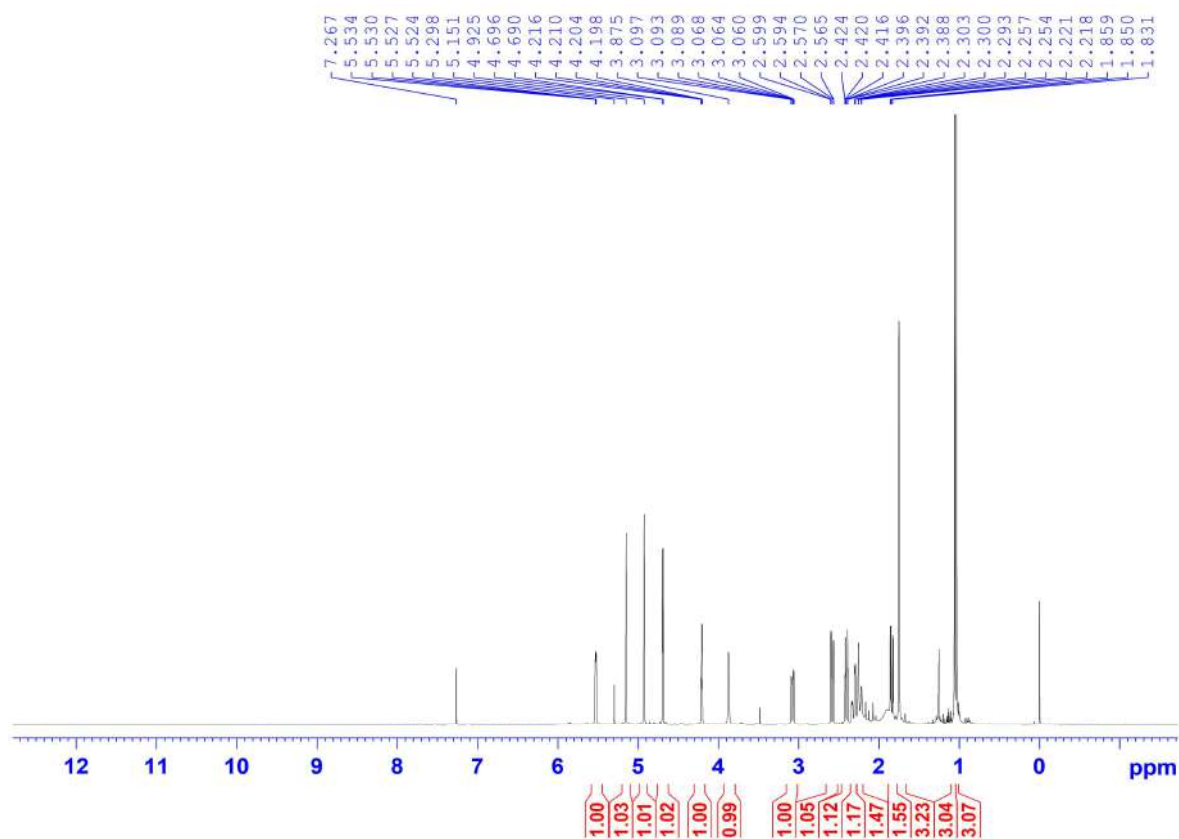


Hình D5.4. Phổ HMBC

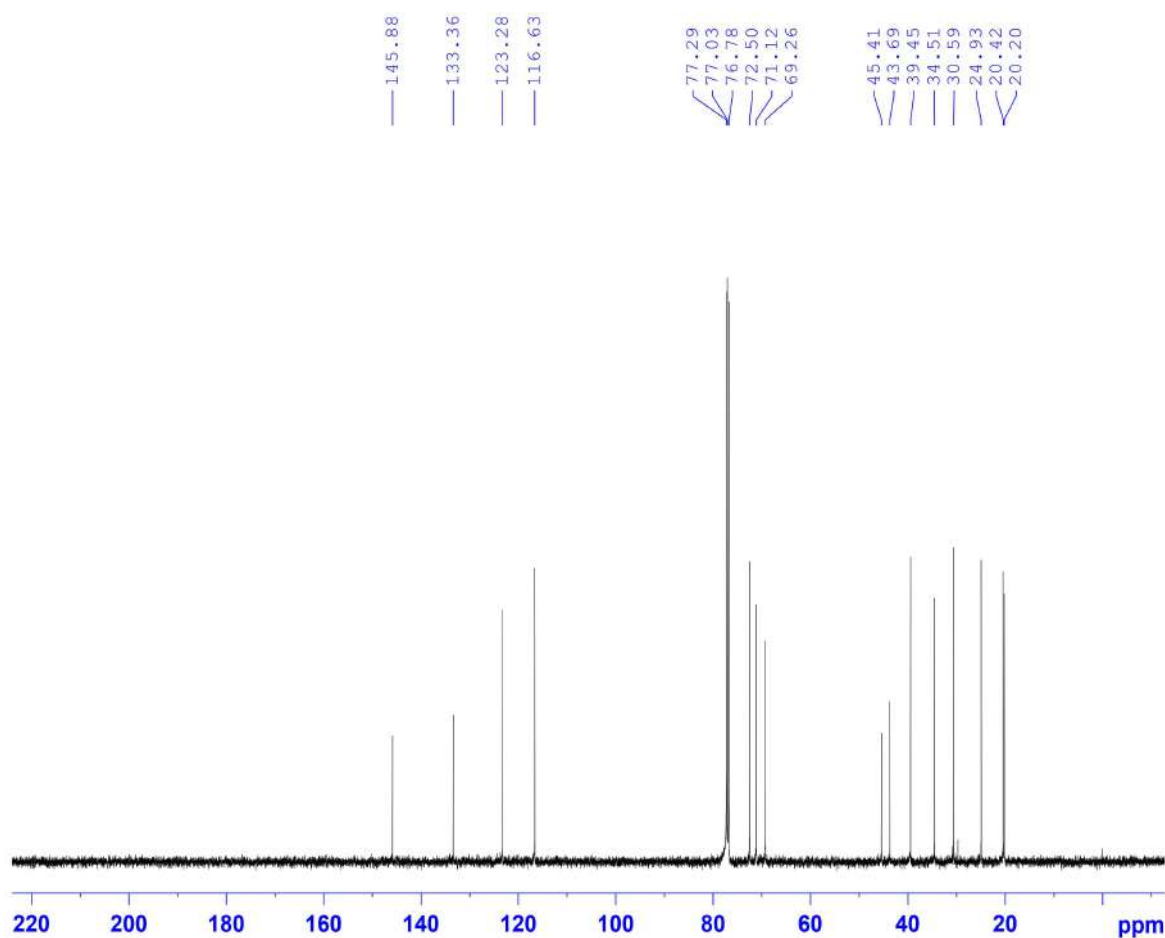
1.6. Phổ hợp chất ADB02: Aplydactylonin I (*chất mới*)



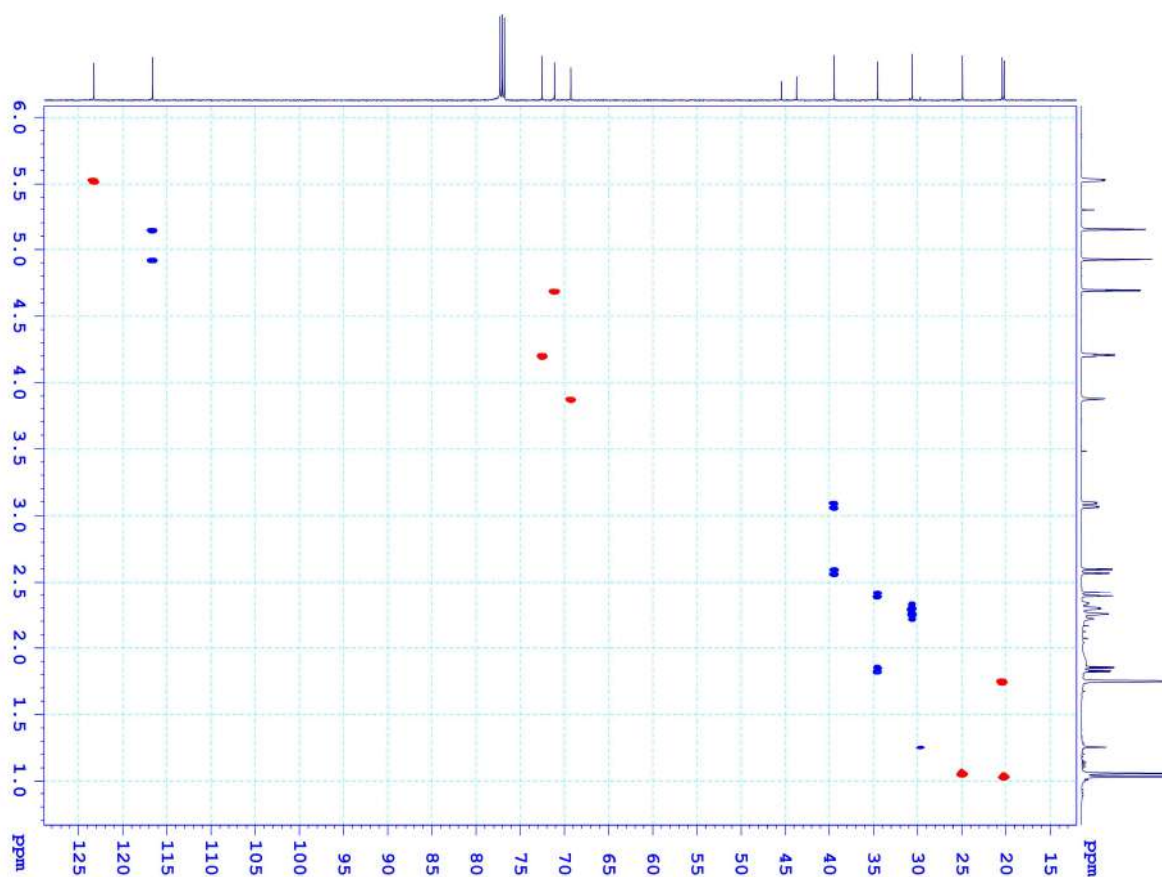
Hình P6.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



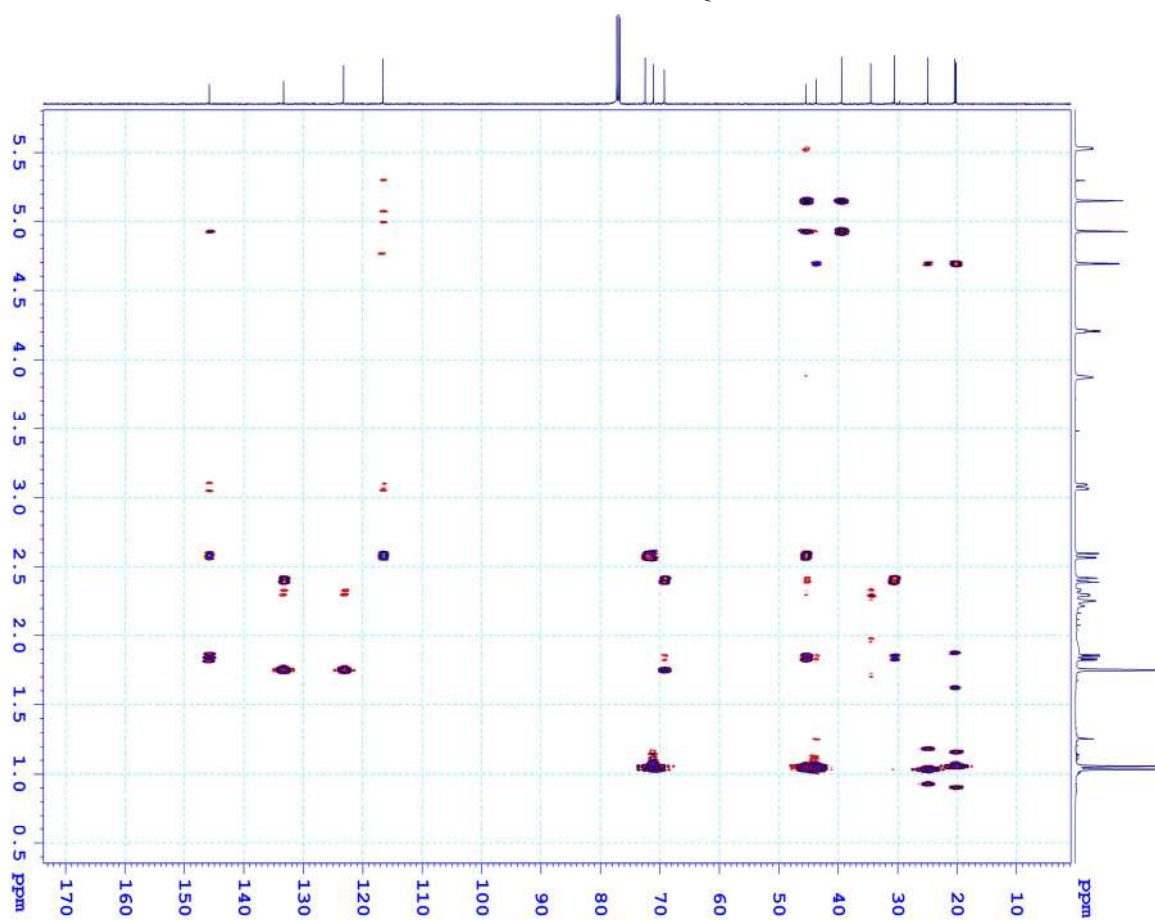
Hình D6.2. Phổ ^1H -NMR



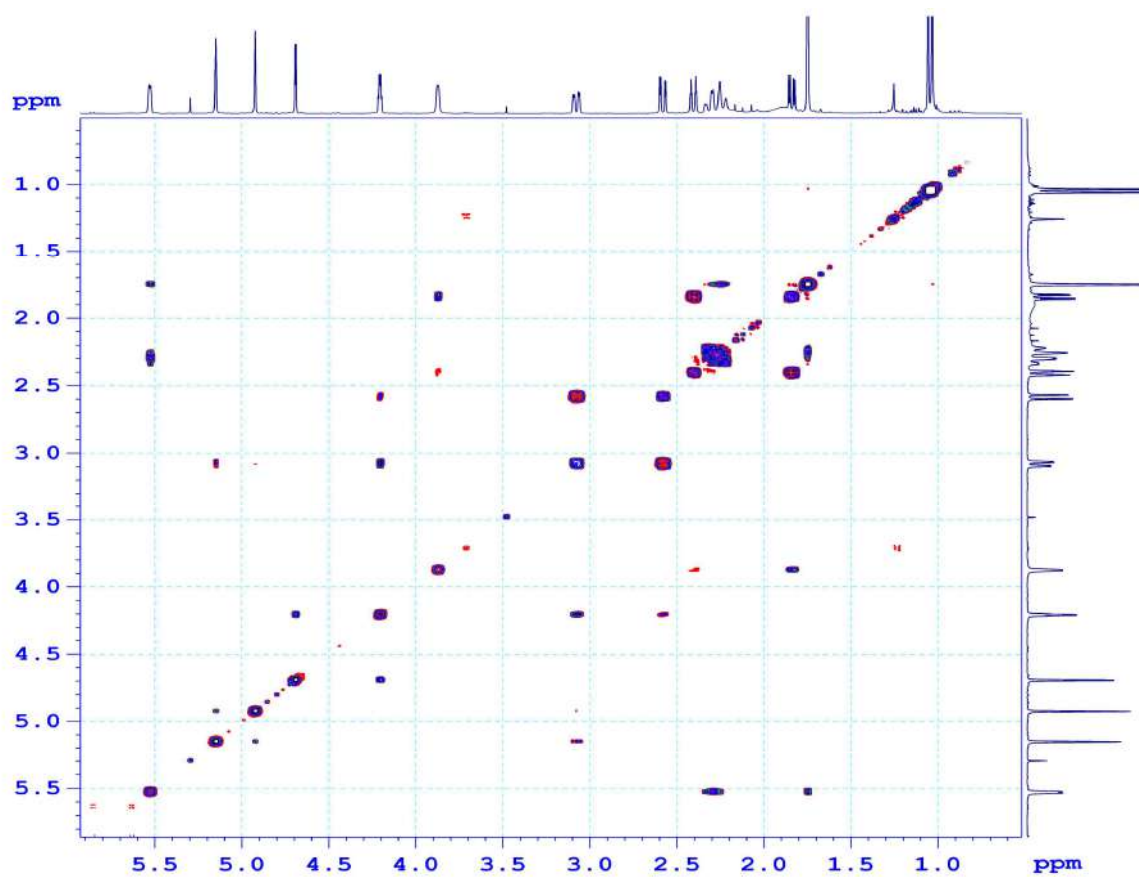
Hình D6.3. Phổ ^{13}C -NMR



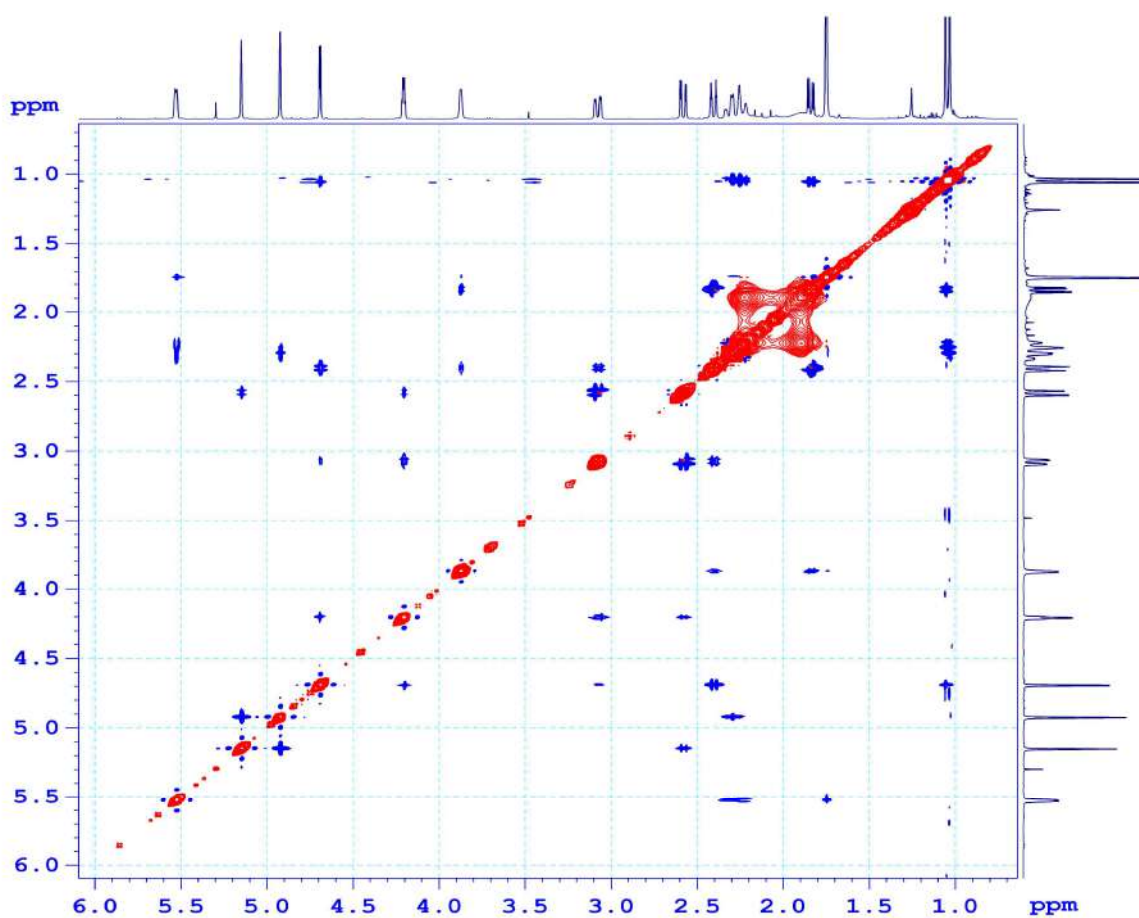
Hình D6.4. Phổ HSQC



Hình D6.5. Phổ HMBC

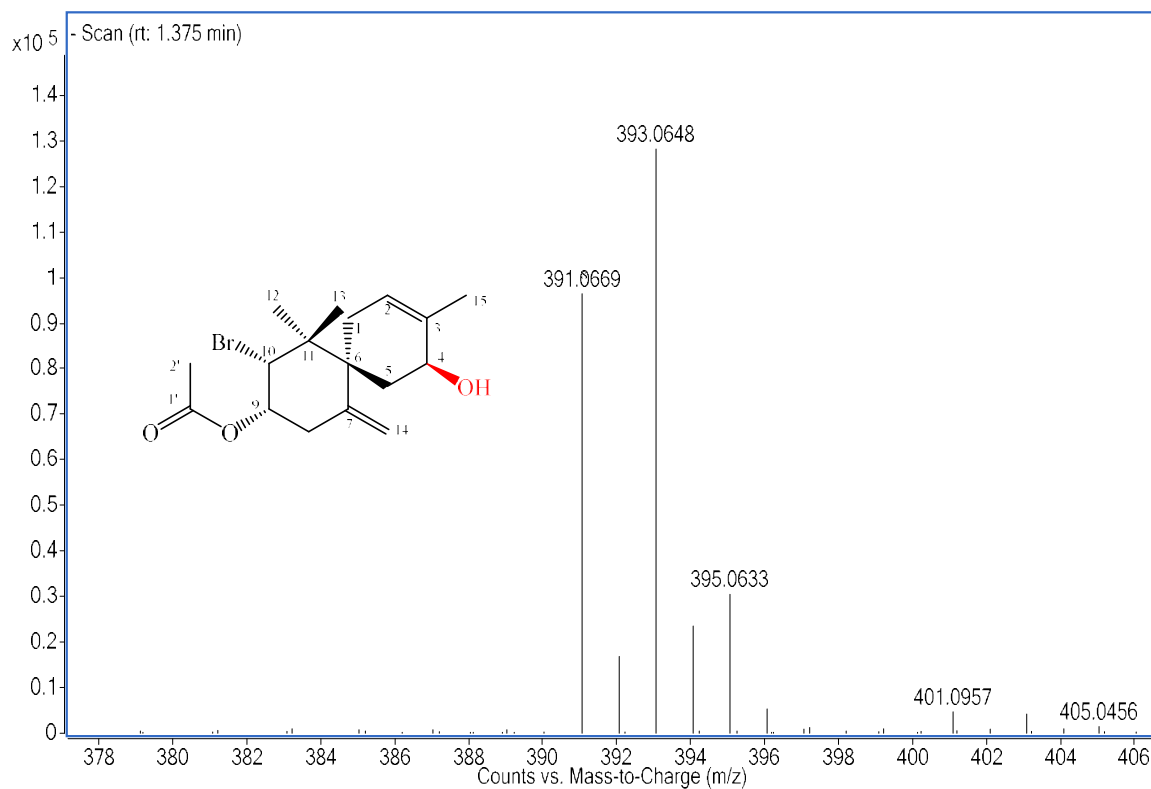


Hình D6.6. Phổ COSY

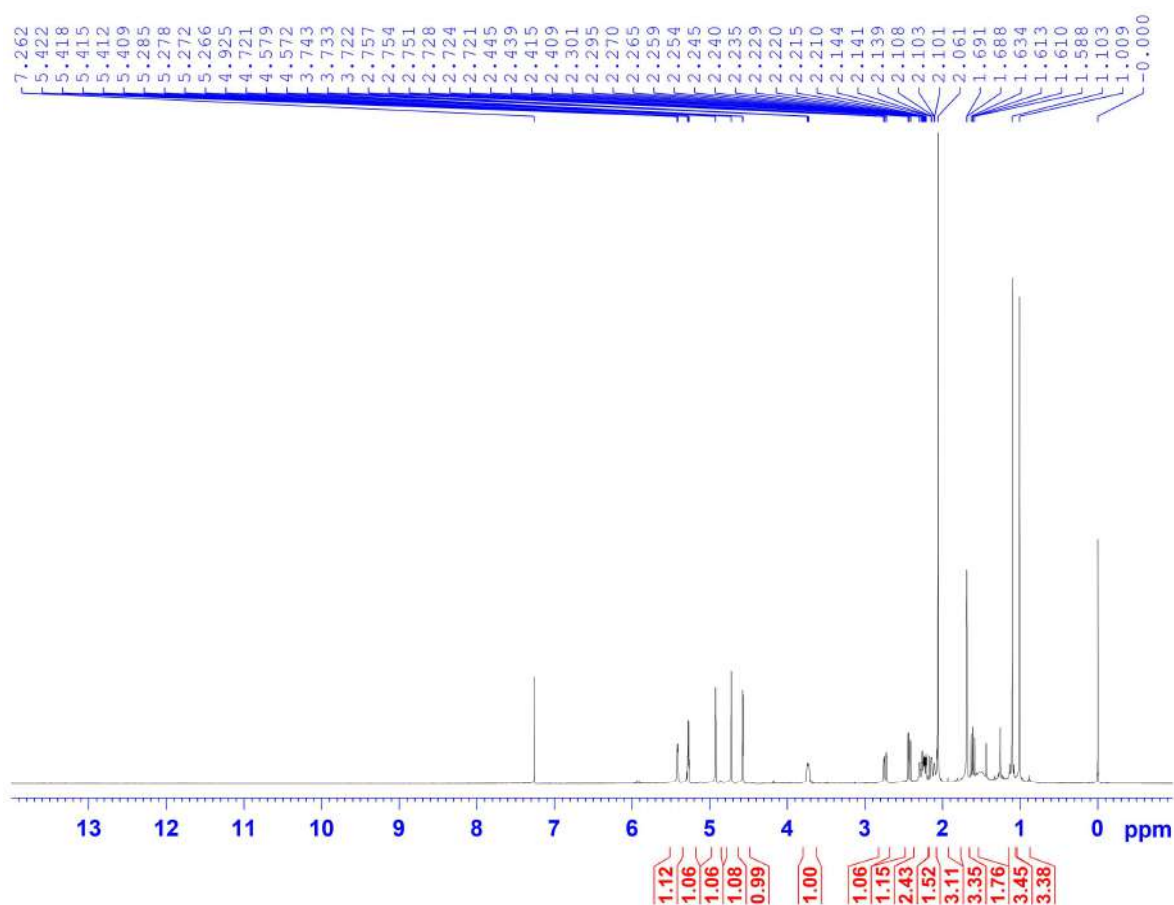


Hình D6.7. Phổ NOESY

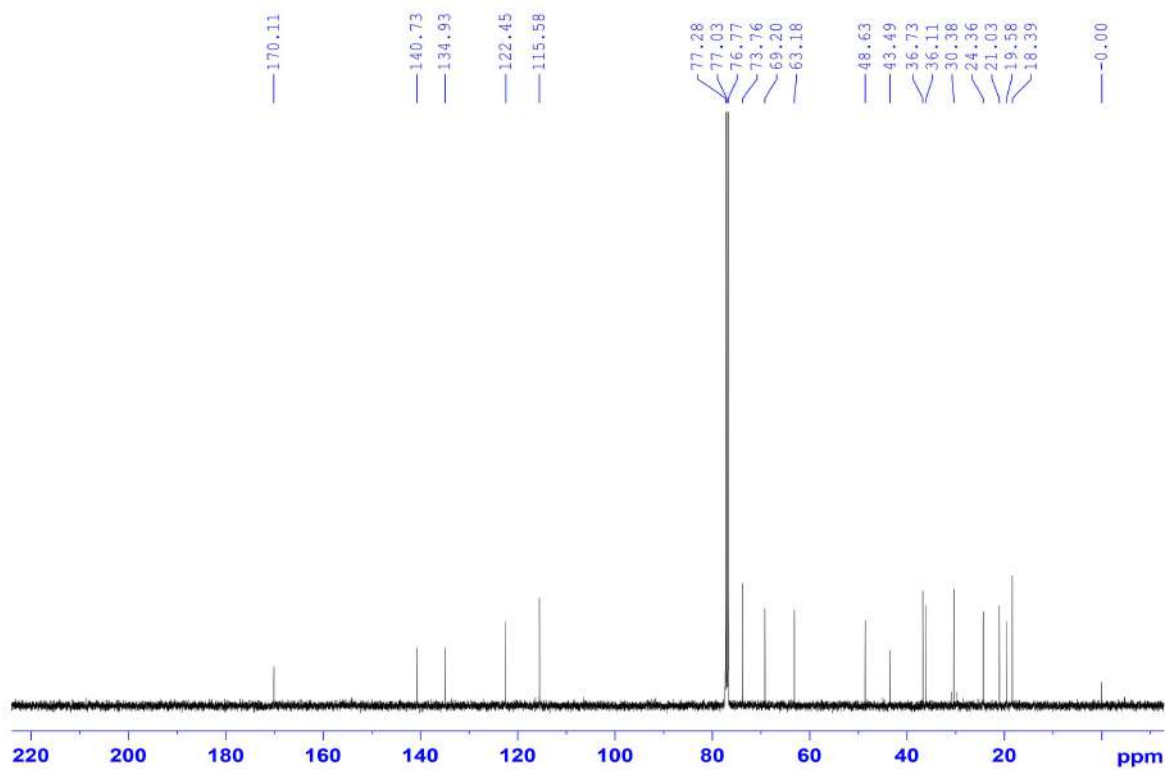
1.7. Phổ hợp chất ADB04: Aplydactylonin K (chất mới)



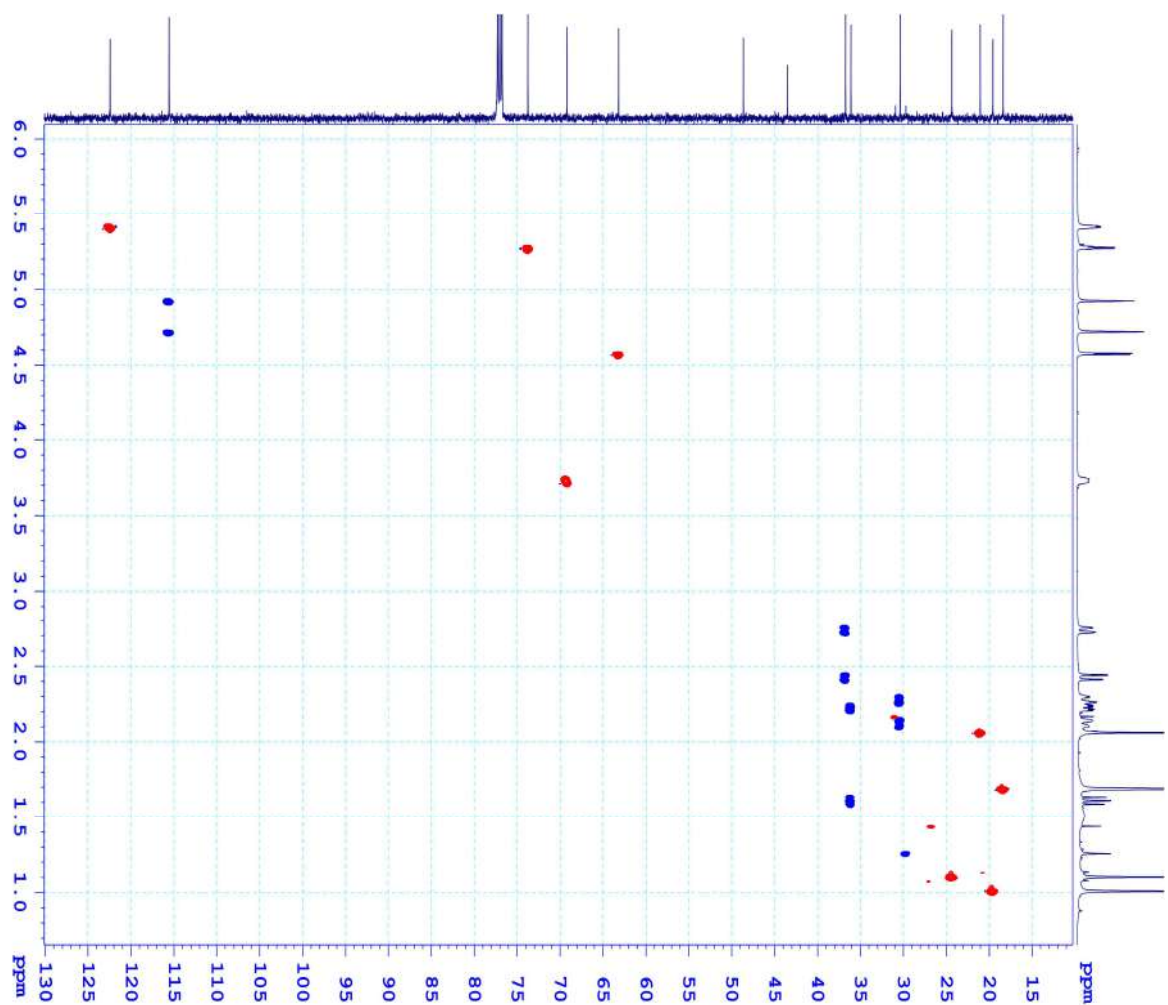
Hình D7.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



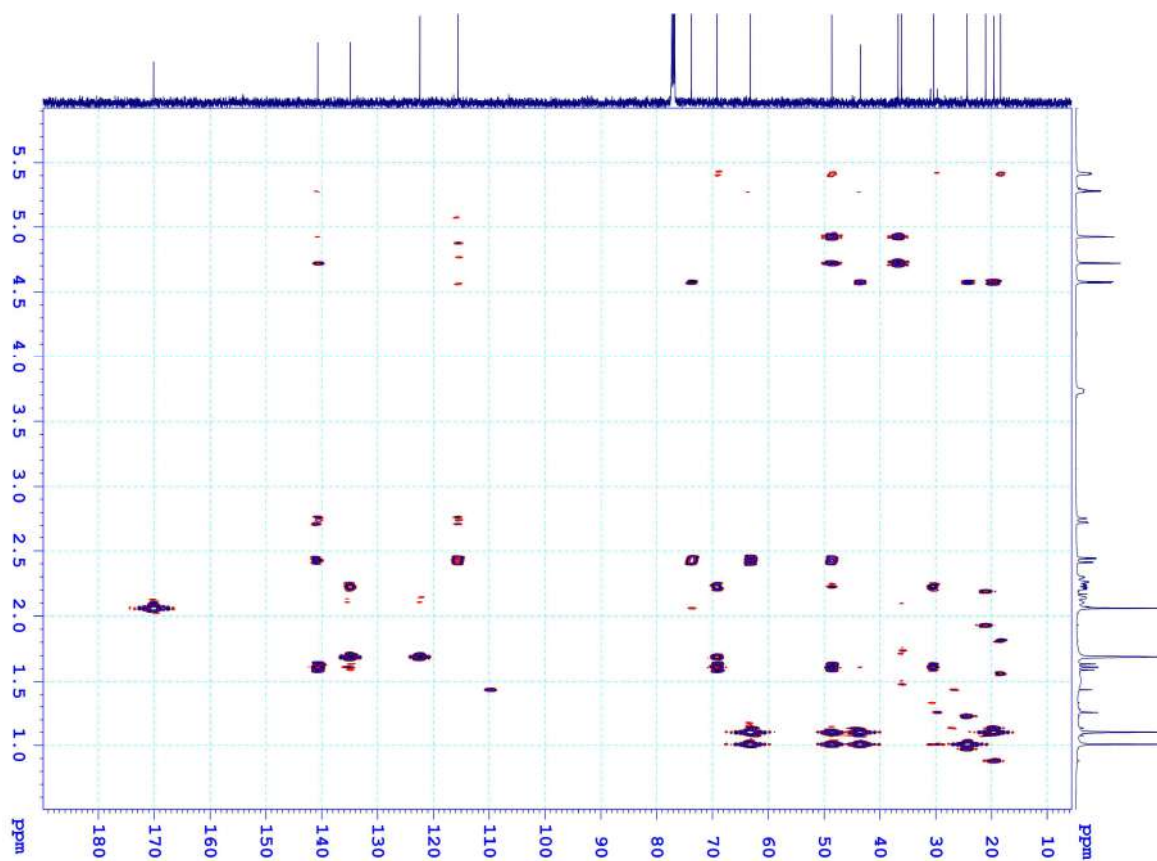
Hình D7.2. Phổ ¹H-NMR



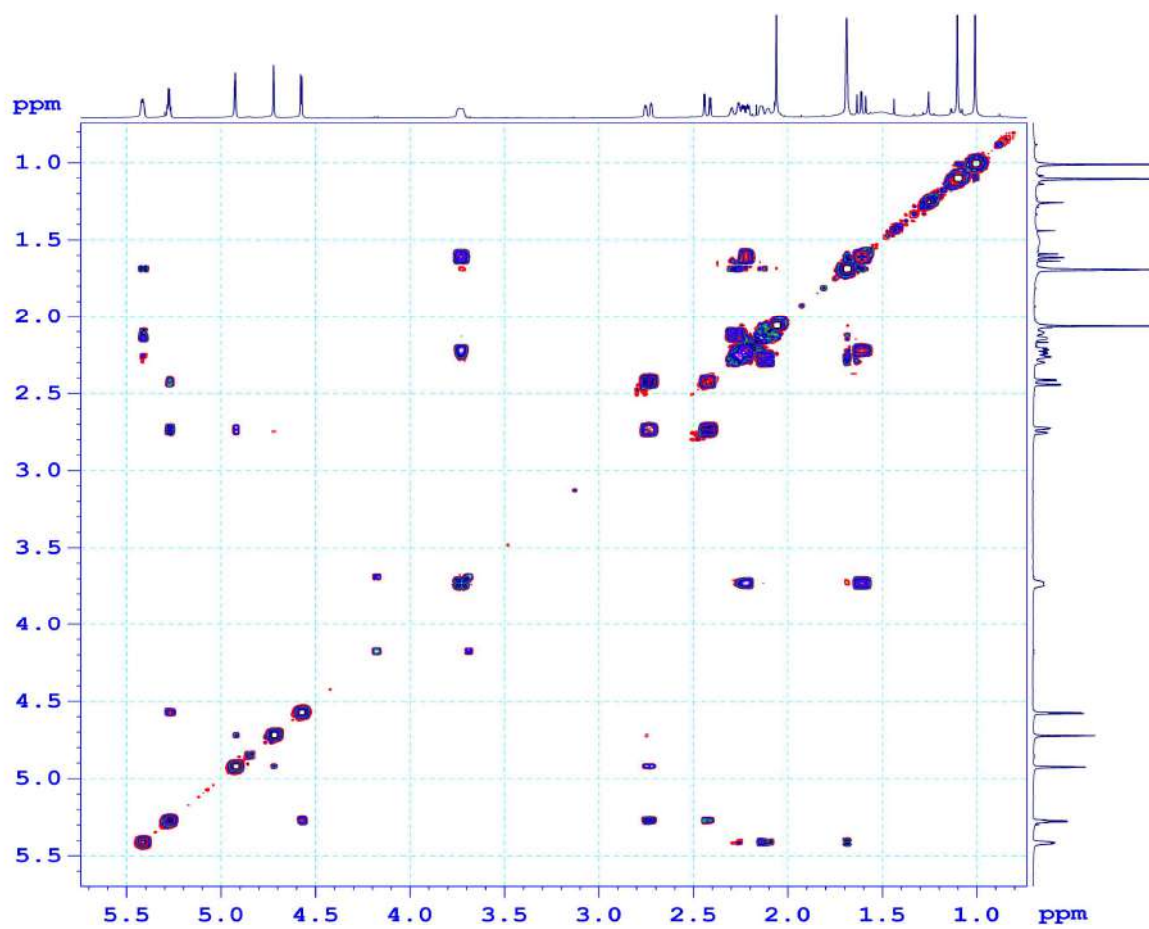
Hình D7.3. Phổ ^{13}C -NMR



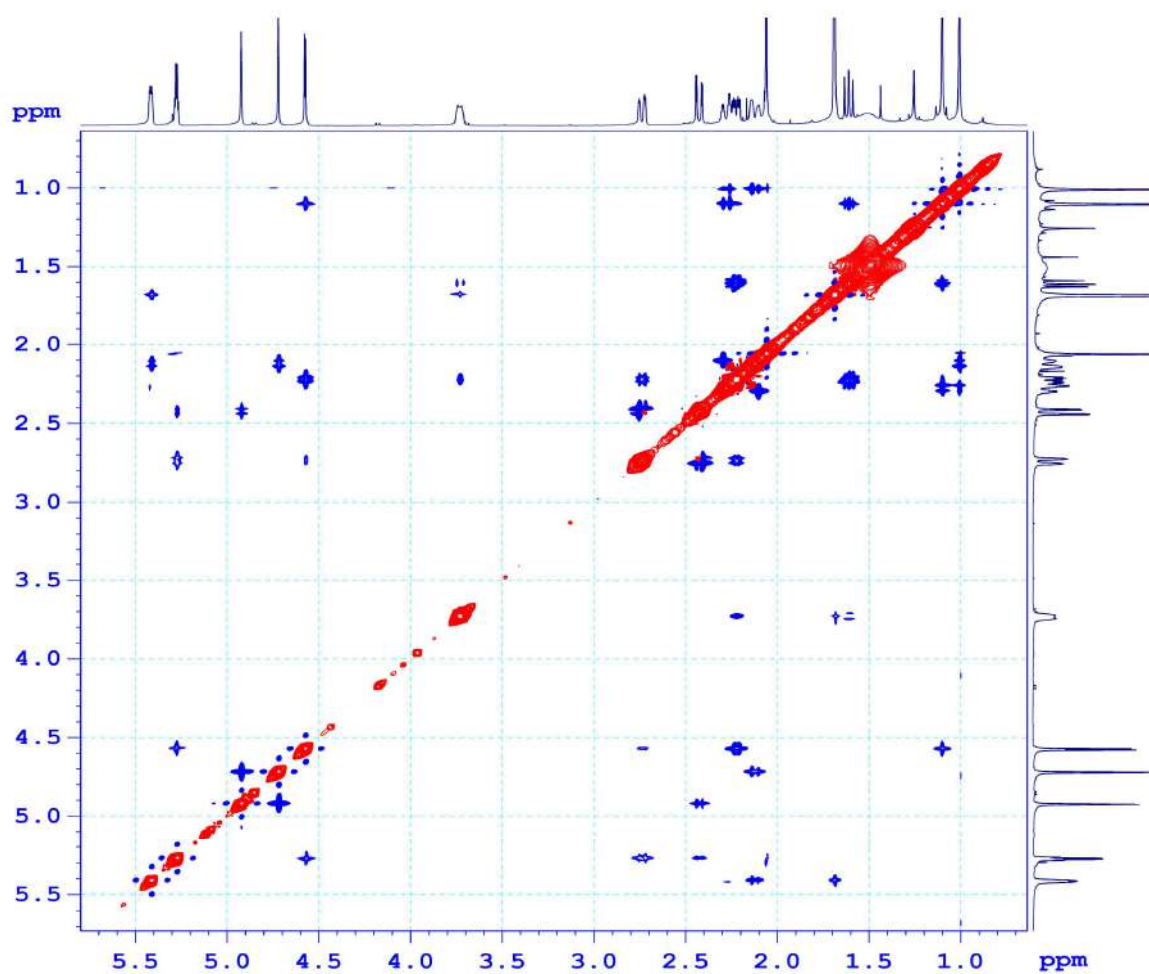
Hình D7.4. Phở HSQC



Hình D7.5. Phổ HMBC

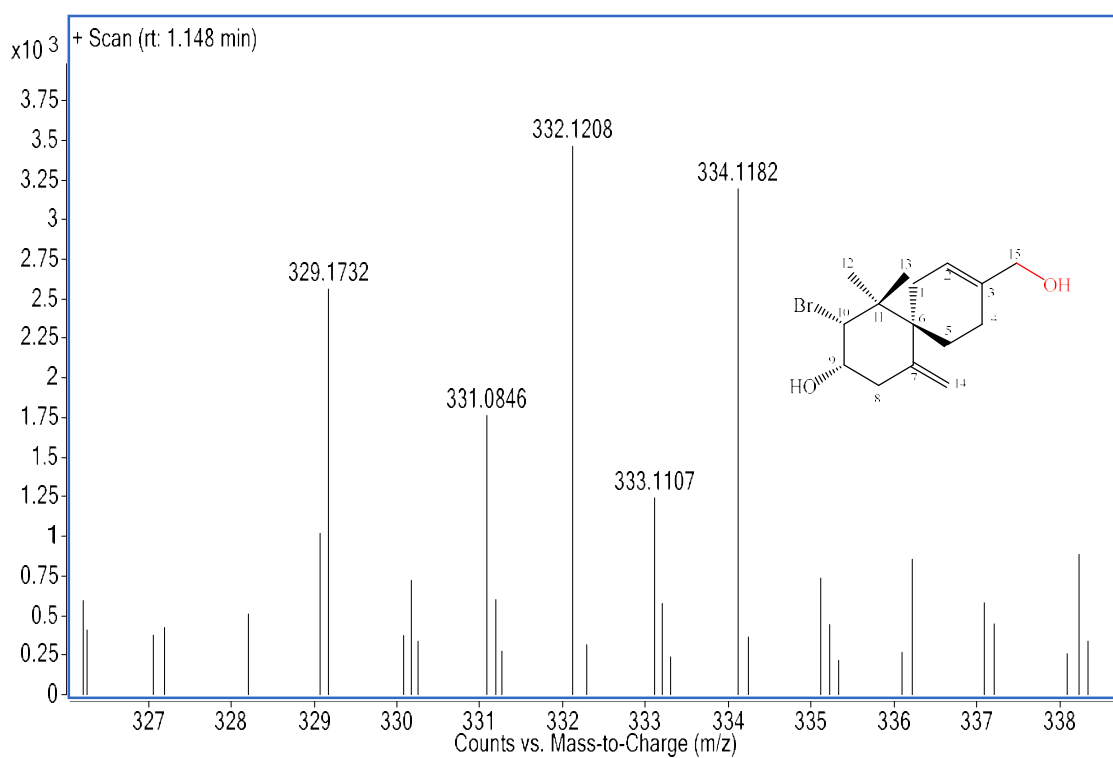


Hình D7.6. Phổ COSY

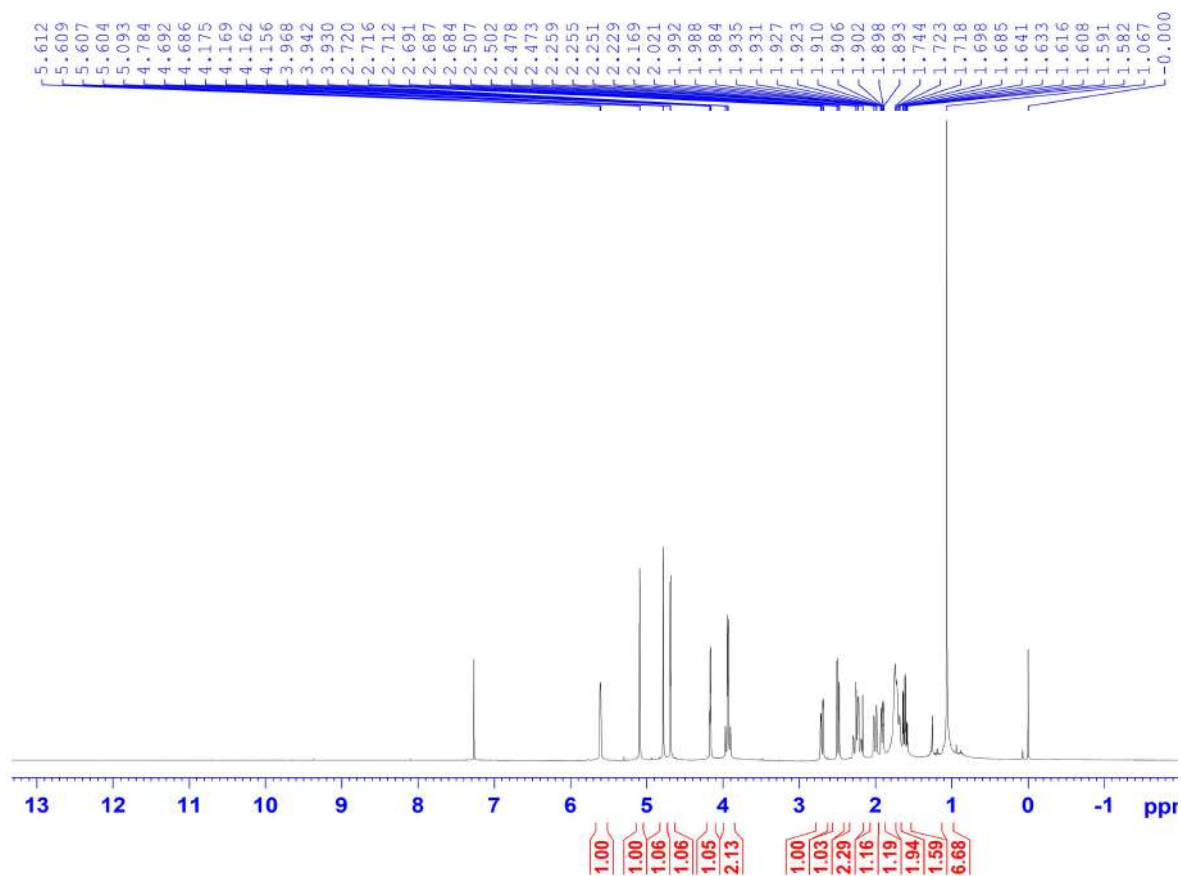


Hình D7.7. Phổ NOESY

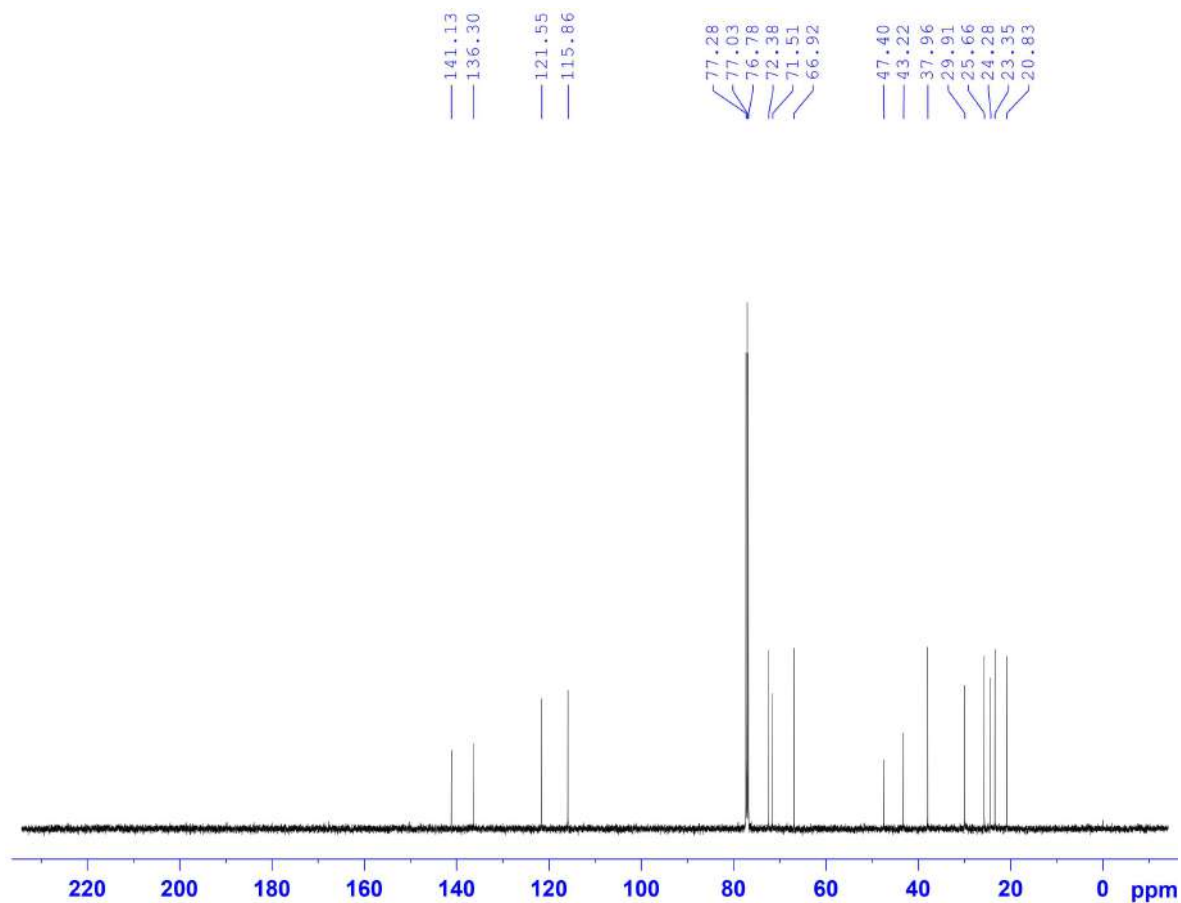
1.8. Phổ hợp chất ADB04: Aplydactylonin G (*chất mới*)



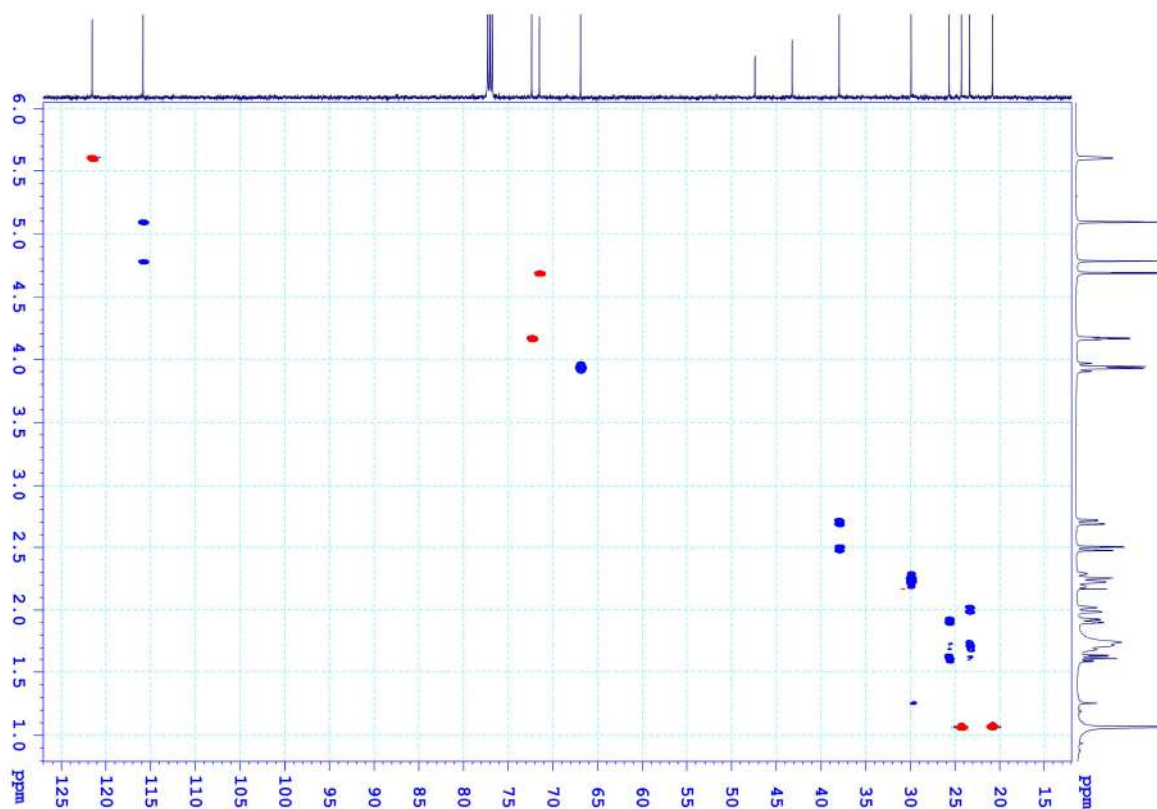
Hình D8.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



