

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

QUÁCH THỊ THANH VÂN

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH
GÂY ĐỘC TẾ BÀO VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI
Barringtonia acutangula (CHIẾC ĐỎ) VÀ *Barringtonia*
racemosa (CHIẾC CHÙM) THUỘC CHI *Barringtonia* Họ
Lecythidaceae (HỌ LỘC VỪNG)

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ

Mã số : 9.44.01.14

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2023

Công trình được hoàn thành tại: - Học Viện Khoa học và Công nghệ
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: GS. VS. Châu Văn Minh

Cơ quan công tác: Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Xuân Cường

Cơ quan công tác: Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và
công nghệ Việt Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Học
viện, họp tại Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa
học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ , ngày tháng
năm 2023.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa
học và Công nghệ Việt Nam

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng các loài thực vật làm thuốc luôn gắn liền với lịch sử tồn tại và phát triển của xã hội loài người. Các hợp chất thiên nhiên có nhiều ưu điểm như cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng, dễ được hấp thụ và chuyển hóa trong cơ thể cũng như độc tính thấp, dễ dàng phân hủy không gây ảnh hưởng đến môi trường. Do đó, các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu với mục đích phát triển thành các dược phẩm chữa bệnh cho người. Việt Nam là một quốc gia được thiên nhiên ưu đãi và sở hữu hệ thực vật vô cùng phong phú với trên 12.000 loài thực vật bậc cao có mạch, trong đó ước tính có tới 5.000 loài được sử dụng trong y học cổ truyền. Ngoài sự phong phú về thành phần chủng loại, nguồn dược liệu Việt Nam còn có giá trị to lớn ở chỗ chúng được sử dụng rộng rãi trong cộng đồng để chữa nhiều chứng bệnh khác nhau.

Chi *Barringtonia* đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu và thể hiện nhiều hoạt tính quý báu như gây độc tế bào ung thư [1-3], ức chế enzym α -glucosidase [4], kháng vi sinh vật [5-9] và kháng viêm do ức chế PGE2, TNF- α , iNOS, COX-2 và kích hoạt yếu tố nhân NF-kB [58]. Tuy nhiên, ở Việt Nam có rất ít các công bố khoa học được ghi nhận về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi này. Hiện mới có một công trình nghiên cứu sơ bộ về loài Chiếc đở - *Barringtonia acutangula* và phân lập được 03 hợp chất khung flavan-3-ol [10]. Xuất phát từ thực tiễn trên, tác giả lựa chọn đề tài luận án của mình với tiêu đề “**Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm của hai loài *Barringtonia acutangula* (chiếc đở) và *Barringtonia racemosa* (chiếc chùm) thuộc chi *Barringtonia* họ Lecythidaceae (họ Lộc vừng)**” nhằm nghiên cứu phân lập được các chất có hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm từ loài Chiếc đở - *B. acutangula* và Chiếc chùm - *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam.

Mục tiêu của luận án:

- Xác định thành phần hóa học của loài Chiếu đỏ - *B. acutangula* và Chiếu chùm - *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam.

- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu được để tìm kiếm các hoạt chất làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo để tạo ra sản phẩm chăm sóc sức khỏe cho cộng đồng.

Nội dung chính của luận án:

- Phân lập các hợp chất từ loài Chiếu đỏ - *B. acutangula* và Chiếu chùm - *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam bằng phương pháp sắc ký.

- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được bằng phương pháp phổ.

- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng viêm của các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

Bao gồm phần tổng quan về các nghiên cứu trong nước và quốc tế về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Barringtonia* và 2 loài Chiếu đỏ - *B. acutangula* và Chiếu chùm - *B. racemosa*

1.1. Khái quát chung về chi *Barringtonia* ở Việt Nam

1.1.1. Đặc điểm phân loại học

Chi *Barringtonia* Forst là một chi thực vật trong họ Lộc vừng Lecythidaceae, có khoảng 45 loài trên thế giới, thường là loài gỗ hoặc loài bụi, phân bố ở các vùng nhiệt đới. Ở Việt Nam hiện có 14 loài, phân mô tả đã được trình bày trong luận án đặc biệt là 2 loài Chiếu đỏ - *B. acutangula* và Chiếu chùm - *B. racemosa*.