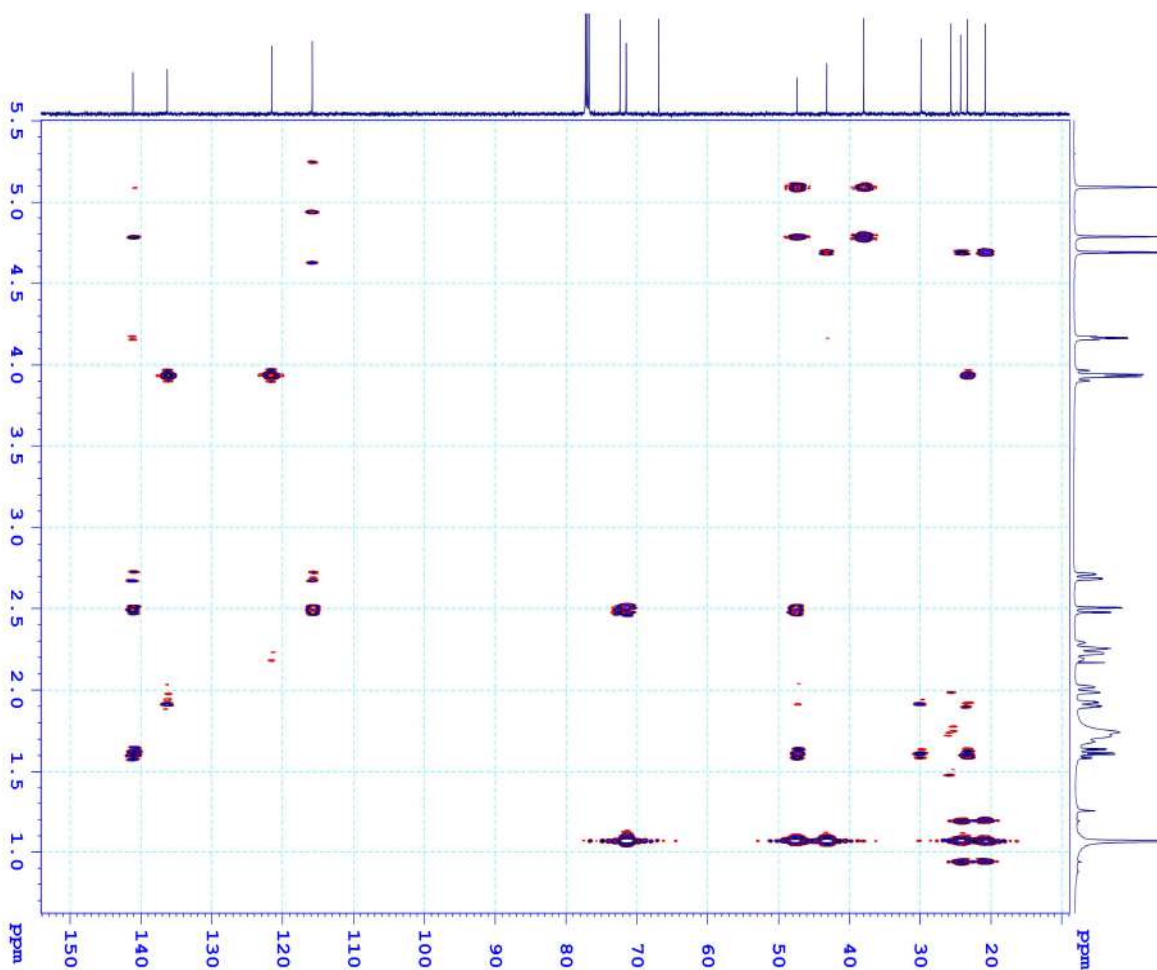
Hình D8.2. Phổ ^1H -NMR



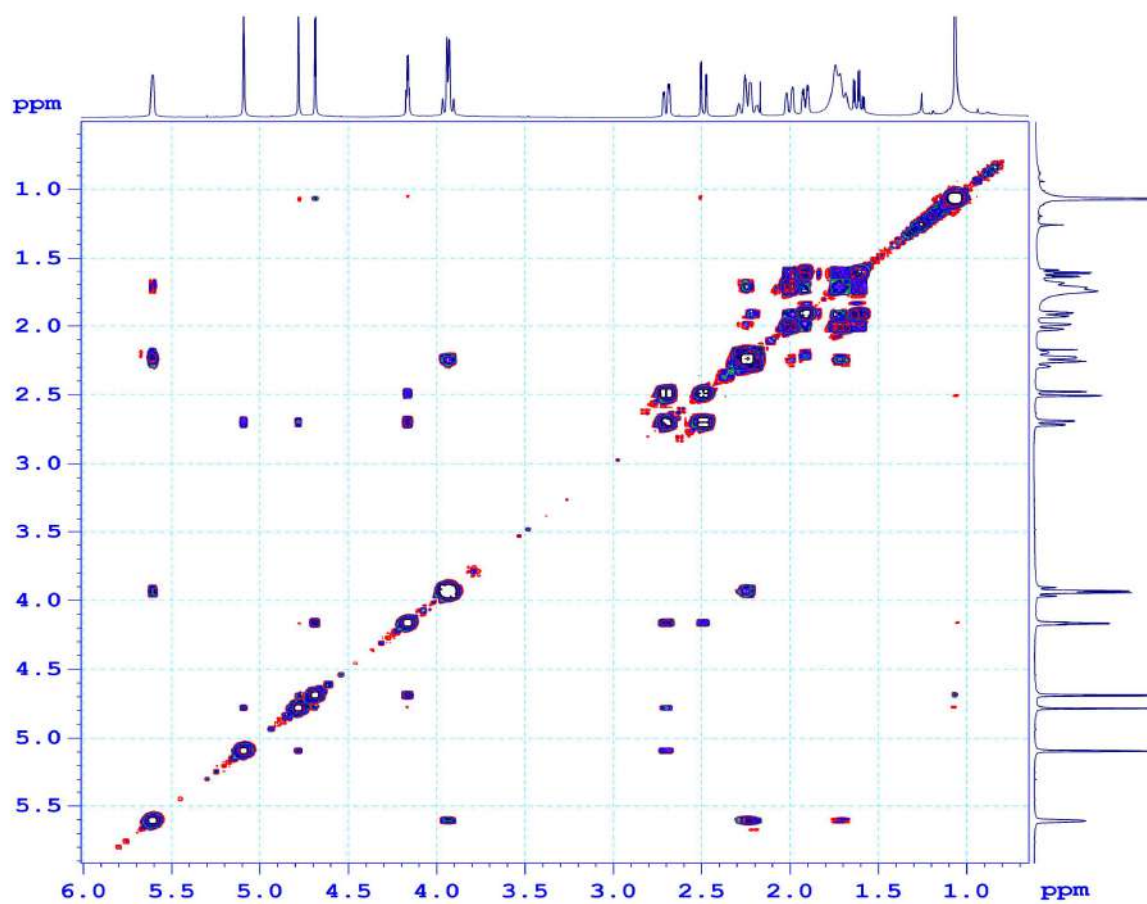
Hình D8.3. Phổ ^{13}C -NMR



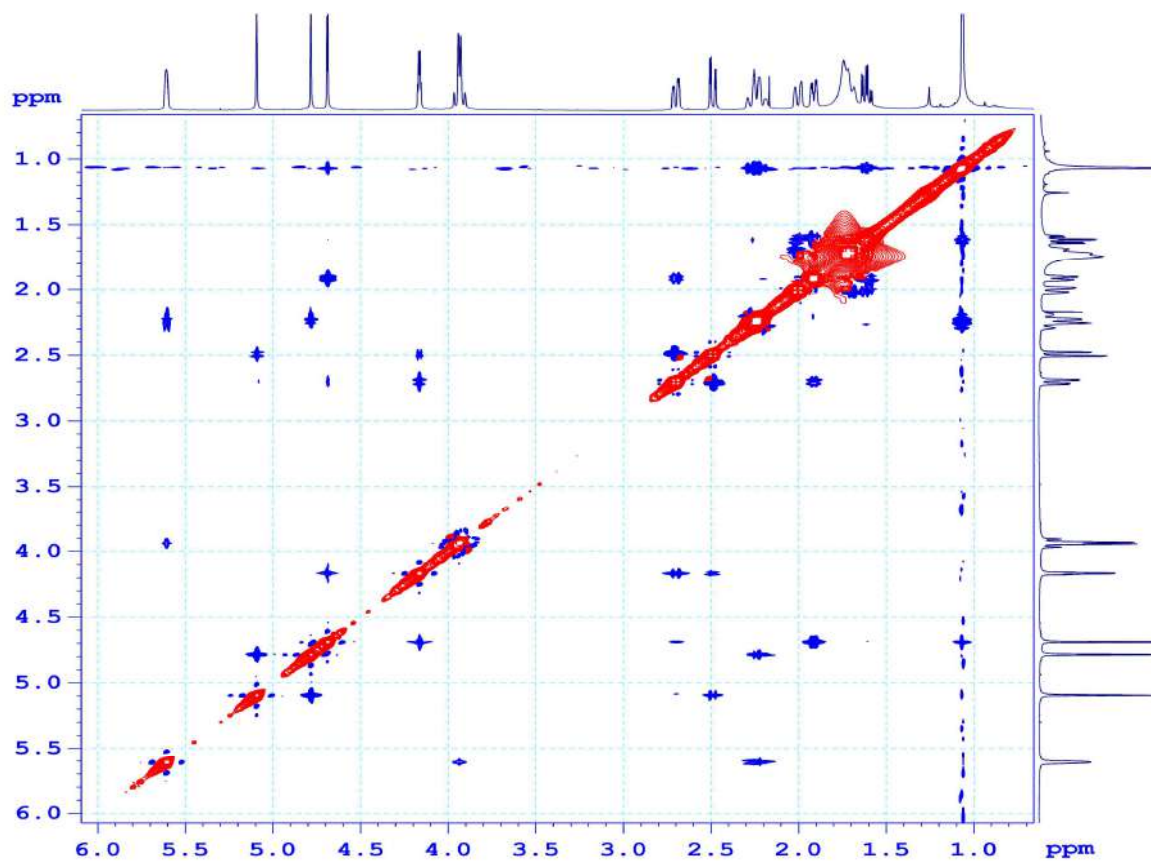
Hình D8.4. Phổ HSQC



Hình D8.5. Phổ HMBC

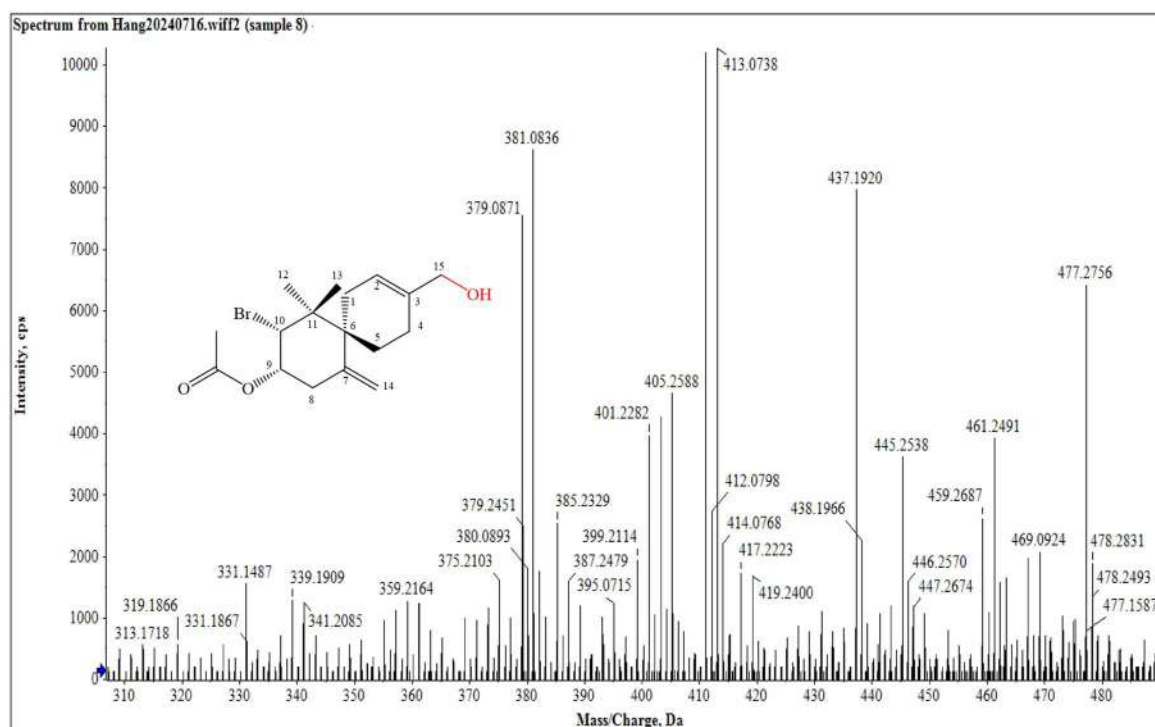


Hình D8.6. Phổ COSY

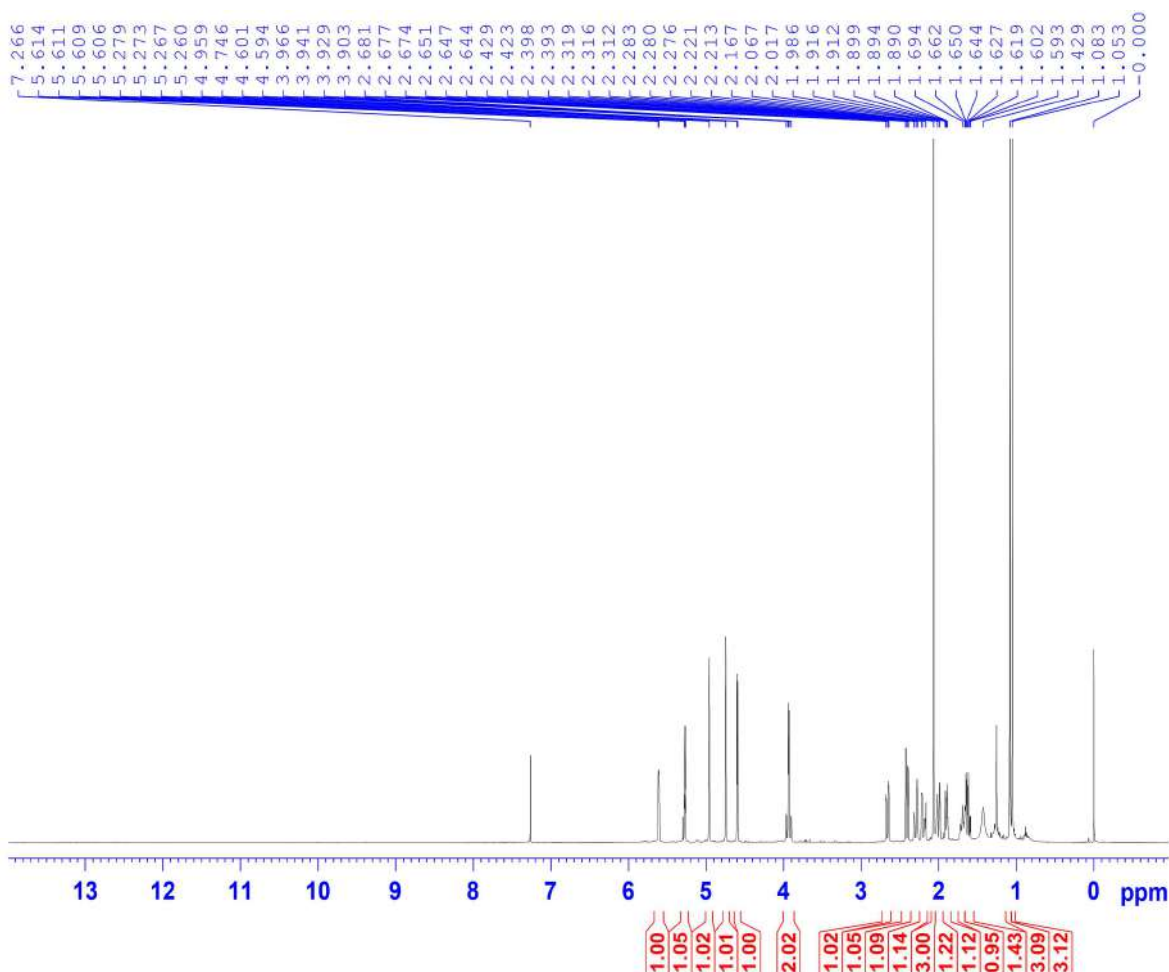


Hình D8.7. Phổ NOESY

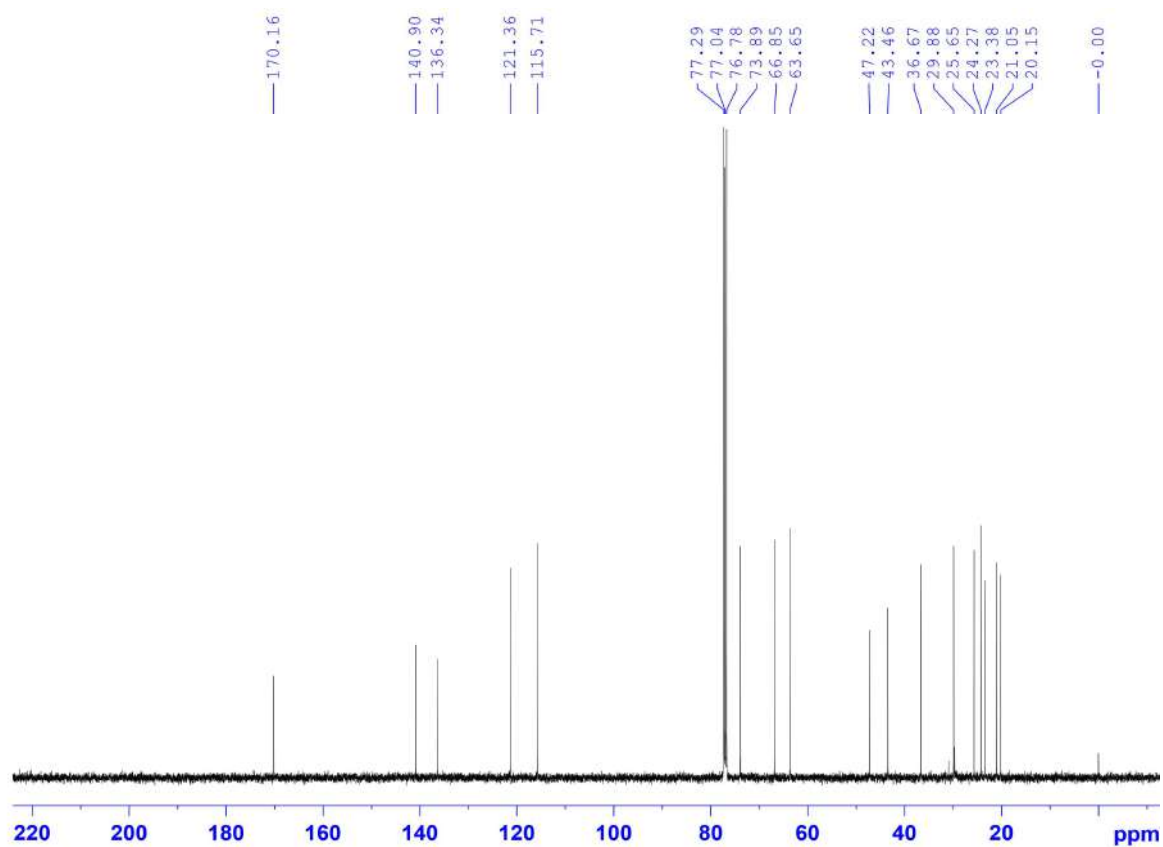
1.9. Phổ hợp chất ADB05: Aplydactylonin H (chất mới)



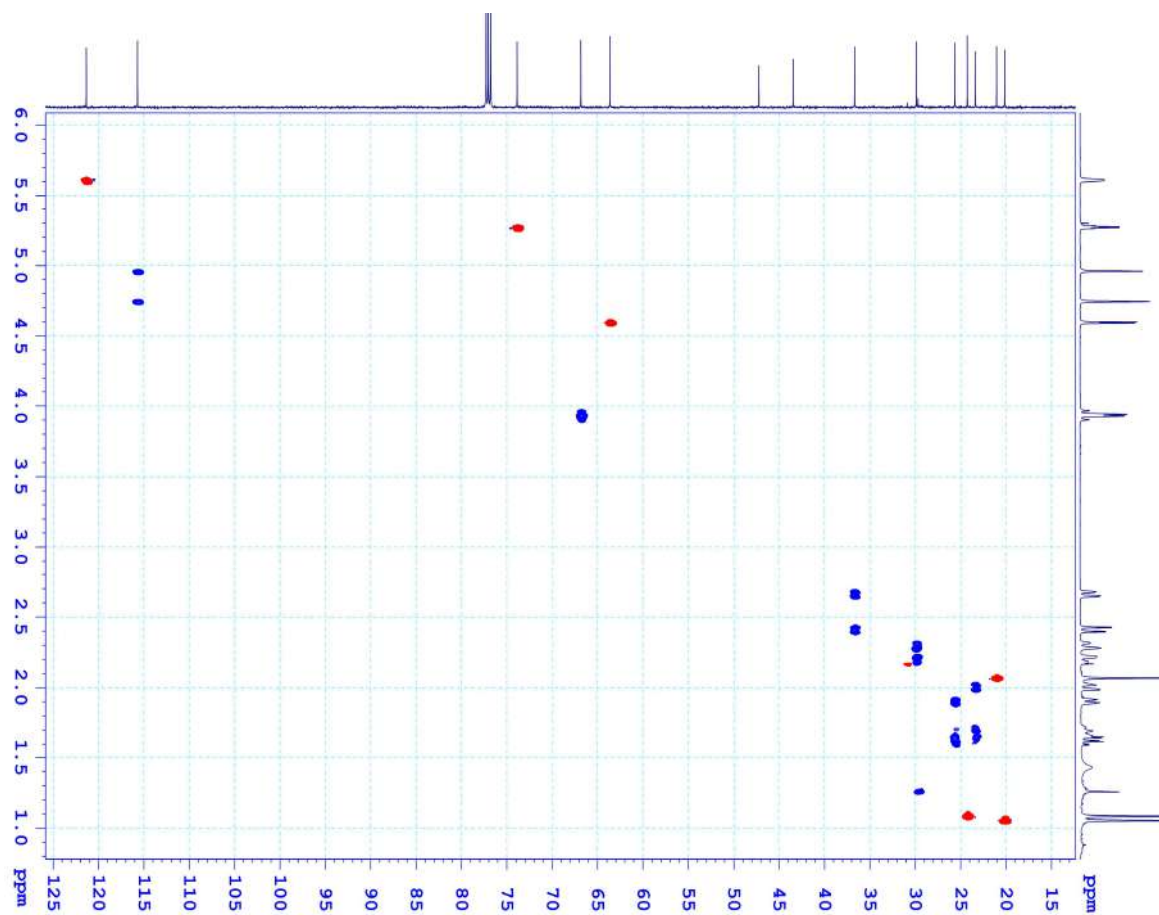
Hình D9.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



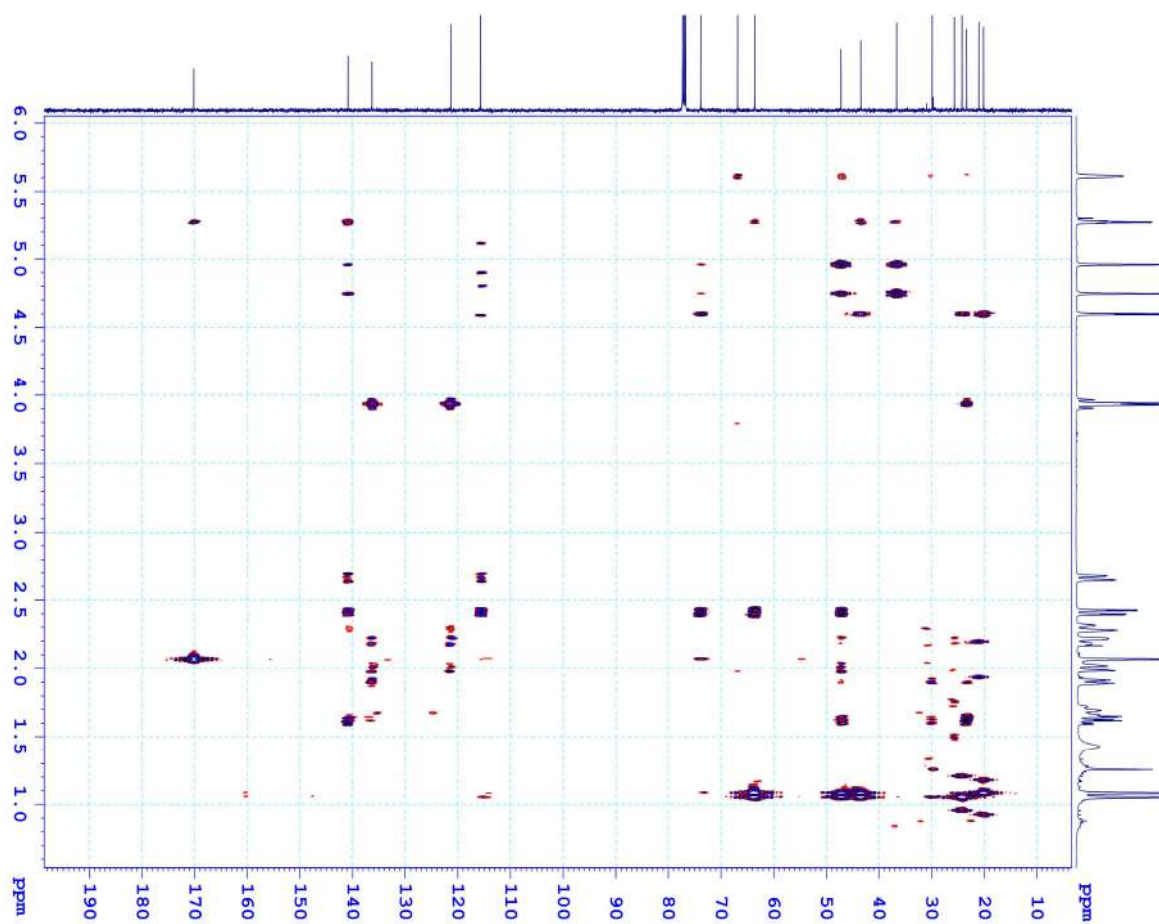
Hình D9.2. Phổ ^1H -NMR



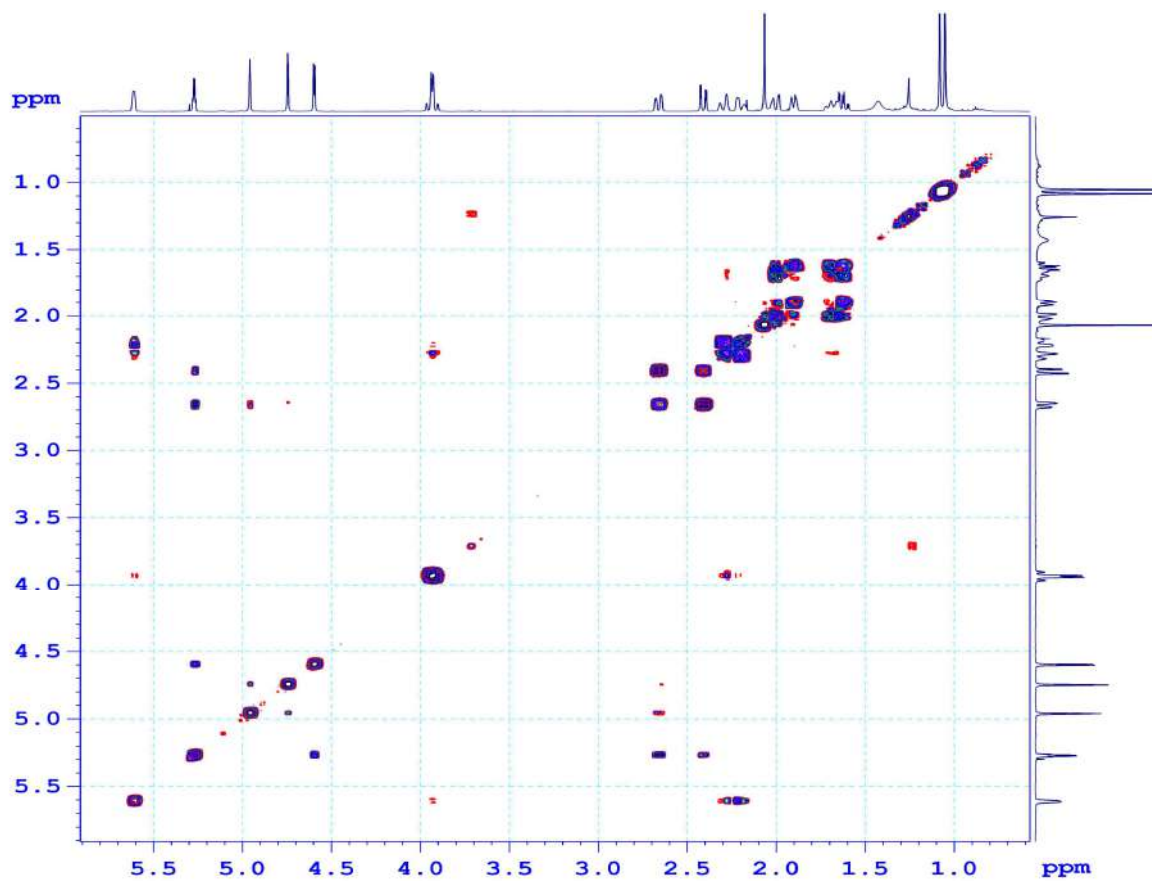
Hình D9.3. Phổ ^{13}C -NMR



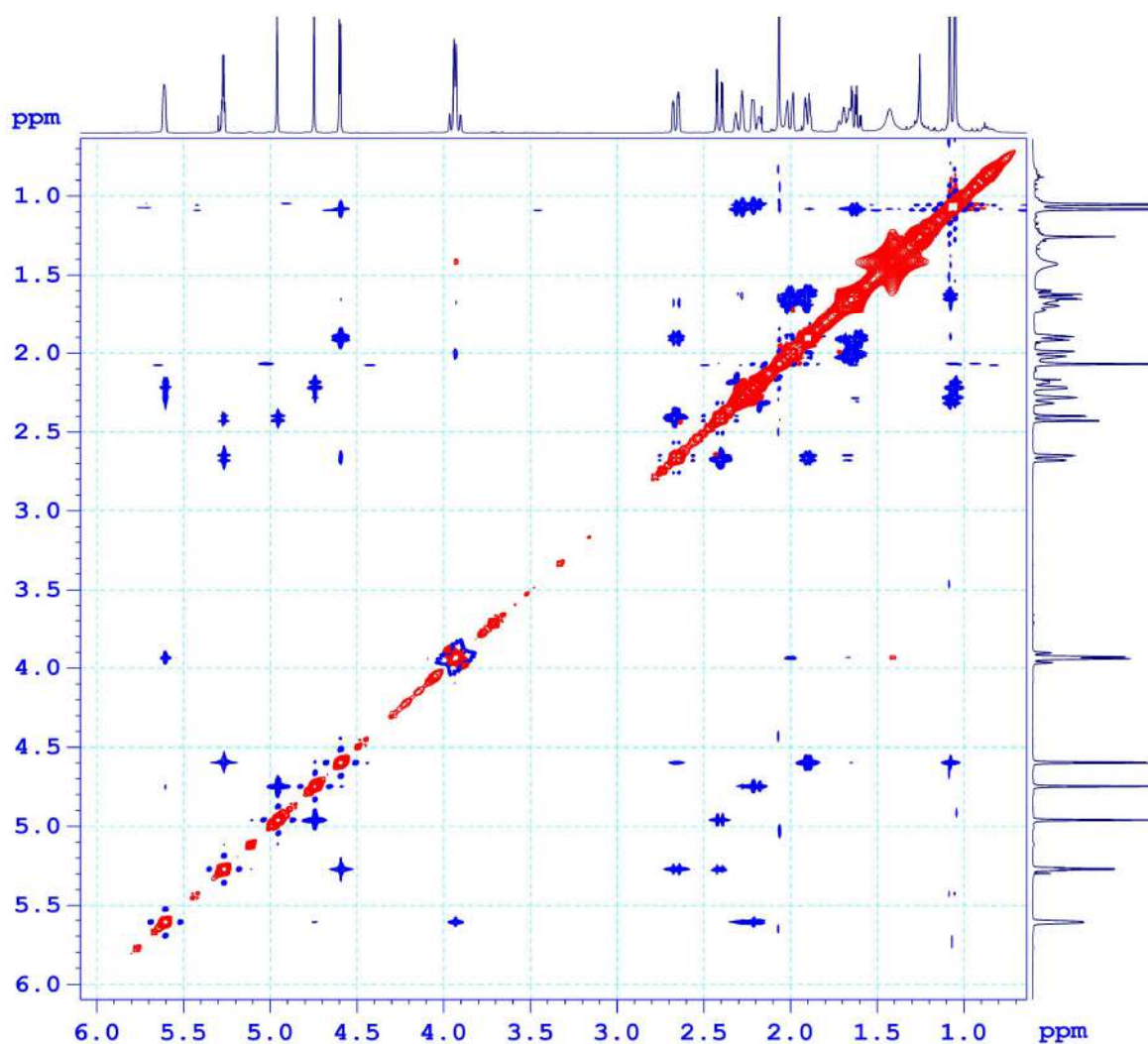
Hình D9.4. Phổ HSQC



Hình D9.5. Phổ HMBC

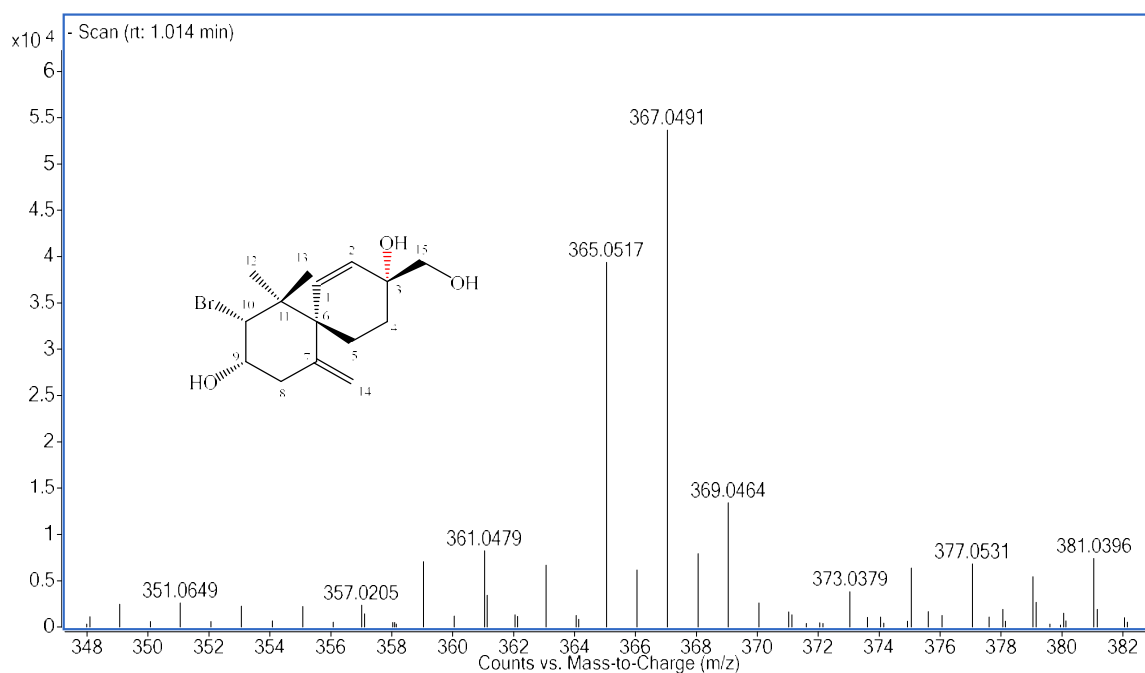


Hình D9.6. Phổ COSY

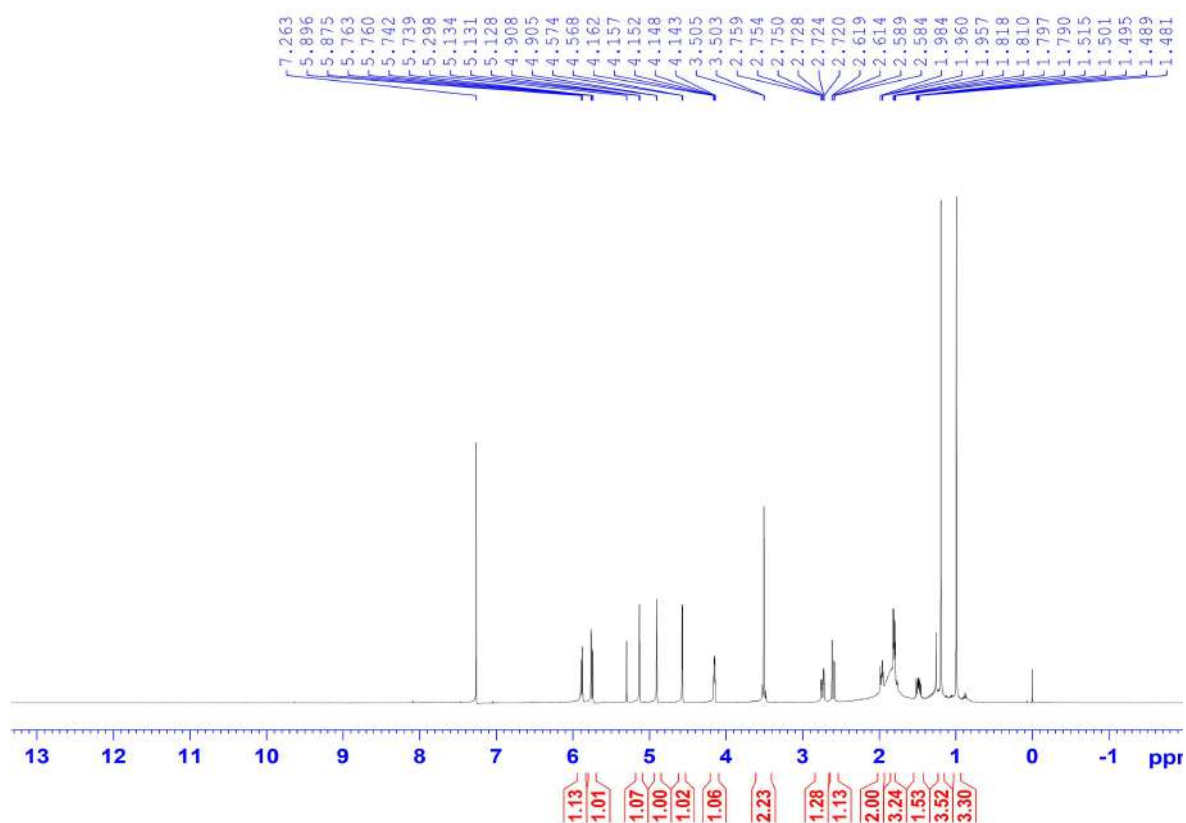


Hình D9.7. Phổ NOESY

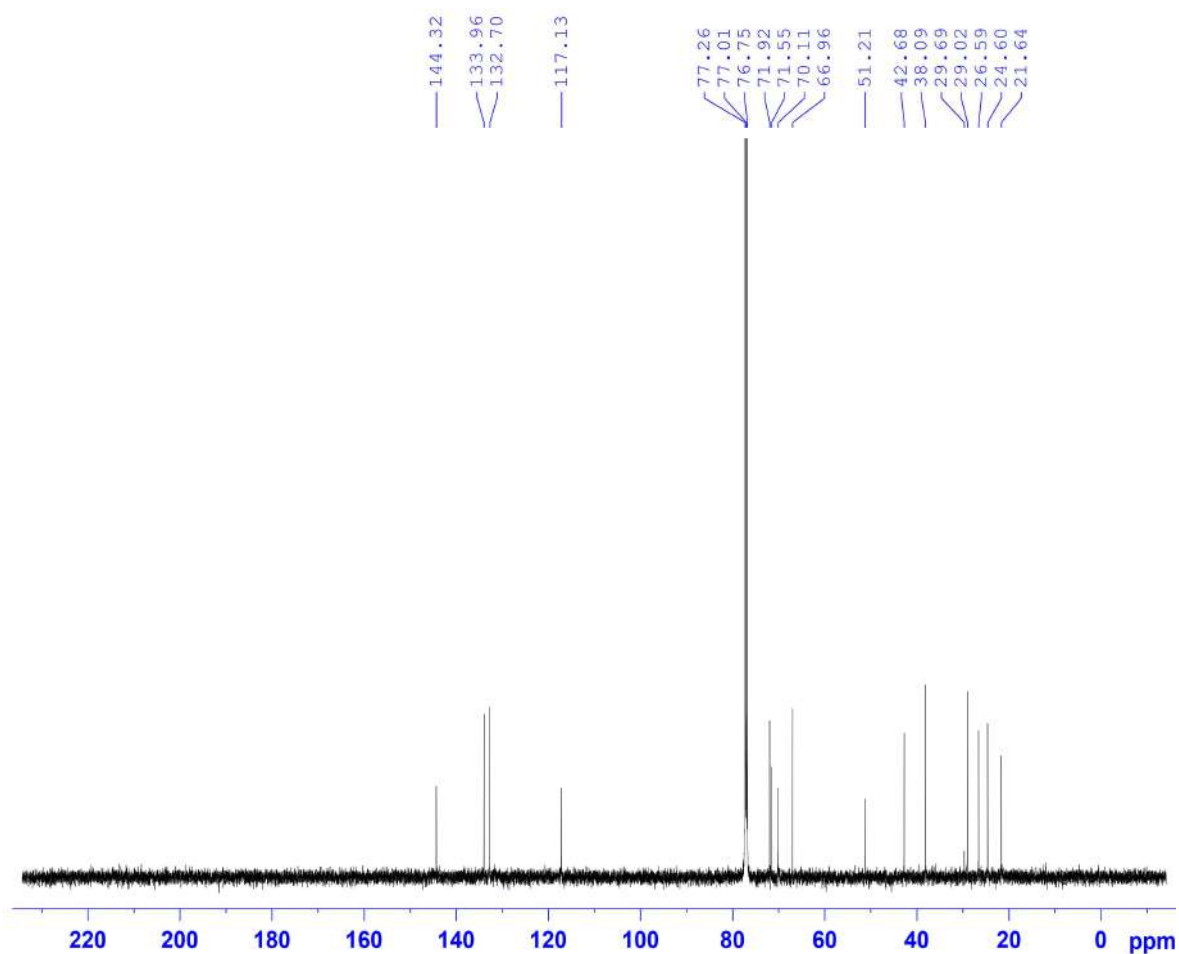
1.10. Phổ hợp chất ADB06: Aplydactylonin F (chất mới)



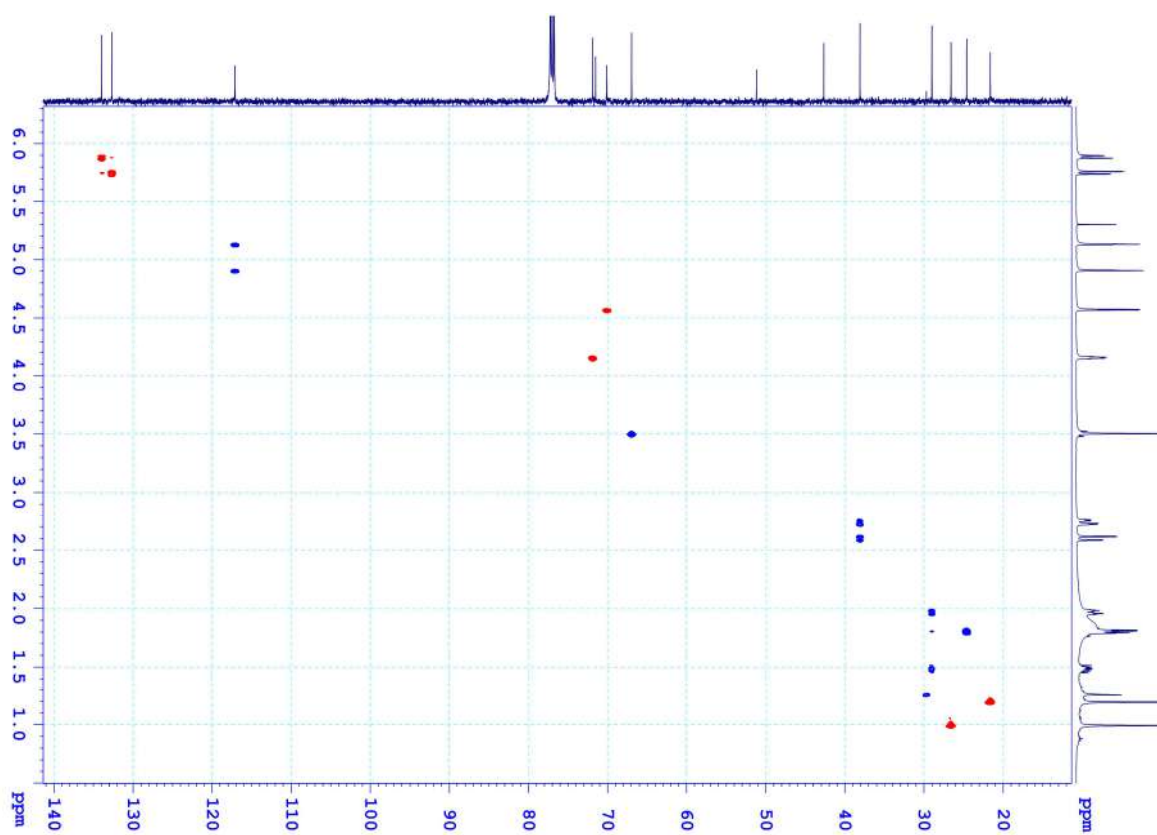
Hình D10.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



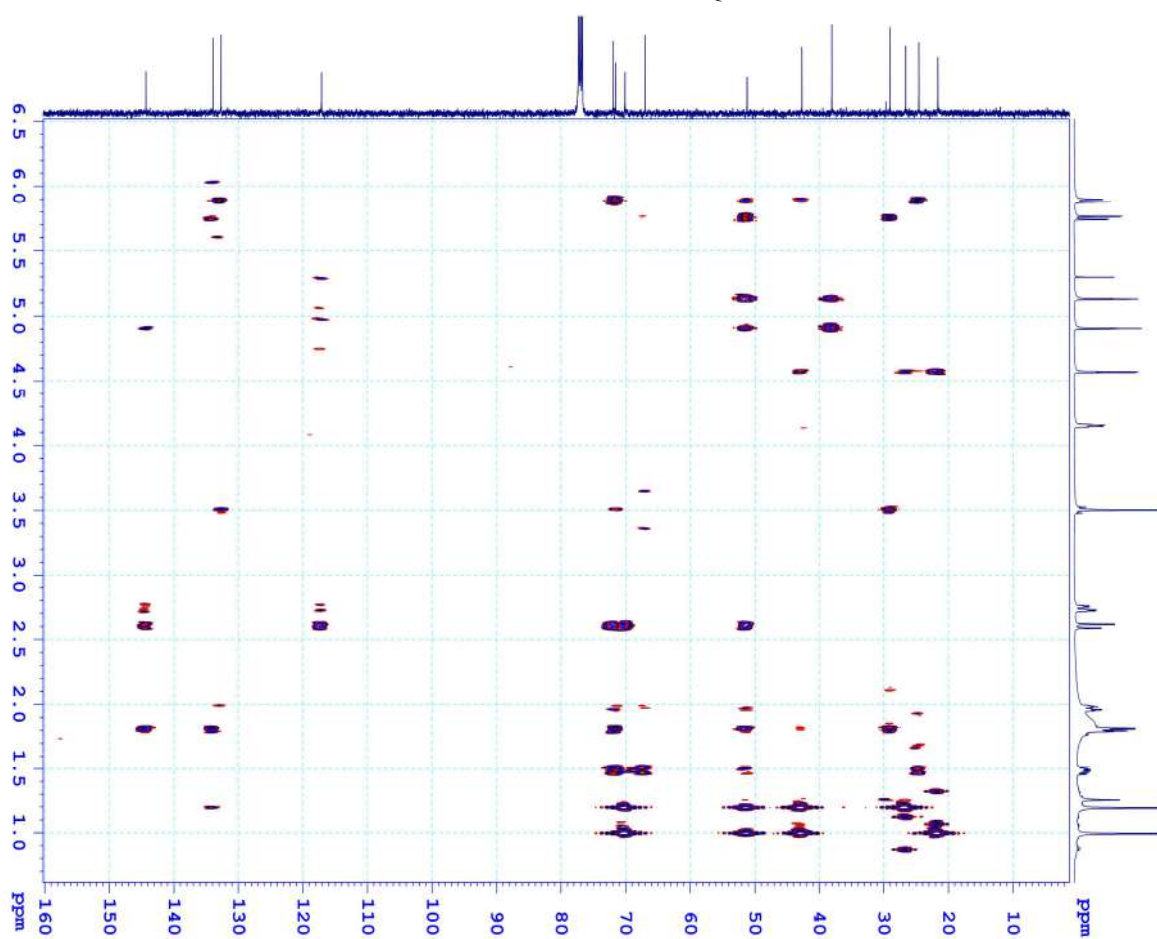
Hình D10.2. Phổ ¹H-NMR



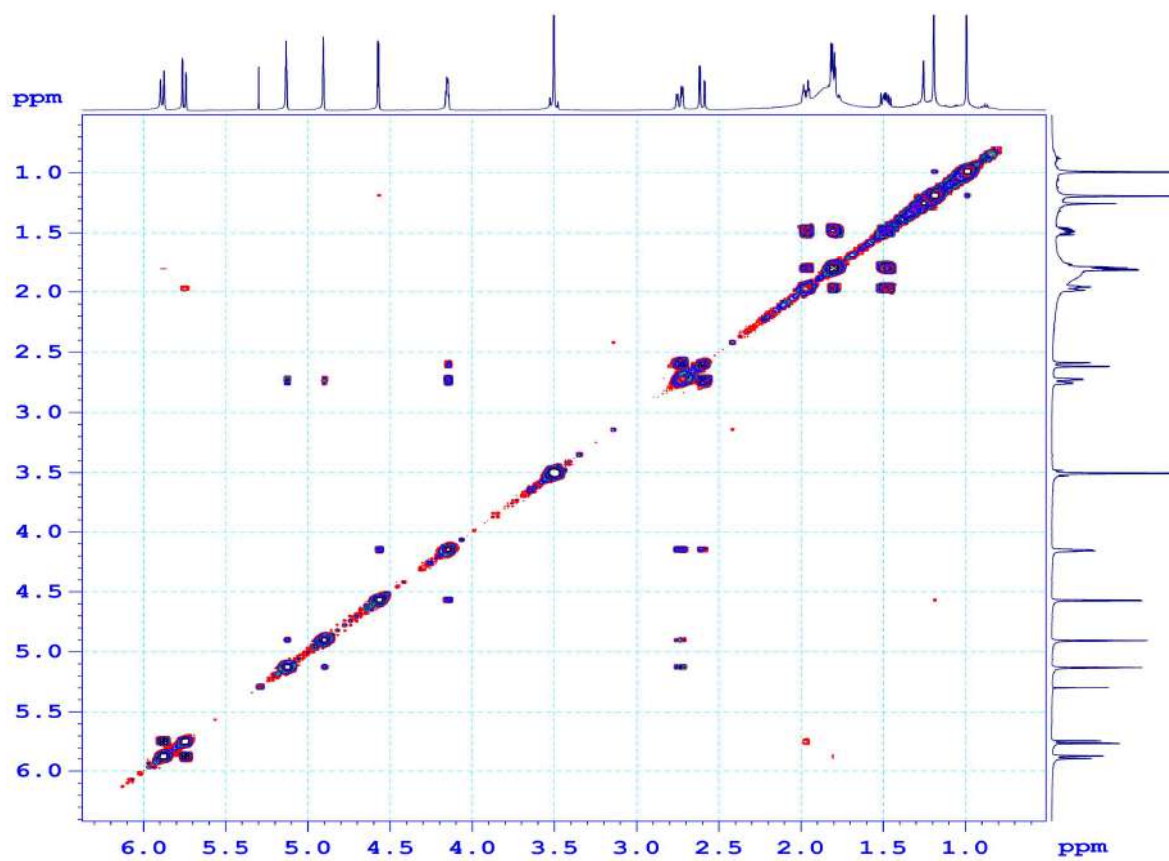
Hình D10.3. Phổ ¹³C-NMR



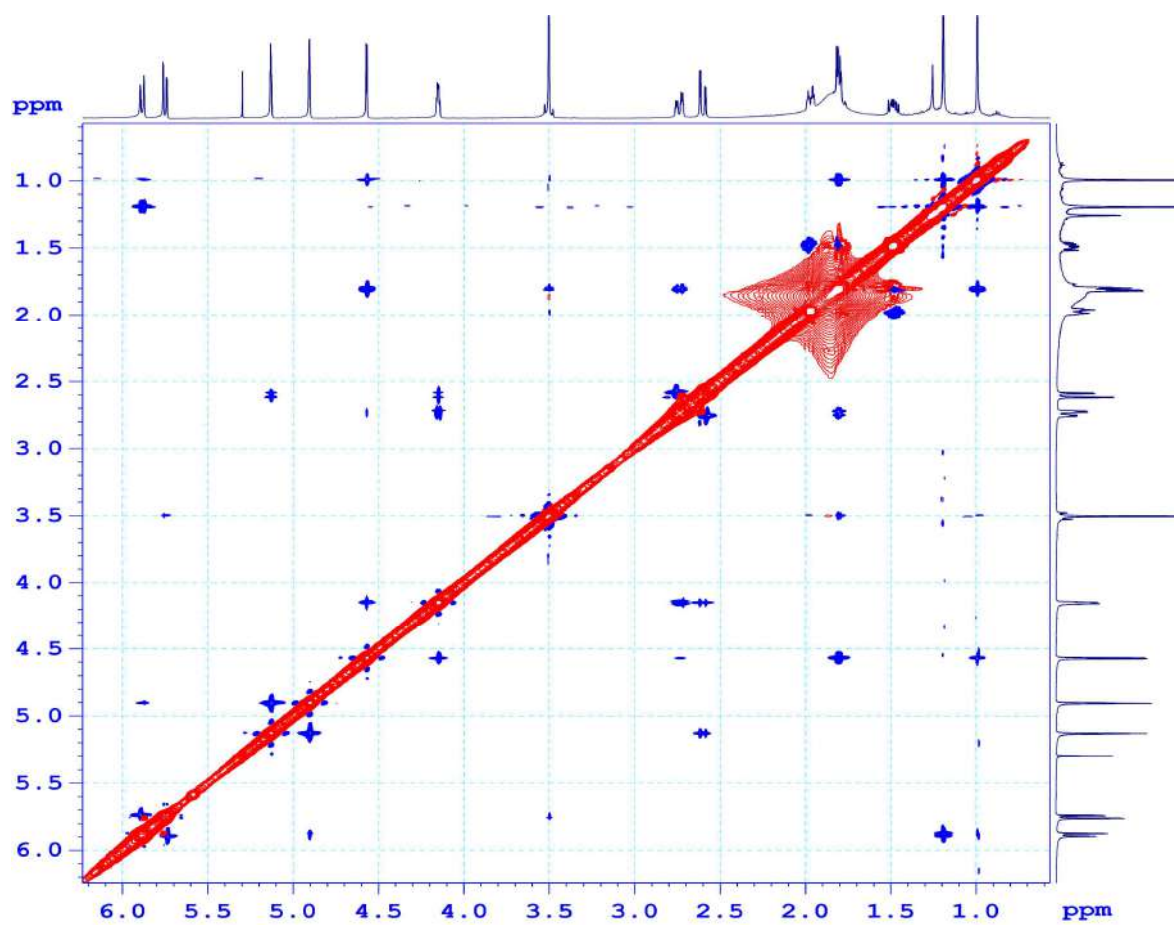
Hình D10.4. Phổ HSQC



Hình D10.5. Phổ HMBC

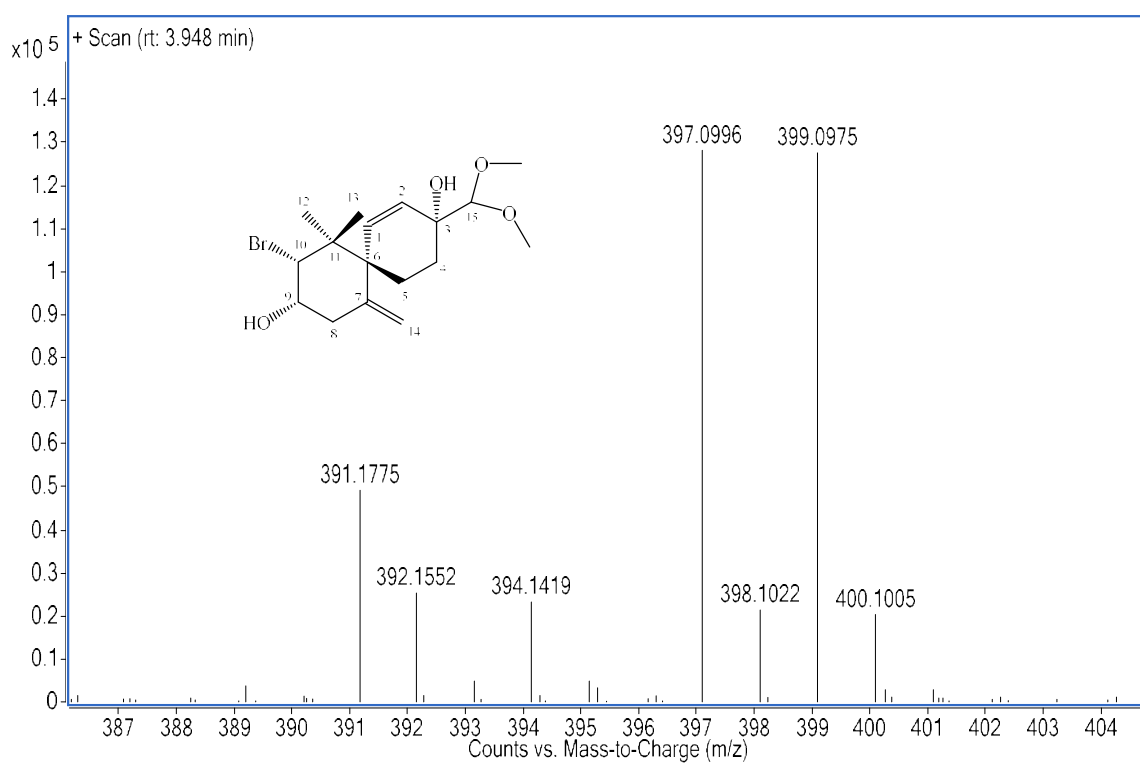


Hình D10.6. Phổ COSY

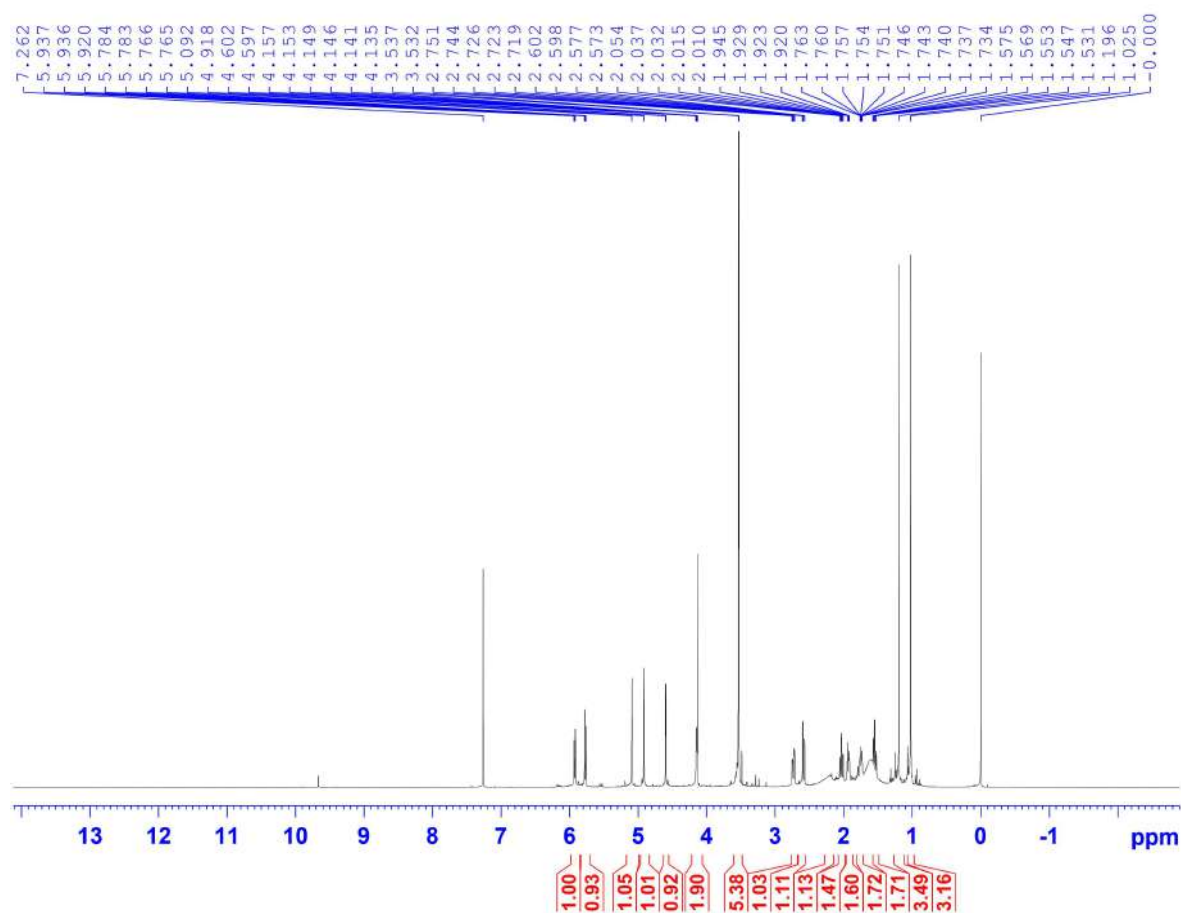


Hình D10.7. Phổ NOESY

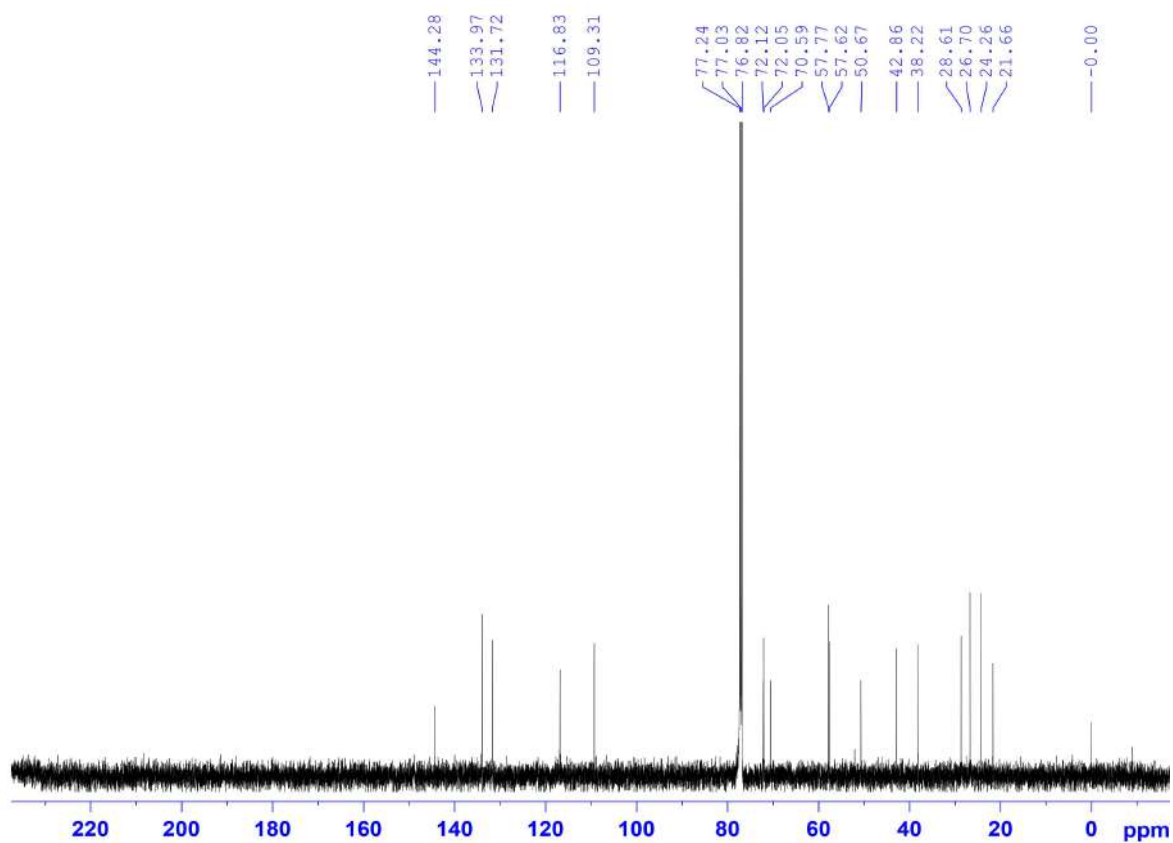
1.11. Phổ hợp chất ADB07: Aplydactylonin E (chất mới)



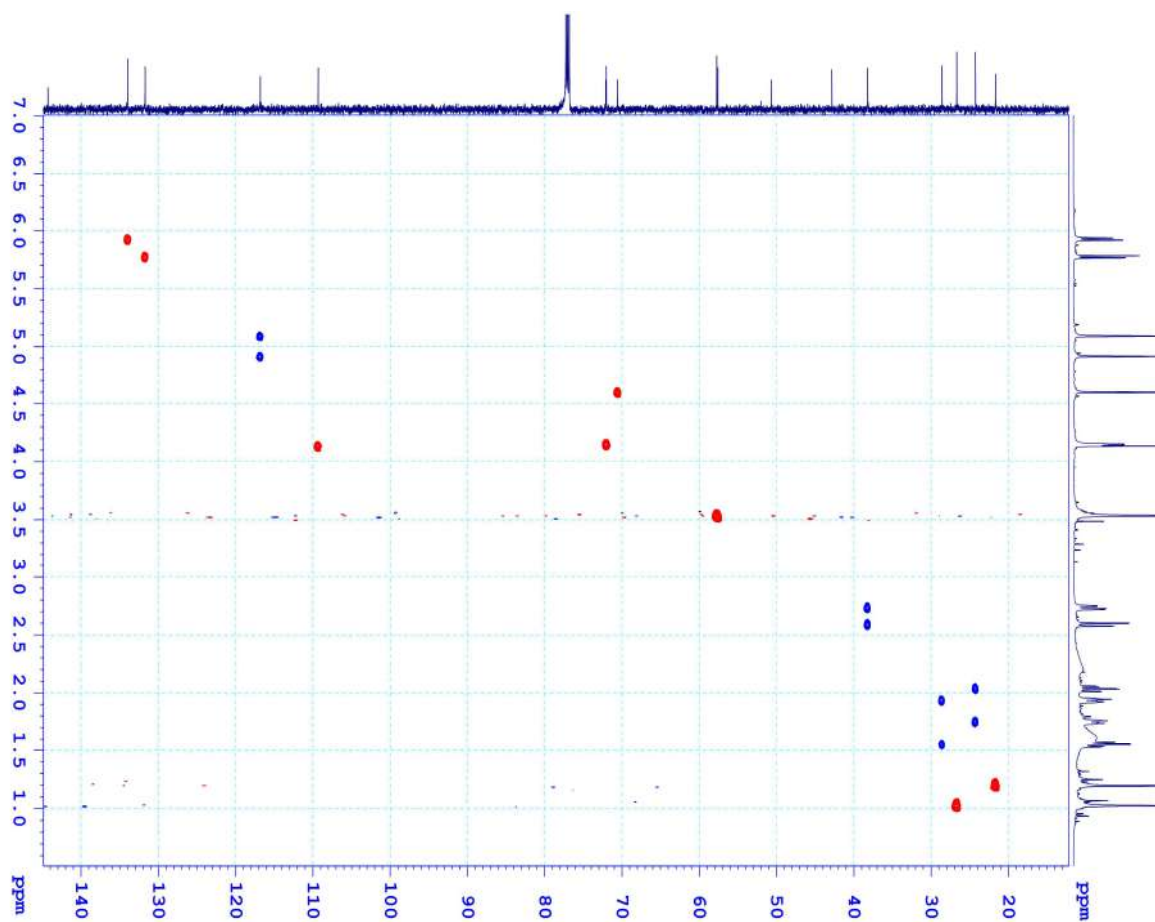
Hình D11.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



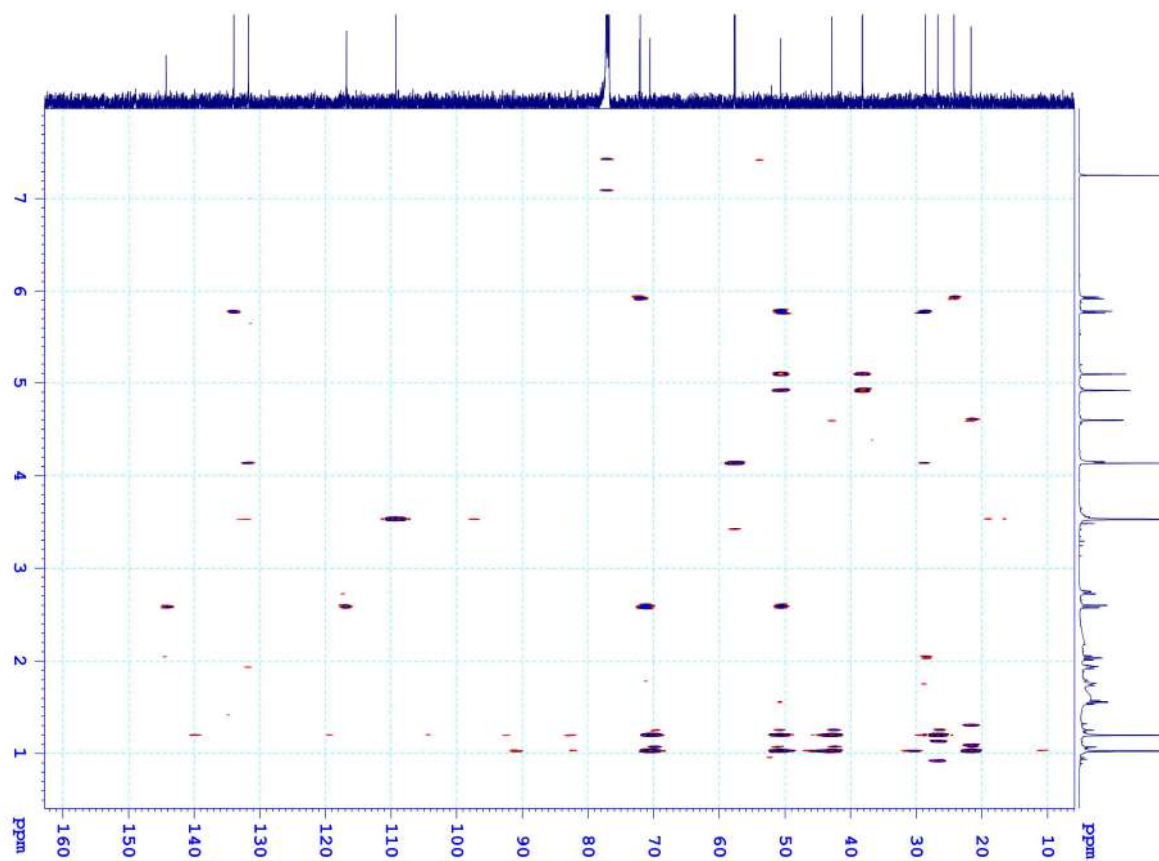
Hình D11.2. Phổ ¹H-NMR



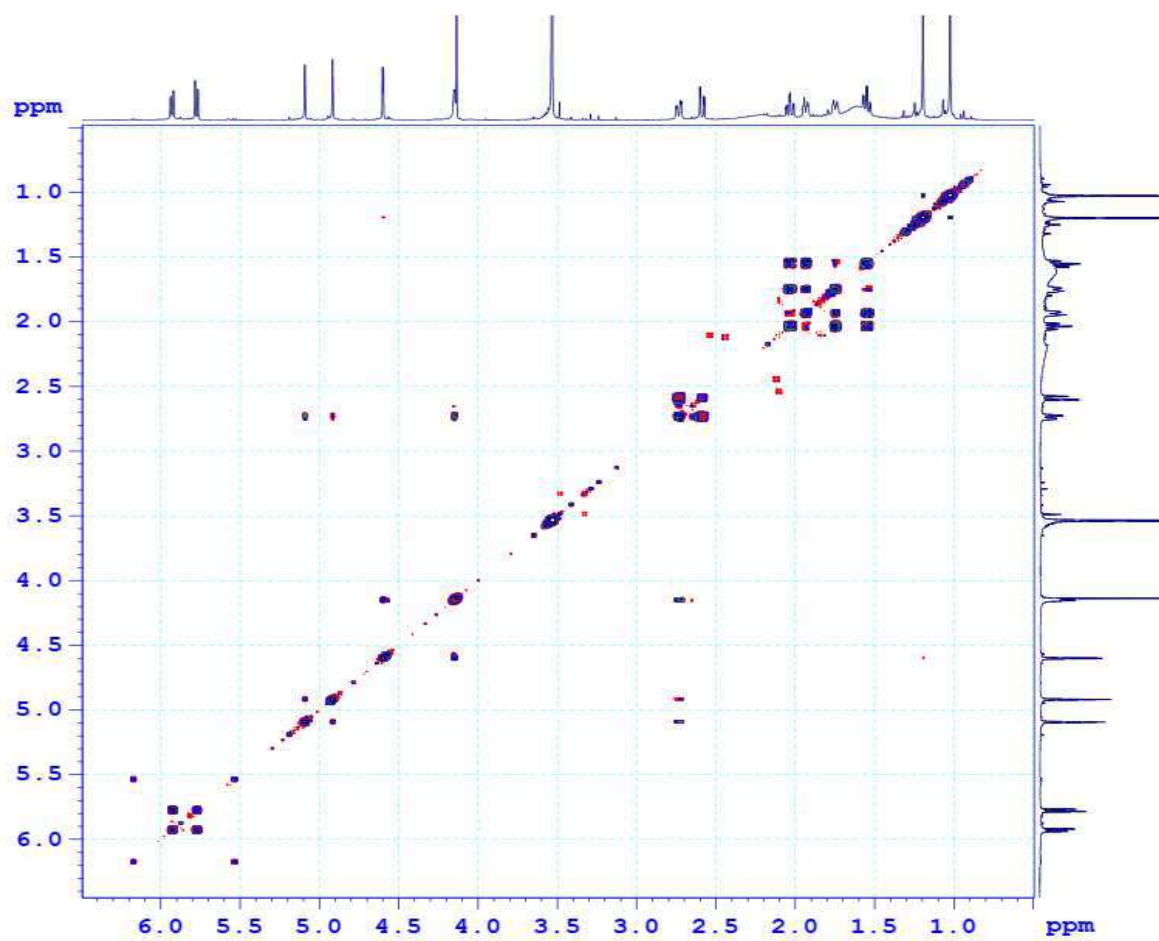
Hình D11.3. Phổ ^{13}C -NMR



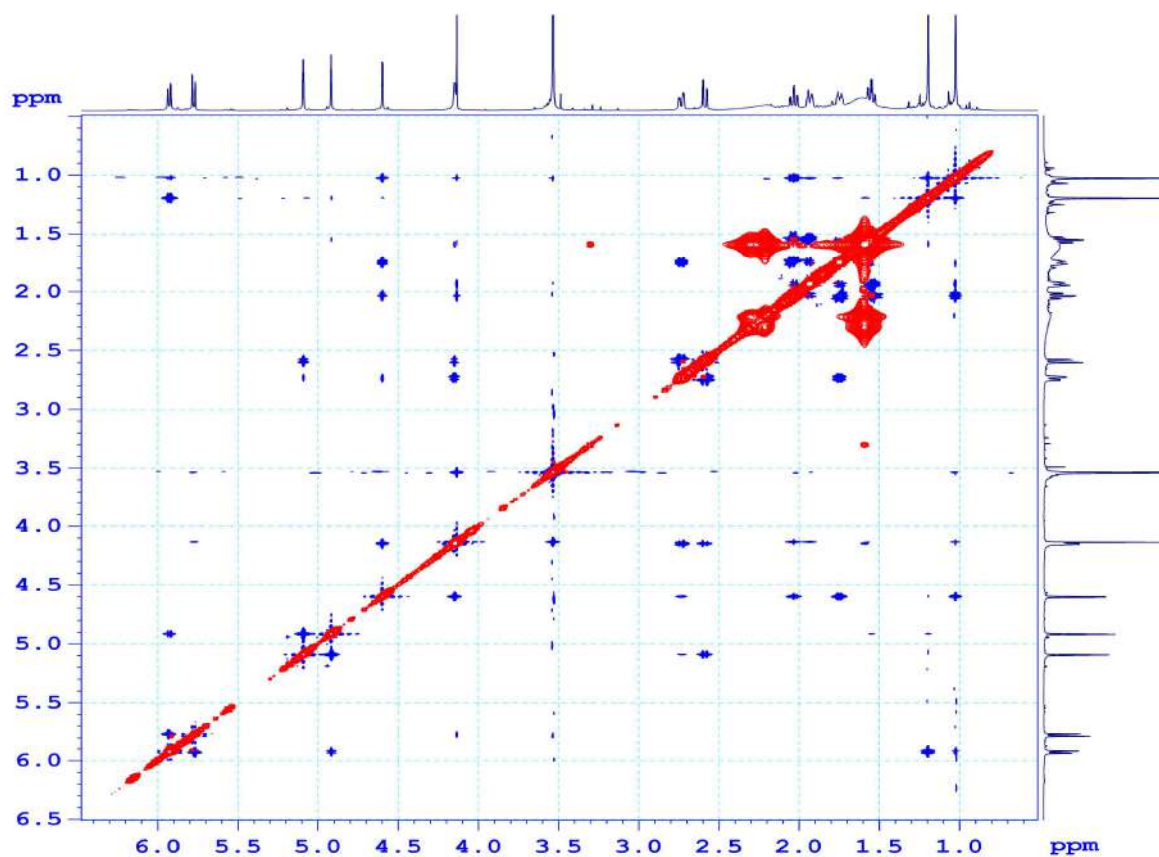
Hình D11.4. Phổ HSQC



Hình D11.5. Phổ HMBC

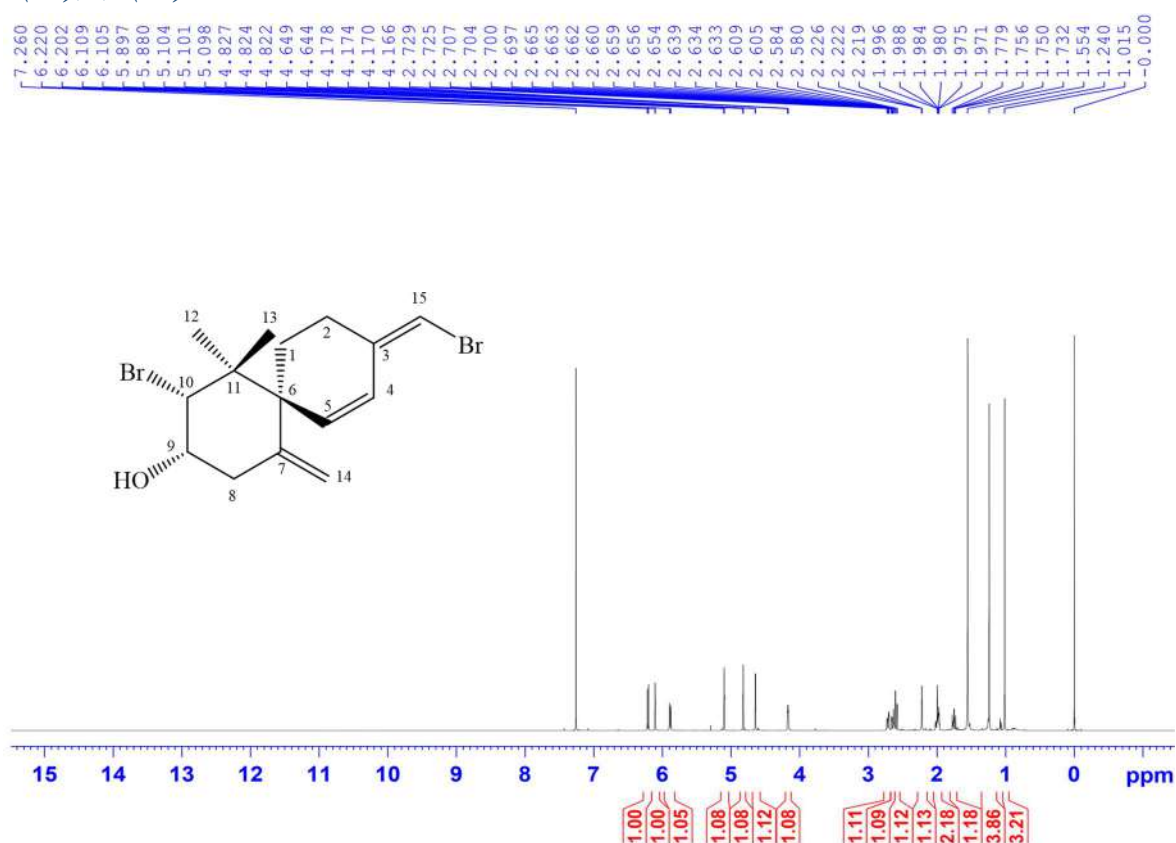


Hình D11.6. Phổ COSY

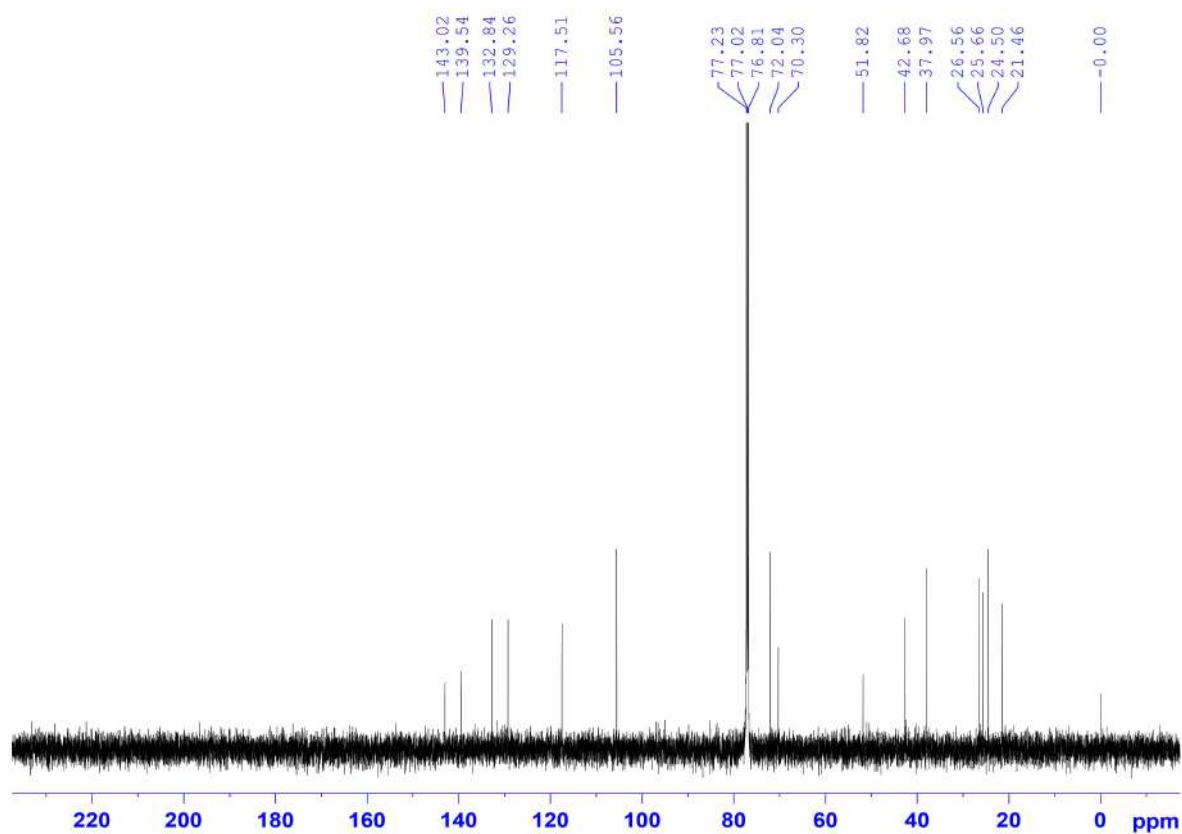


Hình D11.7. Phổ NOESY

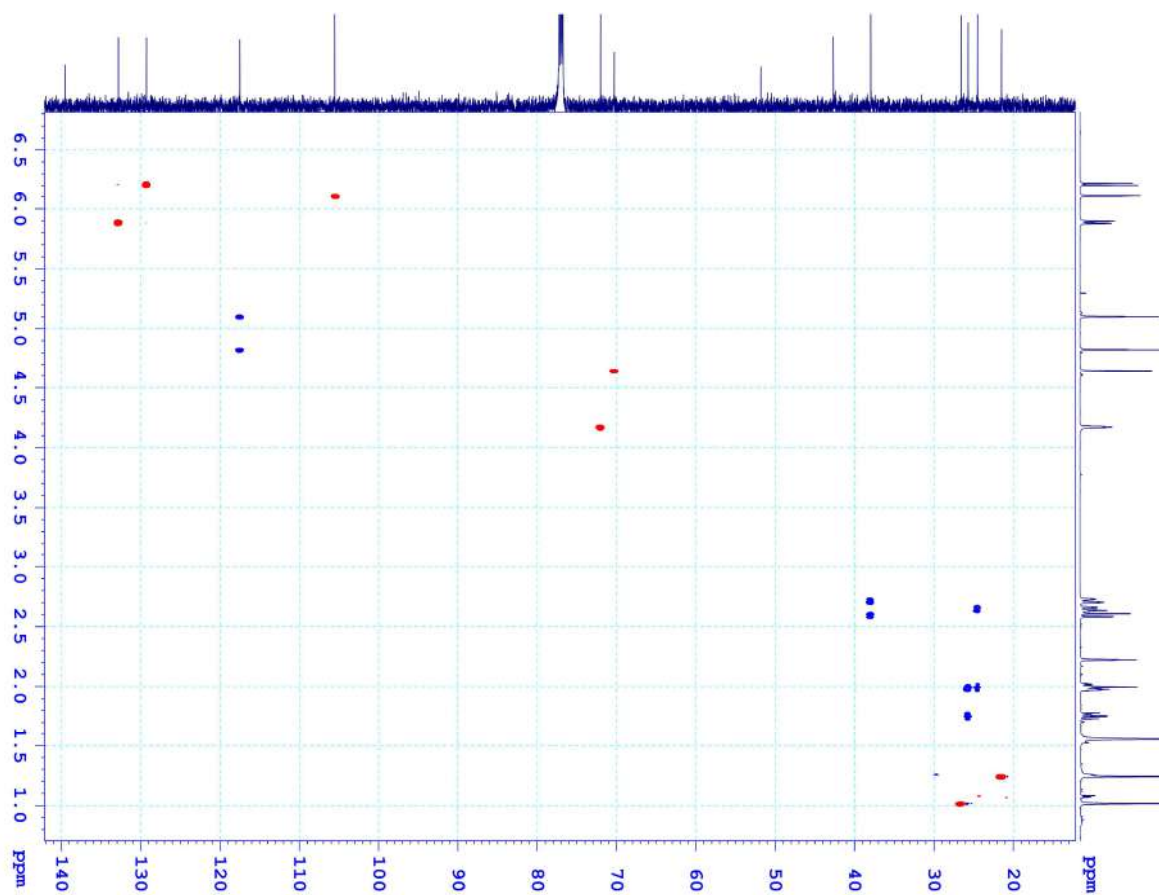
1.12. Phổ hợp chất ADB08: [3(15)*E*,4*Z*,6*S*,9*S*,10*R*]-10,15-dibromochamigra-3(15),4,7(14)-trien-9-ol