1.1.2. Bộ phận dùng và công dụng trong y học cổ truyền

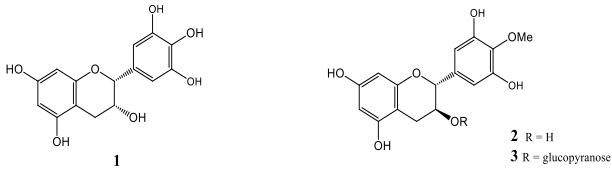
- Vỏ thân chiếu đỏ *B. acutangula* được dùng chữa đau bụng, tiêu chảy, sốt với liều 8-16g, sắc nước uống. Quả còn xanh, ép lấy nước bôi chữa chàm hoặc nghiền nhỏ ngâm với rượu để chữa đau răng (không nuốt nước). Ở Ấn Độ quả và hạt giã nát, đắp lên ngực chữa cảm lạnh, đắp lên bụng chữa đau bụng và đầy hơi [11].

Rễ chiếc chùm *B. racemosa* dùng để chữa bệnh sốt. Quả dùng để chữa bệnh ho và hen suyễn. Nhân hạt giã ra trộn lẫn bột và dầu dùng trị lỵ, ỉa chảy. Hạt thom dùng chữa các cơn đau bụng và bệnh về mắt. Hạt và vỏ cũng được dùng trị giun. Ở Malaysia, lá của *B. racemosa* theo truyền thống được sử dụng trong điều trị tăng huyết áp và làm thuốc giảm đau [14].

1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Barringtonia*

1.2.1. Tình hình nghiên cứu ở trong nước

Ở Việt Nam có 14 loài thuộc chi *Barringtonia* nhưng hiện có rất ít nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Barringtonia* ở nước ta được công bố. Kết quả nghiên cứu bước đầu về thành phần hóa học của vỏ loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* đã phân lập được 03 hợp chất flavan-3-ol là (+)-epigallocatechin (1), (+)-gallocatechin 4'-*O*-methyl ether (2) và (+)-gallocatechin 4'-*O*-methyl ether 5-*O*- β -D-glucopyranoside (3) [10].



Hình 1.1. Cấu trúc Flavan -3 -ol phân lập từ *B. acutangula* ở Việt Nam

Đến năm 2022, nhóm tác giả Nguyễn Phạm Tuấn và cộng sự [17] bằng phương pháp của Yadav và cộng sự (2014) đã định tính được một số dạng hợp chất có trong dịch chiết của lá cây lộc vừng (*B. acutangula*) như Bảng 1.1.

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (phương pháp Dragendorff)	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer 1mL dịch trích + vài giọt TT Dragendorff	Kết tủa màu trắng Kết tủa đỏ cam
Flavonoid Saponin (Foam)	1mL dịch trích + vài giọt FeCl ₃ 3mL dịch trích+ 6mL H ₂ O → đun	Kết tủa nâu đỏ Xuất hiện bọt

Steroid (Salkowski)	nóng	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol(Braymer)	1mL dịch trích + 2mL CHCl ₃ + 2mL H ₂ SO ₄ đậm đặc	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	0,5mL dịch trích + 10mL H ₂ O + 2-3 giọt FeCl ₃ 0,1% 2mL dịch trích + 2mL (CH ₃ CO) ₂ O + 2-3 giọt H ₂ SO ₄ đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

1.2.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

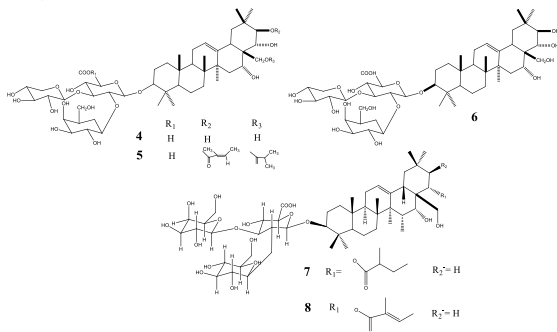
Chi *Barringtonia* đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu trước đây. Những nghiên cứu đầu tiên từ những năm 1898 cho đến nay từ chi *Barringtonia* đã công bố được 113 hợp chất thuộc các lớp chất saponin, terpenoid, alkaloid, lignans, flavonoid, flavanones và steroid. Trong đó, các chất được phân lập và xác định cấu trúc chủ yếu từ loài *B. acutangula* và *B. racemosa*.

a. Các hợp chất saponin

Năm 1994, từ loài *B. acutangula* ba hợp chất saponin glucuronid monouzoidic mới là barringtonoside A-C (**4-6**) được công bố [21].