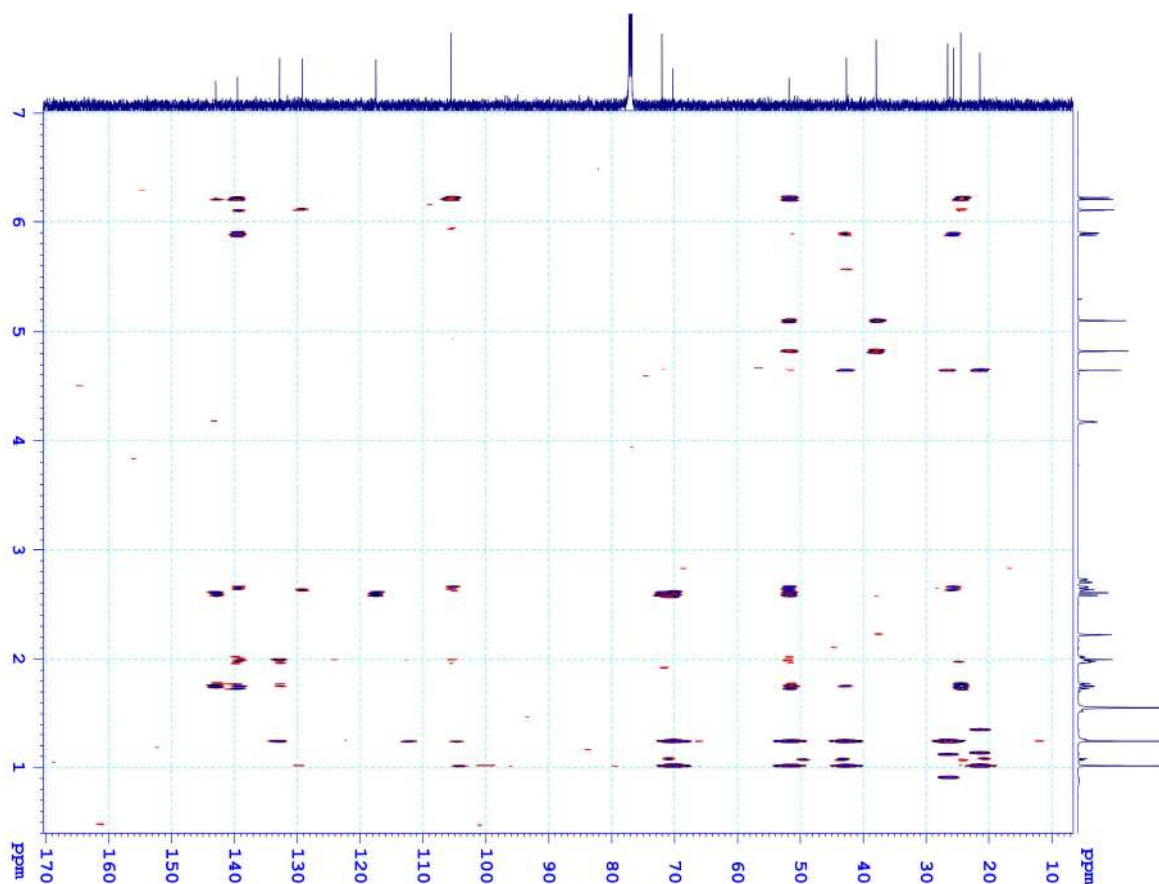
Hình D12.1. Phổ ^1H -NMR



Hình D12.2. Phổ ^{13}C -NMR

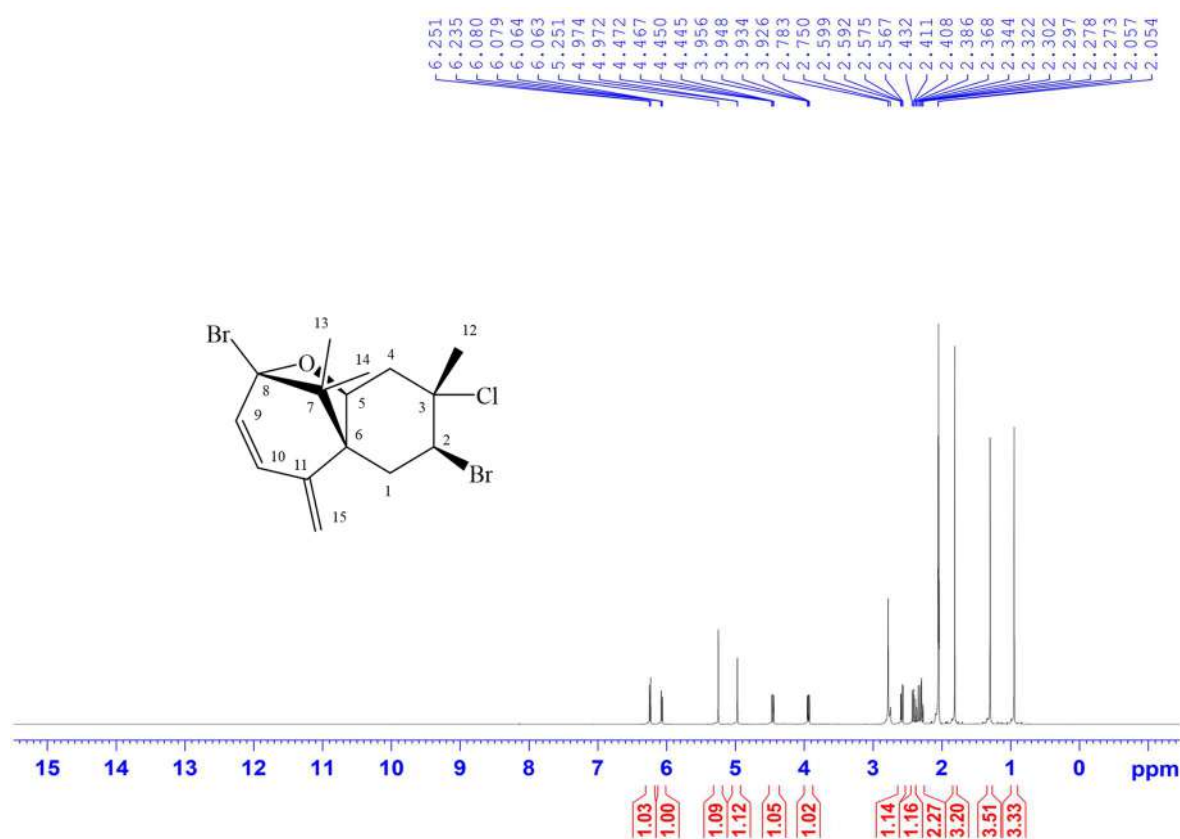


Hình D12.3. Phổ HSQC

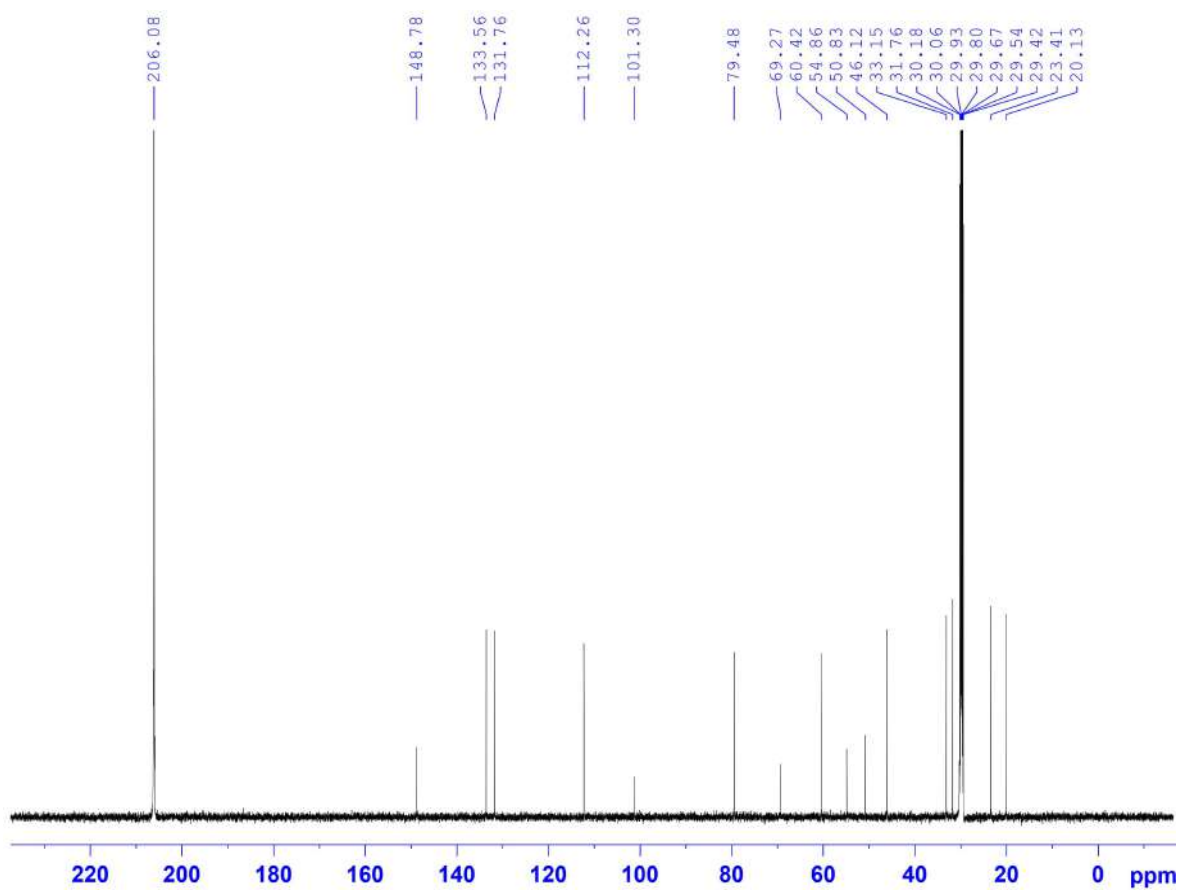


Hình D12.4. Phổ HMBC

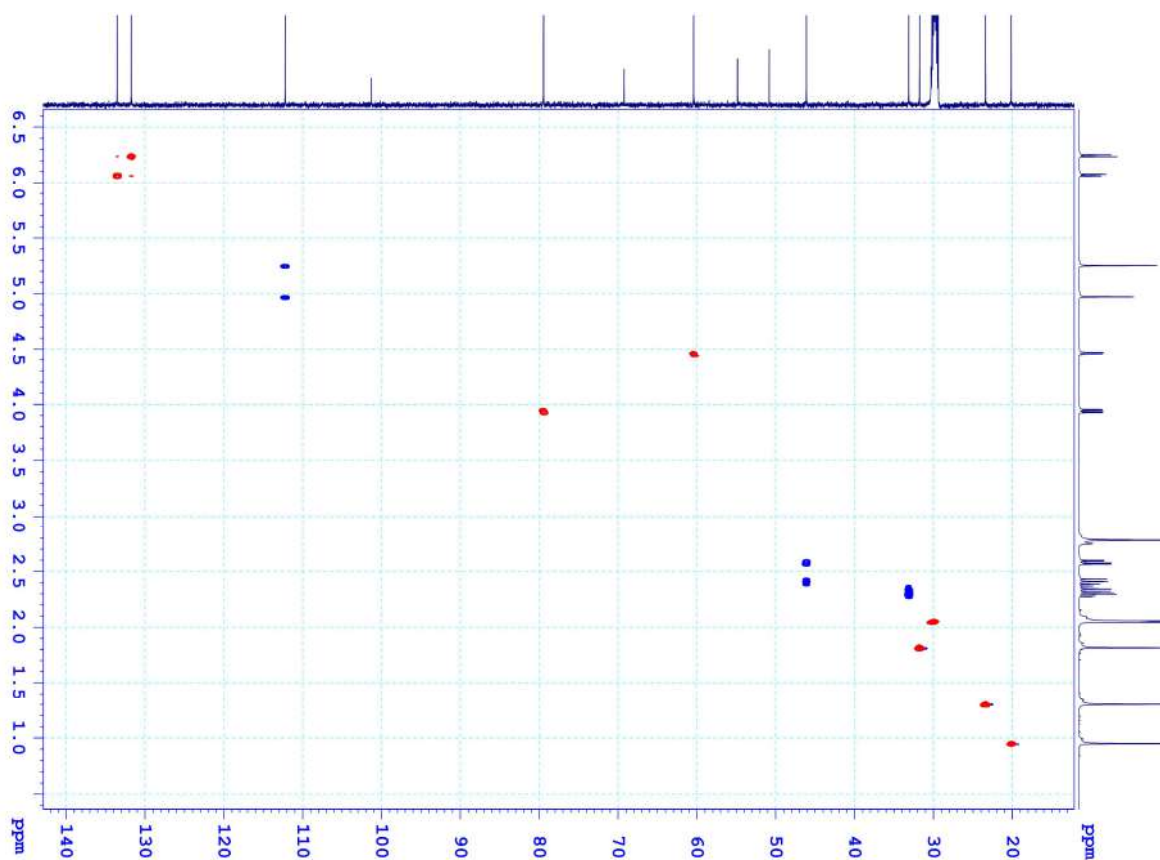
1.13. Phổ hợp chất ADB09: Pacifidiene



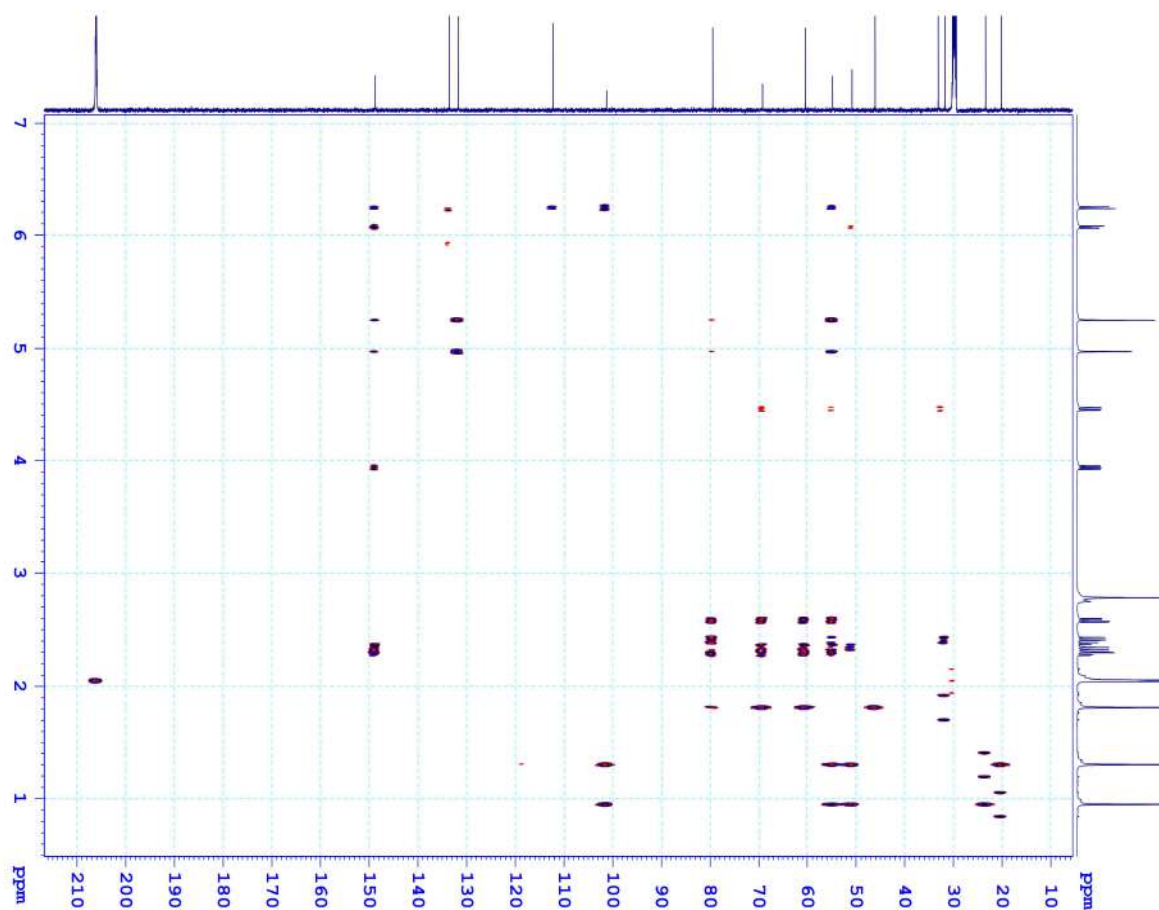
Hình D13.1. Phổ ^1H -NMR



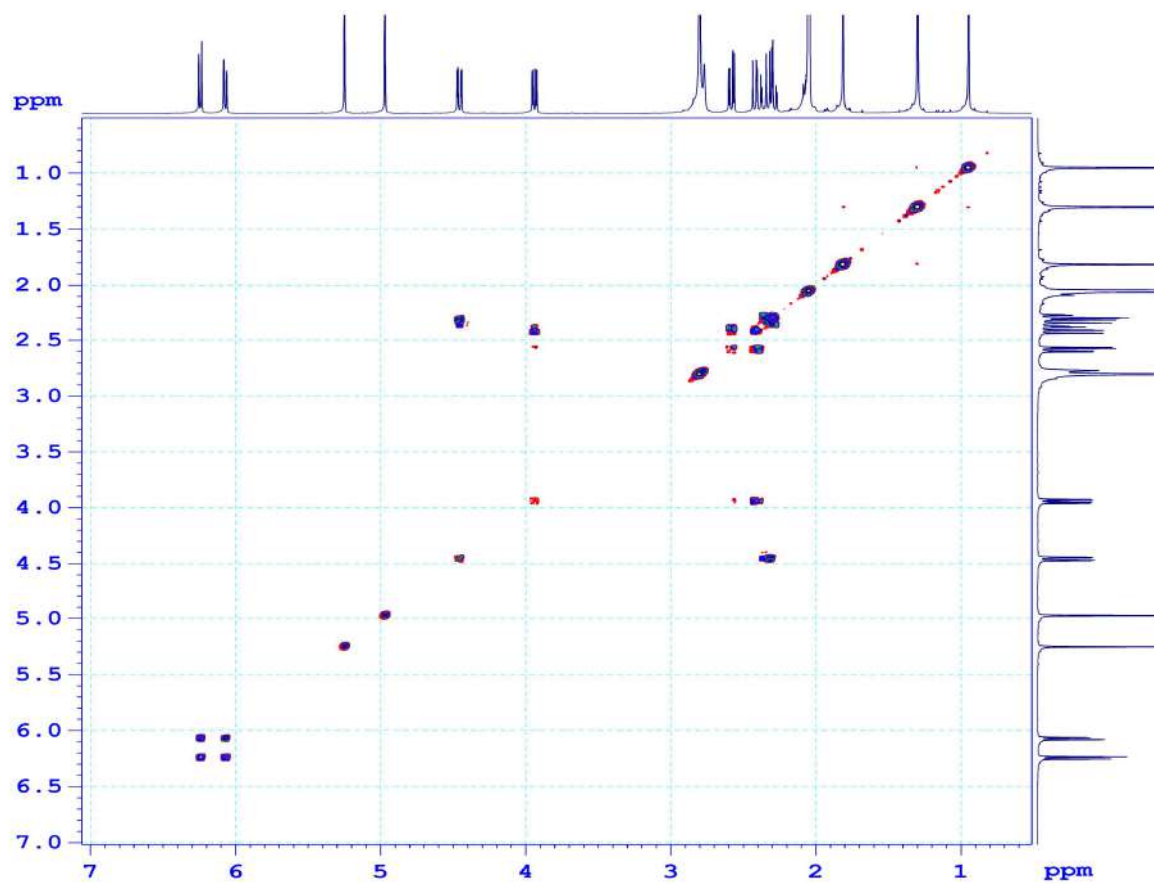
Hình D13.2. Phổ ^{13}C -NMR



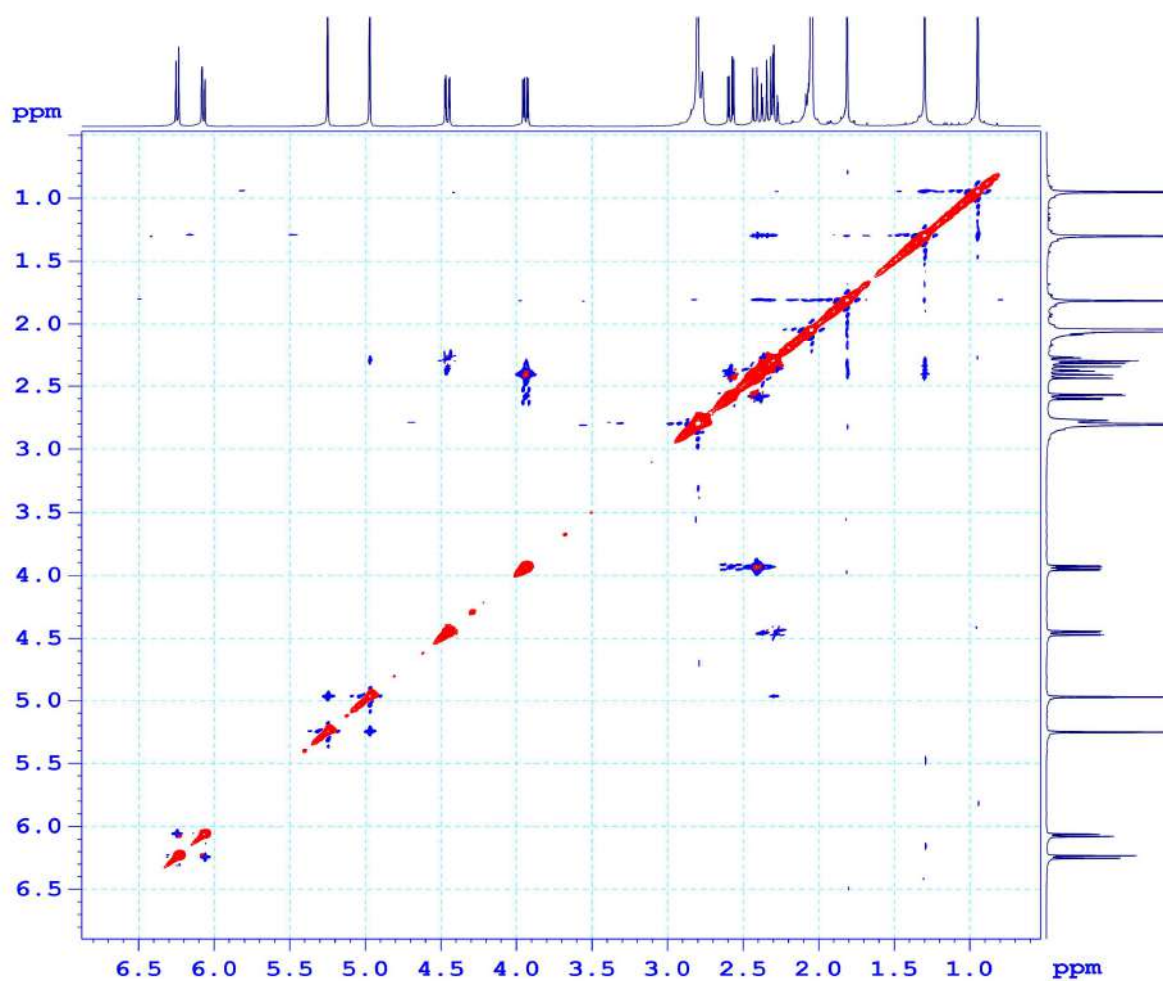
Hình D13.3. Phổ HSQC



Hình D13.4. Phổ HMBC

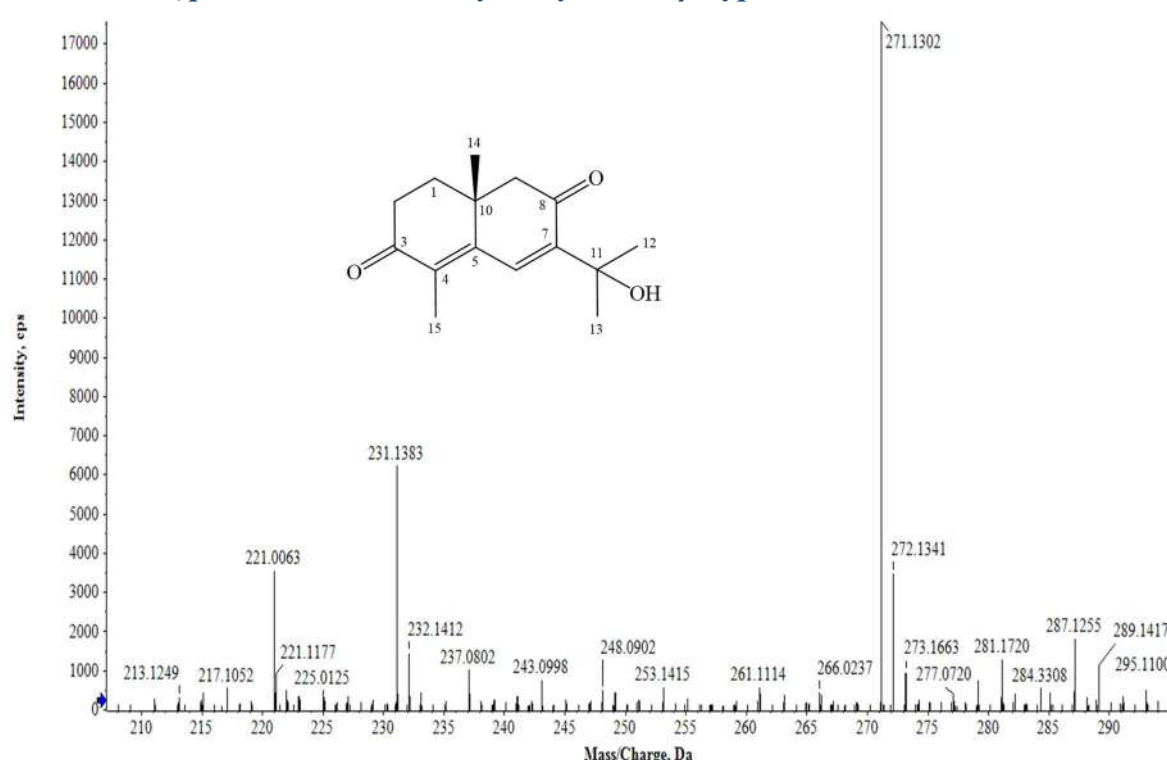


Hình D13.5. Phổ COSY

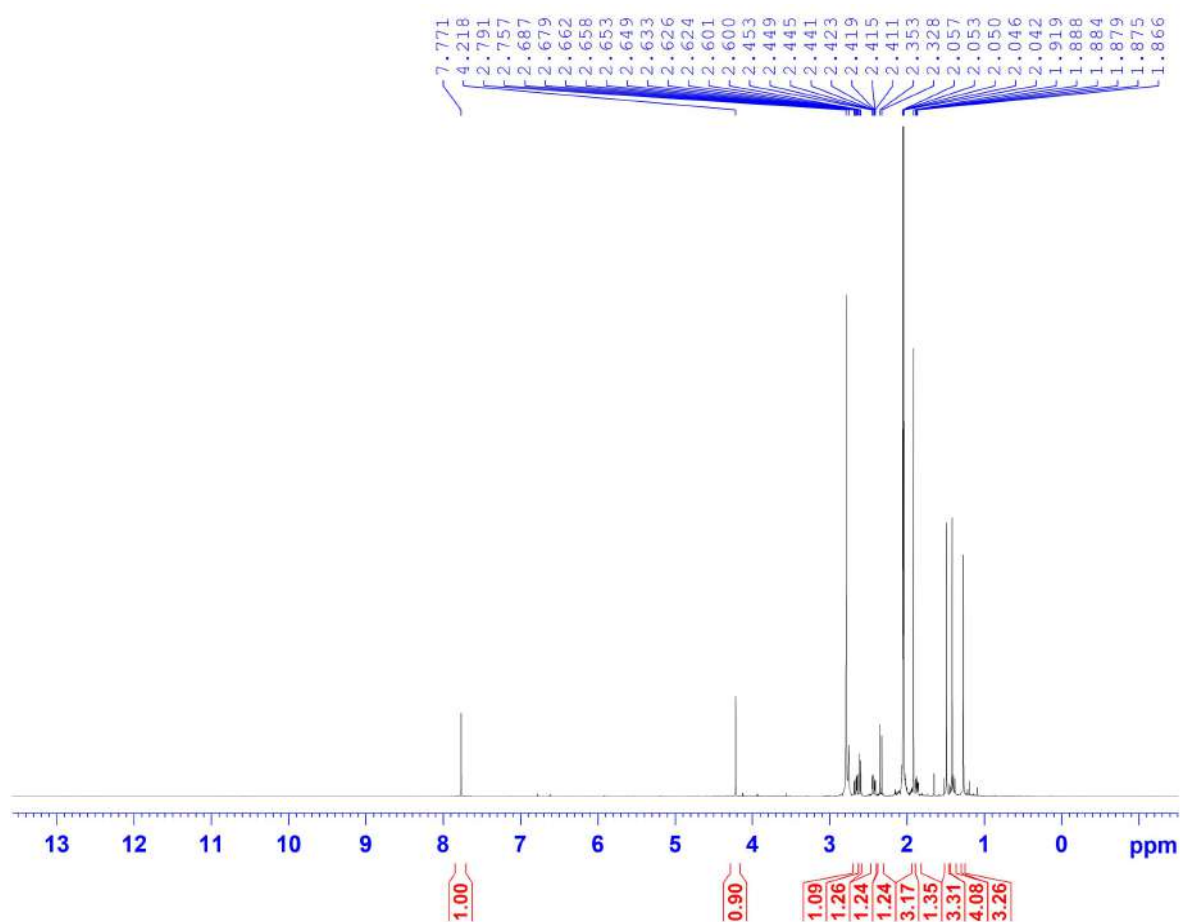


Hình D13.6. Phổ NOESY

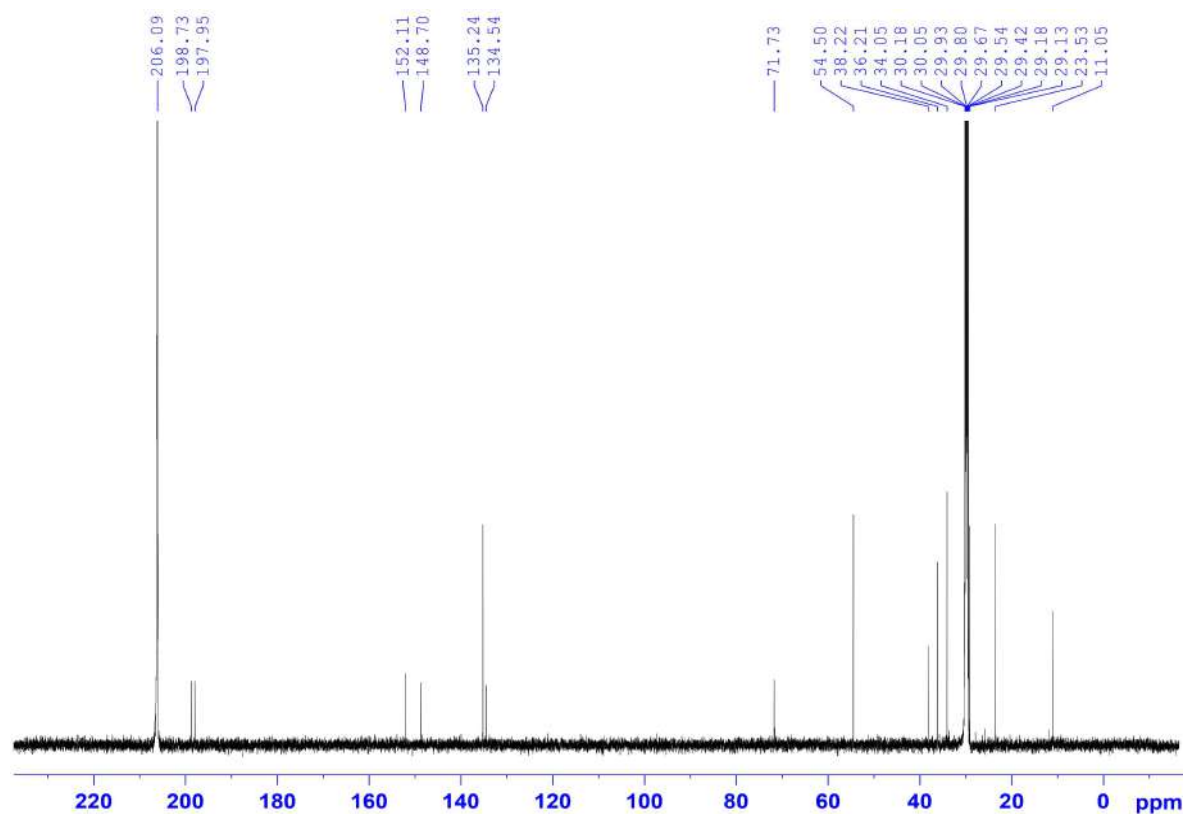
1.14. Phổ hợp chất ADB10: 11-hydroxy-8-oxo- β -cyperon



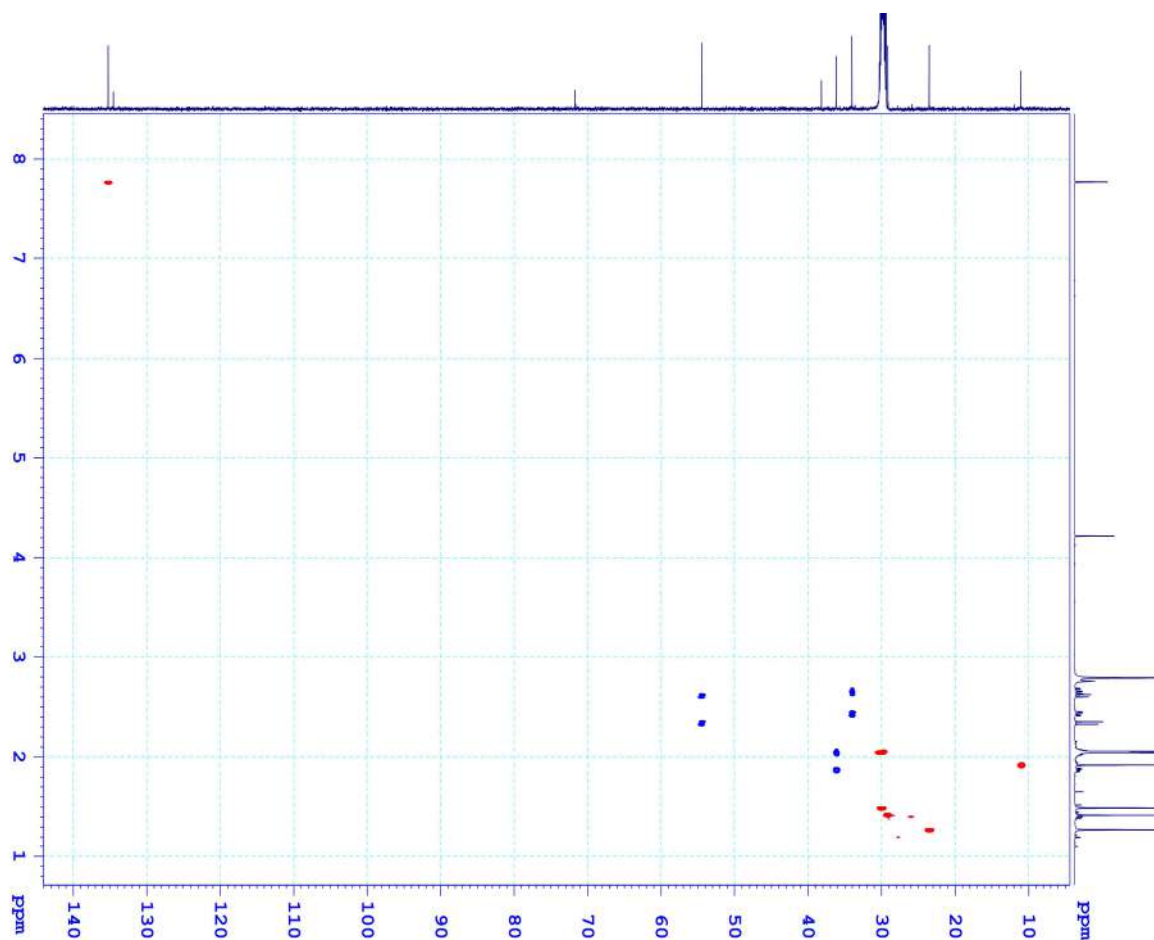
Hình D14.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



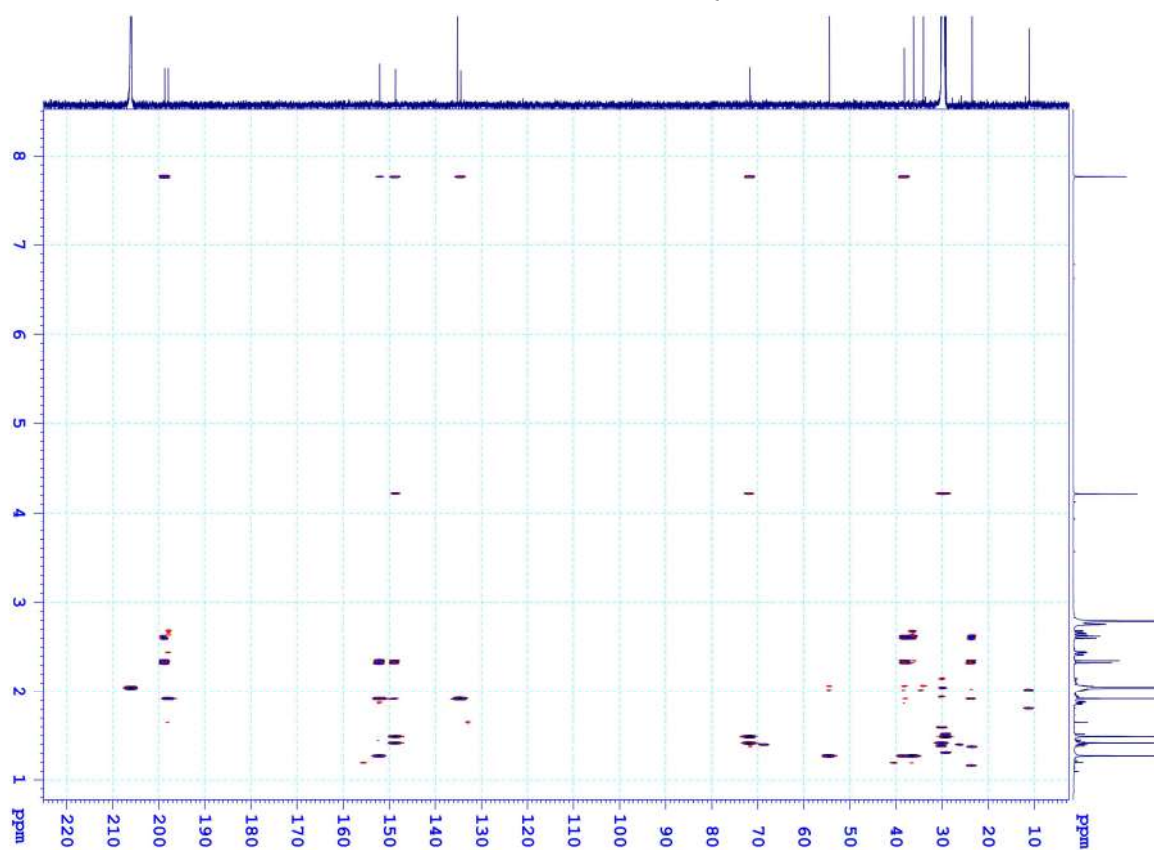
Hình D14.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$



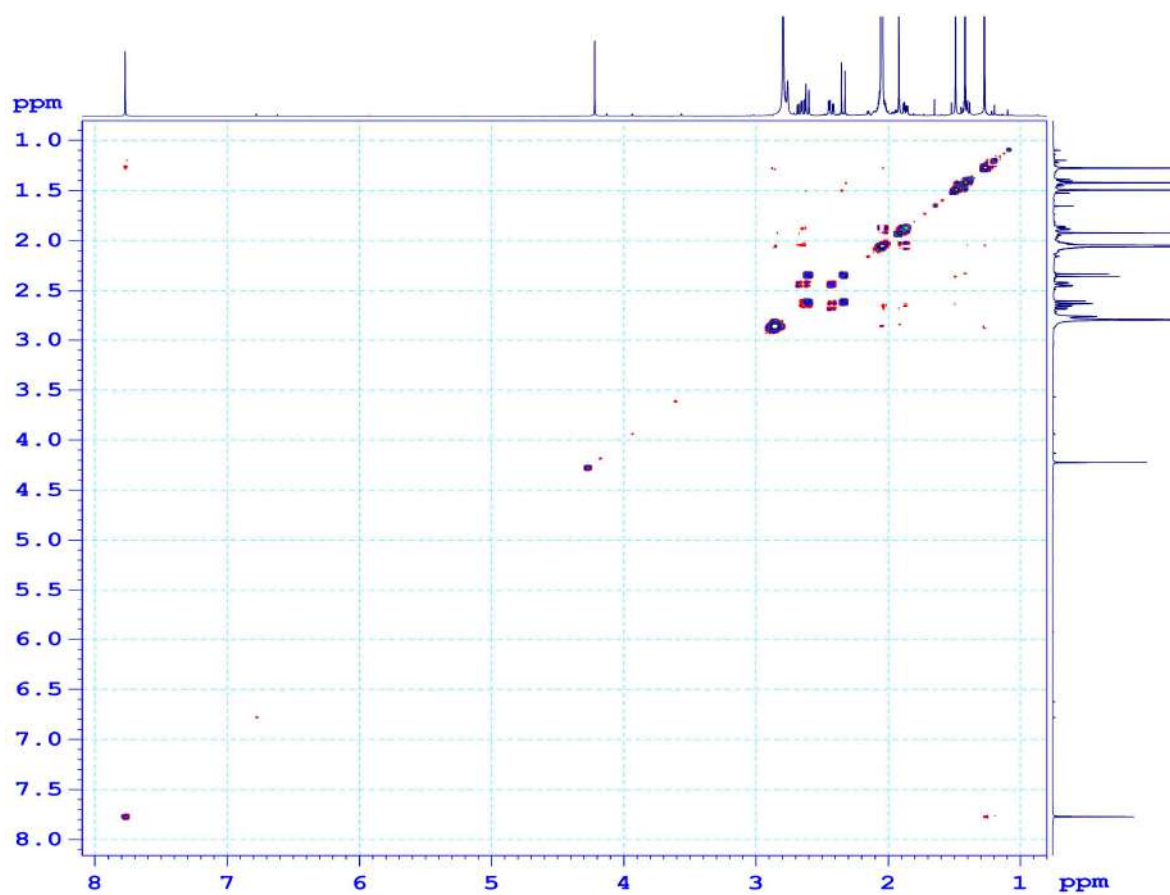
Hình D14.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$



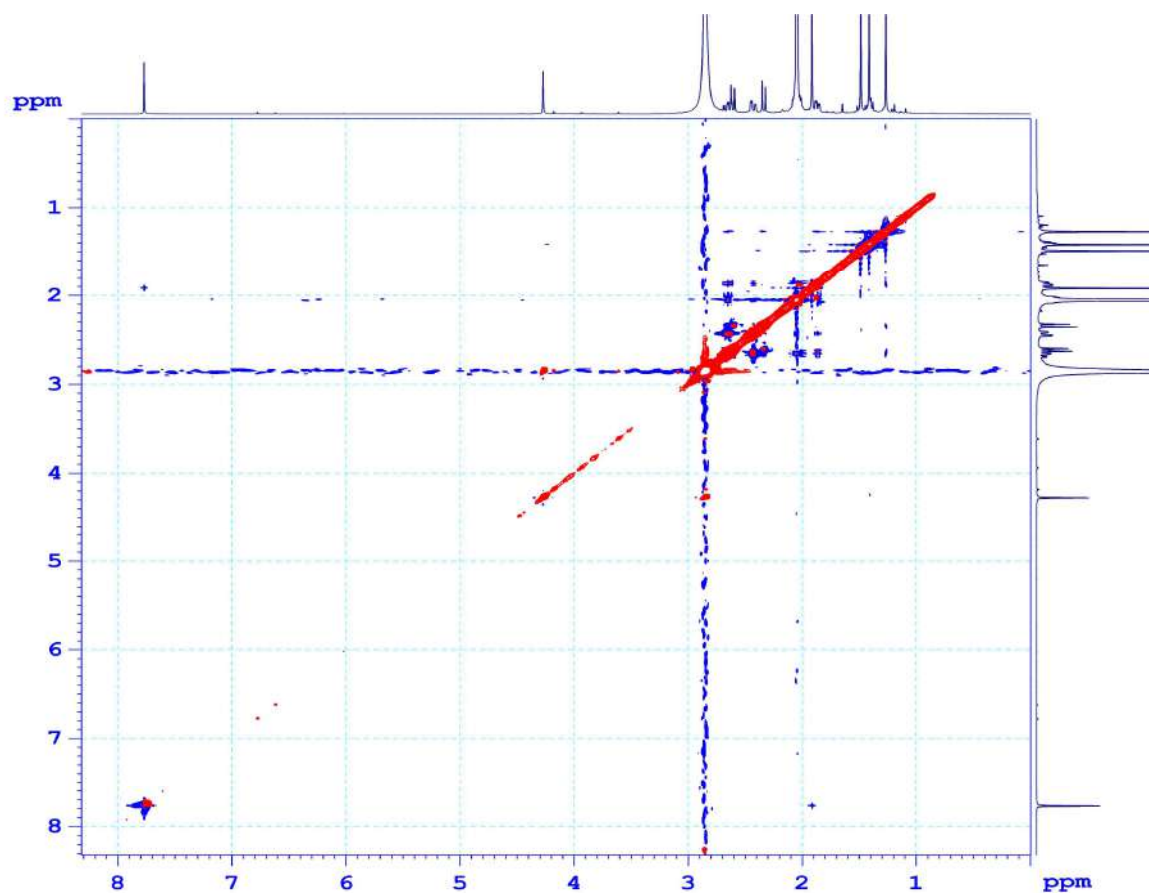
Hình D14.4. Phổ HSQC



Hình D14.5. Phổ HMBC

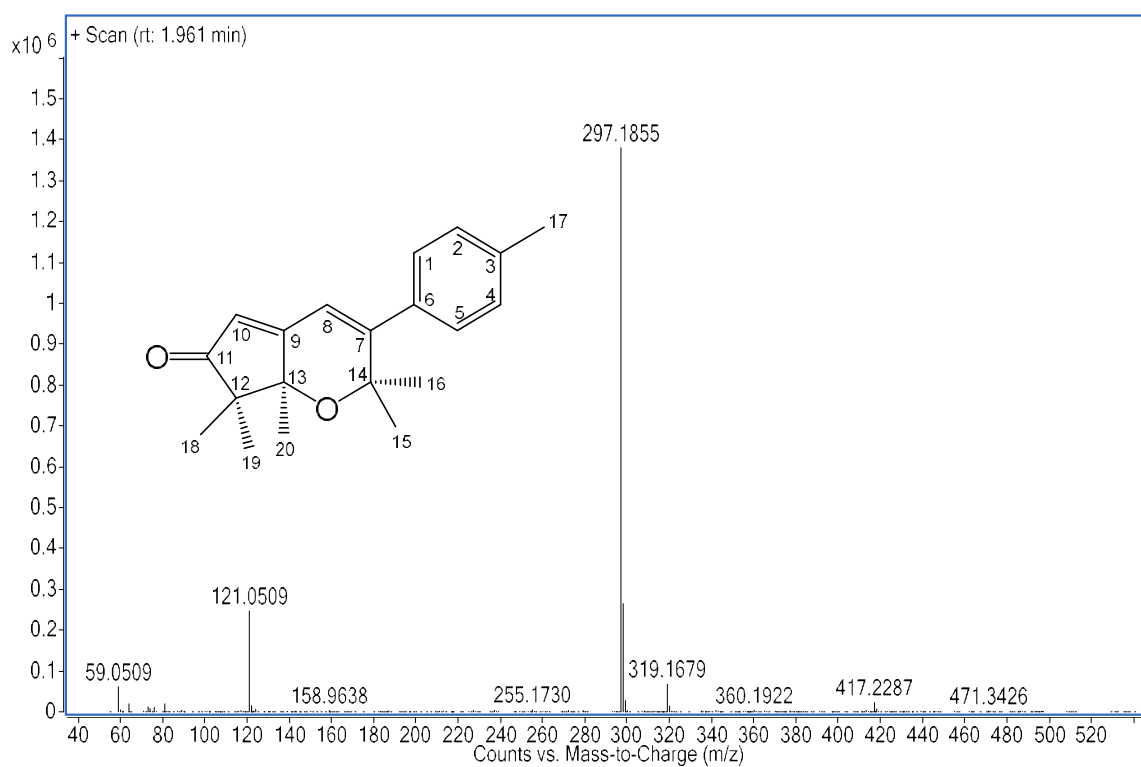


Hình D14.6. Phổ COSY

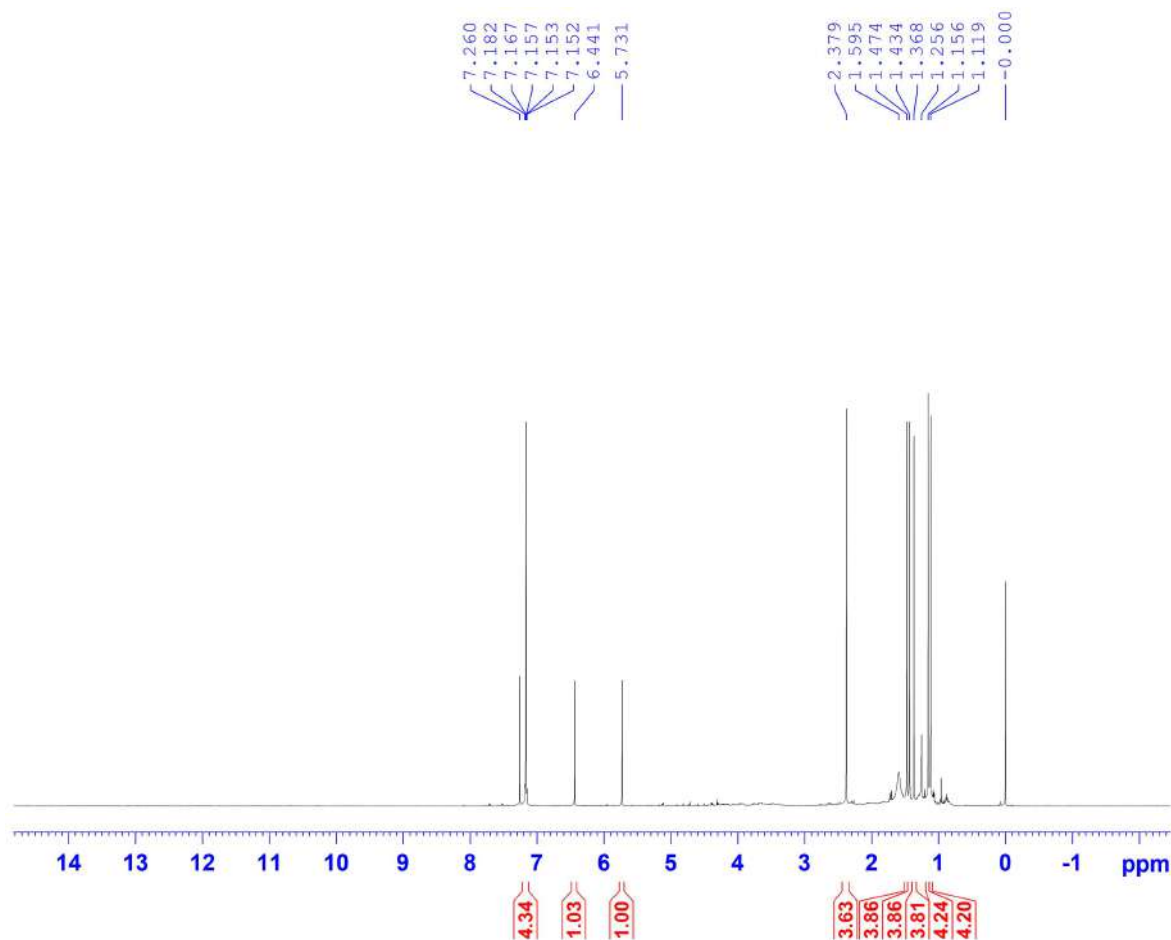


Hình D14.7. Phổ NOESY

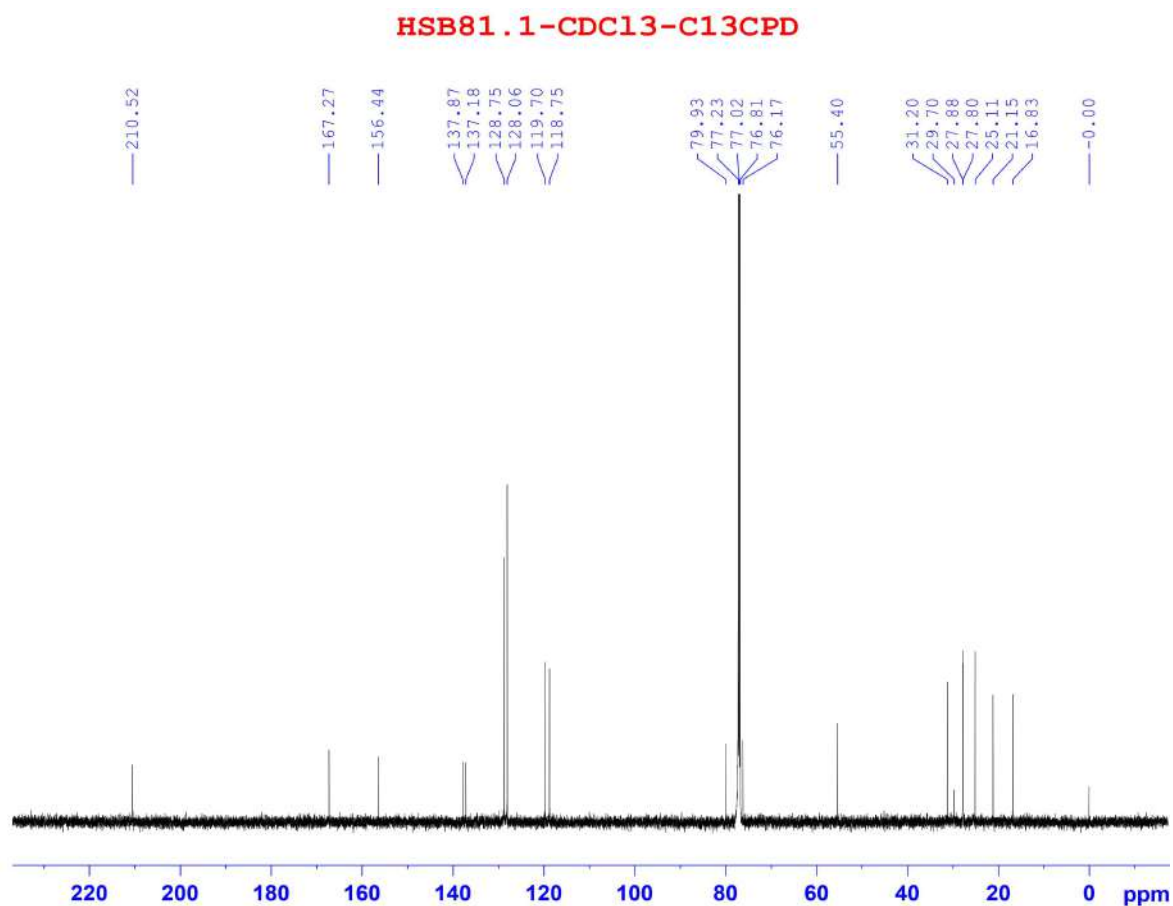
1.15. Phổ hợp chất ADB11: Aplydactylonin D (chất mới)



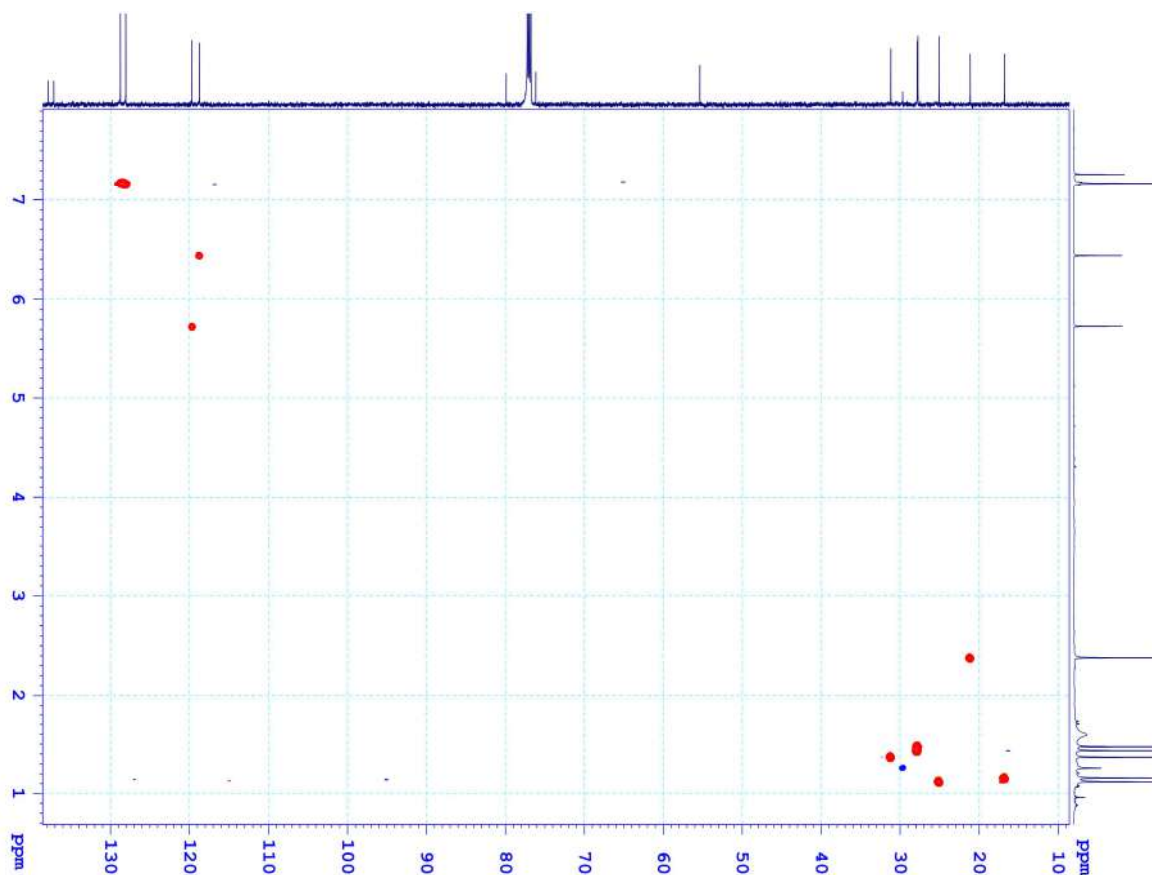
Hình D15.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



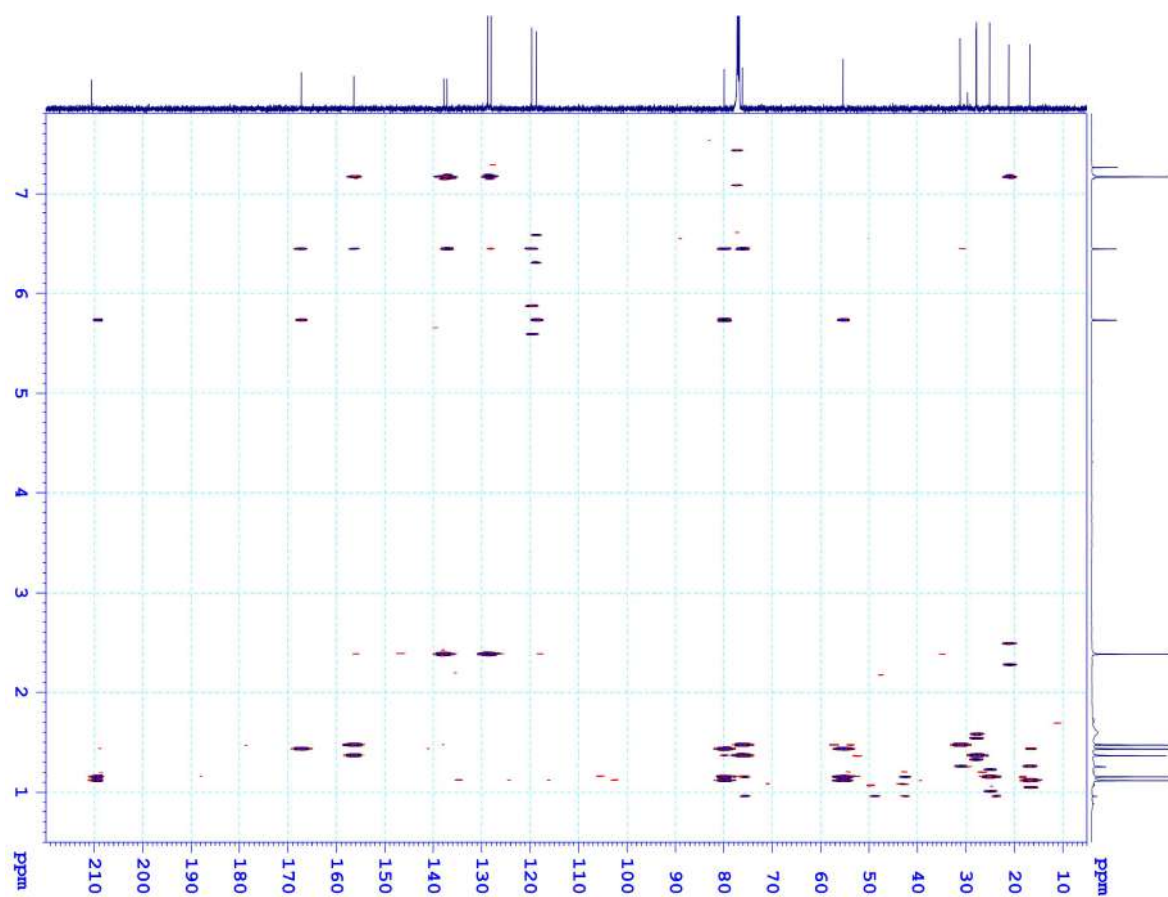
Hình D15.2. Phổ ¹H-NMR



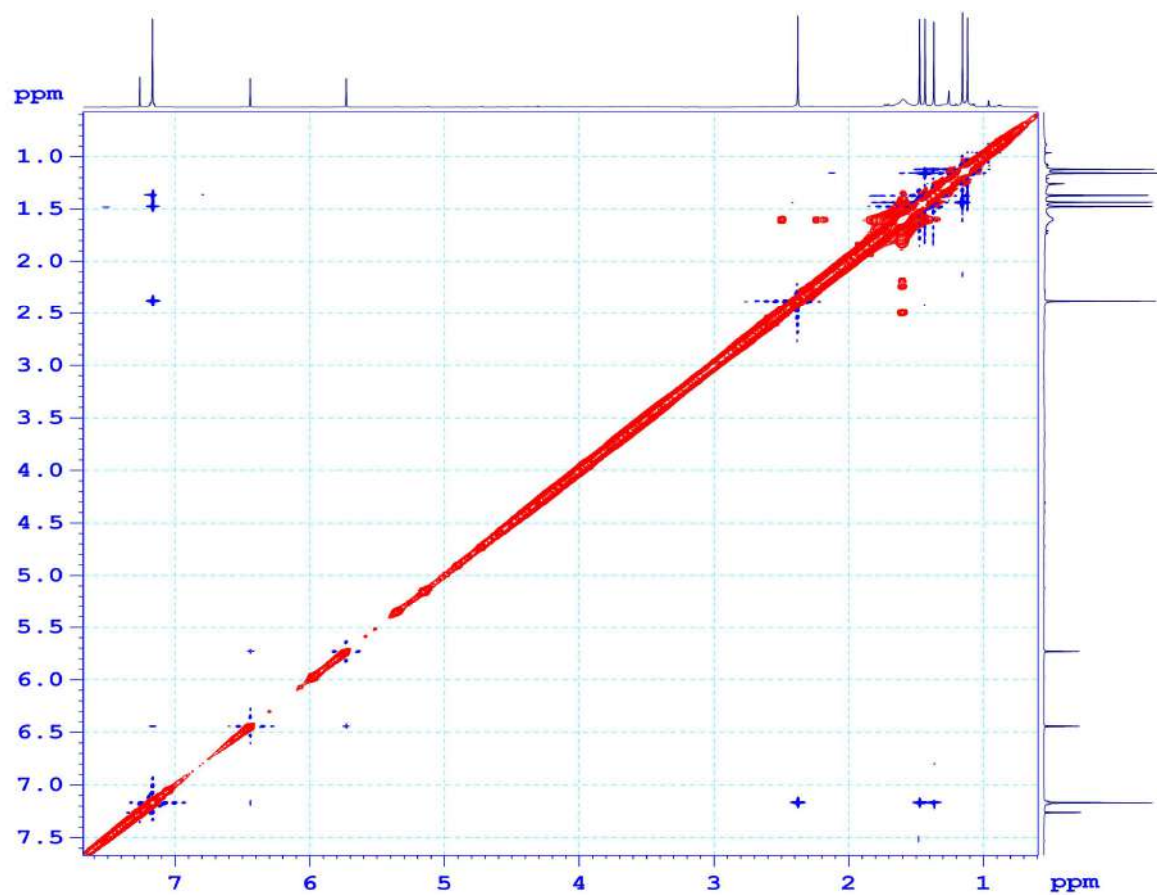
Hình D15.3. Phổ ^{13}C -NMR



Hình D15.4. Phổ HSQC

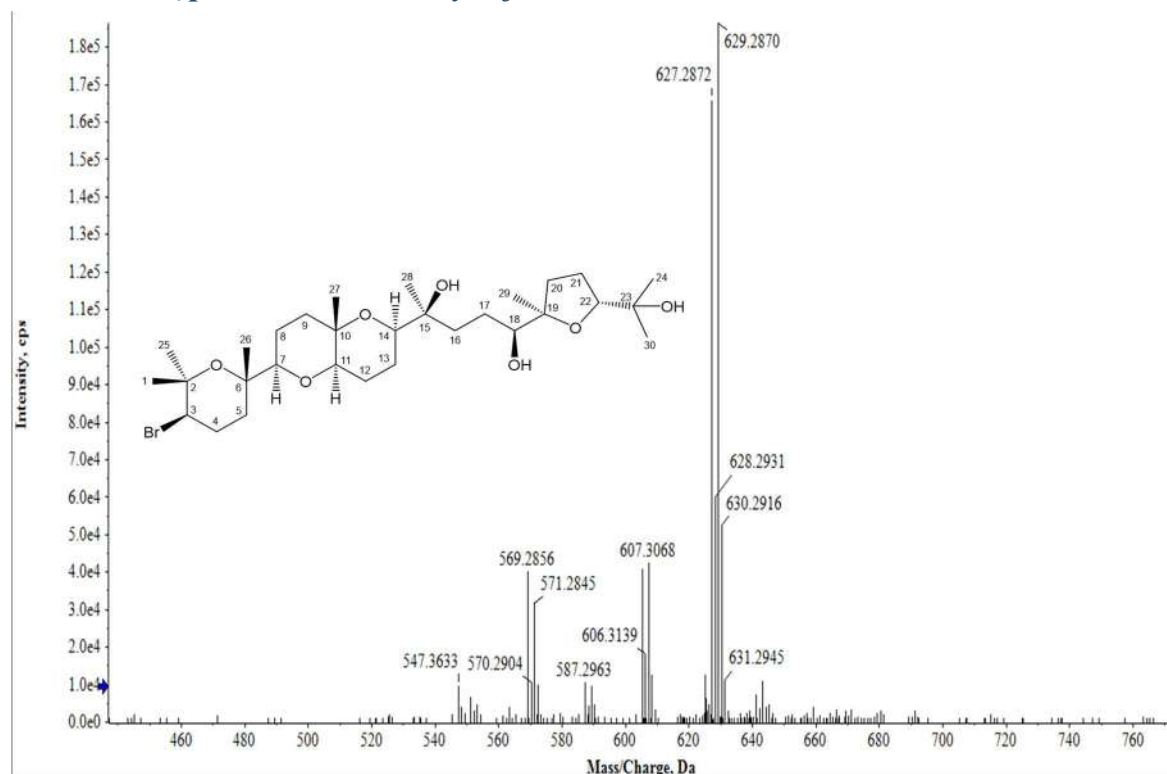


Hình D15.5. Phổ HMBC

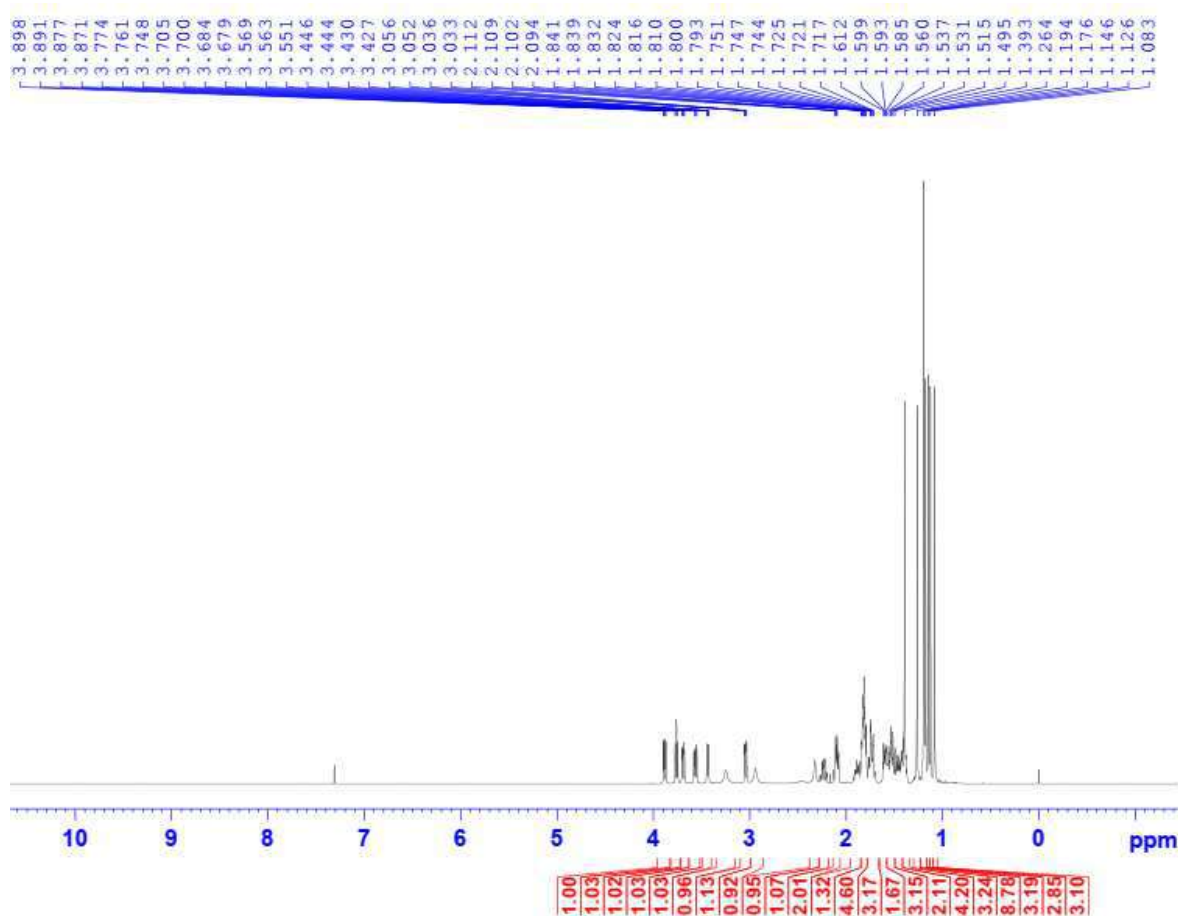


Hình D15.7. Phổ NOESY

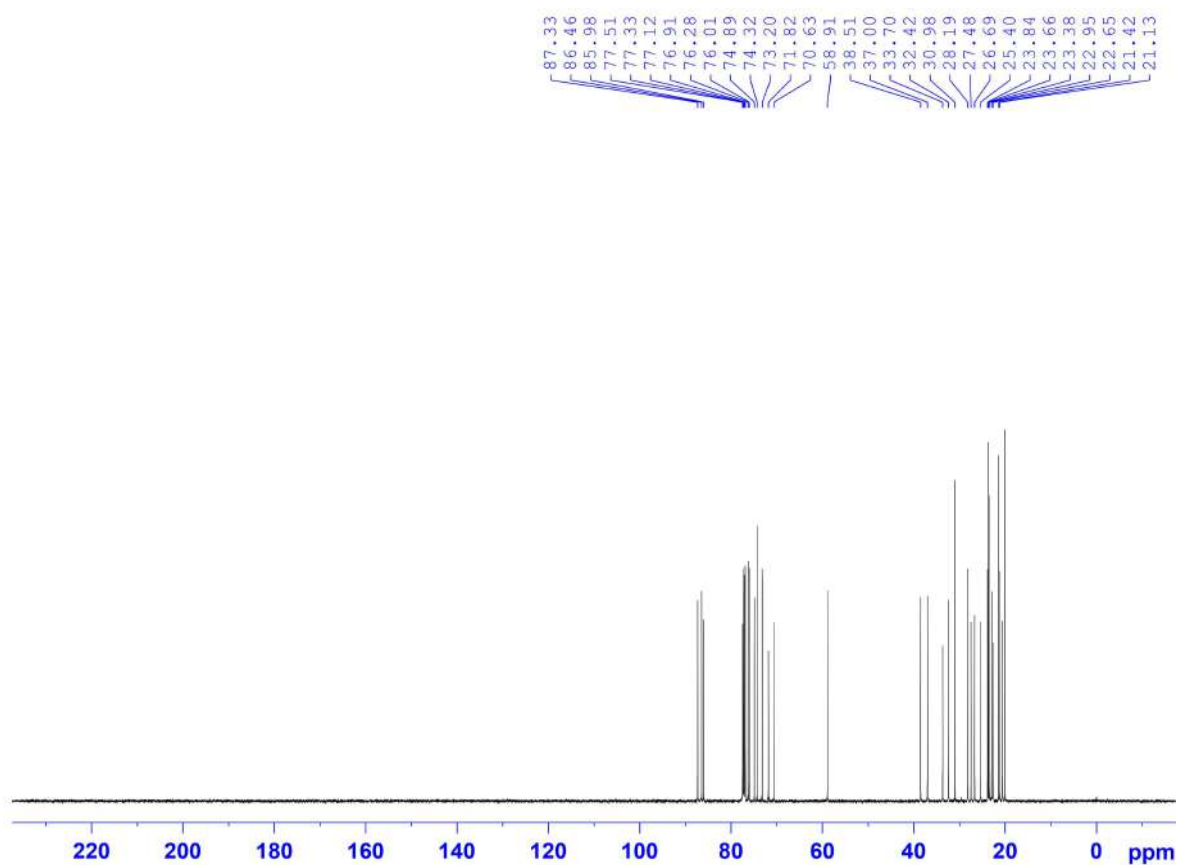
1.16. Phổ hợp chất ADB12: *Thyrsiferol*



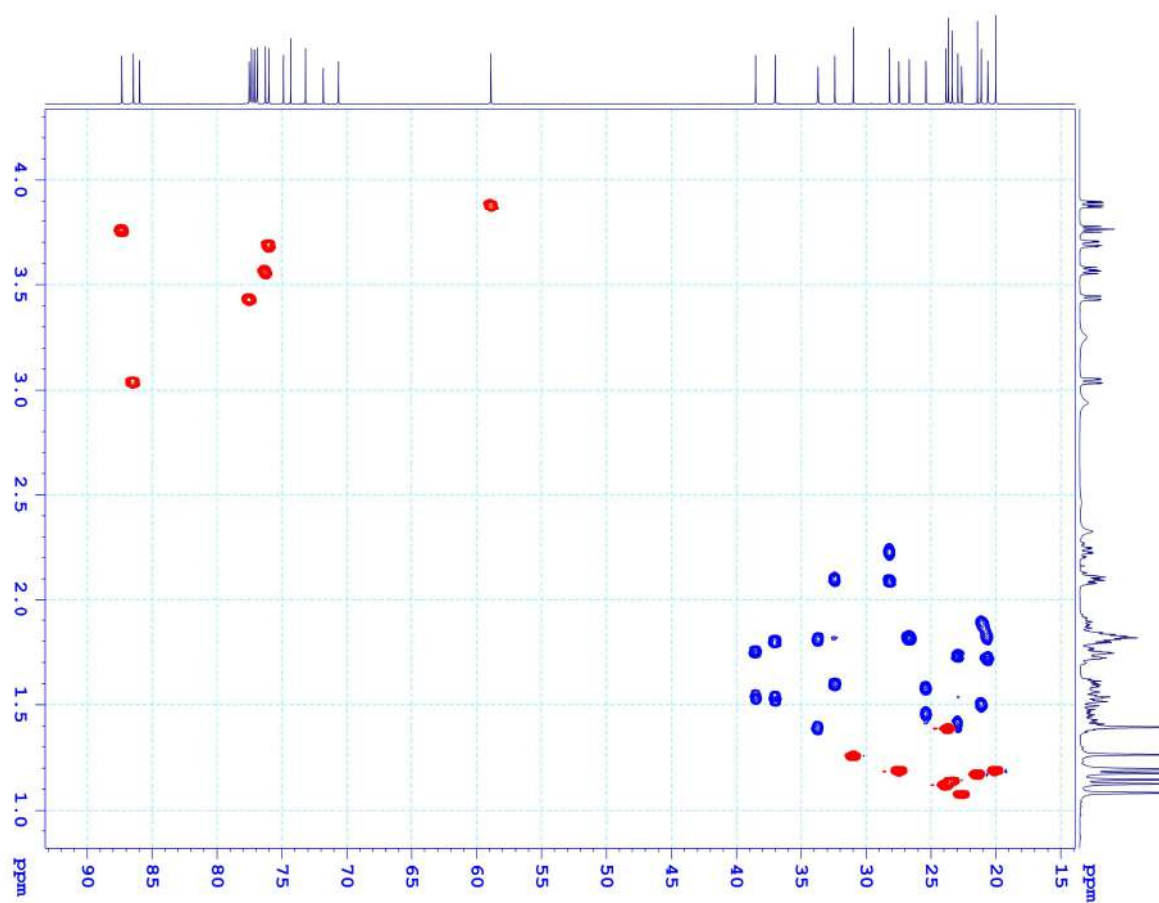
Hình D16.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



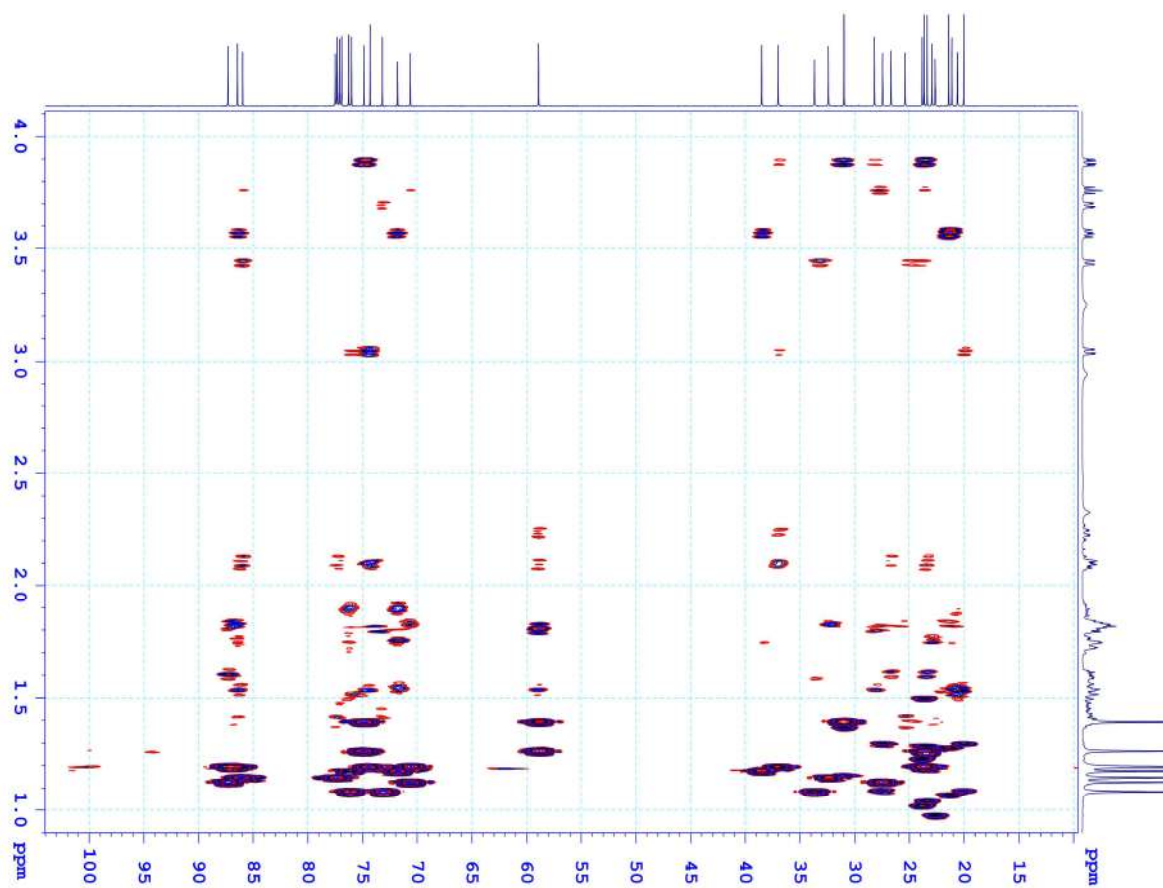
Hình D16.2. Phổ ^1H -NMR



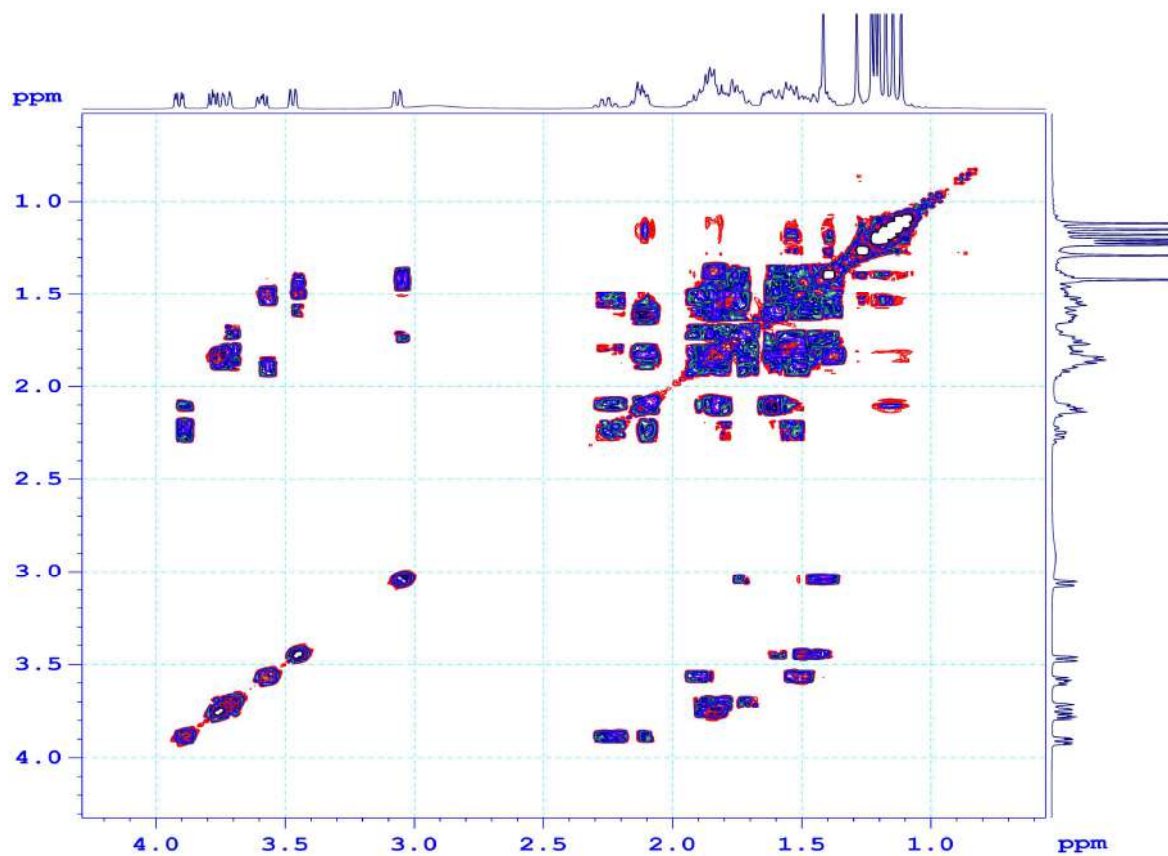
Hình D16.3. Phổ ^{13}C -NMR



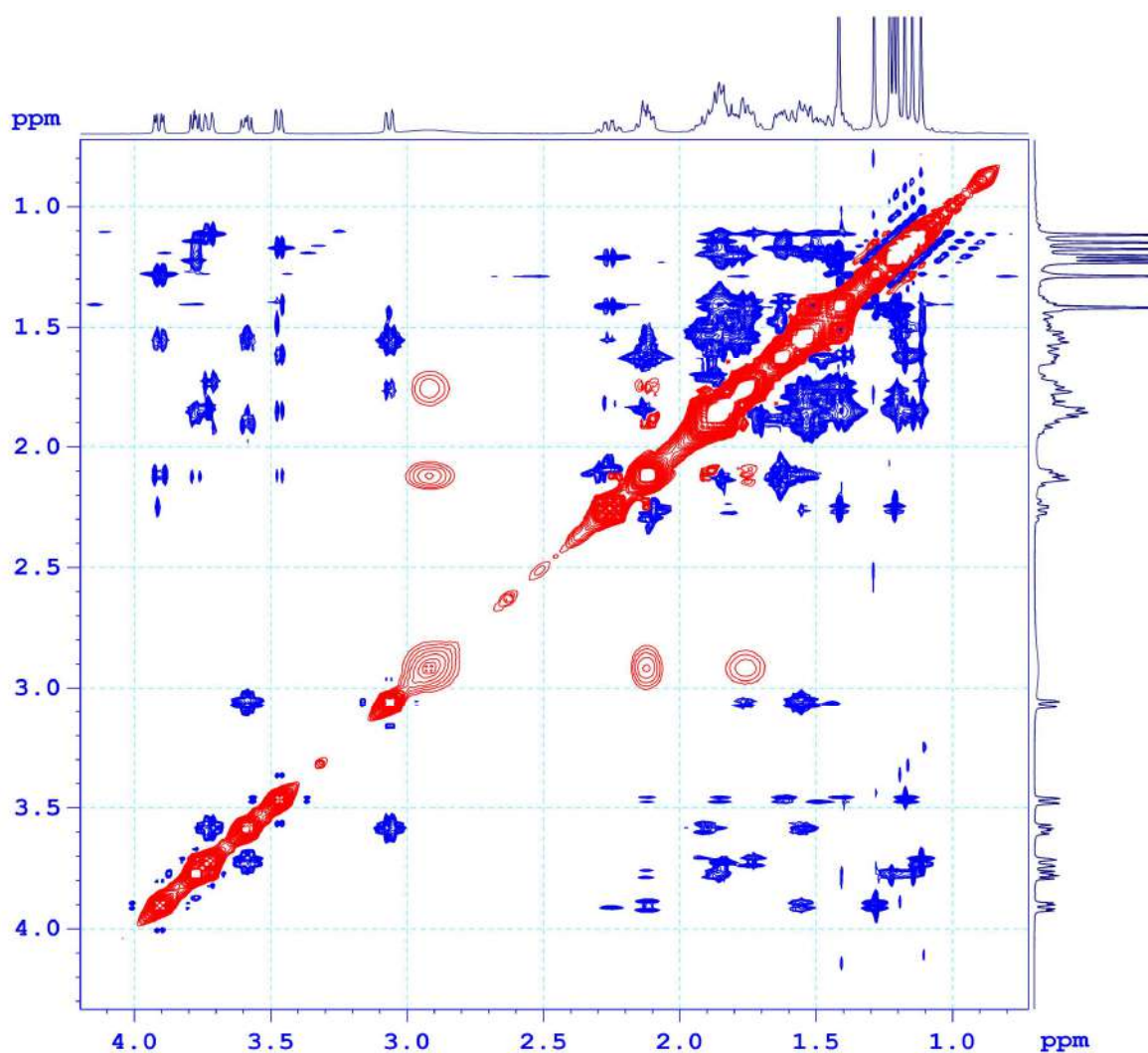
Hình D16.4. Phổ HSQC



Hình D16.5. Phổ HMBC



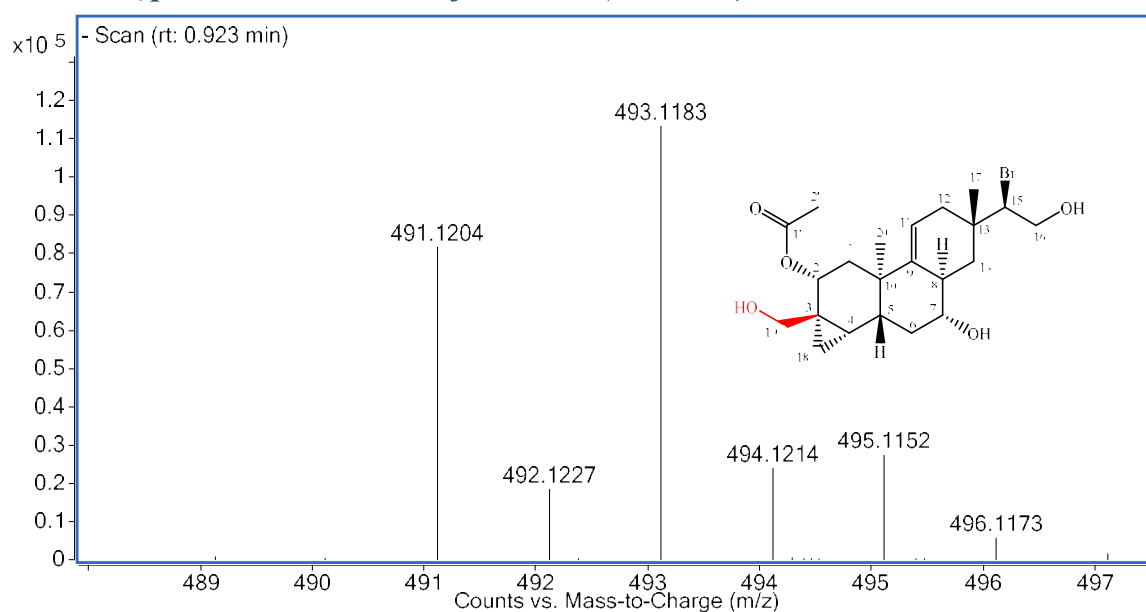
Hình D16.6. Phổ COSY



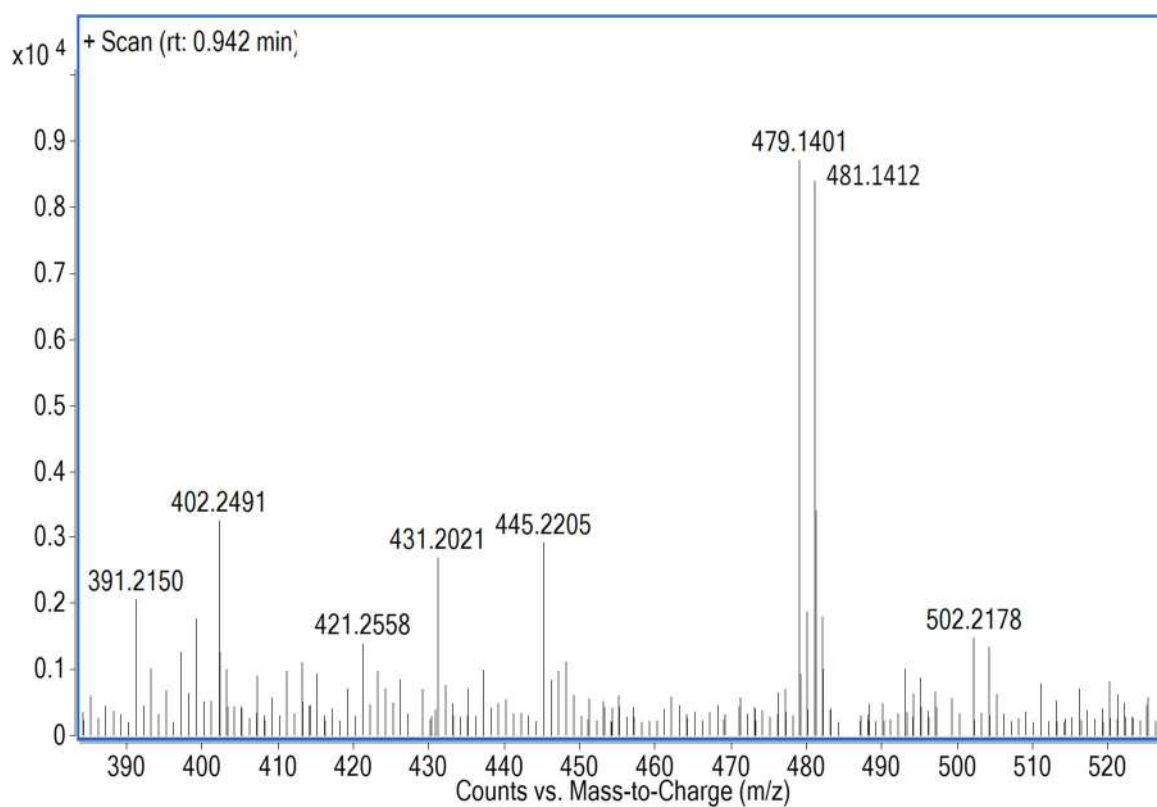
Hình D16.7. Phổ NOESY

2. Bộ phổ các chất phân lập từ mẫu sên *A. oculifera*

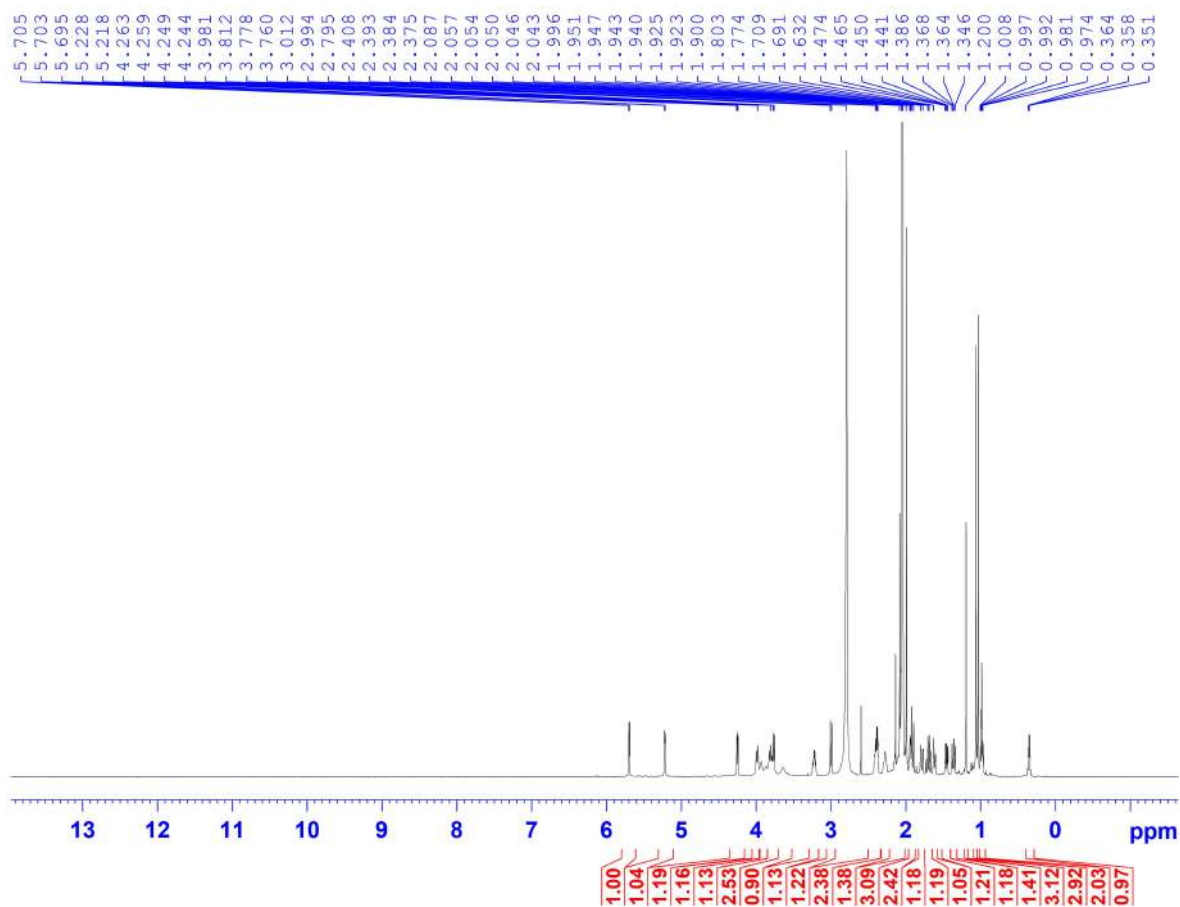
2.1. Phổ hợp chất AOB01: *Oculiferanin A* (*chất mới*)



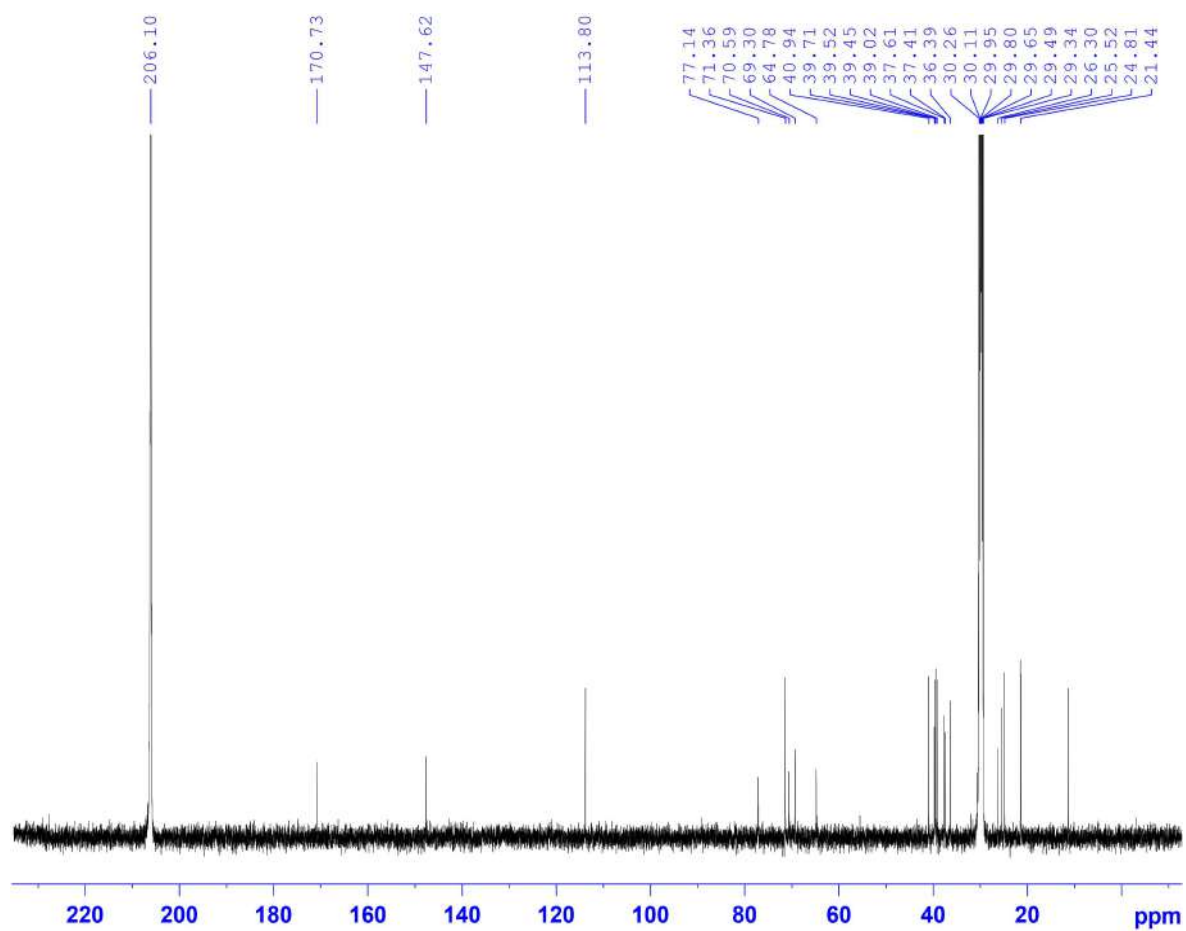
Hình O1.1a. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



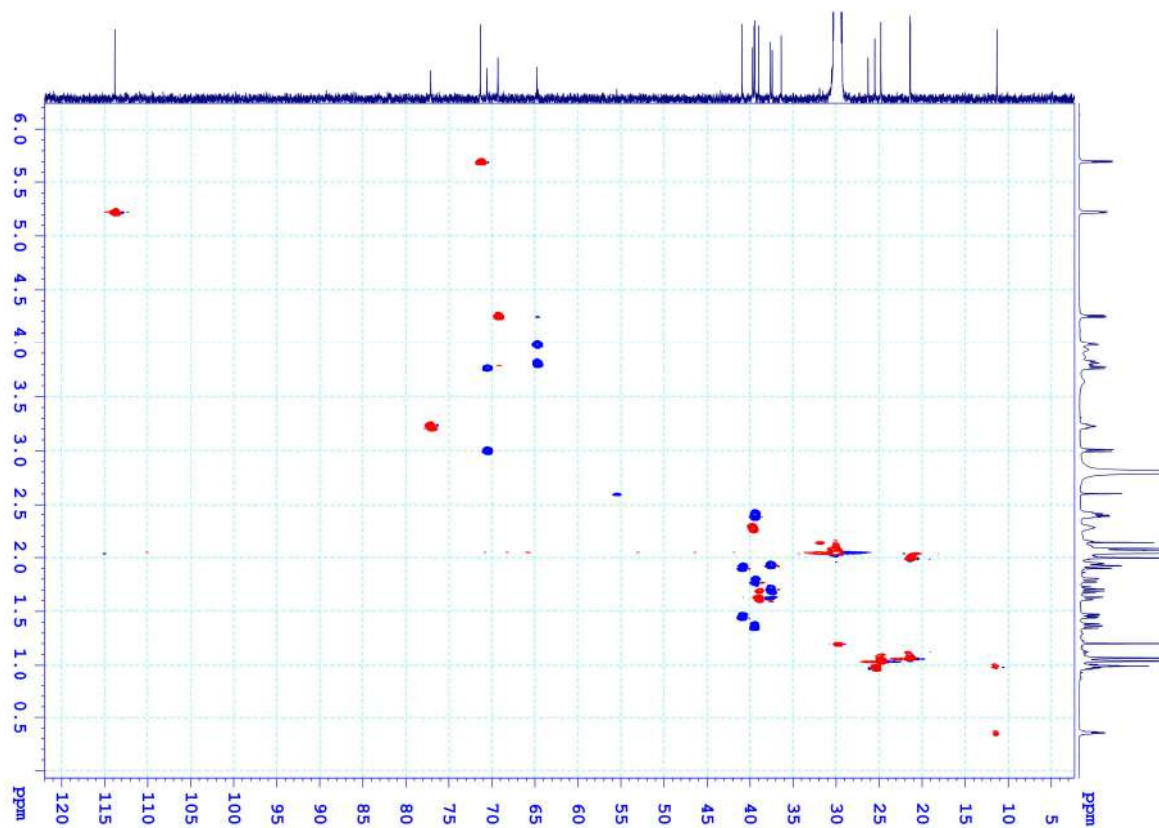
Hình O1.1b. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



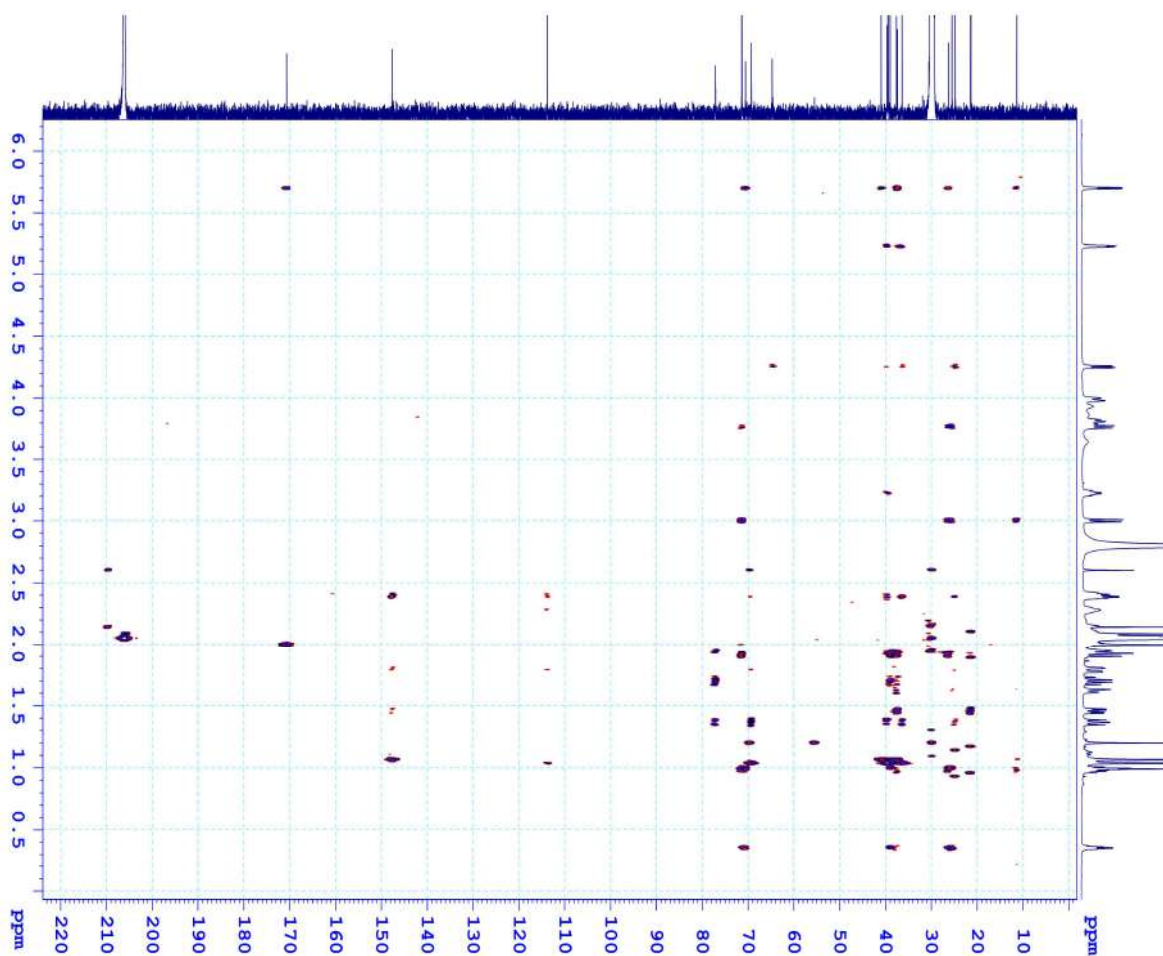
Hình O1.2. Phổ ¹H-NMR (dung môi acetone-d₆)



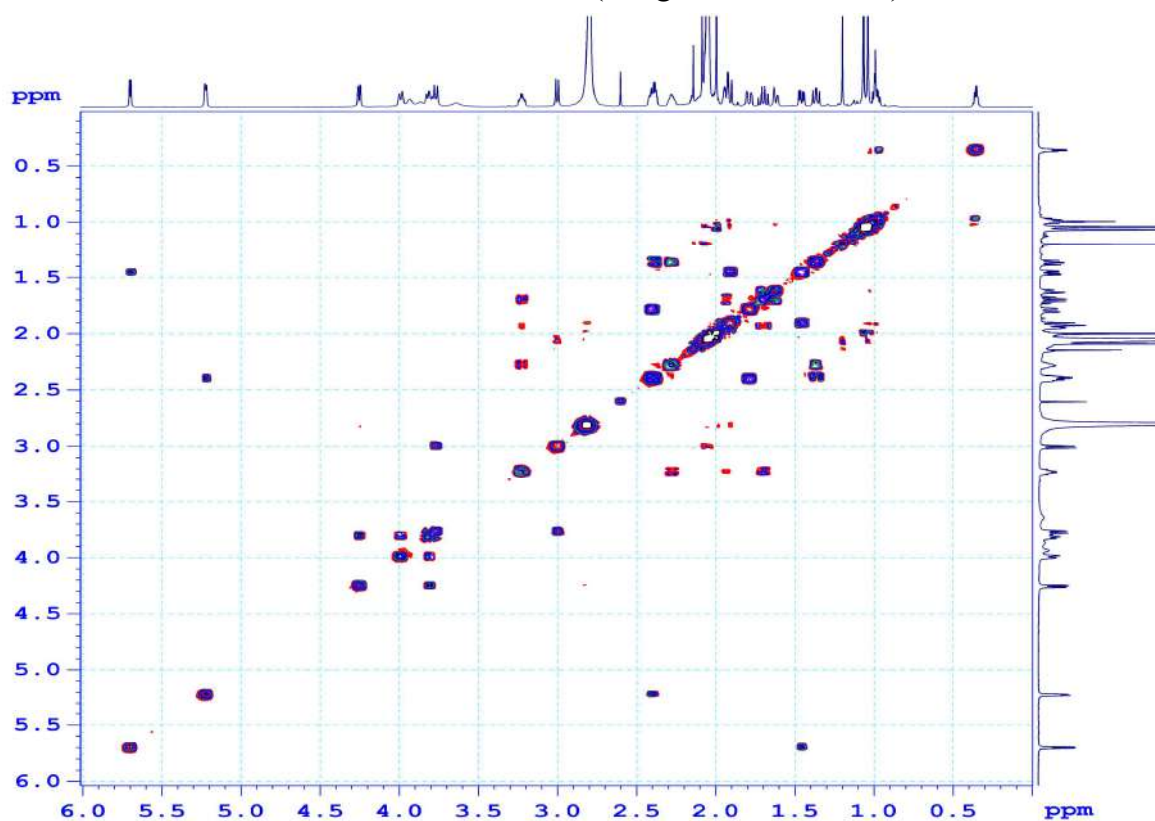
Hình O1.3. Phổ ^{13}C -NMR (dung môi acetone- d_6)



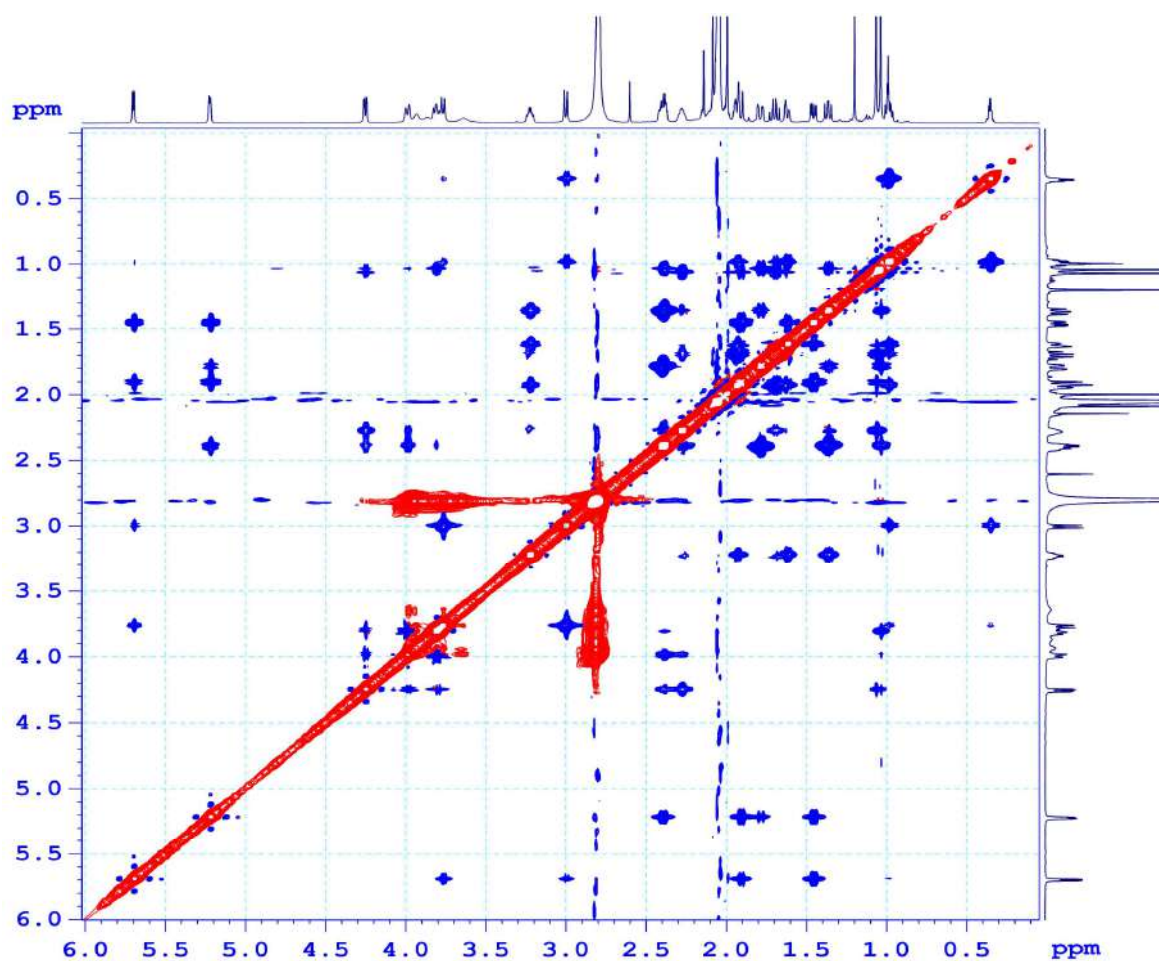
Hình O1.4. Phổ HSQC (dung môi acetone- d_6)



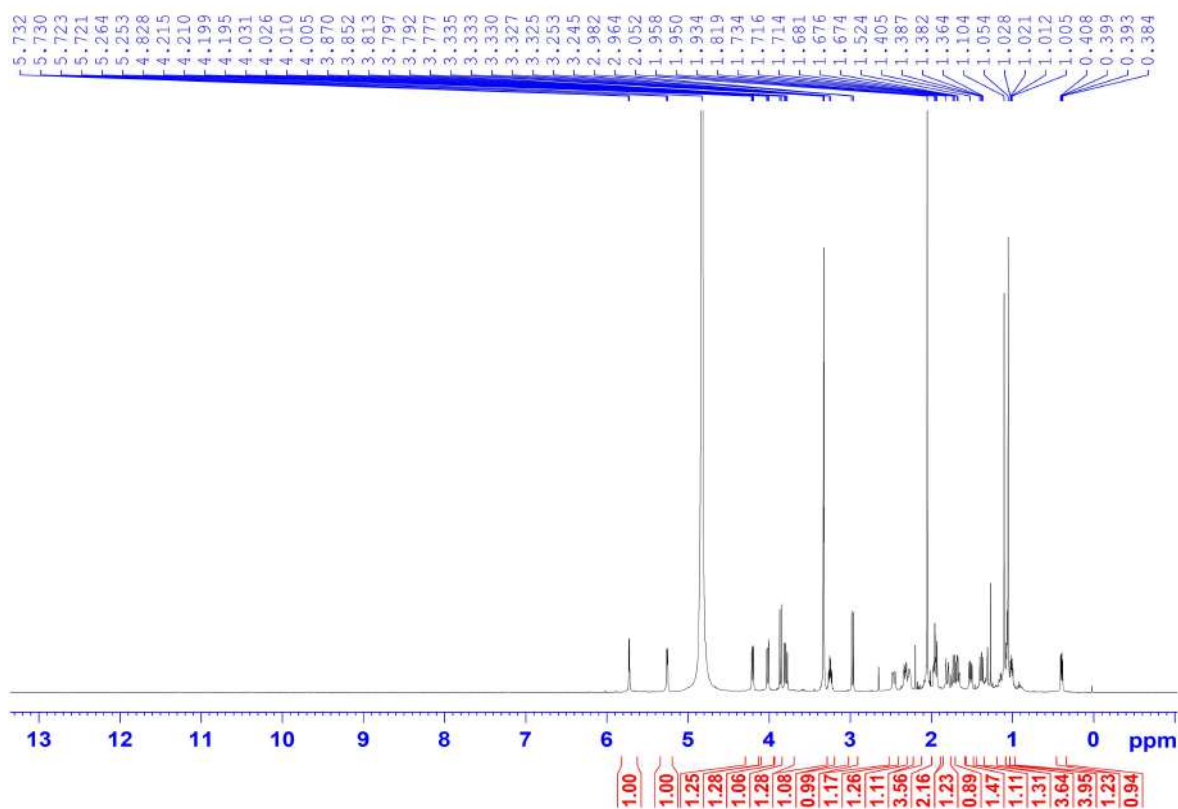
Hình O1.5. Phổ HMBC (dung môi acetone- d_6)



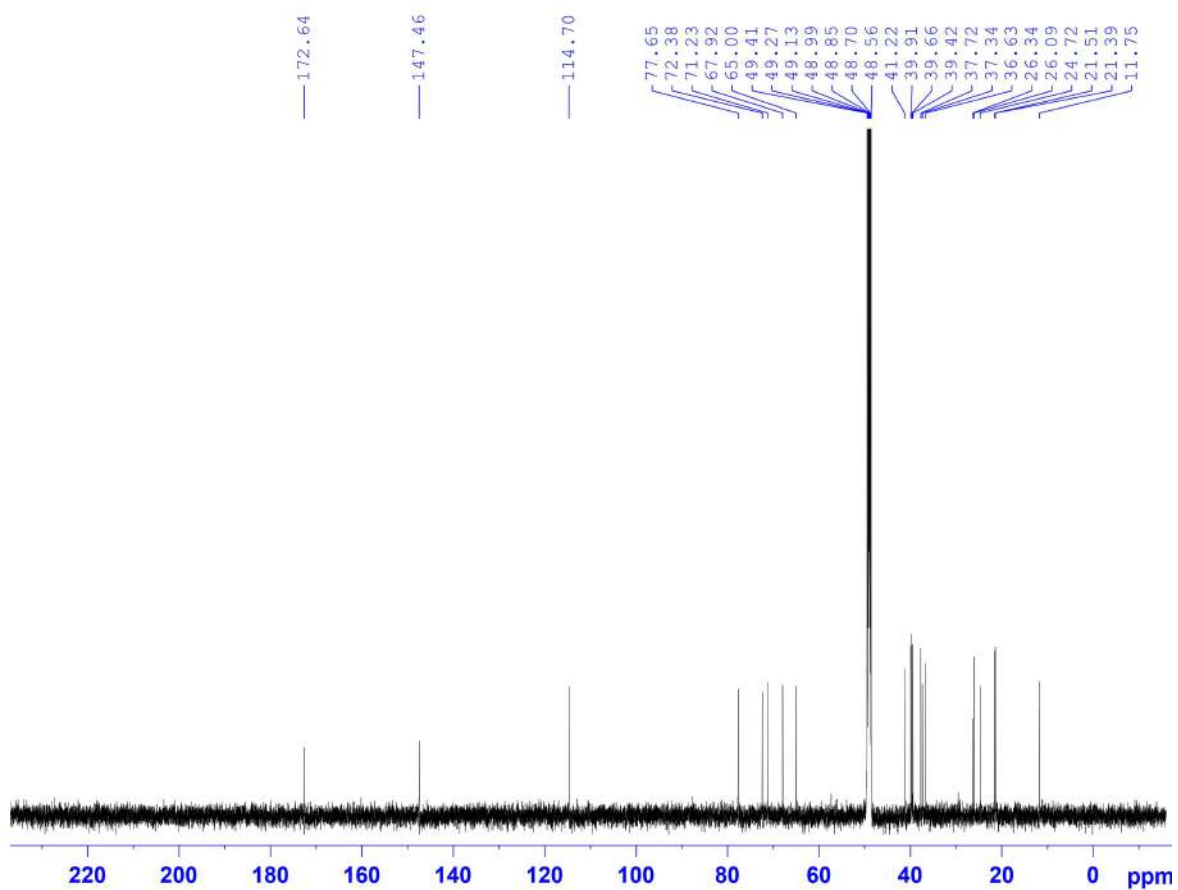
Hình O1.6. Phổ COSY (dung môi acetone- d_6)



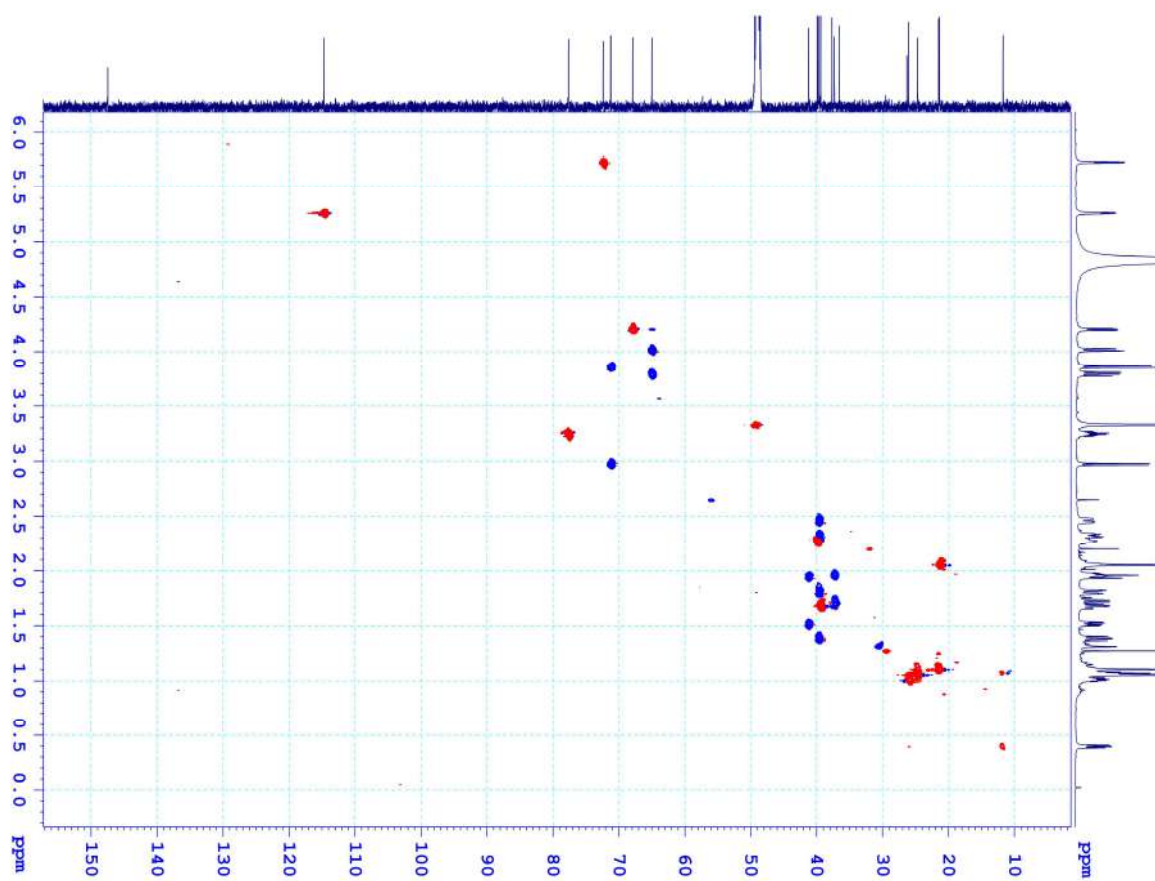
Hình O1.7. Phổ NOESY (dung môi acetone- d_6)



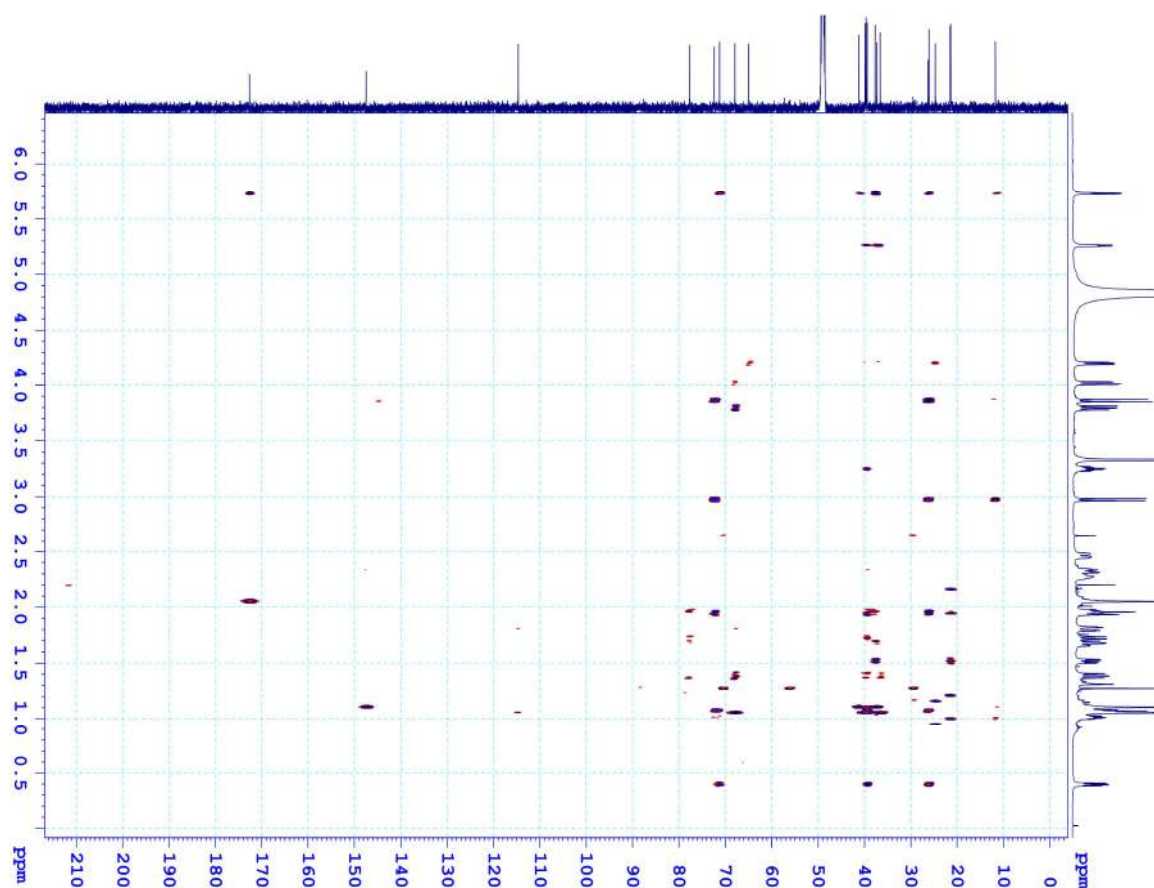
Hình O1.1A. Phổ ^1H -NMR (dung môi CD_3OD)



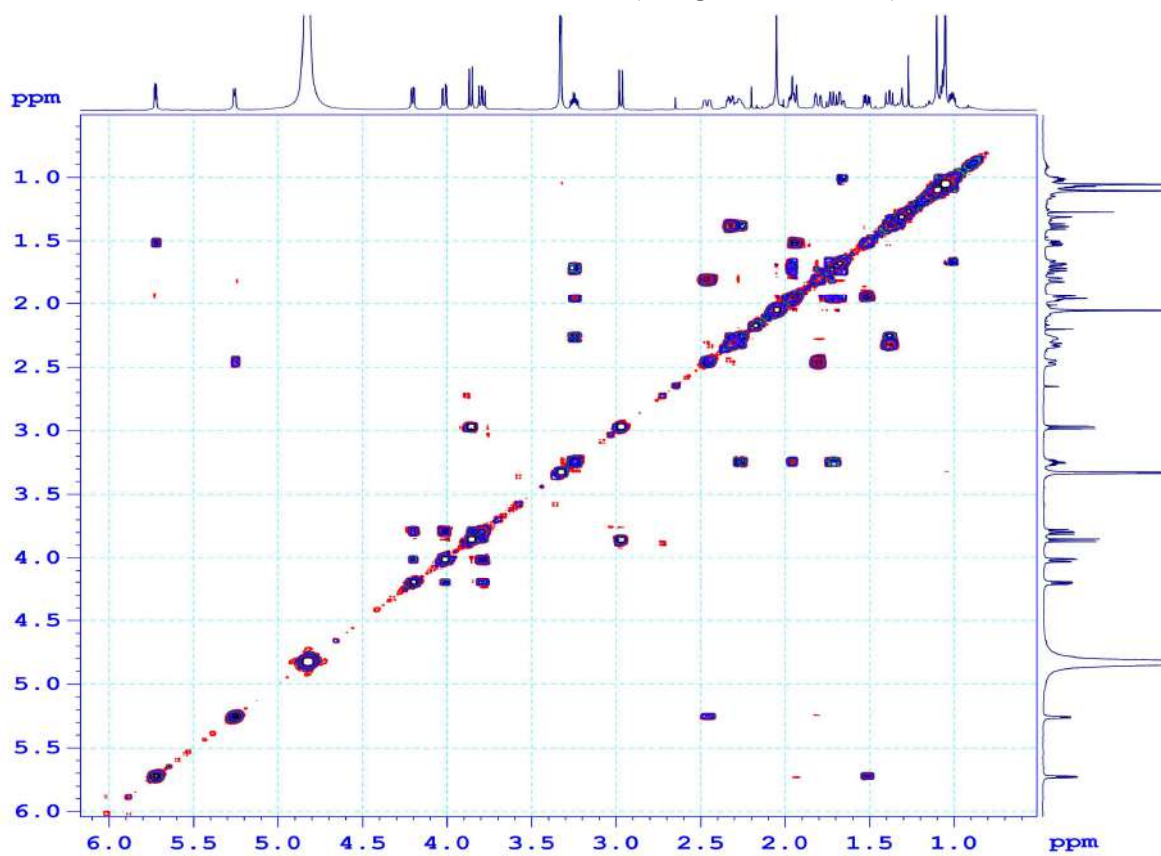
Hình O1.2A. Phổ ^{13}C -NMR (dung môi CD_3OD)