Năm 2002, hai saponin từ hạt loài Chiếu Châu á - *B. asiatica* được phân lập và xác định cấu trúc [22].

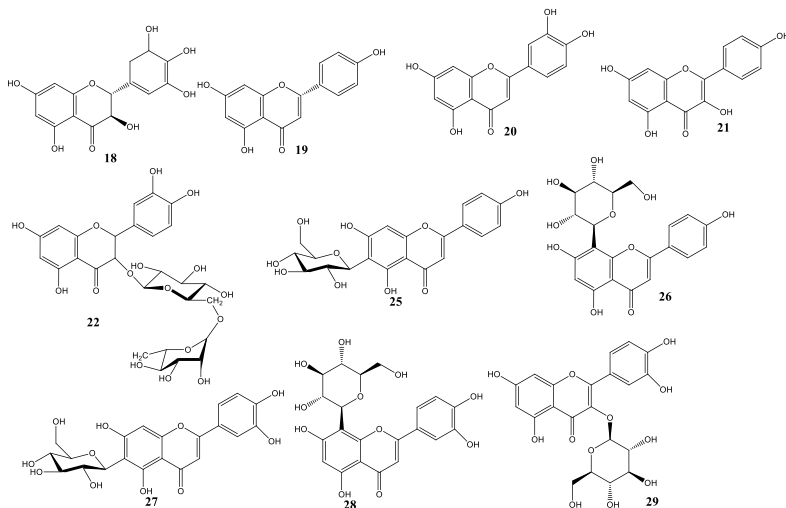
Chín hợp chất saponin mới là acutanguloside A-F (**9-14**) và acutanguloside D-F methyl ester (**15-17**) tiếp tục được công bố từ loài *B. acutangula* vào năm 2005 [23].



Hình 1.2. Cấu trúc các hợp chất saponin phân lập được từ *B. acutangula* và *B. asiatica*

b. Các hợp chất flavonoid

Năm 2006, từ lá *B. racemosa* đã báo cáo phân lập được dihydromyricetin (**18**) [24]. Cũng từ lá của *B. racemosa* đã phân lập và xác định được cấu trúc một flavanone, một flavone và hai flavonols là naringenin (**19**), luteolin (**20**), kaempferol (**21**) và quercetin 3-O-rutinoside (**22**) cùng với axit gallic (**23**) và axit ferulic (**24**) [2, 25, 26].

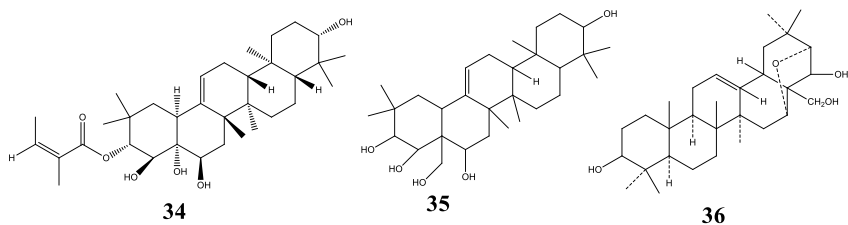


Hình 1.3. Cấu trúc các hợp chất flavonoid phân lập được từ chi *Barringtonia*

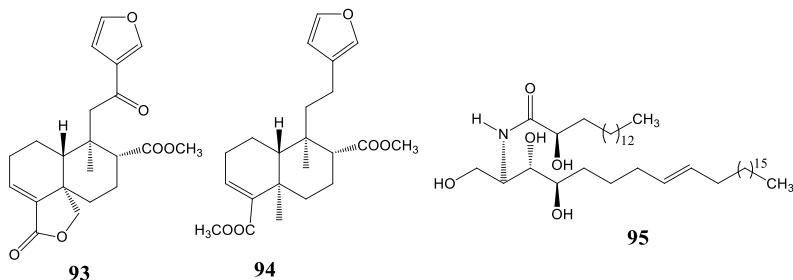
c. Tectenoid và các hợp chất khác

Năm 1942, từ hạt quả *B. acutangula* thu tại Dacca (Bangladesh) ghi nhận sự có mặt của saponin ở dạng bột màu trắng [28]. Năm 1957, từ quả loài *B. racemosa* Yau-Tang Lin và cộng sự đã phân lập được hai hợp chất triterpenoid saponin R2-barringenol (**33**) có thể giống với barringtogenol (2:3:23:28-tetra-hydroxyolean-12-ene) và R1-Barrigenol: C₃₀H₅₀O₇ (**32**) [29]. Năm 1967, từ phổ ¹H-NMR cấu trúc của hợp chất R1-barrigenol (**32**) được xác định là 3β,15α,16α,22α,28β-pentahydroxyolean-12-ene, và hợp chất R2-

barrigenol (**33**) có cấu trúc giống với camelliagenin A, giống với suy luận trước đây là 3β , 16α , 22α , 28β -tetrahydroxyolean-12-ene tức là 15-deoxy-R1-barrigenol [30, 31].