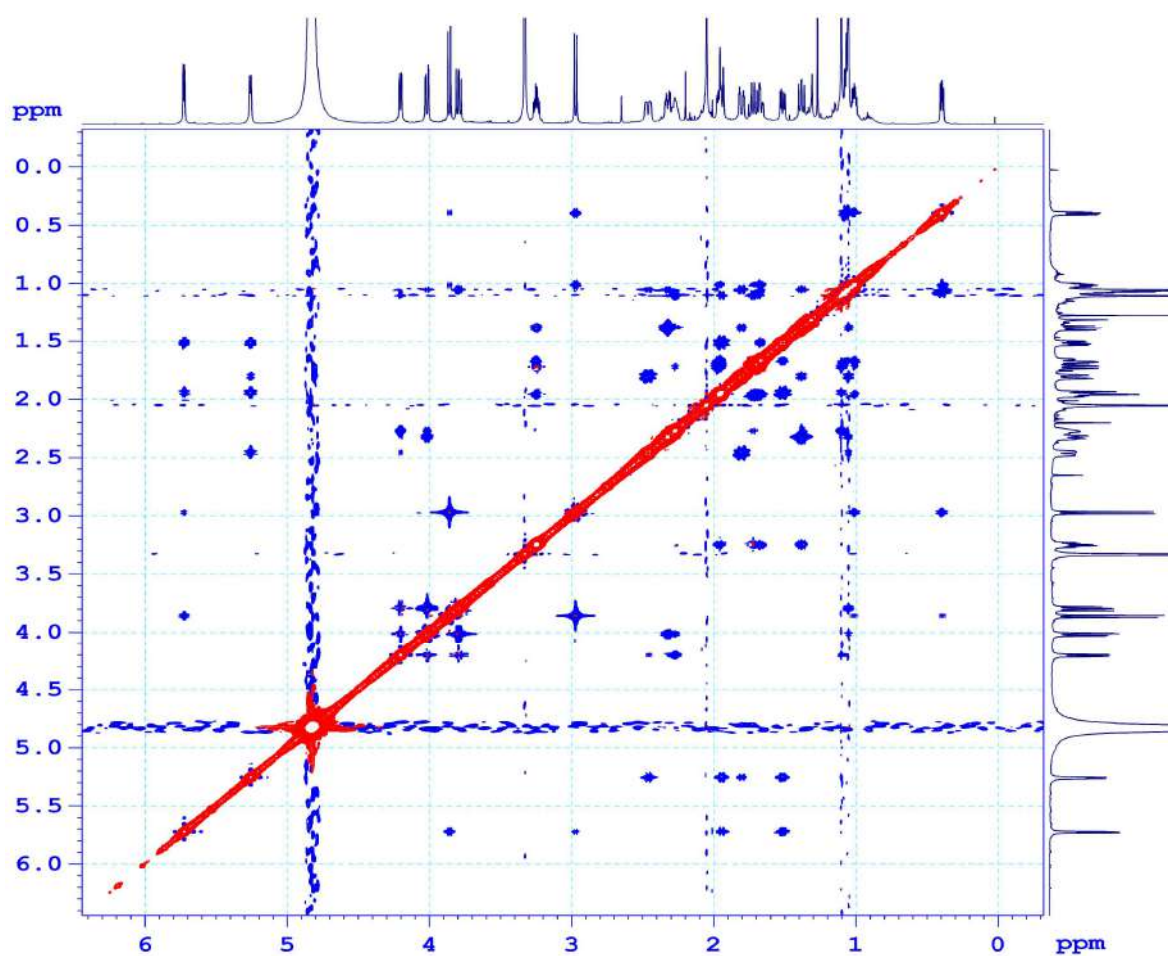
Hình O1.3A. Phổ HSQC (dung môi CD_3OD)



Hình O1.4A. Phổ HMBC (dung môi CD_3OD)

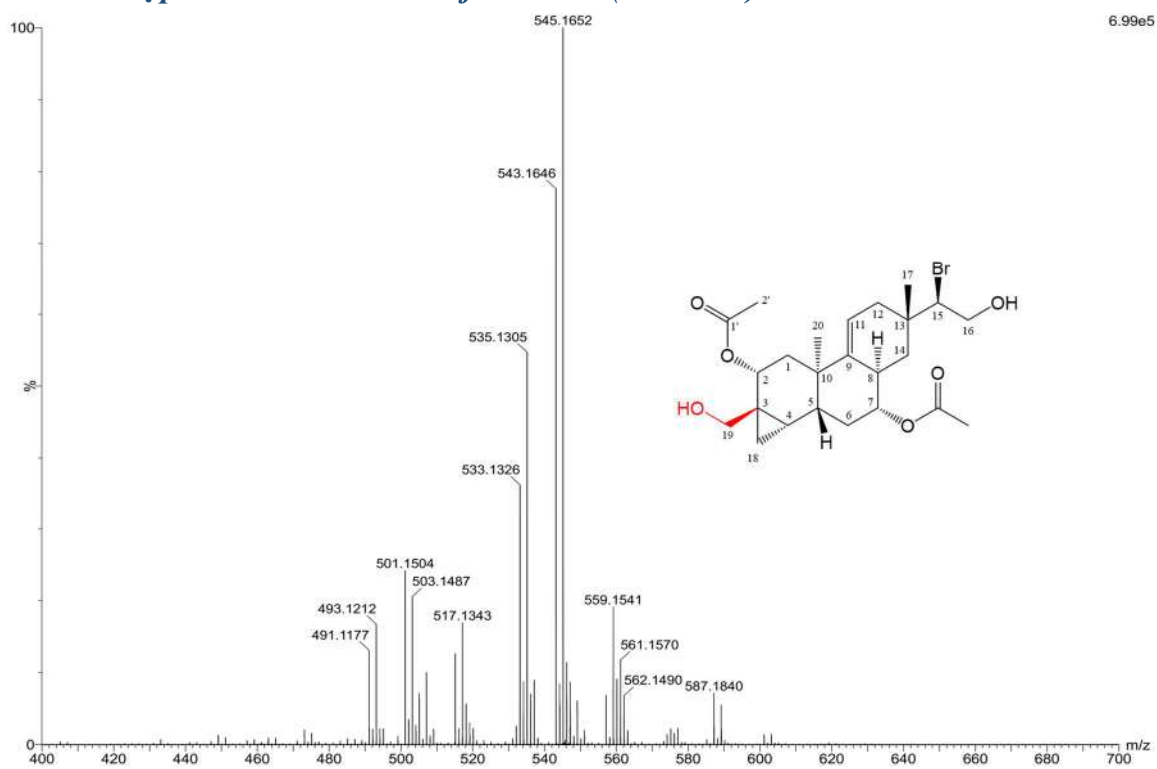


Hình O1.5A. Phổ COSY (dung môi CD_3OD)

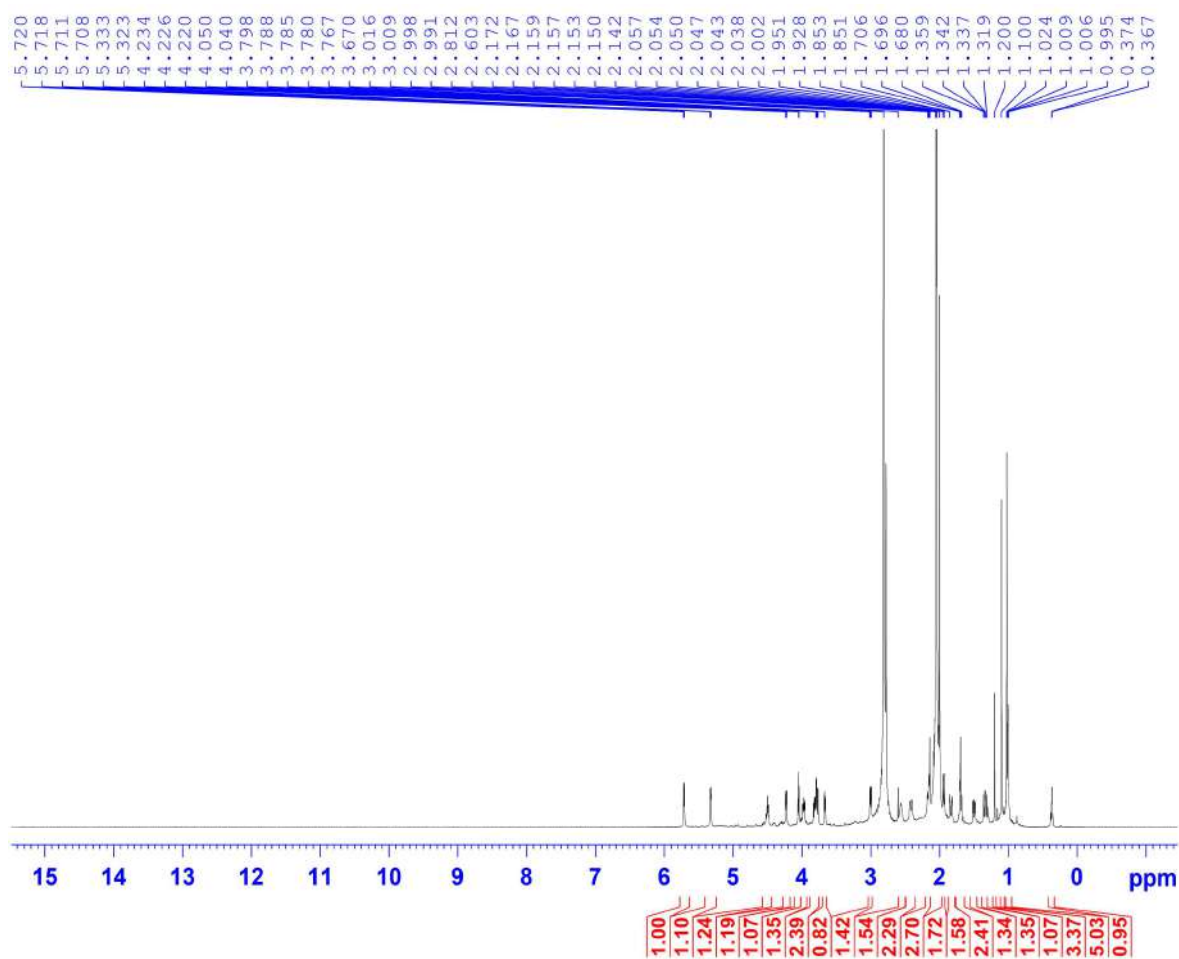


Hình O1.6A. Phổ NOESY (dung môi CD_3OD)

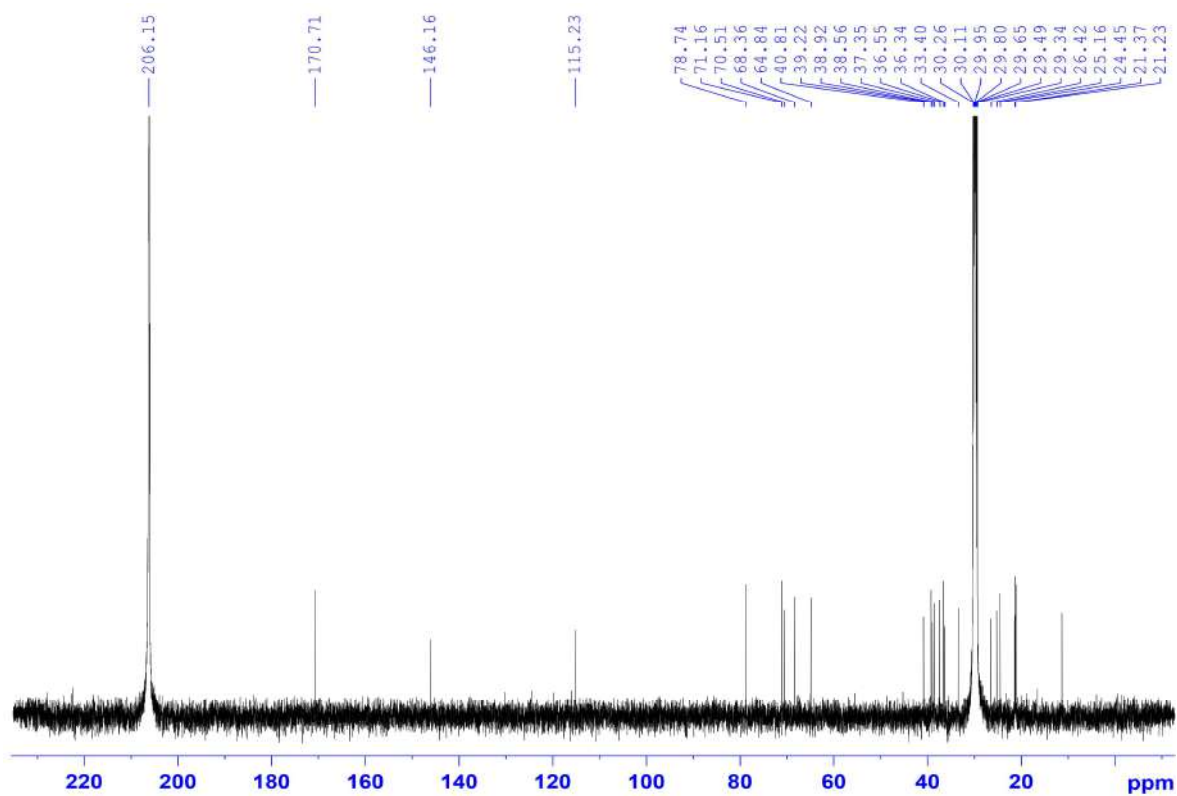
2.2. Phổ hợp chất AOB02: Oculiferanin B (chất mới)



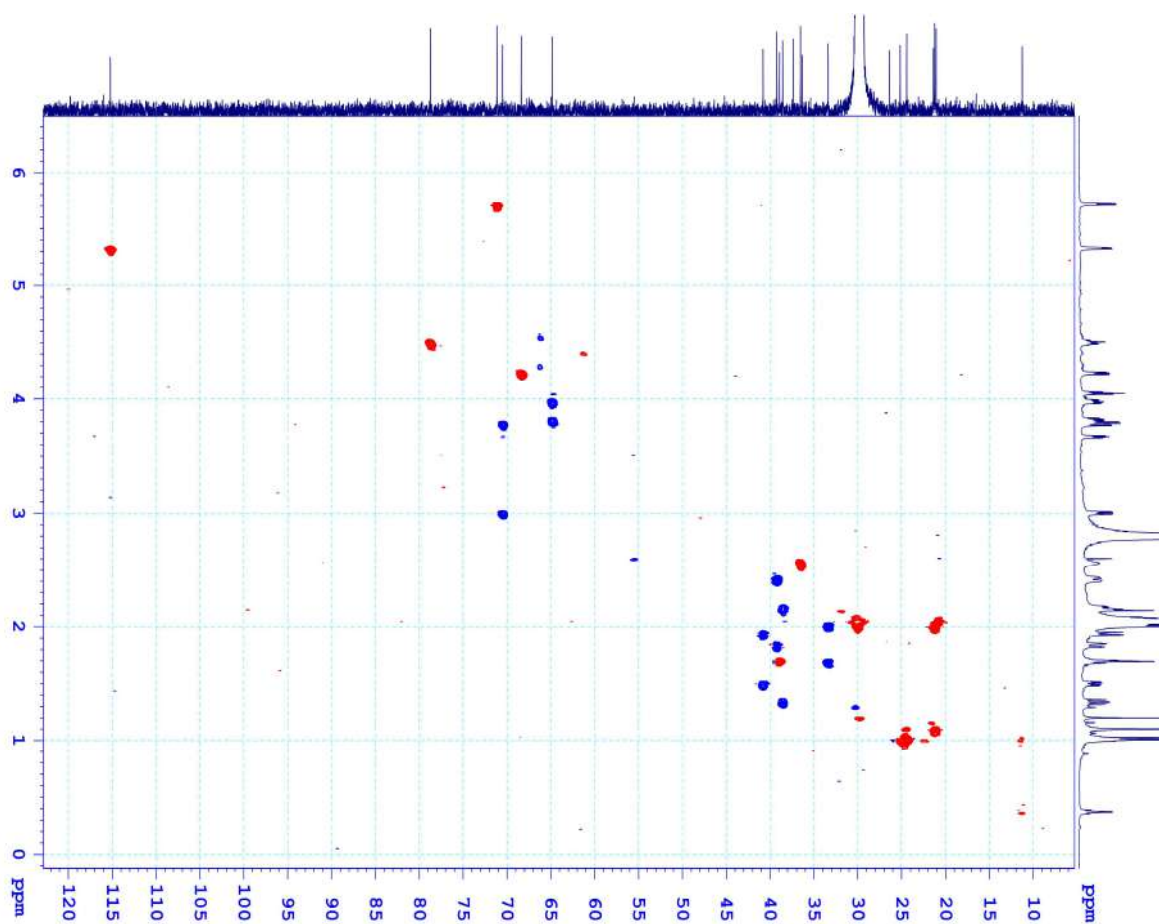
Hình O2.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



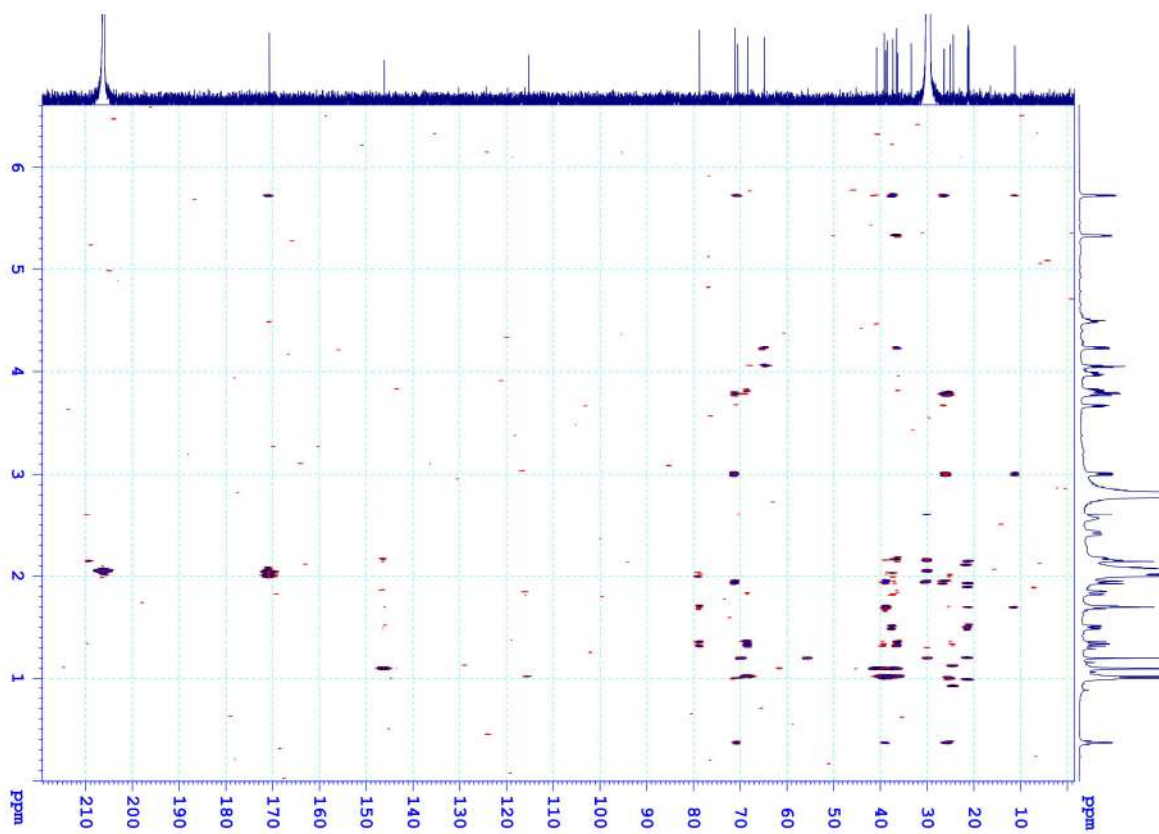
Hình O2.2. Phổ ^1H -NMR



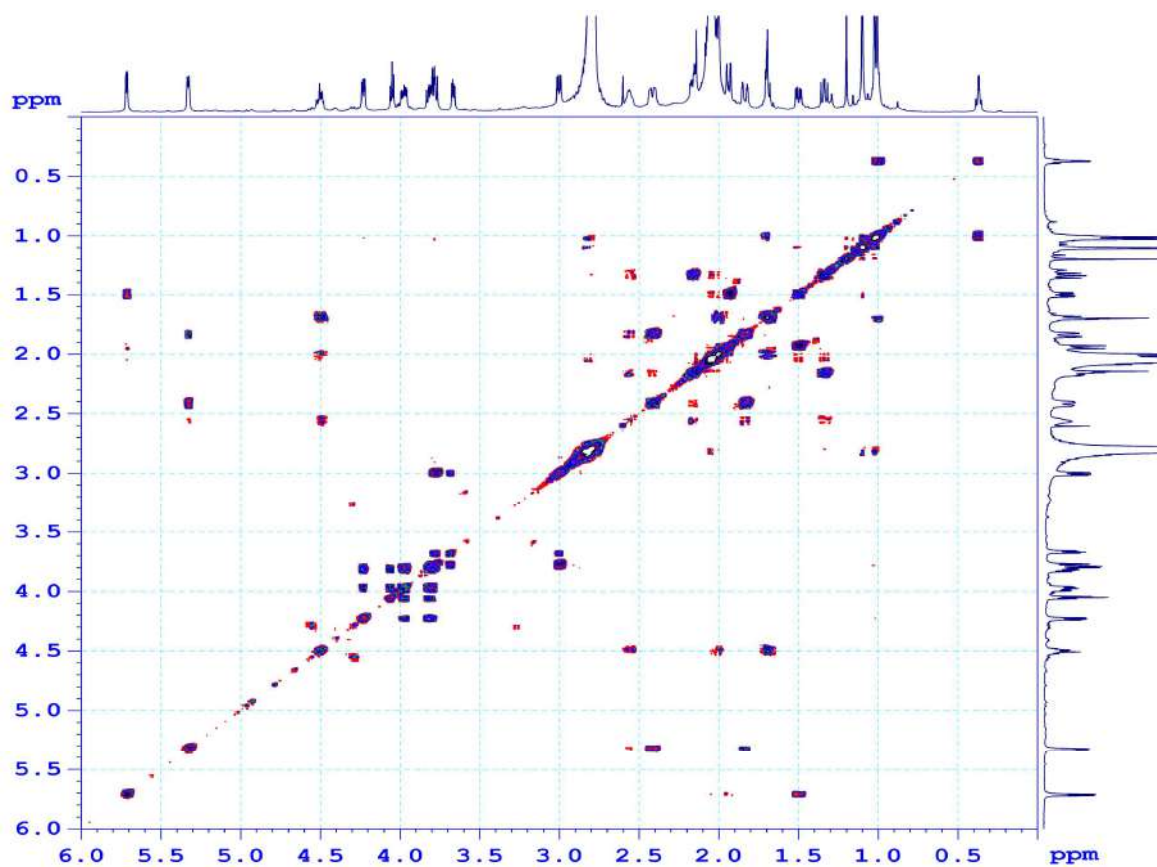
Hình O2.3. Phổ ^{13}C -NMR



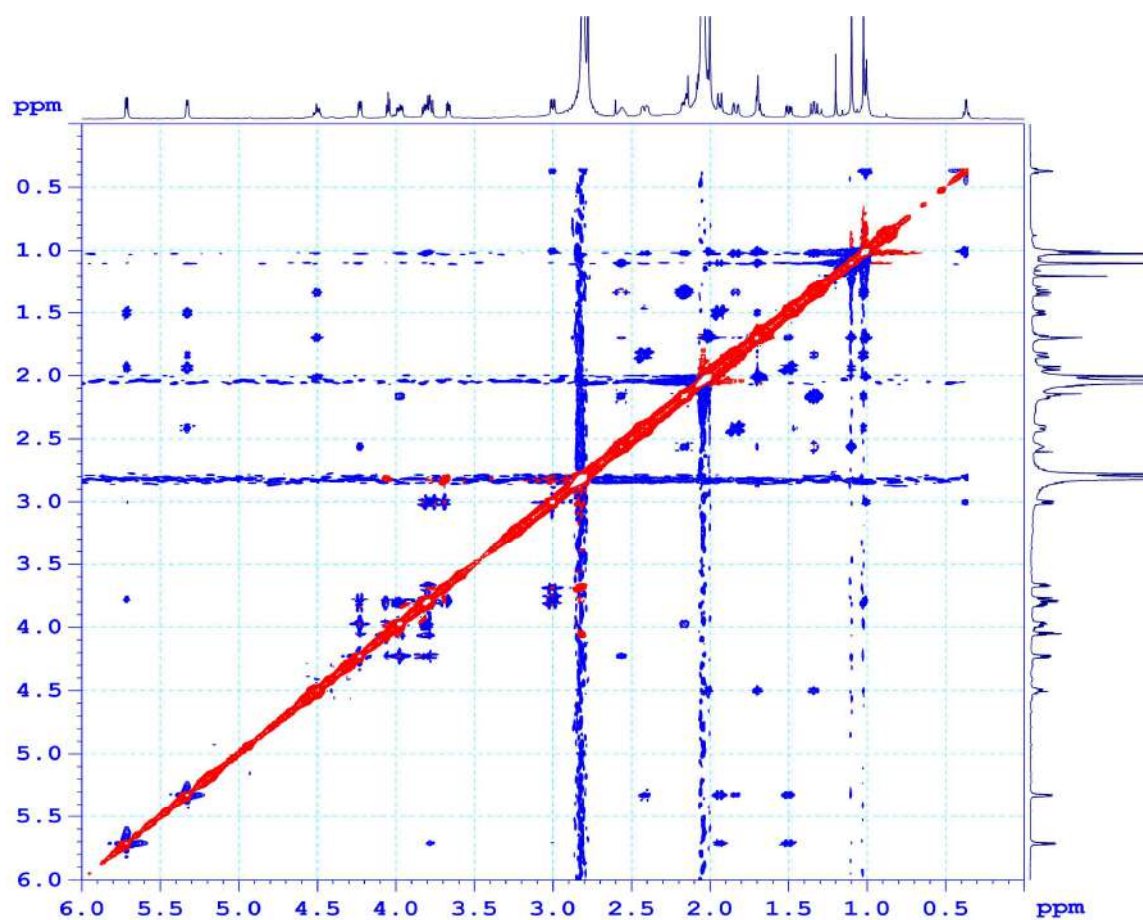
Hình O2.4. Phổ HSQC



Hình O2.5. Phổ HMBC

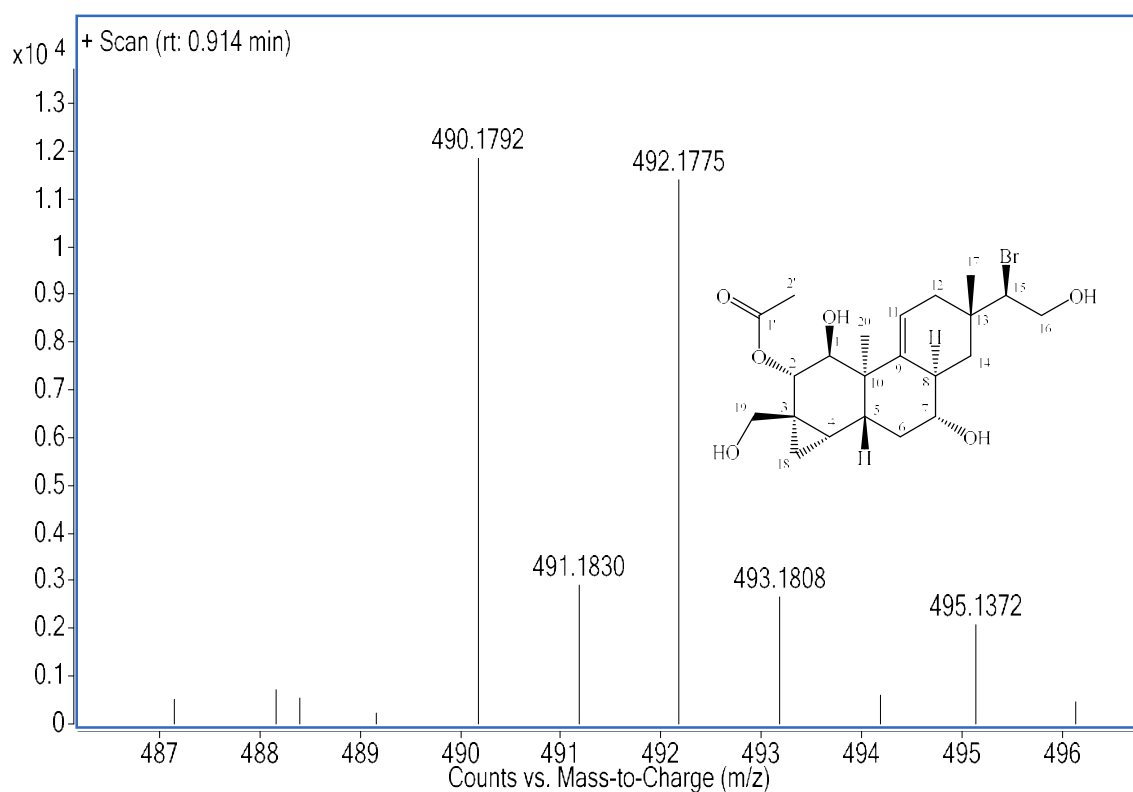


Hình O2.6. Phổ COSY

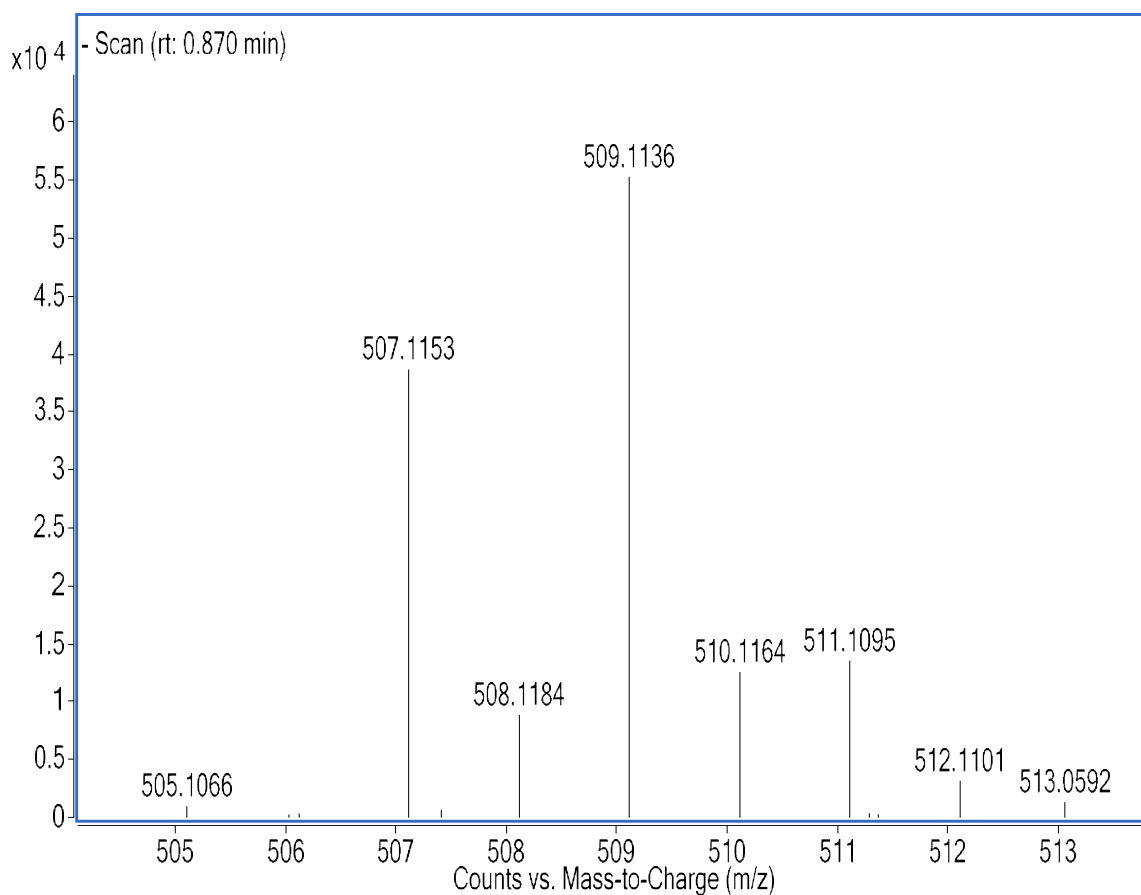


Hình O2.7. Phổ NOESY

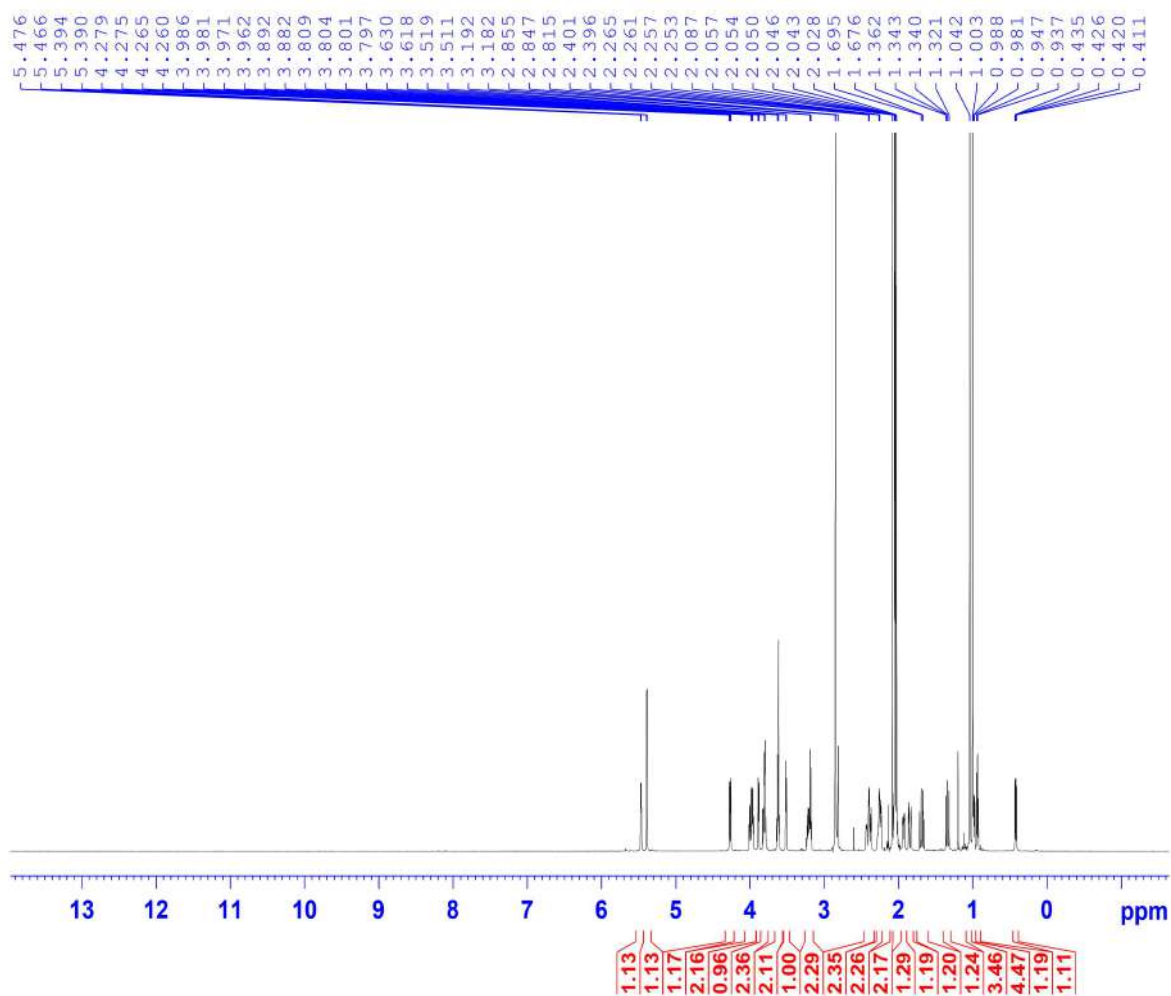
2.3. Phổ hợp chất AOB03: Oculiferanin C (chất mới)



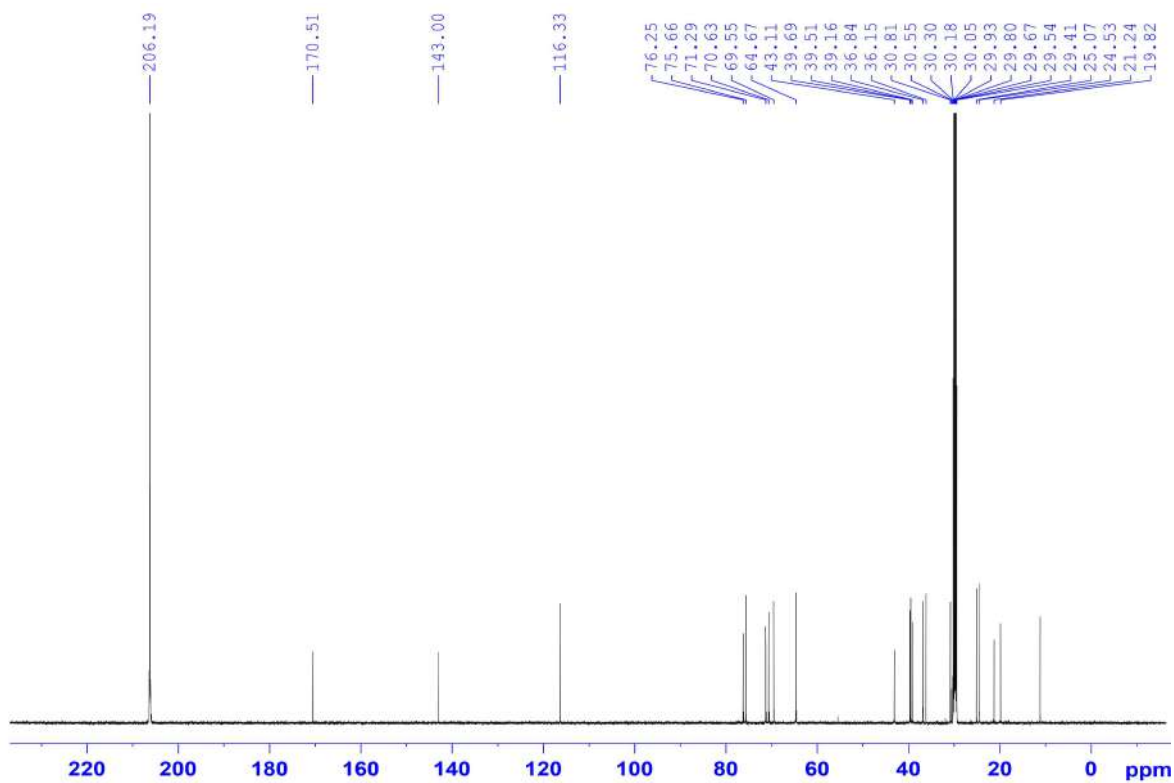
Hình O3.1a. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



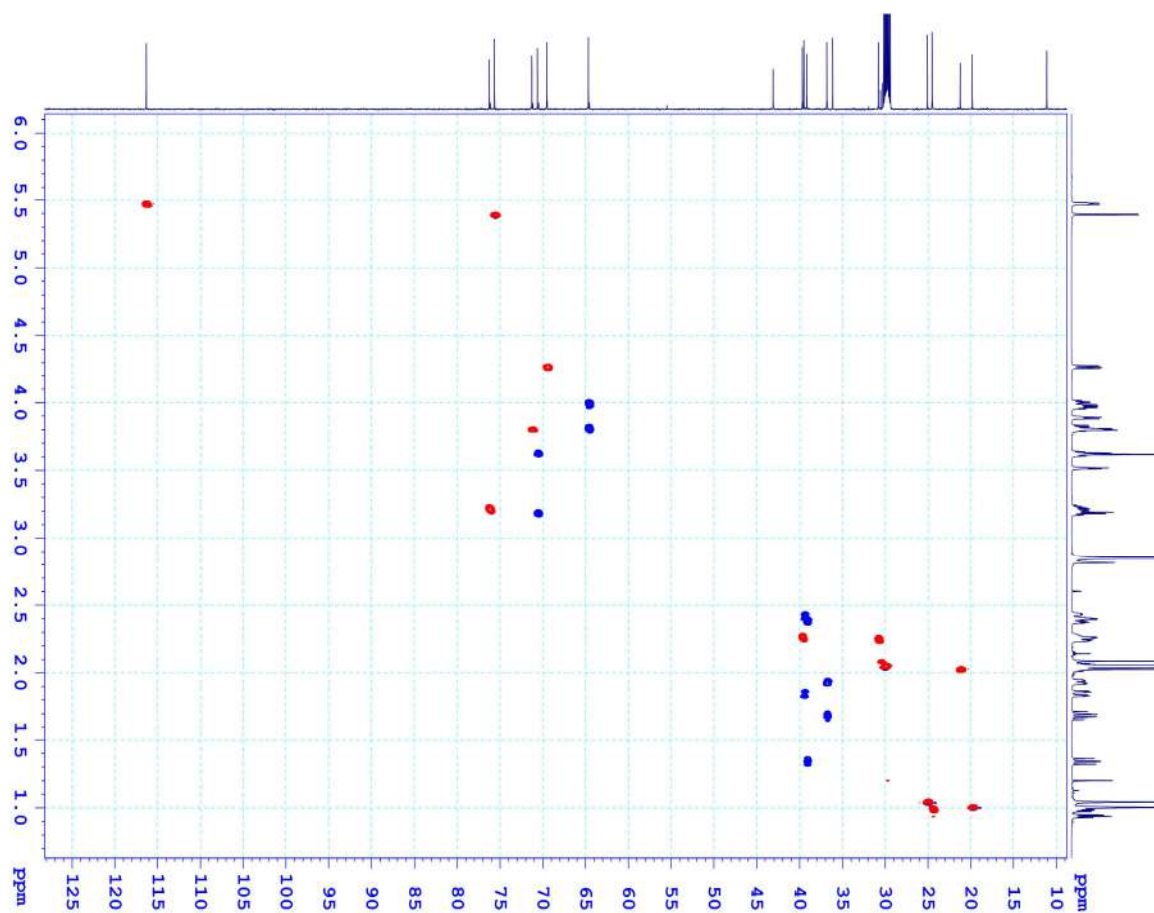
Hình O3.1b. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



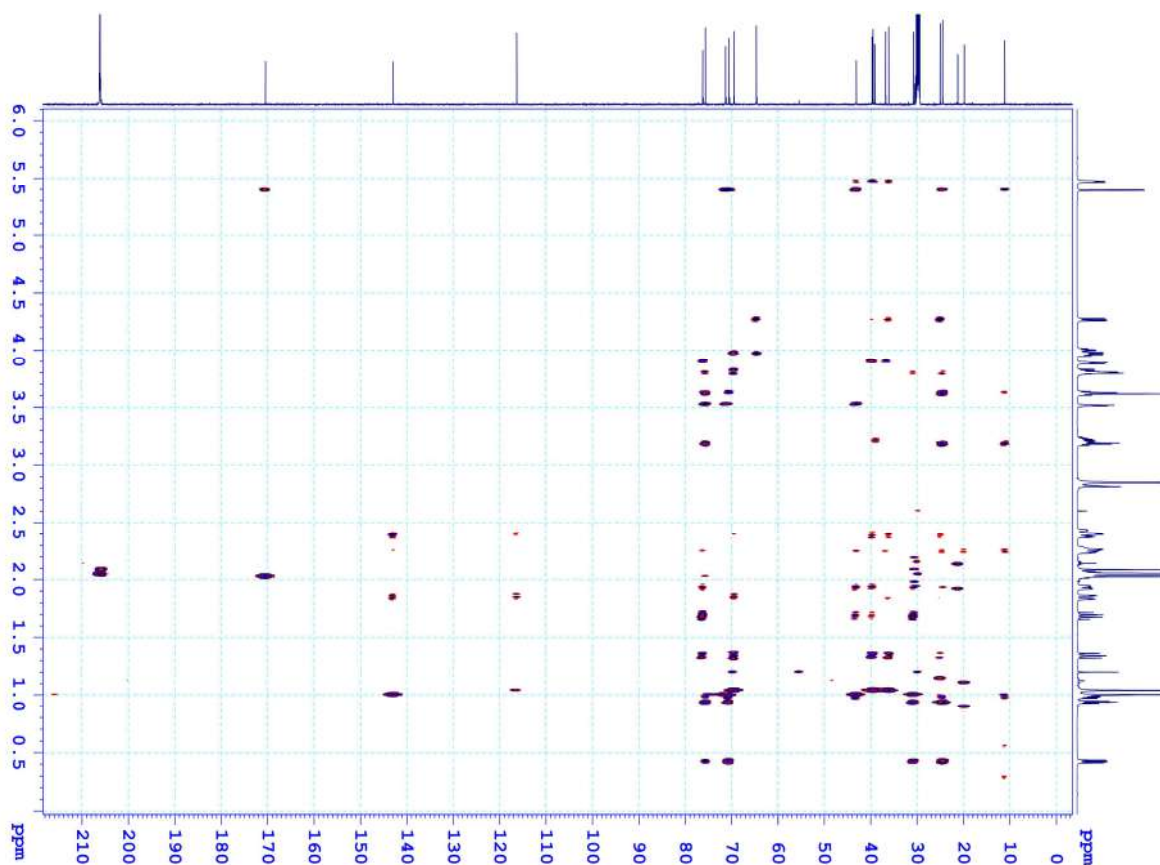
Hình O3.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$



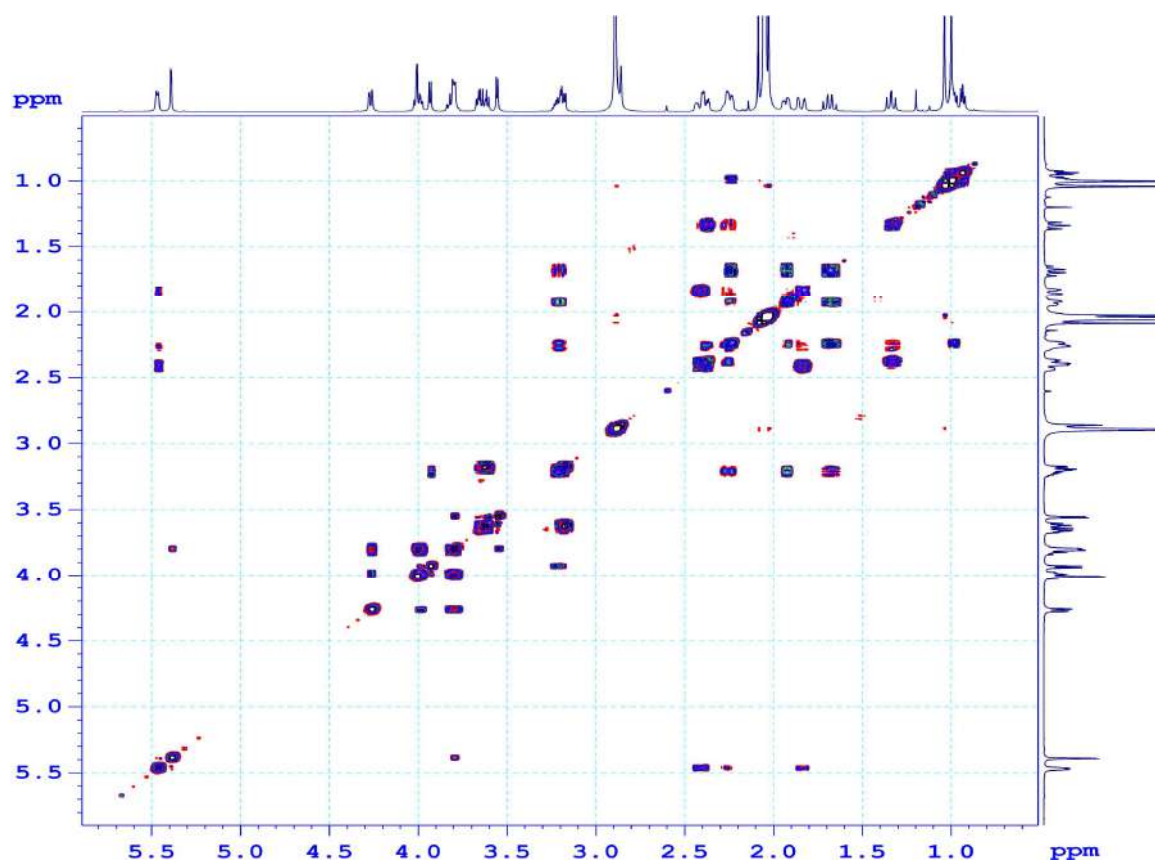
Hình O3.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$



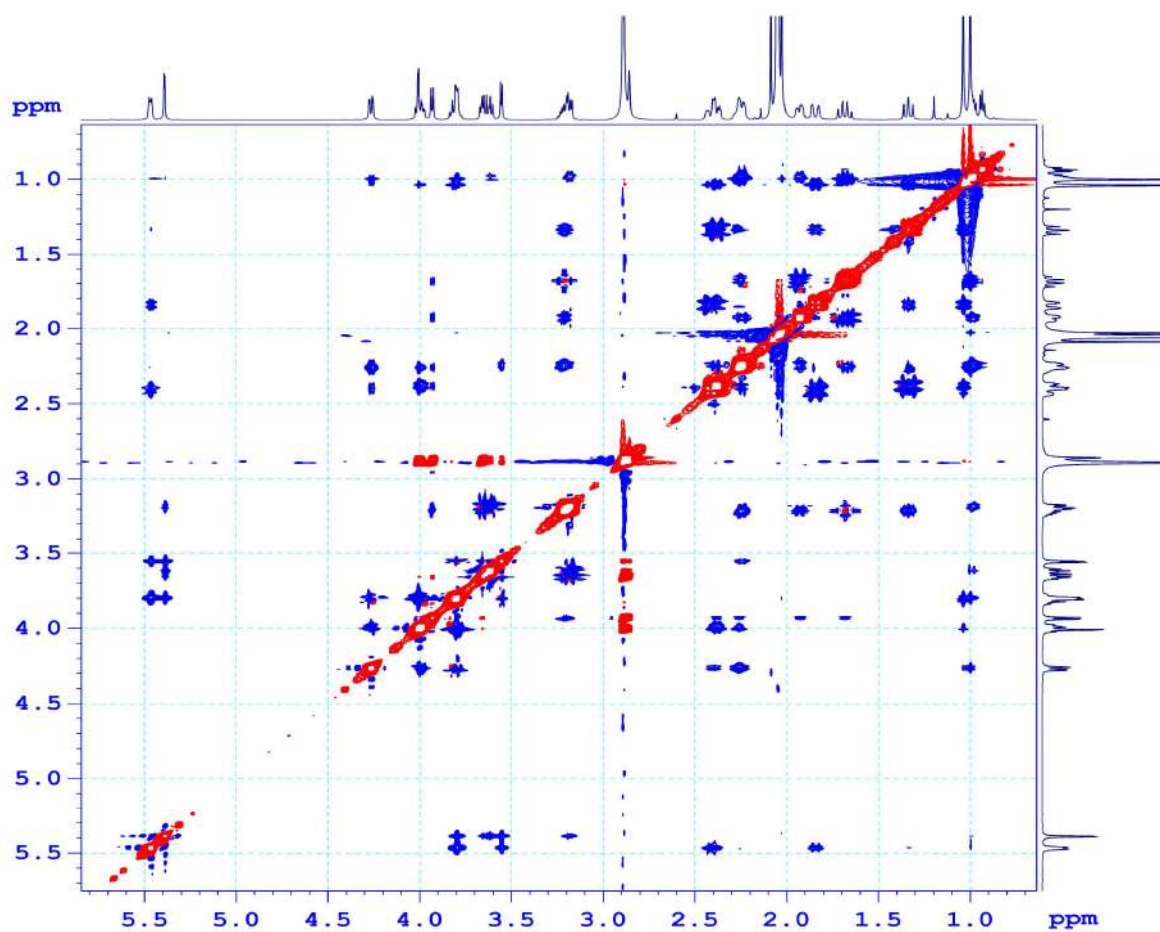
Hình O3.4. Phổ HSQC



Hình O3.5. Phổ HMBC

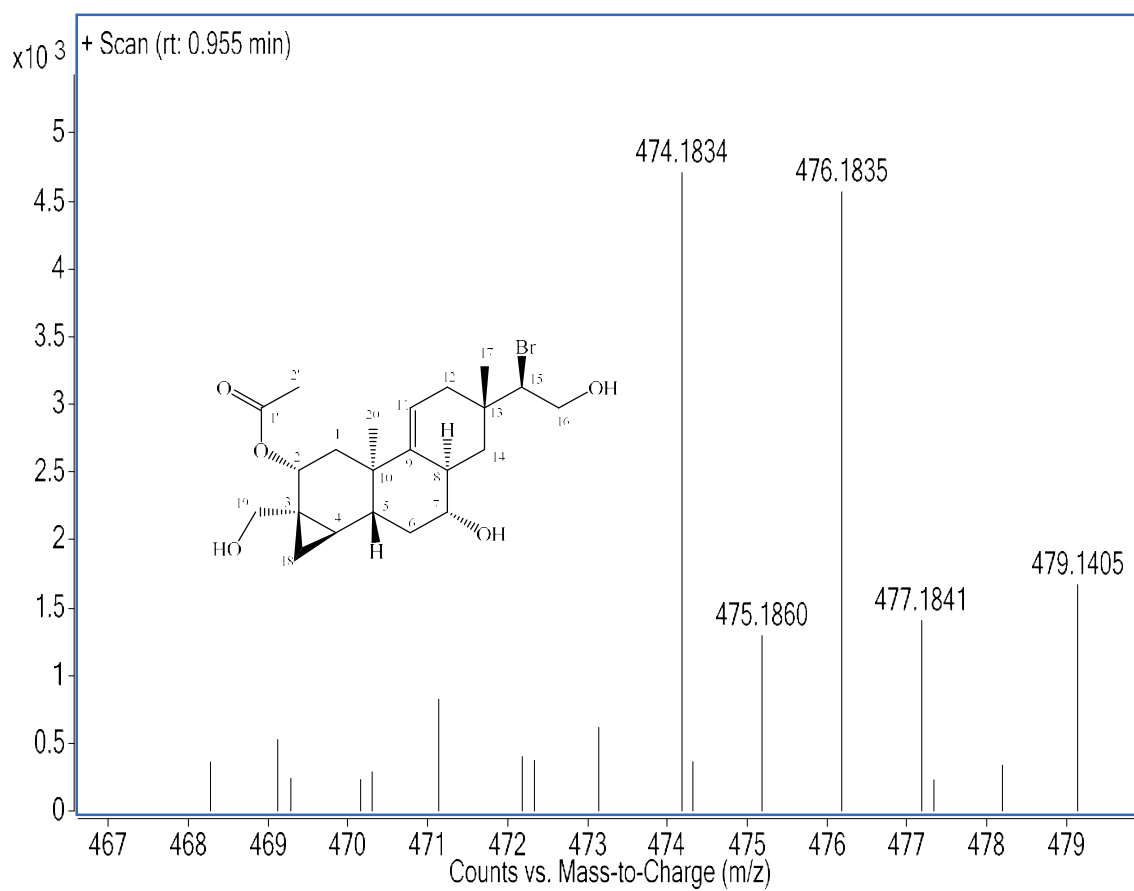


Hình O3.6. Phổ COSY

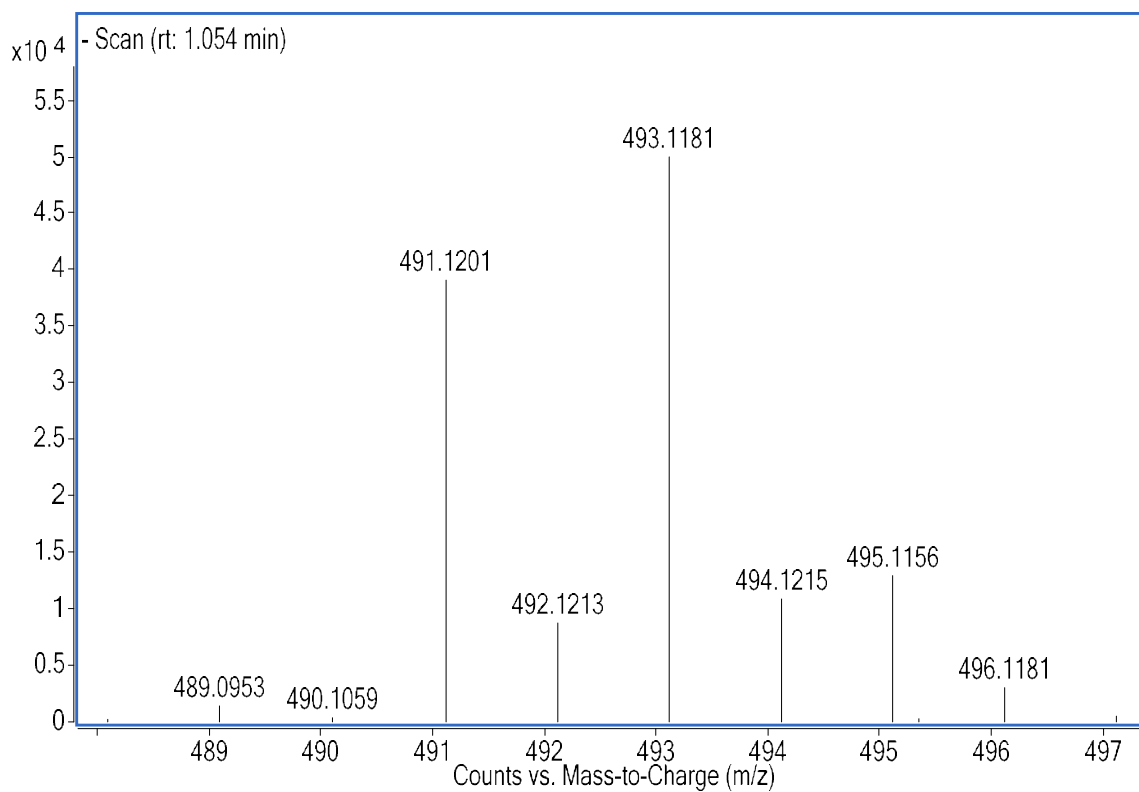


Hình O3.7. Phổ NOESY

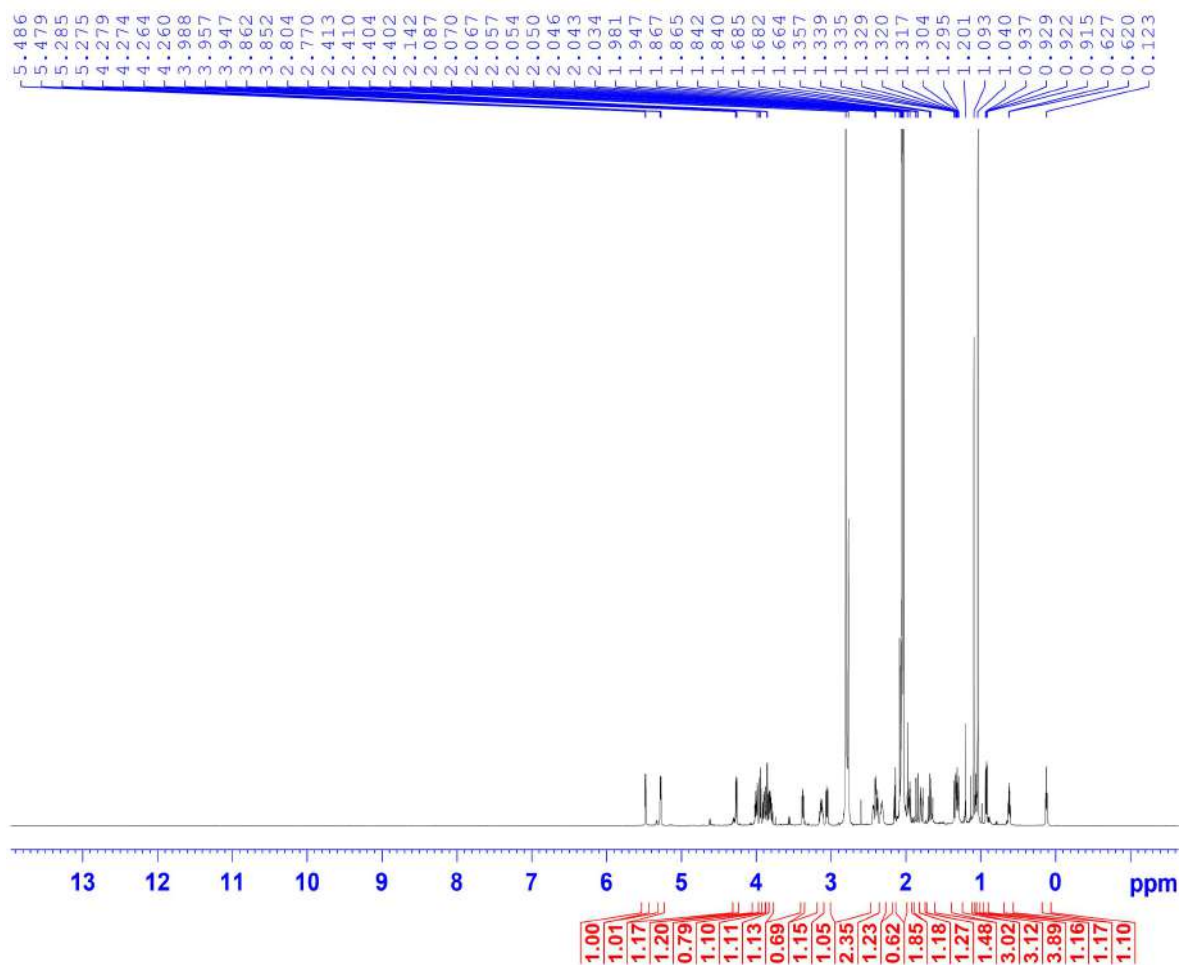
2.4. Phổ hợp chất AOB04: Oculiferanin D (chất mới)



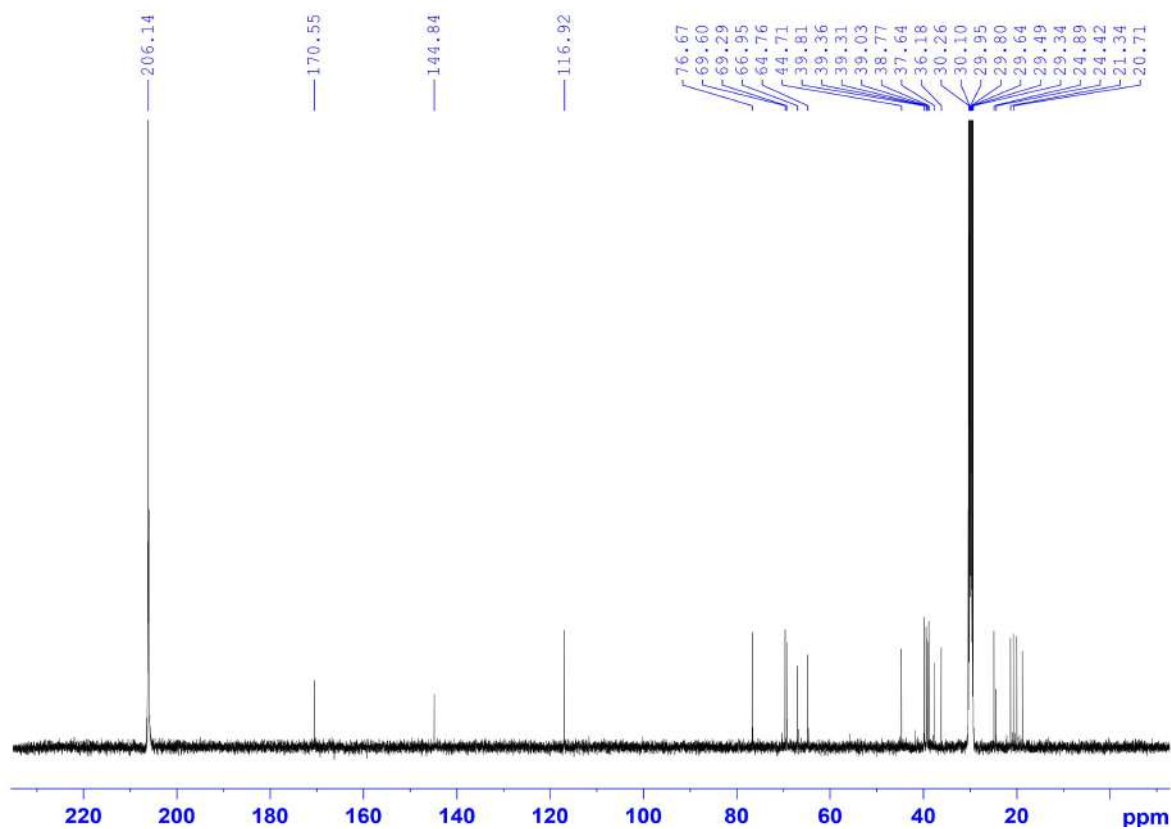
Hình O4.1a. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



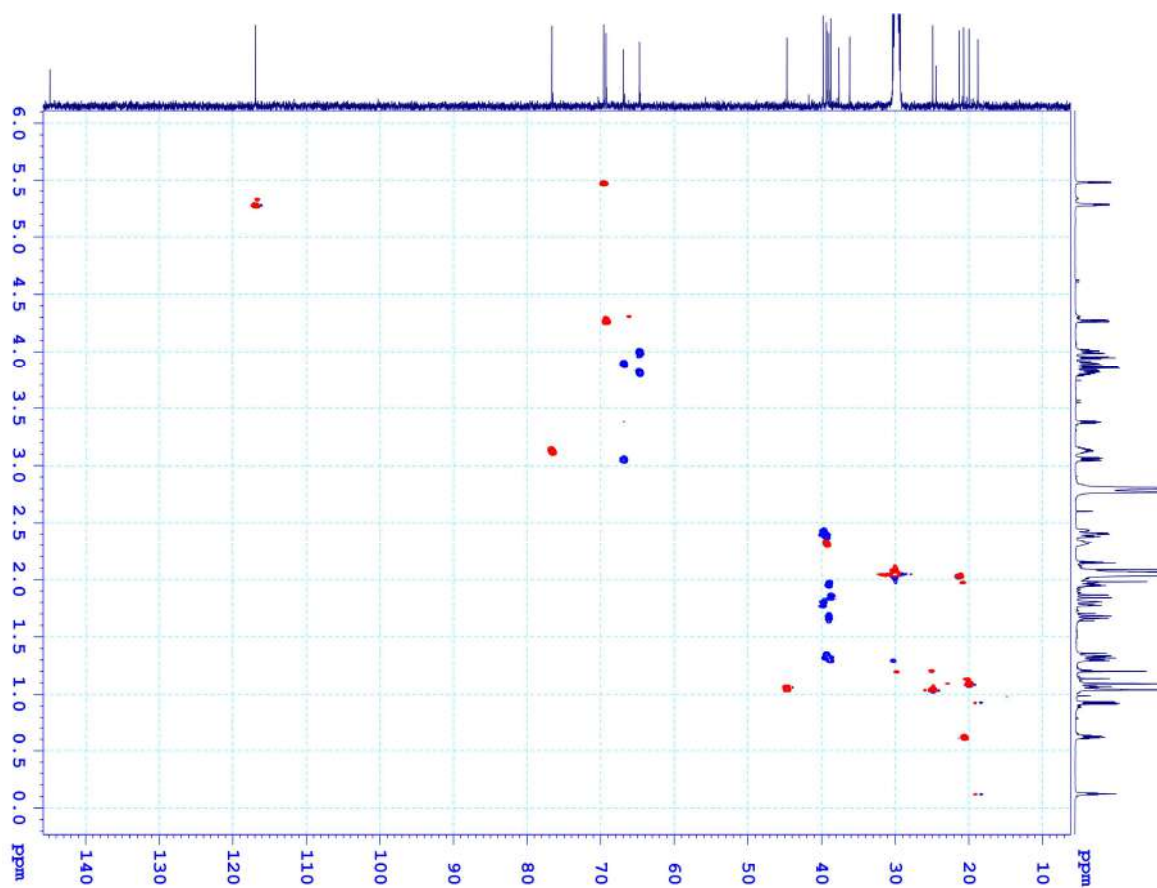
Hình O4.1b. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



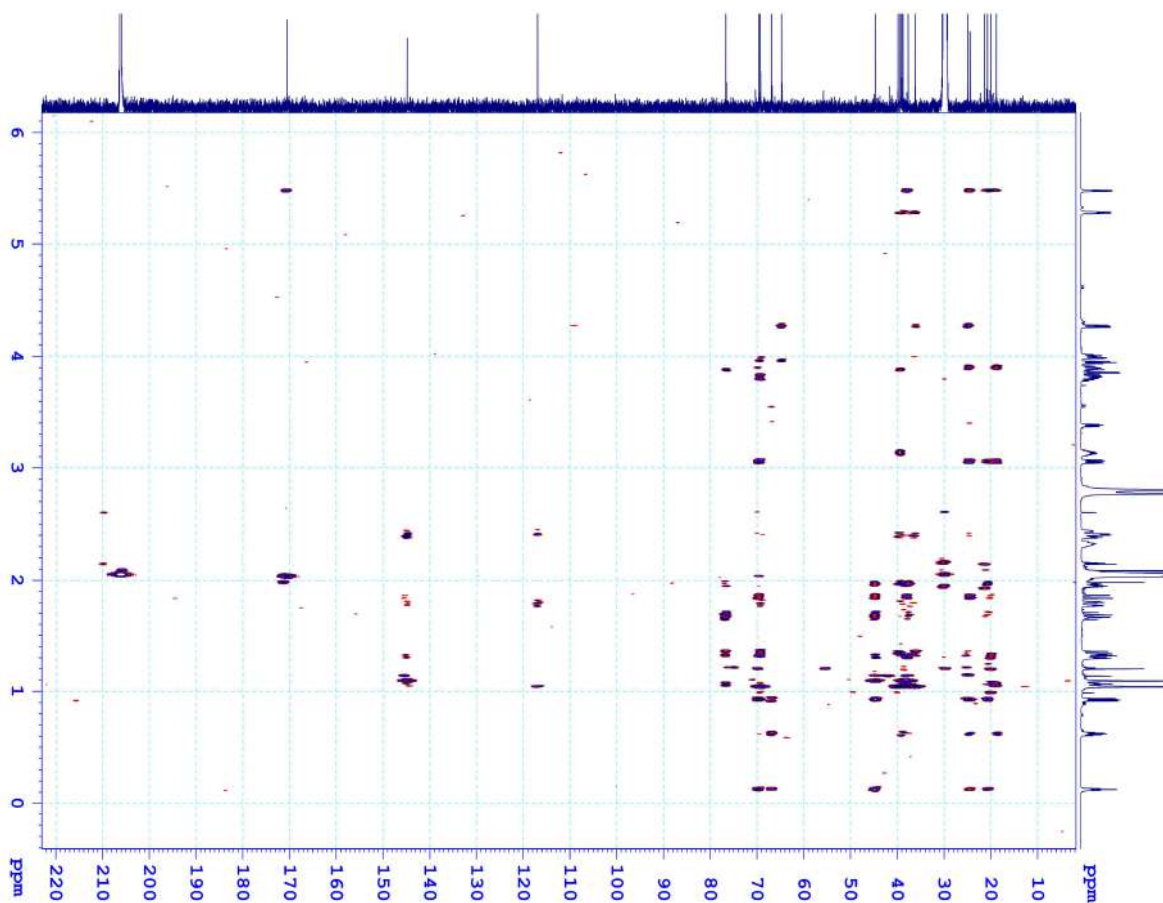
Hình O4.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$



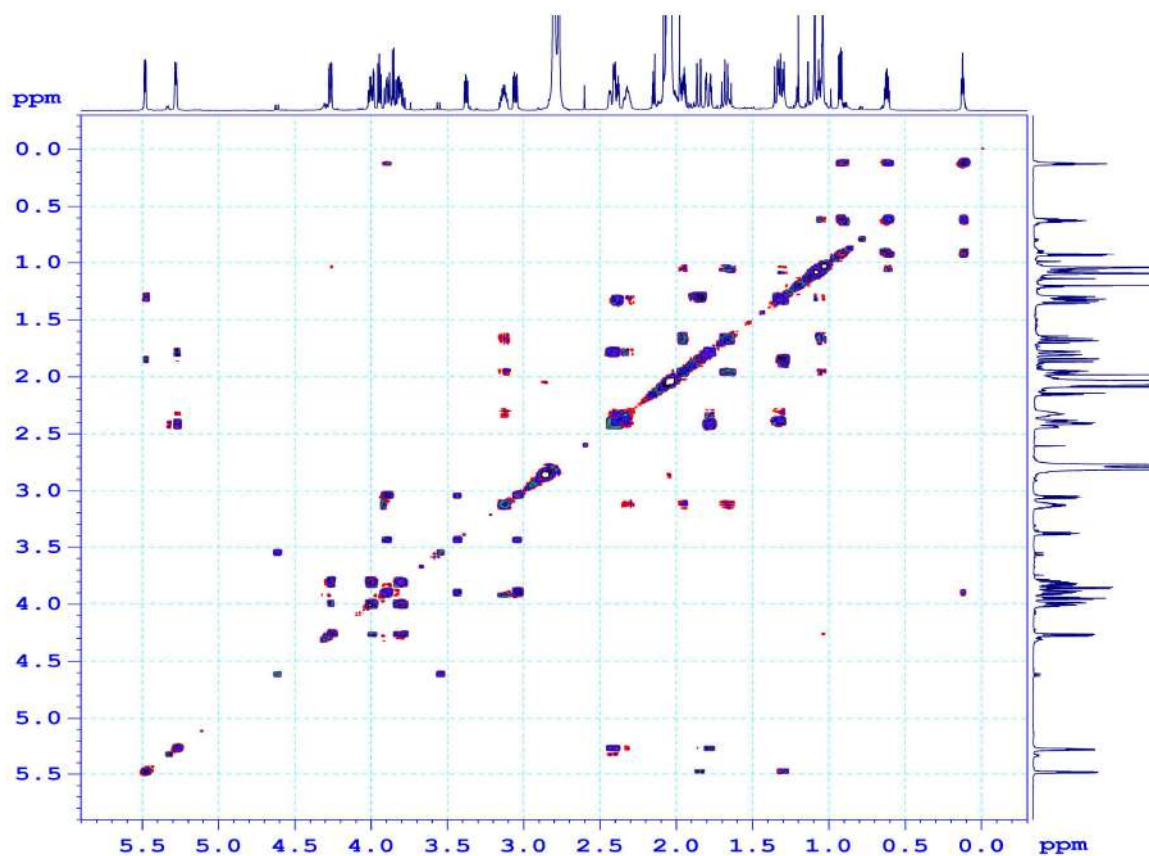
Hình O4.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$



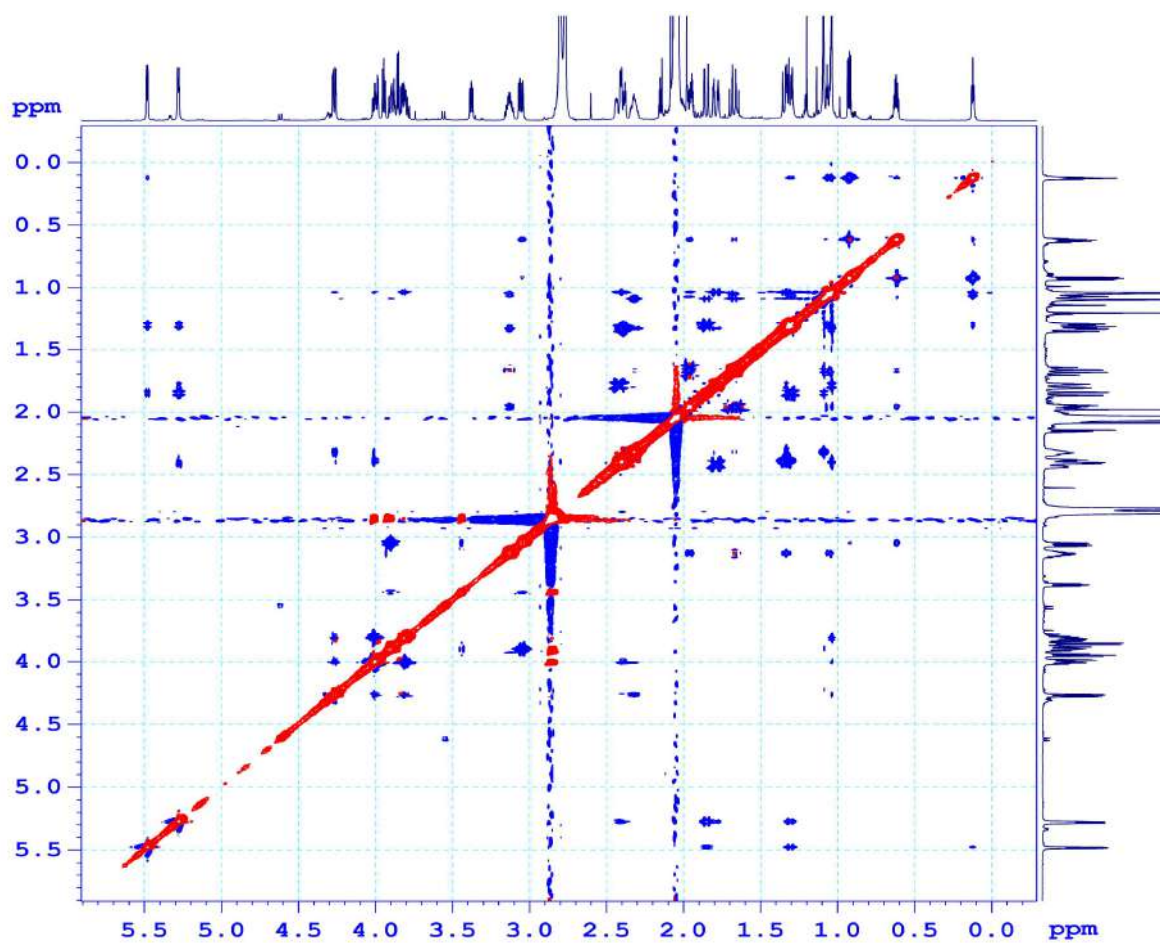
Hình O4.4. Phổ HSQC



Hình O4.5. Phổ HMBC

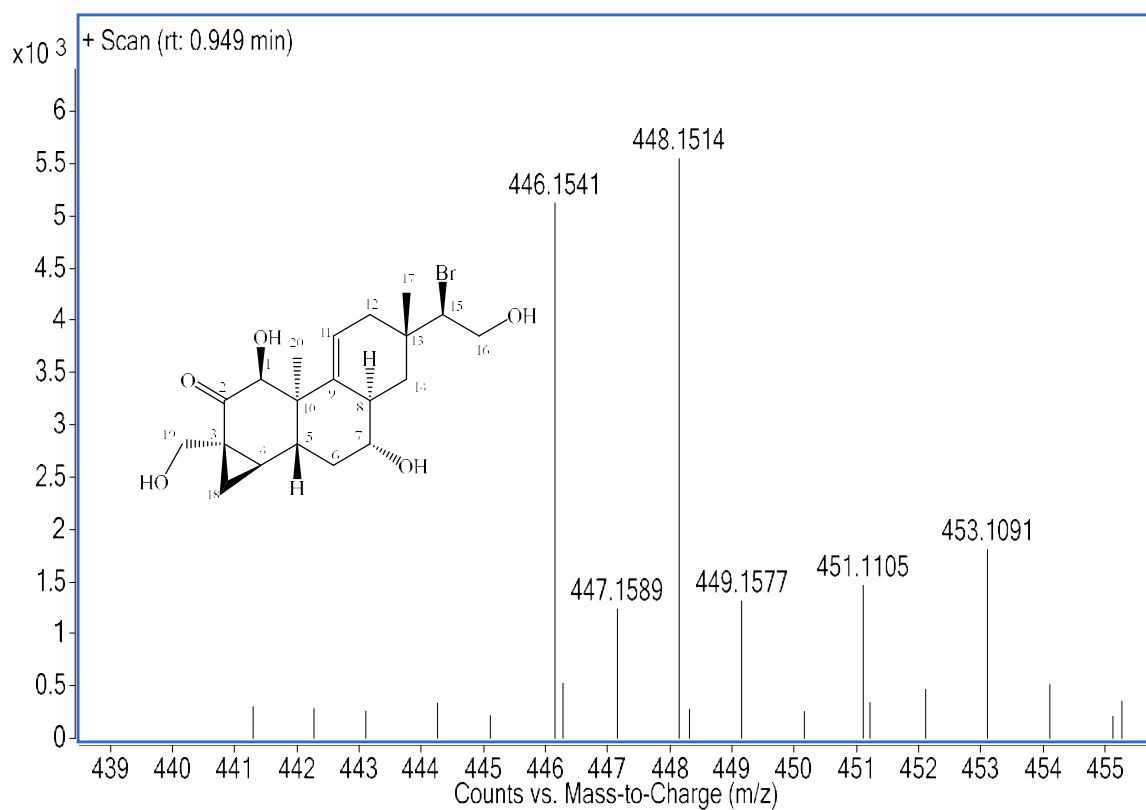


Hình O4.6. Phổ COSY

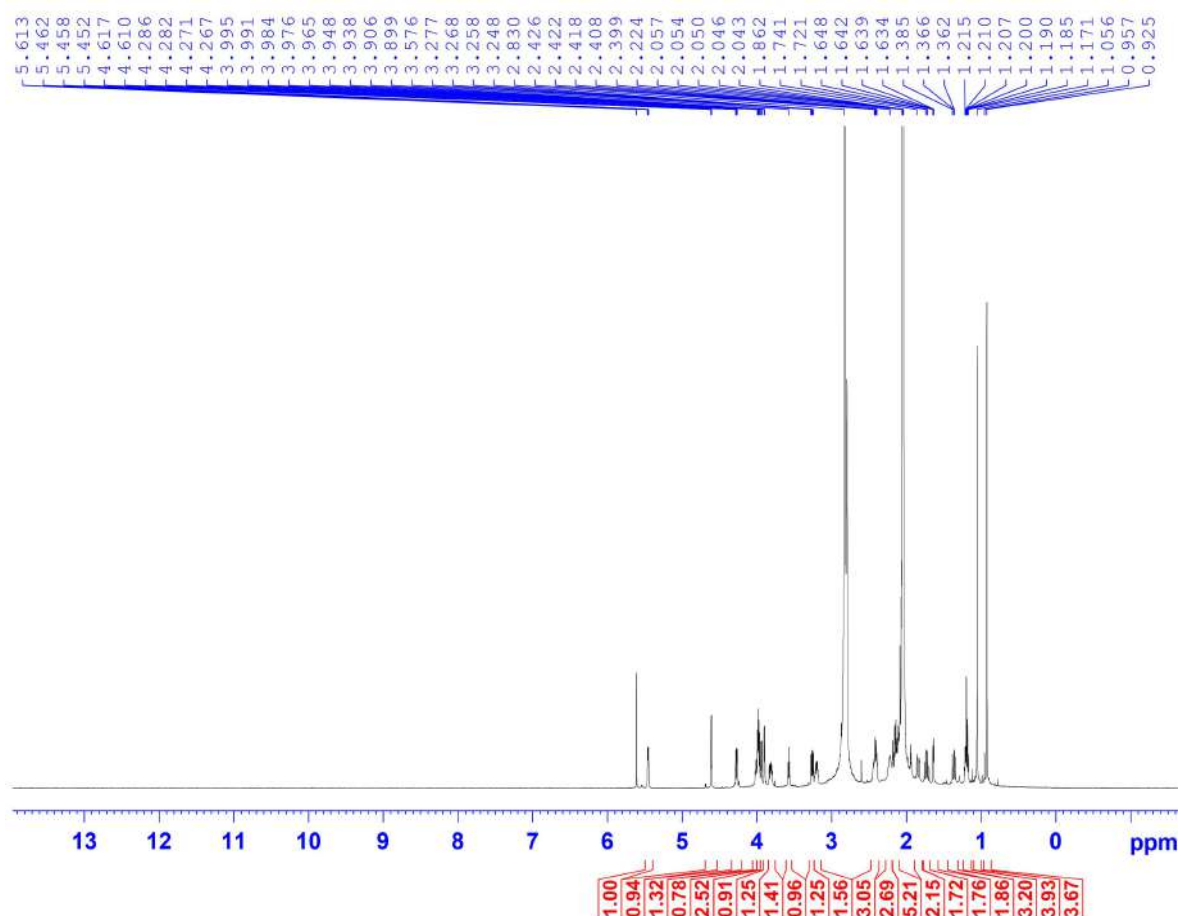


Hình O4.7. Phổ NOESY

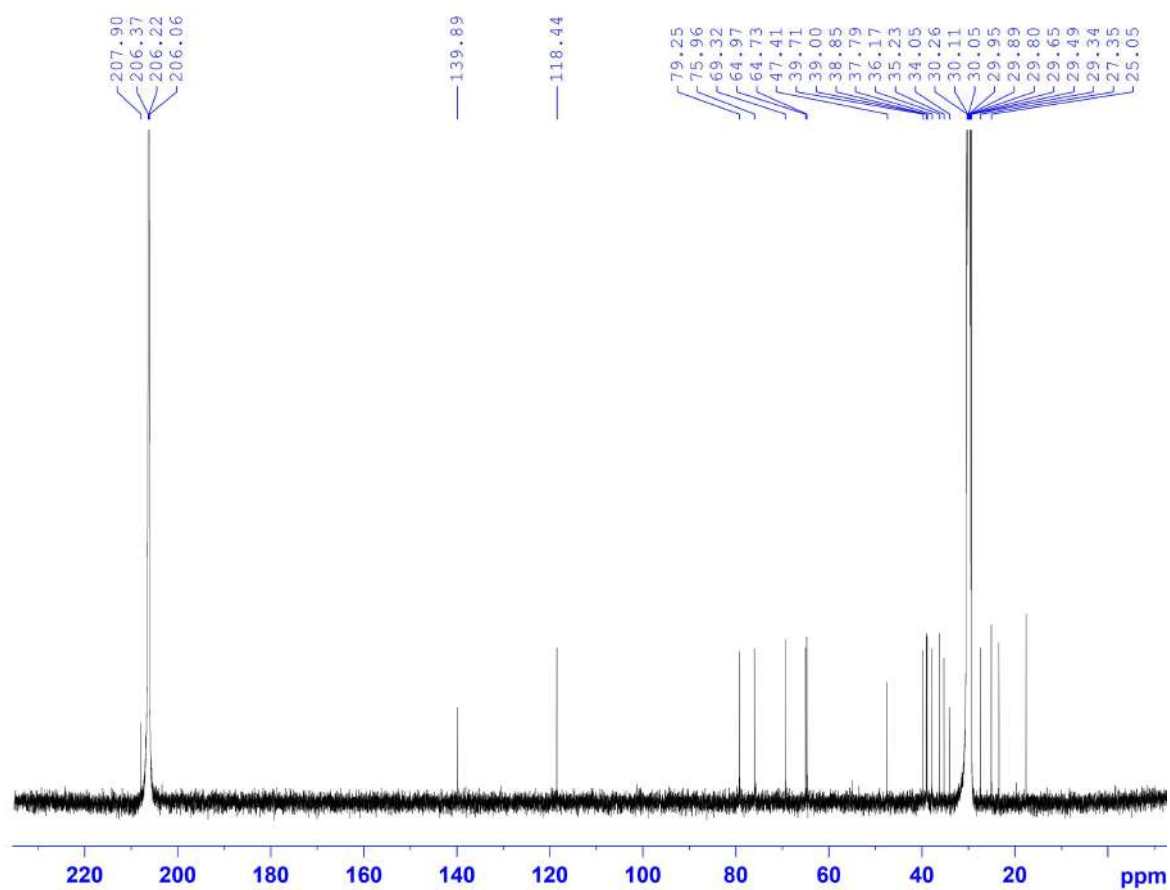
2.5. Phổ hợp chất AOB05: Oculiferanin E (chất mới)



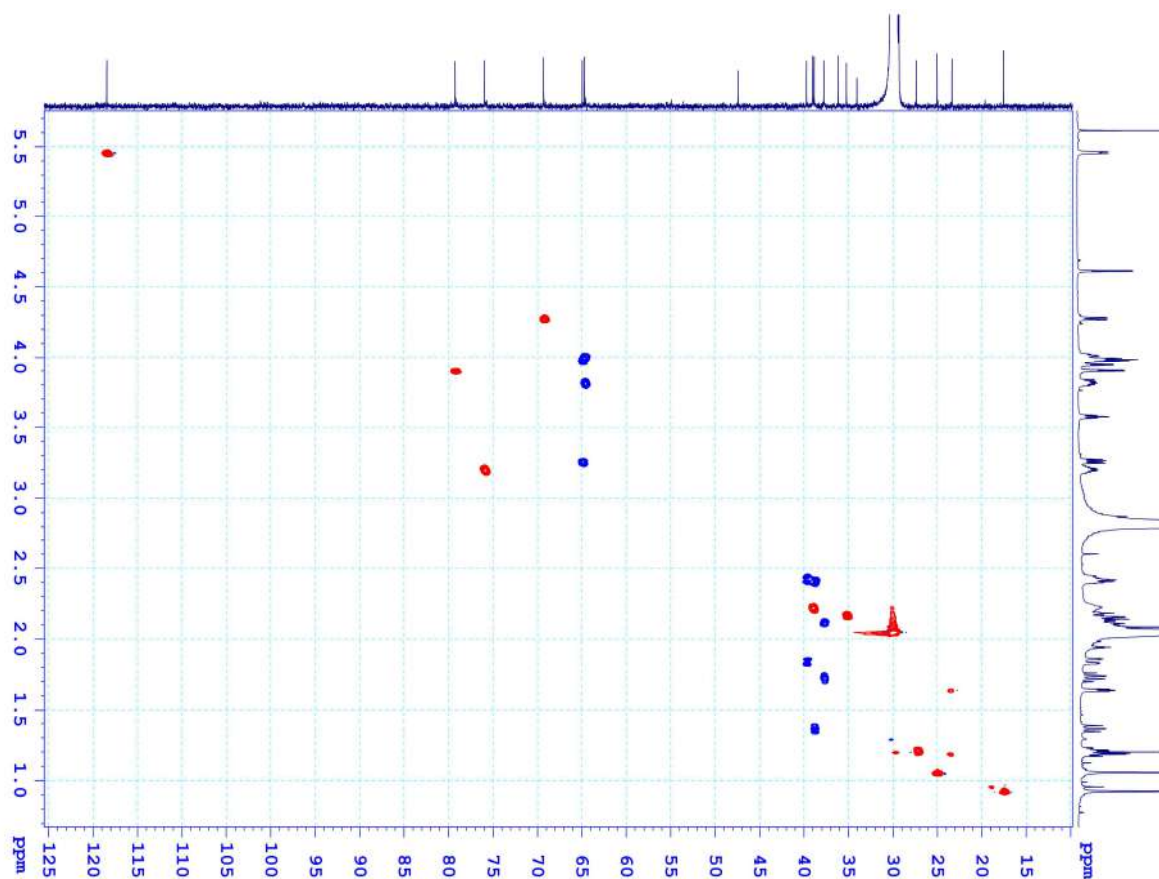
Hình O5.1. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



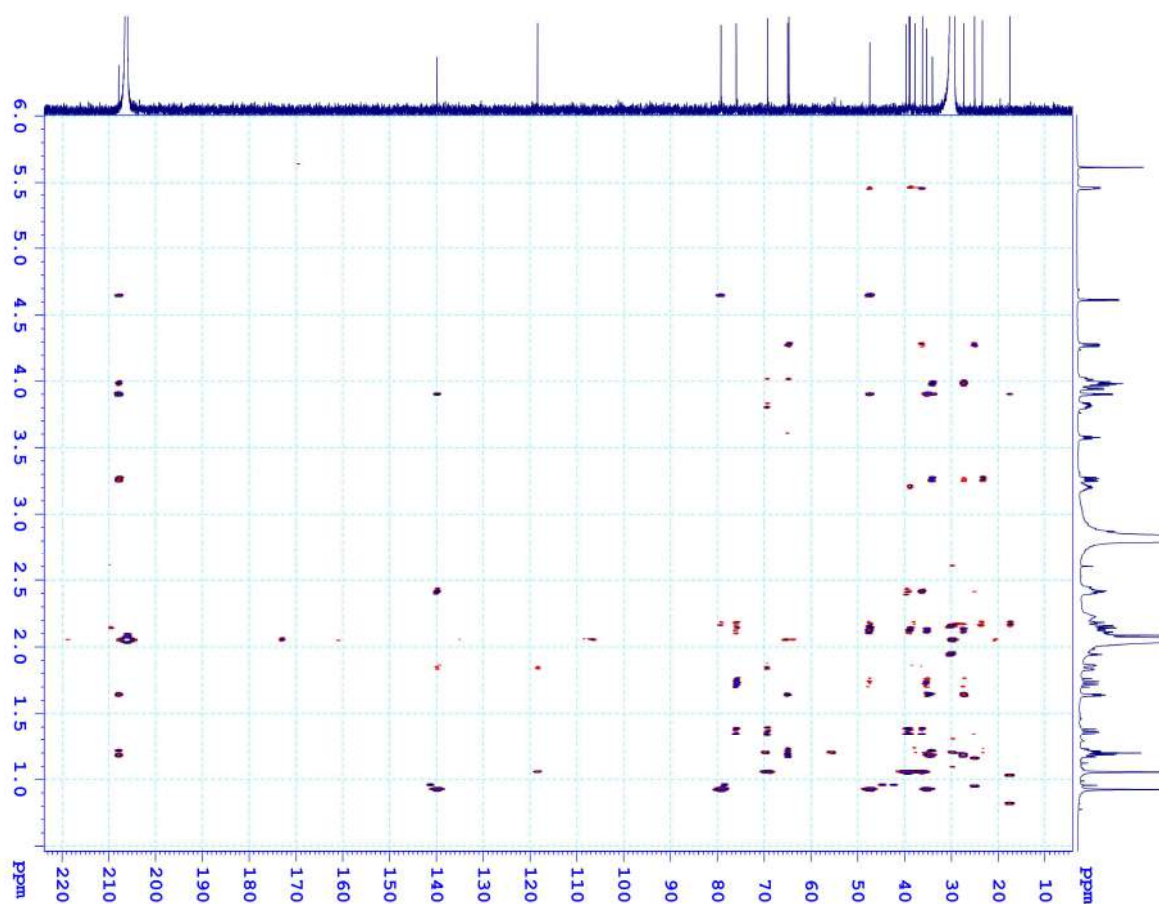
Hình O5.2. Phổ ¹H-NMR



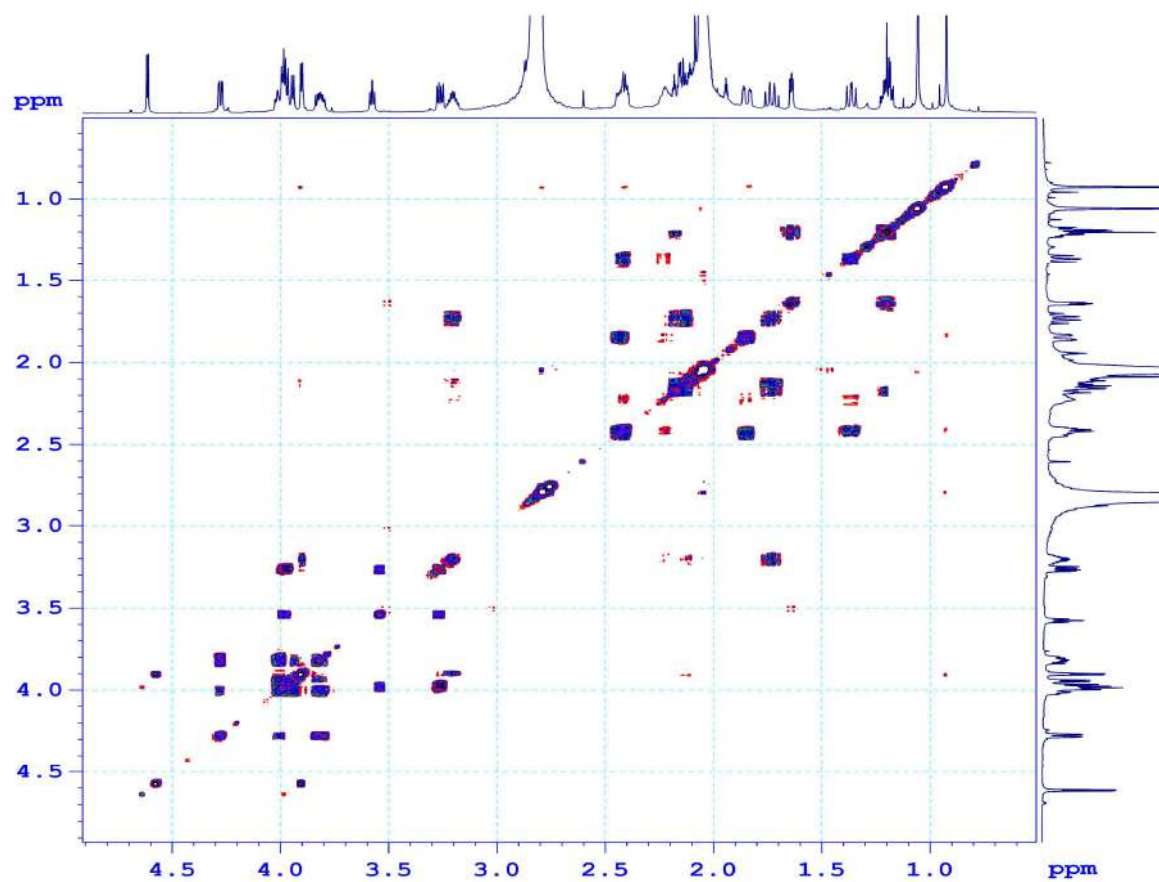
Hình O5.3. Phổ ^{13}C -NMR



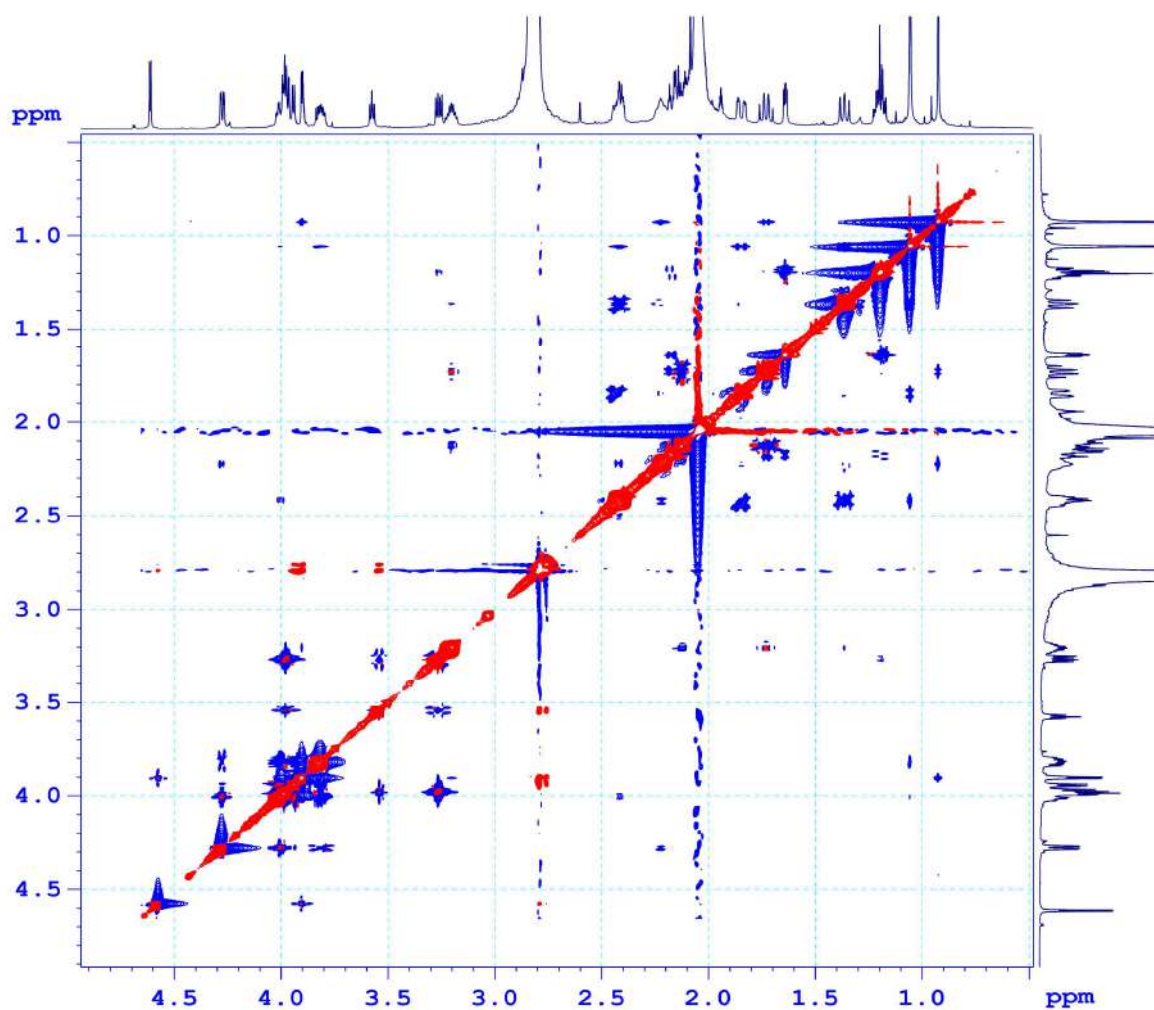
Hình O5.4. Phổ HSQC



Hình O5.5. Phổ HMBC

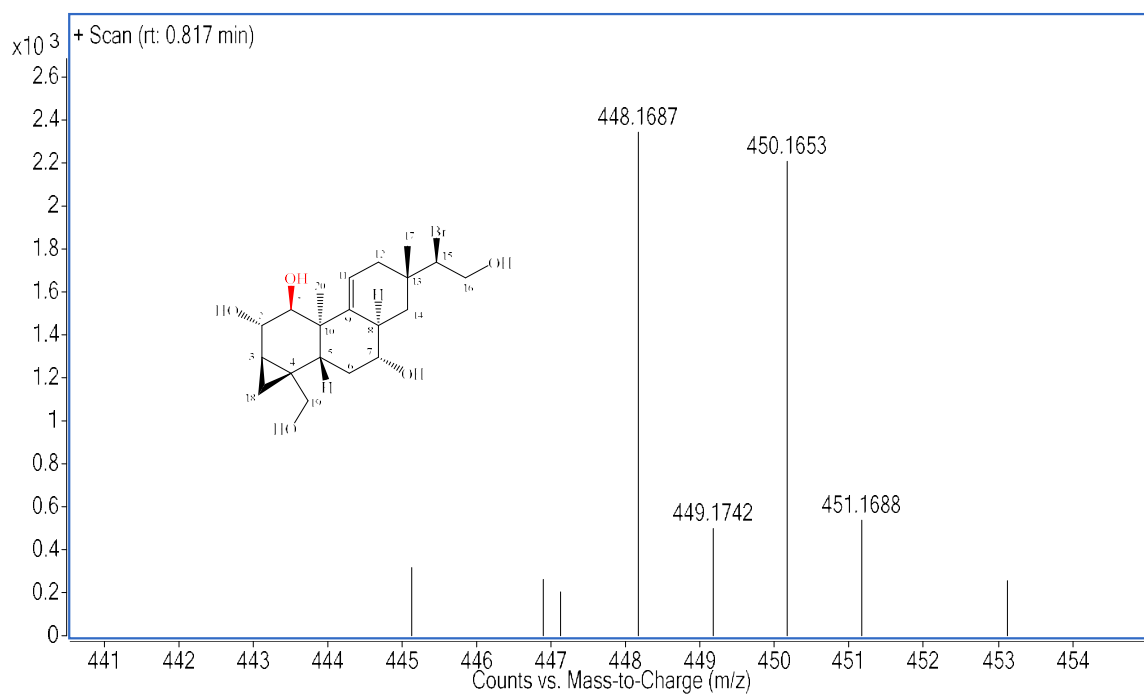


Hình O5.6. Phổ COSY

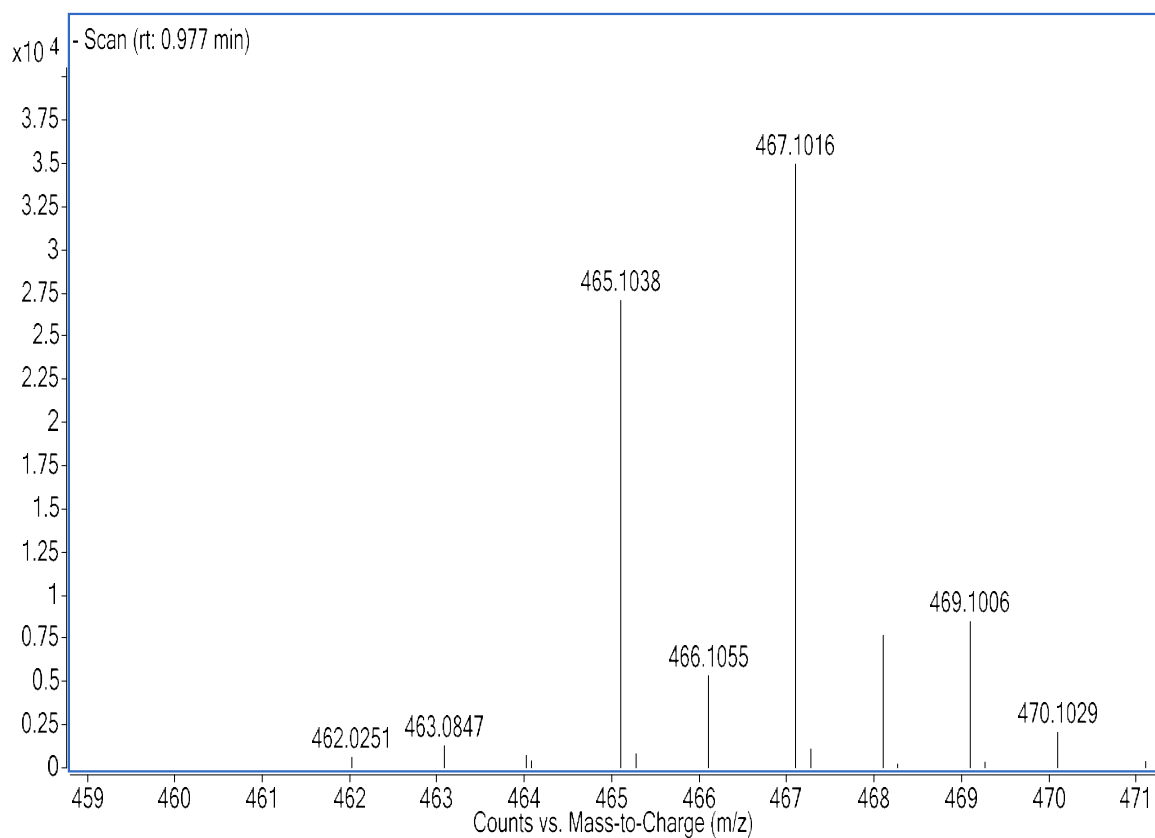


Hình O5.7. Phổ NOESY

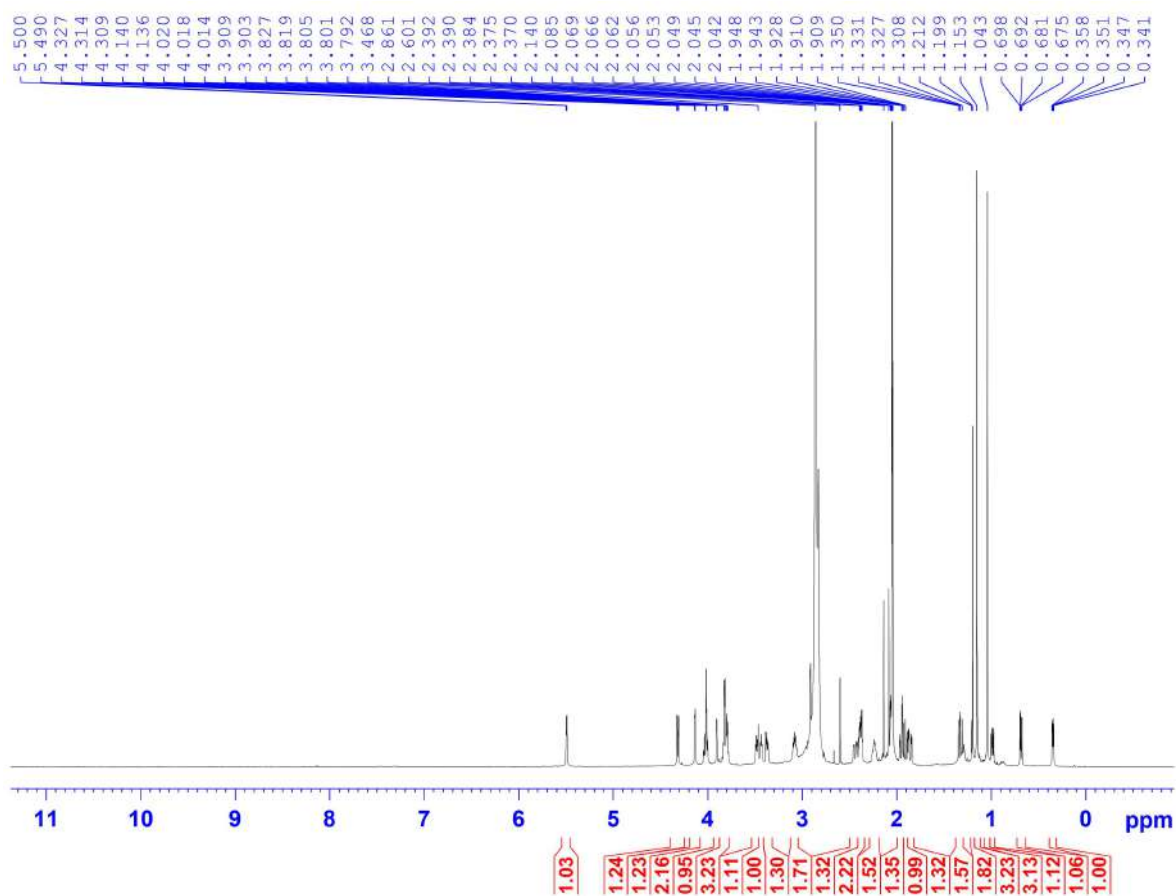
2.6. Phổ hợp chất AOB06: Oculiferanin F (*chất mới*)