Hình 1.6. Cấu trúc triterpenoids mới phân lập được từ *B. racemosa*



Hình 1.9. Cấu trúc 2 hợp chất diterpenoid và hợp chất ceramid mới phân lập được từ *B. racemosa*

1.3. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học chi *Barringtonia*

1.3.1. Các nghiên cứu theo hướng gây độc tế bào

Theo kinh nghiệm dân gian các hạt loài *B. racemosa* được sử dụng ở Kerala (Ấn Độ) để ngăn ngừa và điều trị ung thư tuy nhiên chưa được báo cáo đầy đủ. Gần đây, đã có một số nghiên cứu báo cáo về hoạt tính chống ung thư của chi này. Nghiên cứu của nhóm tác giả Murakami và cộng sự năm 2000 cho thấy dịch chiết lá loài *B. racemosa* có khả năng ức chế 12-O hexadecanoylphorbol-13-acetate, một chất thúc đẩy khối u gây ra sự hoạt hóa của virus Epstein-Barr [49]. Virus herpes này được biết là sản xuất các protein của virus mà sau đó có thể dẫn đến bệnh ác tính bằng cách ảnh hưởng đến yếu tố phiên mã [49].

Mười triterpene, ba steroid và một dẫn xuất vitamin E đã được phân lập từ *B. maunwongyathiae* được đánh giá tiềm năng chống ung thư dựa trên sự ức chế biểu hiện ornithine decarboxylase do TPA gây ra, các hoạt động COX-1 và COX-2, và biểu hiện NF- κ B luciferase gây ra bởi phorbol, cũng như kích hoạt yếu tố phản ứng chống oxy hóa qua trung gian biểu thức luciferase. Trong số các hợp chất này, taraxerol (**45**), 3-(E)-coumaroyl taraxerol (**56**) và α -tocopherylquinone (**68**) cho thấy tiềm năng ngăn ngừa hóa học đầy hứa hẹn. Hợp chất α -tocopherylquinone (**68**) ức chế hoạt động của ornithine decarboxylase do TPA gây ra với giá trị IC₅₀ là 5,9 μ M và tăng cường biểu hiện ARE với EC₅₀ là 5,2 μ M [41].

1.4.2. Các nghiên cứu theo hướng kháng viêm

Quả loài *B. racemosa* thường được sử dụng trong y học Ấn Độ để điều trị đau và kháng viêm thông qua phép ức chế PGE2, TNF- α , iNOS, COX-2 và kích hoạt yếu tố nhân NF- κ B [36].

Chandra Mohan. S và cộng sự đã nghiên cứu hoạt tính chống viêm và chống viêm khớp của lá cây *B. acutangula*. Dịch chiết ethanol của *B. acutangula* đã được nghiên cứu về hoạt tính chống viêm *in vitro* bằng phương pháp ổn định màng tế bào hồng cầu người (HRBC) và hoạt tính chống khớp *in vitro* bằng phương pháp biến tính protein huyết thanh bò và phương pháp biến tính albumin trứng. Hoạt tính của dịch chiết xuất ethanol của *B. acutangula* được so sánh với thuốc chống viêm tiêu chuẩn Diclofenec. Nhóm tác giả nghiên cứu thấy rằng chiết xuất *B. acutangula* ở nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 μ g/mL cho thấy 29,95, 43,97, 47,63, 48,66 và 49,69% bảo vệ HRBC trong dung dịch nhược trương tương ứng. (IC₅₀: 43,71), trong khi diclofenac chuẩn ở 20, 40, 60, 80 và 100 μ g/mL cho thấy 56,28, 60,14, 67,49, 72,78 và 78,69% (IC₅₀: 0,592). Trong phương pháp biến tính albumin trứng, dịch chiết *B. acutangula* ở nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 μ g/mL cho thấy ức chế 37,57, 44,16, 60,57, 66,24 và 70,98% đối với sự biến tính albumin của trứng (IC₅₀ 23,36); trong khi đó, diclofenac chuẩn 20,40, 60, 80 và 100 μ g/mL cho thấy 47,76, 57,71, 63,89, 75,87 và 84,81% ức chế biến tính albumin trứng (IC₅₀:

25,31). Từ nghiên cứu này cho thấy chiết xuất ethanol của cây *B. acutangula* có tác dụng ức chế sự biến tính albumin của trứng mạnh hơn so với thuốc kháng viêm diclofenac. Có thể kết luận rằng *B. acutangula* có các hoạt động chống viêm và khớp *in vitro* tốt [62].