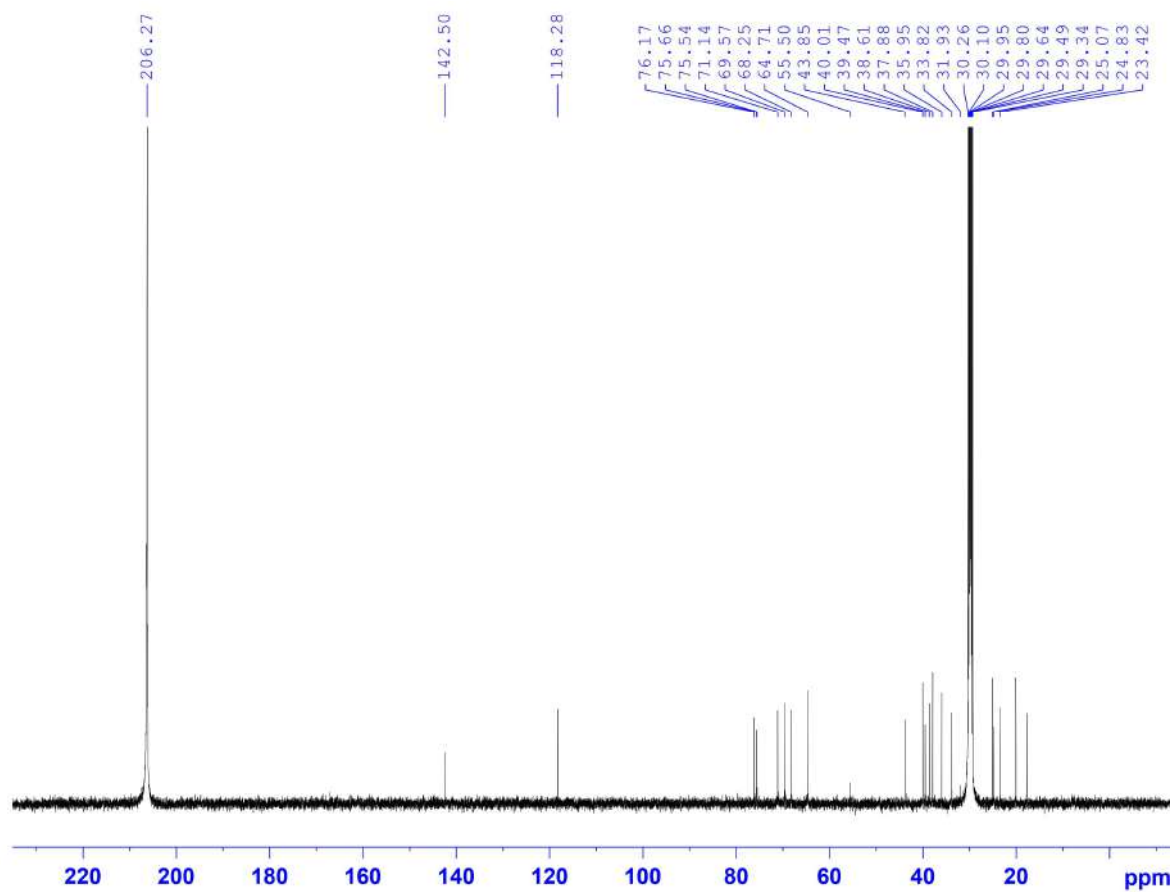
Hình O6.1a. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



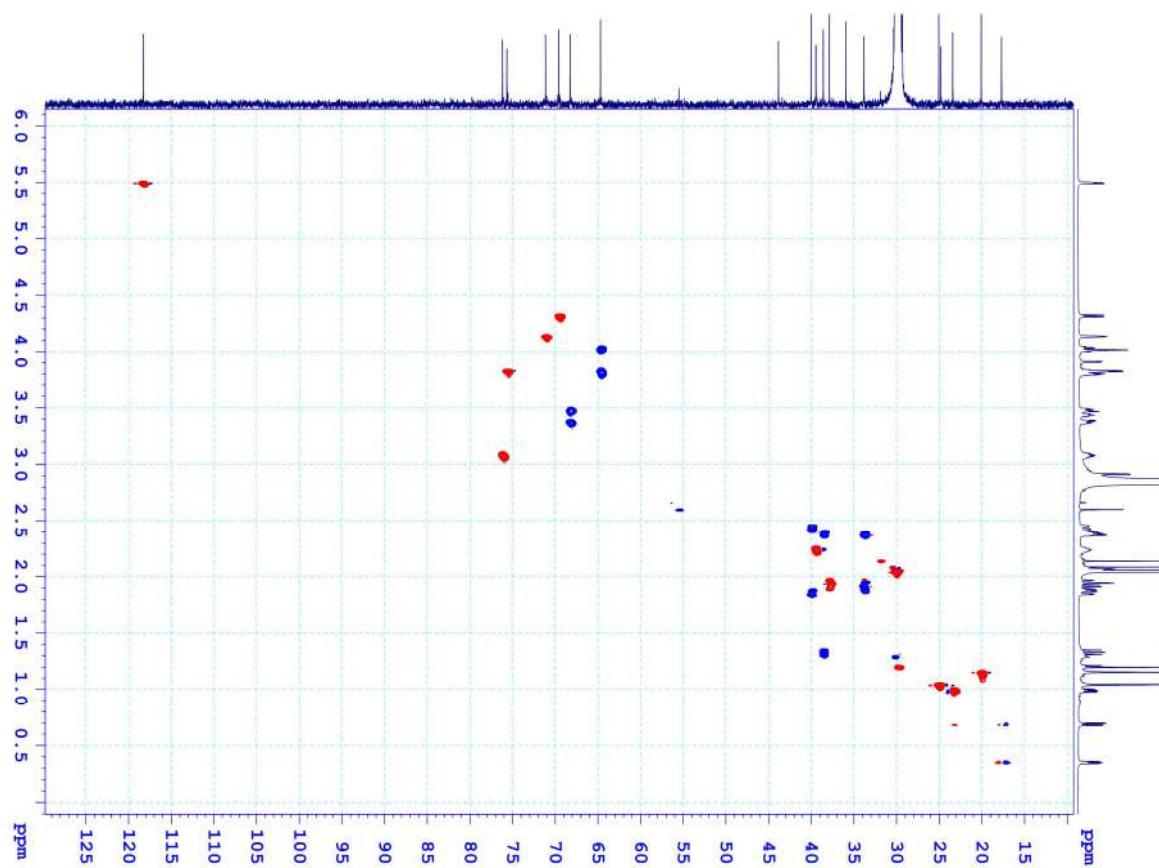
Hình O6.1b. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



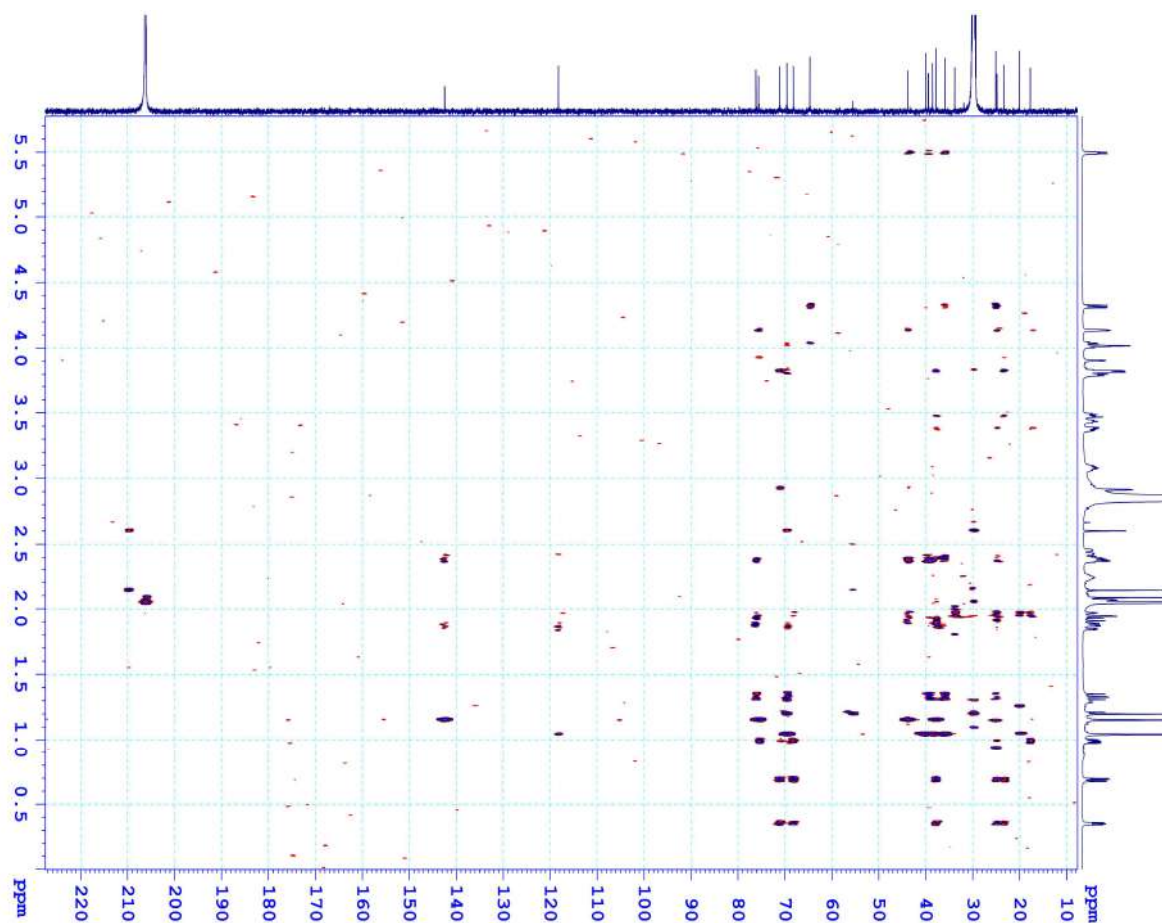
Hình O6.2. Phổ ¹H-NMR



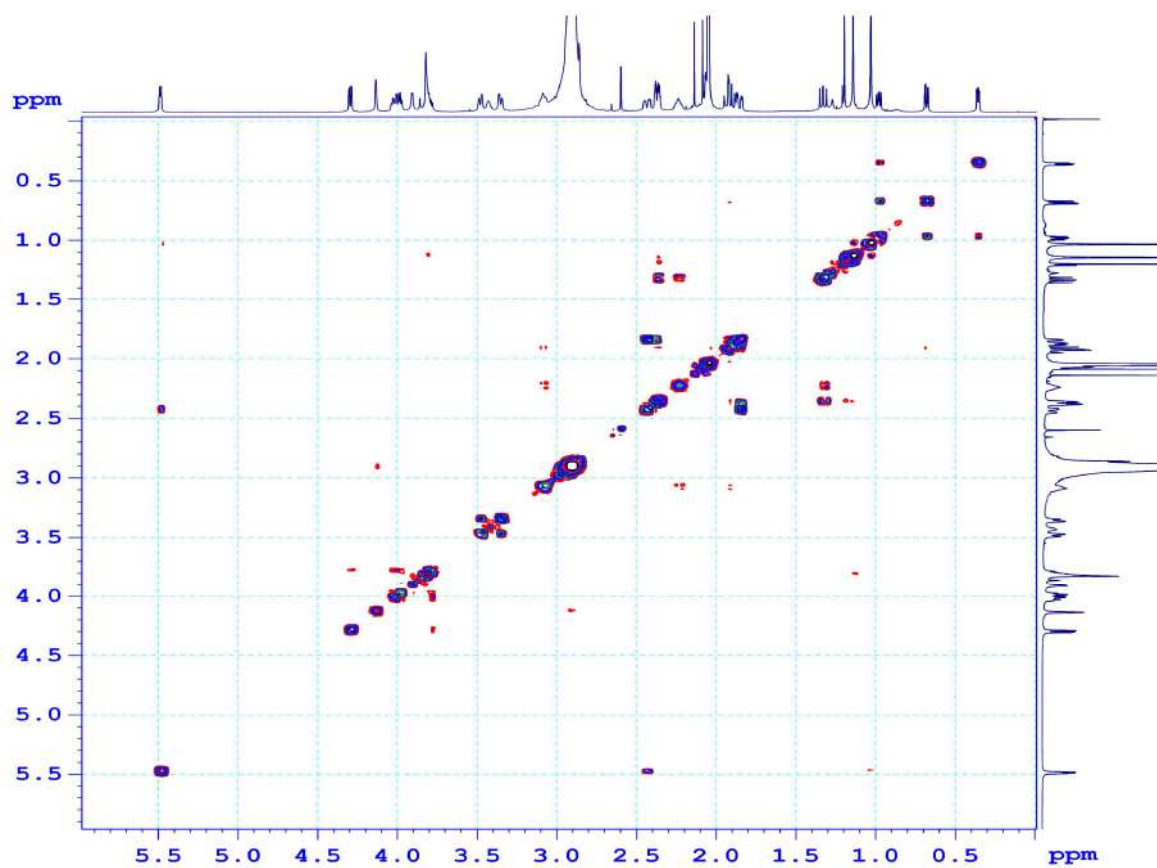
Hình O6.3. Phổ ^{13}C -NMR



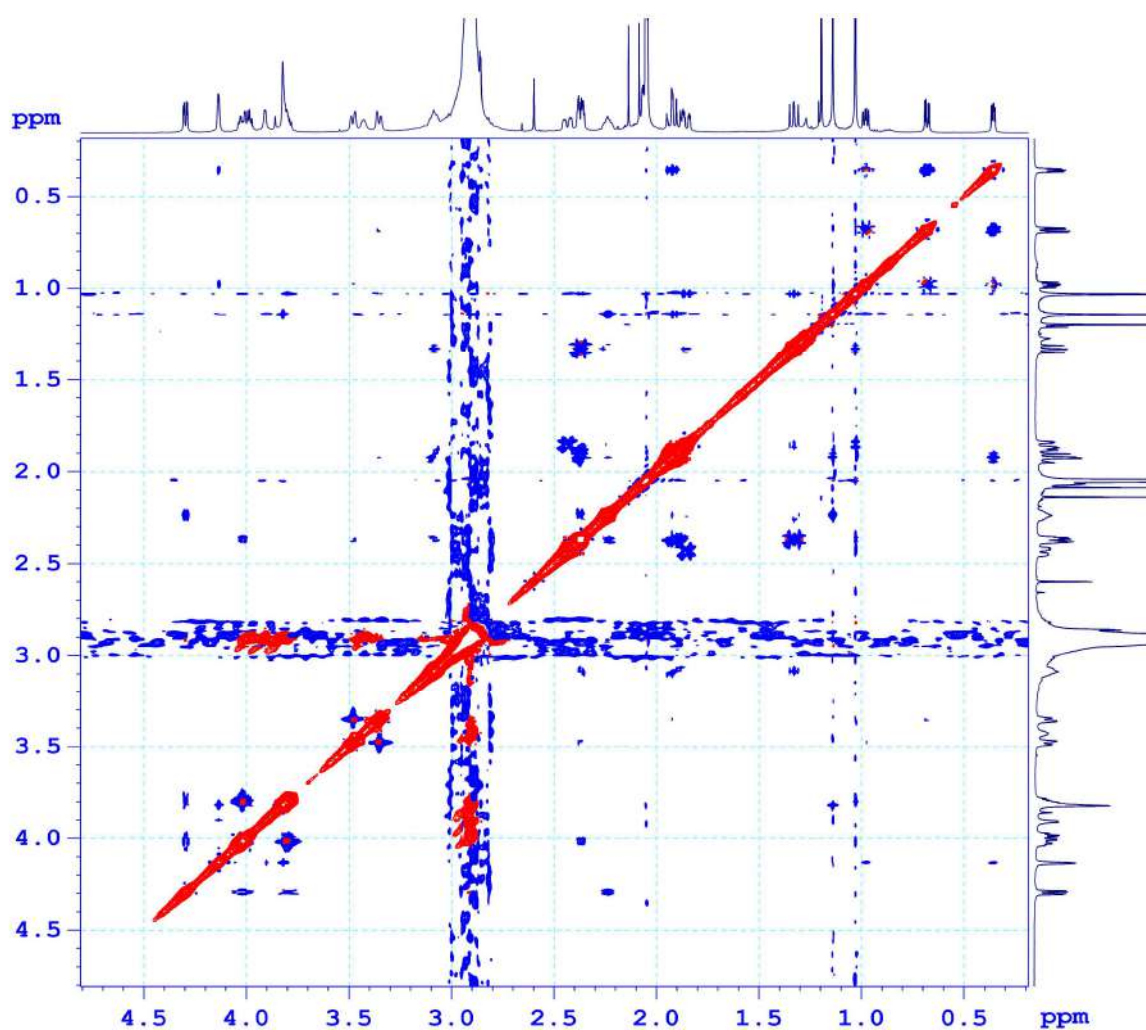
Hình O6.4. Phổ HSQC



Hình O6.5. Phổ HMBC

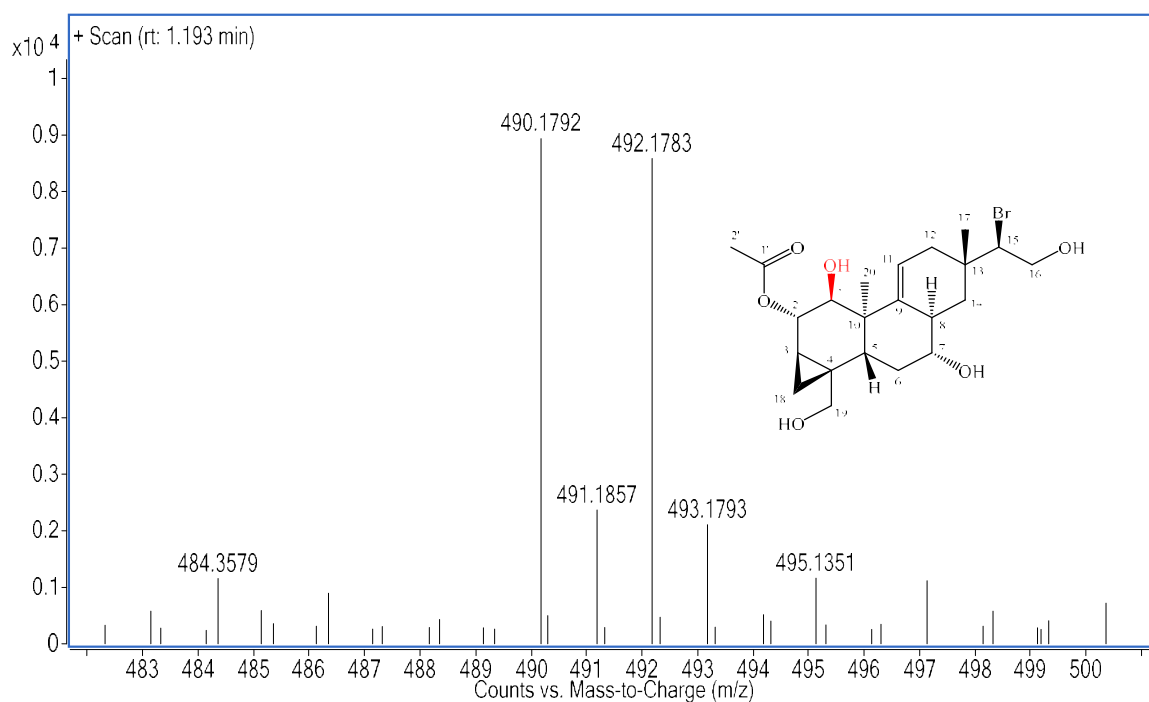


Hình O6.6. Phổ COSY

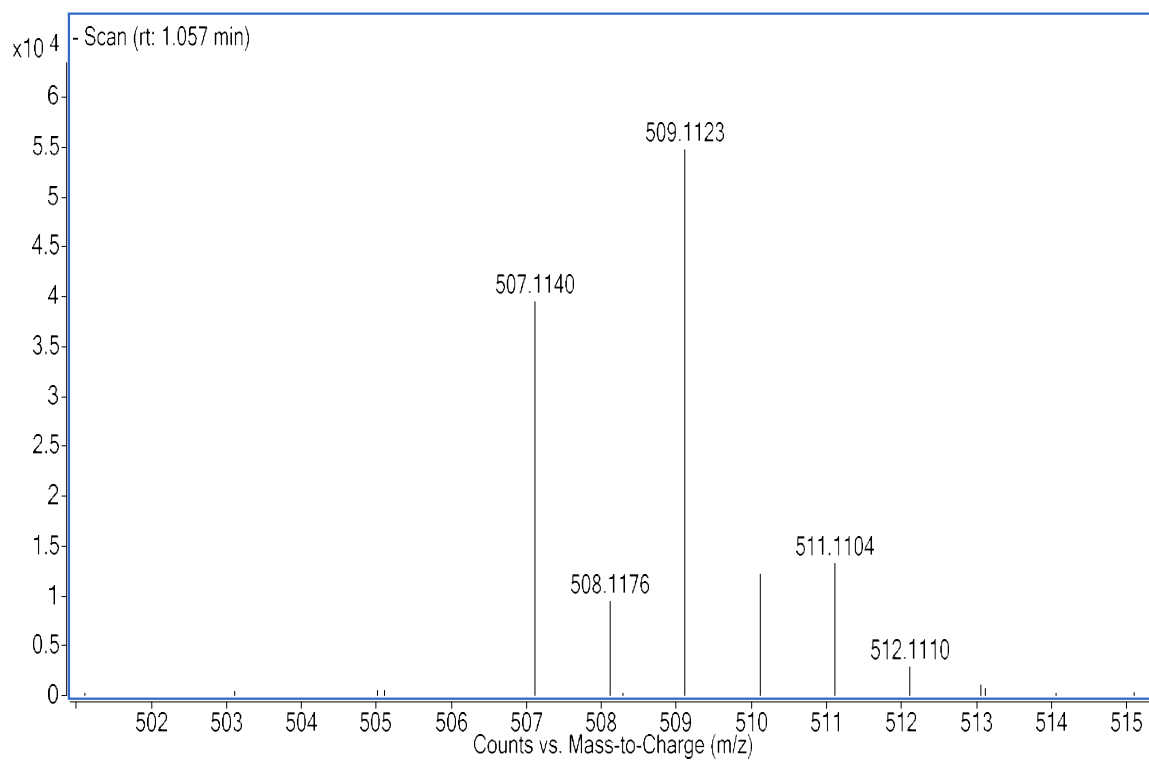


Hình O6.7. Phổ NOESY

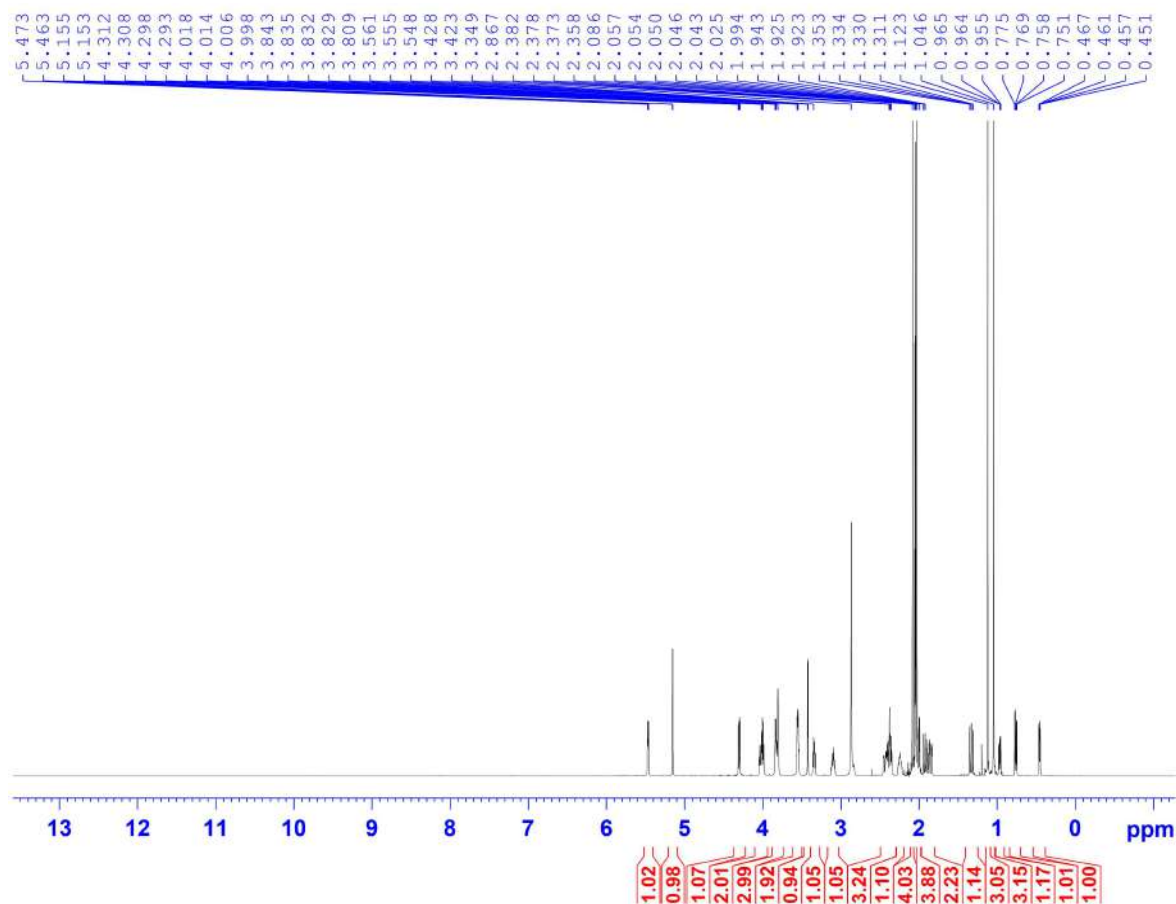
2.7. Phổ hợp chất AOB07: Oculiferanin G (chất mới)



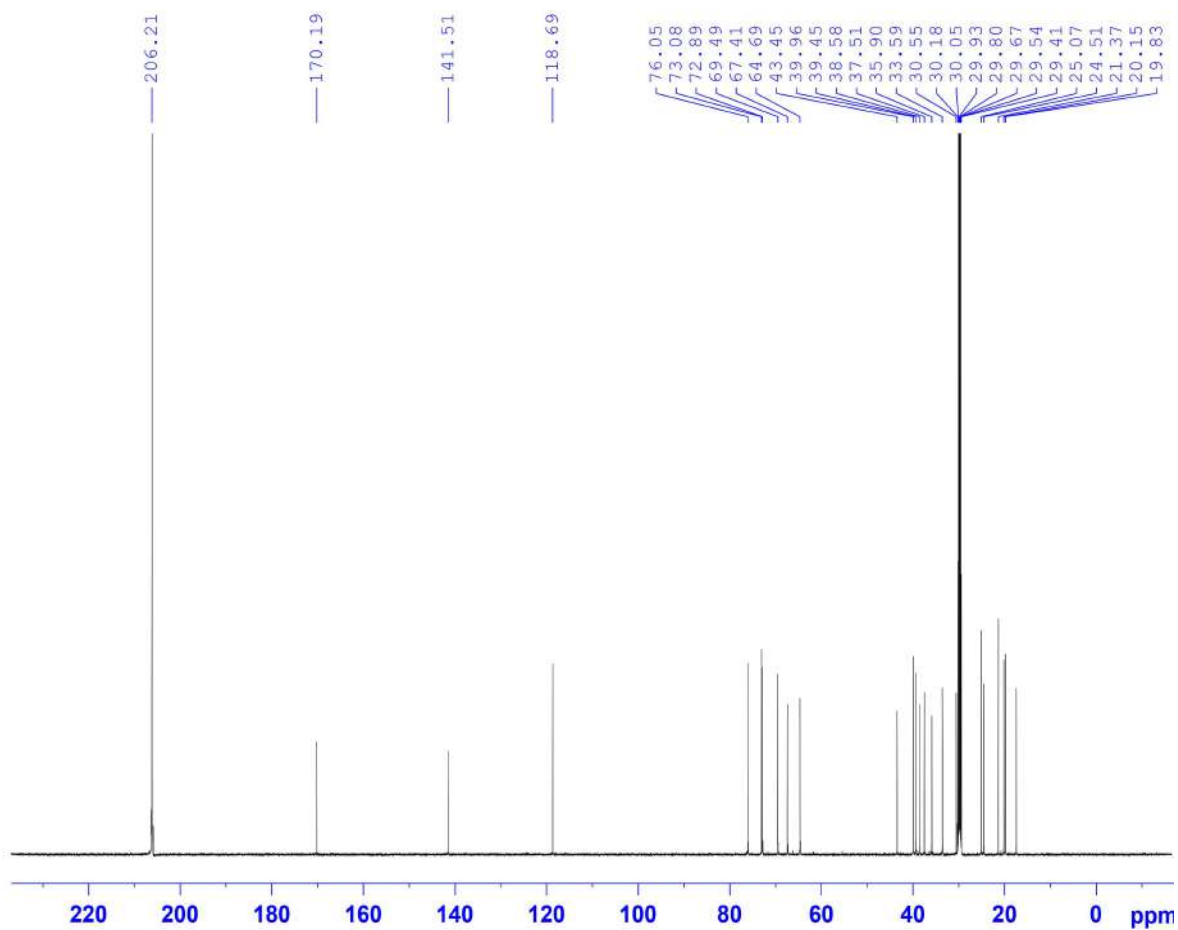
Hình O7.1a. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



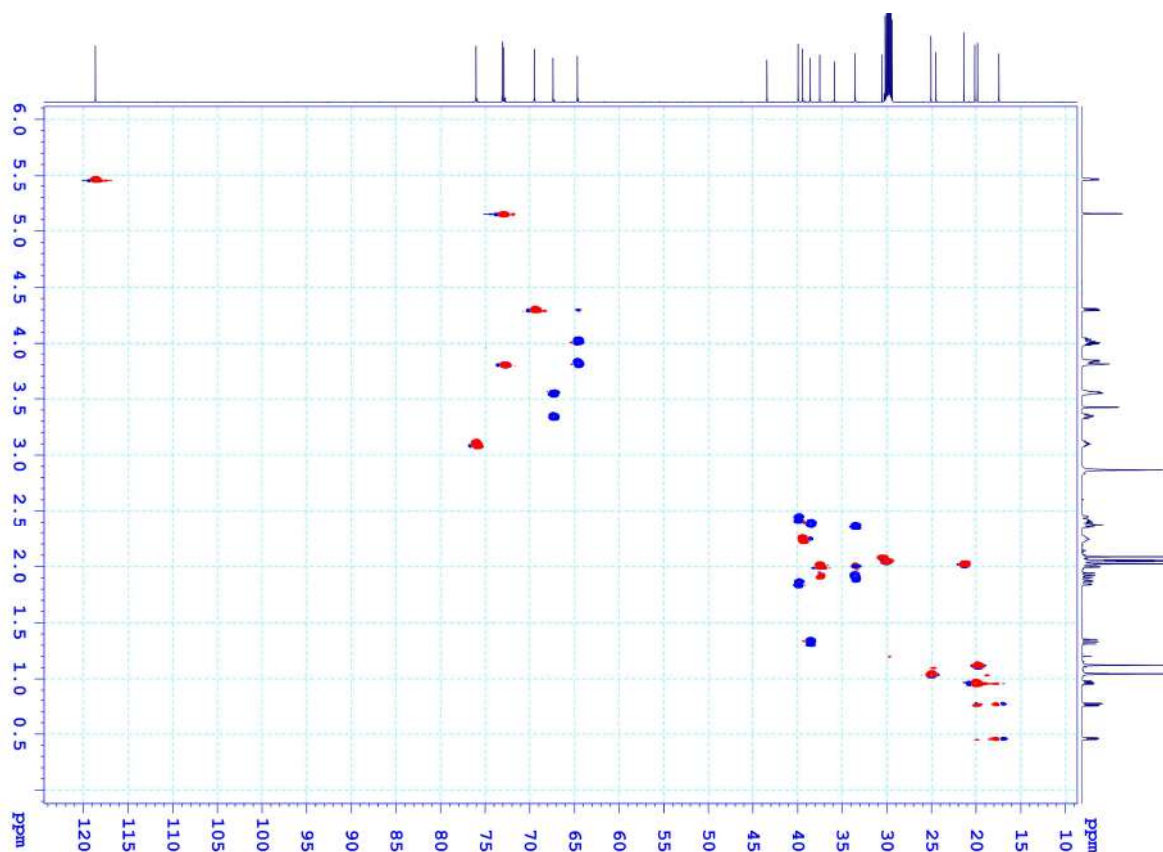
Hình O7.1b. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS



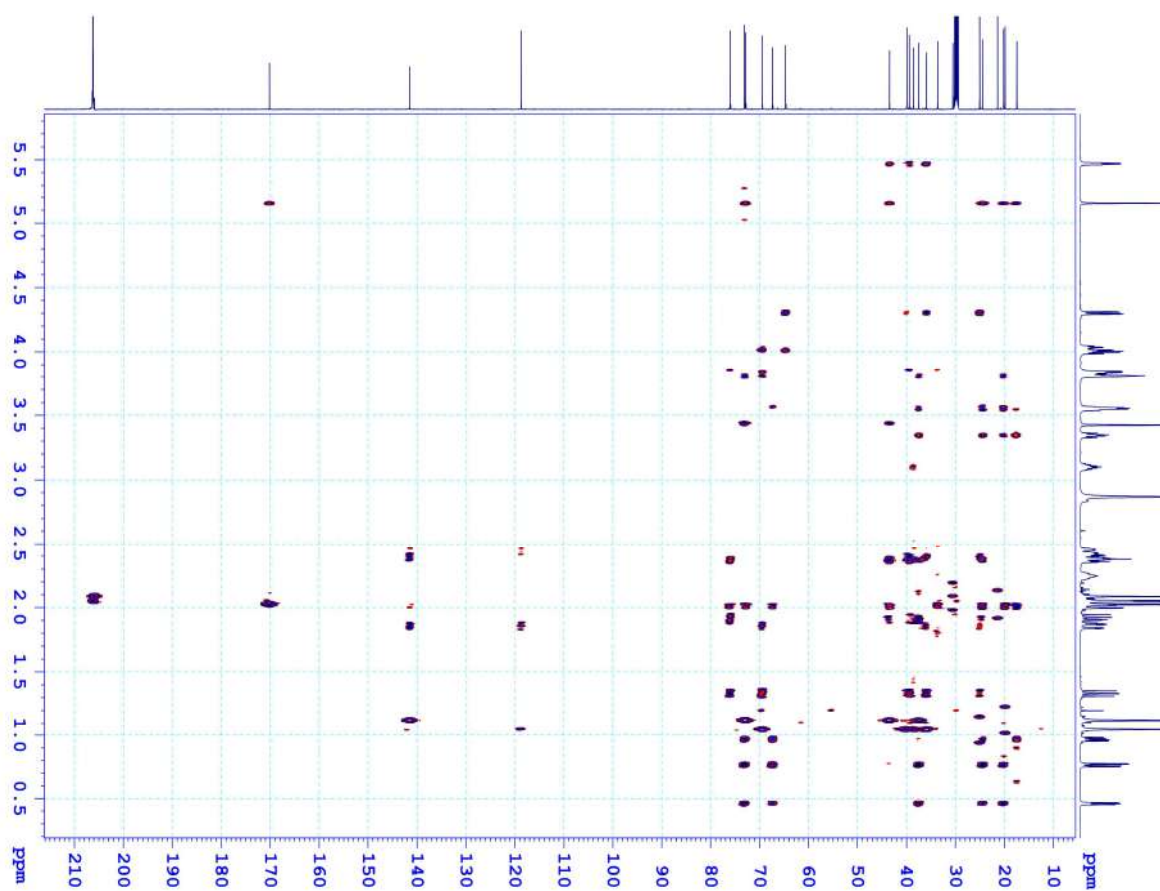
Hình O7.2. Phổ ¹H-NMR



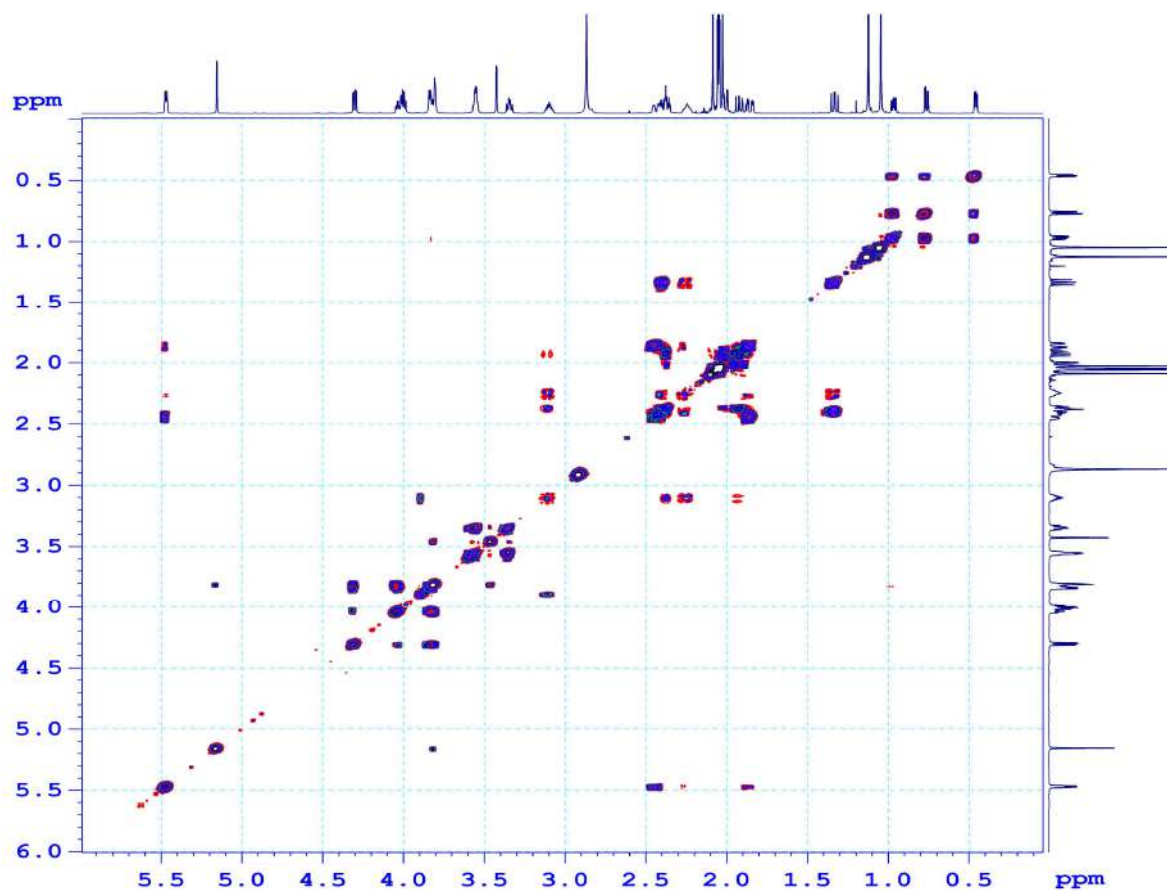
Hình O7.3. Phổ ^{13}C -NMR



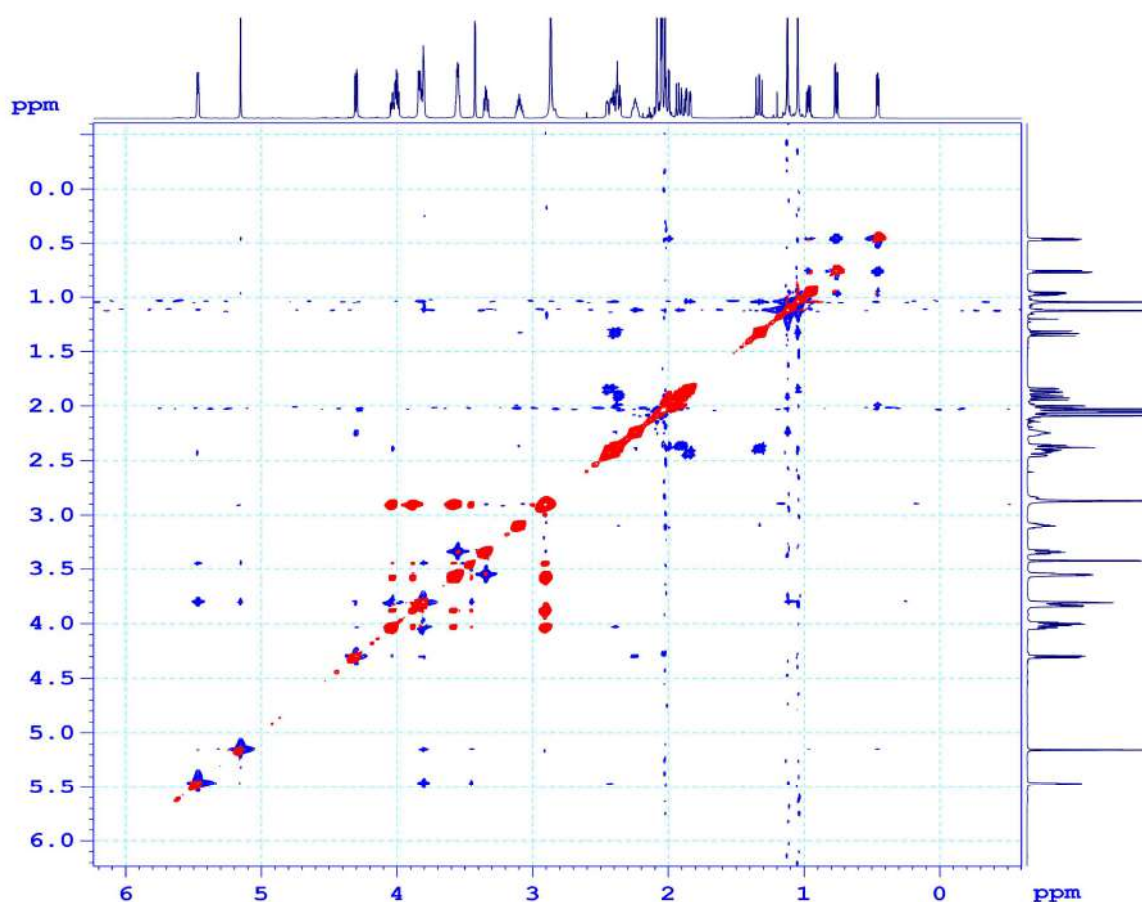
Hình O7.4. Phổ HSQC



Hình O7.5. Phổ HMBC



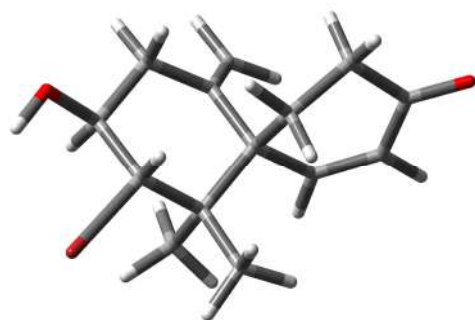
Hình O7.6. Phổ COSY



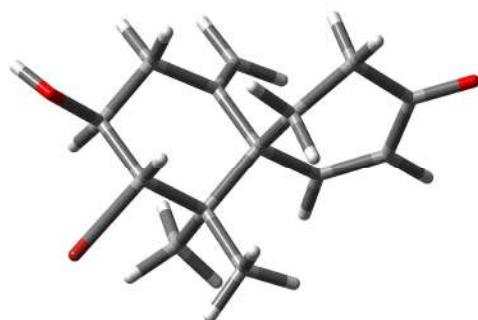
Hình O7.7. Phổ NOESY

3. Kết quả tính toán NMR và ECD của hợp chất ADB11

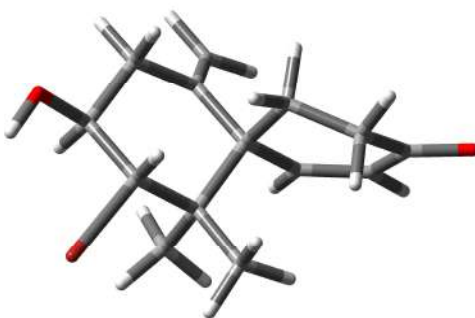
Hình S1. Các đồng phân ổn định nhất của **ADB11-a** được tính toán ở mức B3LYP/6-31G(d)



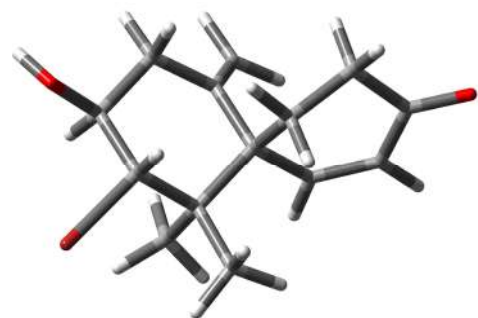
11a-1



11a-2



11a-3



11a-4

Bảng S2. Năng lượng điện tử và mật độ Boltzmann của các đồng phân bền nhất của **ADB11-a** ở mức PCM-CHCl₃/MPW1PW91/6-31+G(d,p)

Bảng S3. Dữ liệu ^{13}C -NMR tính toán cho đồng phân **ADB11-a** ở mức PCM-CHCl₃/MPW1PW91/6-31+G(d,p)

[illegible]

Bảng S4. Dữ liệu ^1H -NMR tính toán cho đồng phân **ADB11-a** ở mức PCM- $\text{CHCl}_3/\text{MPW1PW91}/6\text{-}31+\text{G}(\text{d},\text{p})$

H	Shielding values					δ_{exp}	δ_{calc}^*	$ \Delta\delta $
	1a-1	1a-2	1a-3	1a-4	Average			
1	24.22	24.19	24.09	24.22	24.21	6.87	6.93	0.06
2	25.21	25.23	25.15	25.21	25.21	6.14	6.01	0.13
4	29.25	29.26	29.12	29.27	29.25	2.35	2.25	0.10
5	29.33	29.31	29.29	29.38	29.33	2.21	2.18	0.03
8a	28.71	28.89	28.79	28.67	28.72	2.80	2.75	0.05
8b	28.97	28.89	29.10	29.21	28.98	2.44	2.51	0.07
9	27.63	27.59	27.67	27.80	27.64	3.90	3.75	0.15
10	26.64	26.85	26.51	27.09	26.65	4.38	4.37	0.01
12	30.27	30.27	30.38	30.27	30.27	1.20	1.30	0.10
13	30.46	30.42	30.32	30.43	30.45	1.13	1.13	0.00
14a	25.96	26.05	26.20	25.99	25.96	5.18	5.30	0.12
14b	26.37	26.45	26.45	26.40	26.37	4.81	4.92	0.11
CMAE (ppm)								0.0793
RMSD (ppm)								0.0917

Hình S2. Các đồng phân ổn định nhất của **ADB11-b** được tính toán ở mức B3LYP/6-31G(d)



Bảng S5. Năng lượng điện tử và mật độ Boltzmann của các đồng phân bền nhất của **ADB11-b** ở mức PCM- $\text{CHCl}_3/\text{MPW1PW91}/6\text{-}31+\text{G}(\text{d},\text{p})$

Conformers	E (Hartree)	Boltz. Pop.
1b-1	-3267.136839	0.962055112
1b-2	-3267.133786	0.037944888

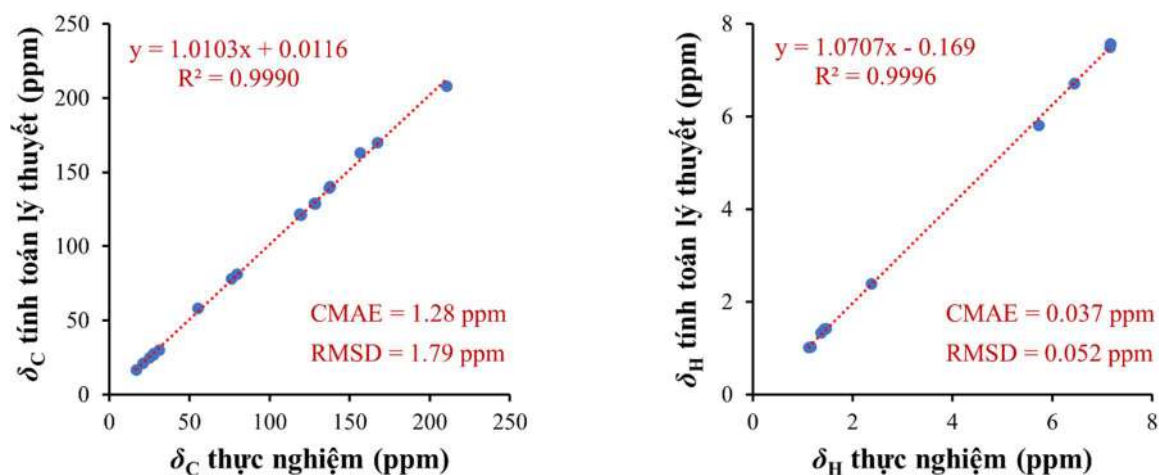
Bảng S6. Dữ liệu ^{13}C -NMR tính toán cho đồng phân **ADB11-b** ở mức PCM- $\text{CHCl}_3/\text{MPW1PW91}/6\text{-}31\text{+G(d,p)}$

C	Shielding values			δ_{exp}	δ_{calc}^*	$ \Delta\delta $
	1b-1	1b-2	Average			
1	43.07	43.88	43.10	152.27	153.62	1.35
2	66.02	67.14	66.07	131.41	130.26	1.15
3	-0.10	0.25	-0.08	198.76	197.56	1.20
4	159.30	157.79	159.24	34.02	35.45	1.43
5	166.28	163.39	166.17	26.31	28.40	2.09
6	140.25	143.43	140.37	51.49	54.66	3.17
7	50.35	43.13	50.08	142.87	146.53	3.66
8	151.67	151.84	151.68	39.24	43.15	3.91
9	120.11	120.14	120.11	71.15	59.97	11.18
10	119.31	117.96	119.26	73.16	76.14	2.98
11	147.81	145.43	147.72	42.51	47.17	4.66
12	179.72	179.00	179.69	19.17	14.65	4.52
13	171.64	170.81	171.61	26.34	22.87	3.47
14	80.52	85.72	80.71	117.04	115.35	1.69
CMAE (ppm)						3.32
RMSD (ppm)						4.15

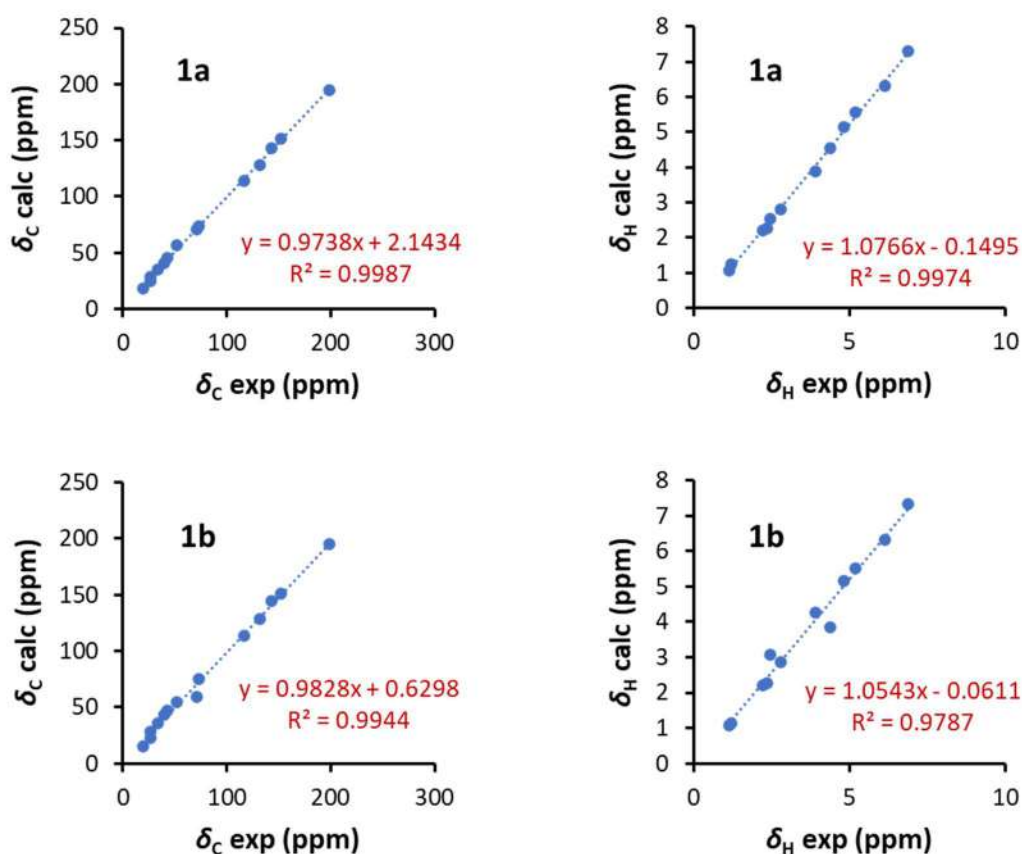
Bảng S7. Dữ liệu ^1H -NMR tính toán cho đồng phân **ADB11-b** ở mức PCM- $\text{CHCl}_3/\text{MPW1PW91}/6\text{-}31\text{+G(d,p)}$

H	Shielding values			δ_{exp}	δ_{calc}^*	$ \Delta\delta $
	1b-1	1b-2	Average			
1	24.20	24.17	24.20	6.87	7.01	0.14
2	25.21	25.15	25.21	6.14	6.05	0.09
4	29.26	29.12	29.26	2.35	2.21	0.14
5	29.32	29.26	29.32	2.21	2.15	0.06
8a	28.65	28.73	28.65	2.80	2.78	0.02
8b	28.46	28.58	28.46	2.44	2.96	0.52
9	26.93	26.95	26.93	3.90	4.11	0.21
10	27.69	27.54	27.68	4.38	3.71	0.67
12	30.39	30.52	30.40	1.20	1.13	0.07
13	30.44	30.30	30.43	1.13	1.09	0.04
14a	26.01	26.25	26.02	5.18	5.28	0.10
14b	26.38	26.45	26.38	4.81	4.94	0.13
CMAE (ppm)						0.1817
RMSD (ppm)						0.2664

Hình S3. Phân tích hồi quy tuyến tính độ dịch chuyển hóa học thực nghiệm so với tính toán của **ADB11**



Hình S4. Phân tích hồi quy tuyến tính độ dịch chuyển hóa học thực nghiệm so với tính toán của **ADB11-a** và **ADB11-b** ở mức PCM-CHCl₃/MPW1PW91/6-31+G(d,p)



Bảng S8. Độ dịch chuyển hóa học tỷ lệ của kết quả **ADB11-a** và **ADB11-b** và DP4+

Settings			Type of data (shifts)		
Default			Scaled shifts		
Functional		Solvent?		Basis Set	
mPW1PW91		PCM		6-31+G(d,p)	
Isomer Nº			1	2	3
DP4+ (%)		H data	99.99%	0.01%	-
		C data	100.00%	0.00%	-
		All data	100.00%	0.00%	-
Type	sp2?	Exp	1	2	3
C	x	152.27	153.88	153.62	
C	x	131.41	129.78	130.26	
C	x	198.76	197.57	197.56	
C		34.02	34.18	35.45	
C		26.31	26.78	28.4	
C		51.49	55.96	54.66	
C	x	142.87	144.48	146.53	
C		39.24	39.58	43.15	
C		71.15	70.93	59.97	
C		73.16	73.19	76.14	
C		42.51	44.61	47.17	
C		19.17	16.19	14.65	
C		26.34	23.54	22.87	
C	x	117.04	115.07	115.35	
H	x	6.87	6.93	7.01	
H	x	6.14	6.01	6.05	
H		2.35	2.25	2.21	
H		2.21	2.18	2.15	
H		2.8	2.75	2.78	
H		2.44	2.51	2.96	
H		3.9	3.75	4.11	
H		4.38	4.37	3.71	
H		1.2	1.3	1.13	
H		1.13	1.13	1.09	
H	x	5.18	5.3	5.28	
H	x	4.81	4.92	4.94	