1.4.3. Các nghiên cứu theo hướng khác

Ngoài ra còn có các hướng nghiên cứu hoạt tính ức chế vi khuẩn, bệnh tim mạch, chống oxi hóa, bệnh tiểu đường typ 2.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là hai loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* và Chiếc chùm - *B. Racemosa* ở Việt Nam.

2.1.1. Loài Chiếc đỏ - *B. acutangula*



Hình 2.1. Ảnh loài *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn.

Số hiệu: PL 01

Nơi thu: xã Lộc Trì, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế

Ngày thu: 17/08/2016

Người thu: Nguyễn Thế Cường & c.s.

Người định loại và mô tả: Nguyễn Thế Cường

2.1.2. Loài Chiếc chùm - *B. racemosa*



Hình 2.2. Ảnh loài *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng

Số hiệu BH 01**Nơi thu:** Biên Hòa, Đồng Nai**Ngày thu:** 25/08/2016**Người thu:** Nguyễn Thế Cường & c.s.**Người định loại và mô tả:** Nguyễn Thế Cường.**2.2. Phương pháp nghiên cứu****2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất**

Sử dụng các phương pháp chiết phân đoạn, sắc kí bản mỏng, sắc kí cột, sắc kí lỏng trung áp (MPLC), sắc kí lỏng cao áp (HPLC)

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc

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

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 1D TOCSY.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, NOESY, HSQC, HMQC, HMBC, 2D TOCSY.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học**2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm**

Các hợp chất được đánh giá khả năng kháng viêm dựa trên sự ức chế sản sinh nitric oxid (NO) trên dòng tế bào RAW264.7 theo phương pháp của Dirsch

2.2.3.2. phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào**2.2.3.2.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro**

- Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO).

- Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 .

2.2.3.2.2. Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay)

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 kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Monks [42]

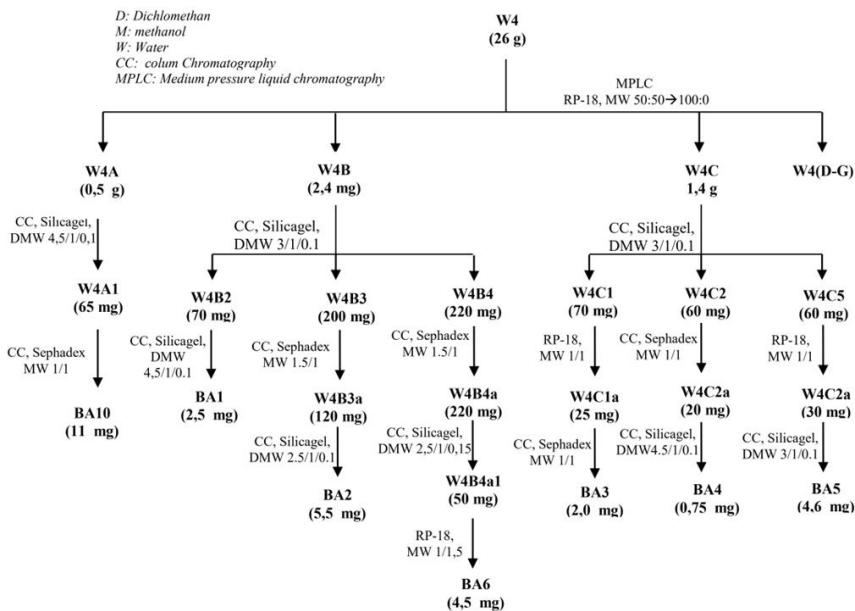
Các dòng tế bào MCF-7: Ung thư vú ở người (human breast carcinoma) và LNCaP: Ung thư tuyến tiền liệt ở người (human prostate carcinoma) do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM

3.1. Phân lập các hợp chất

3.1.1. Phân lập các hợp chất từ loài *B. acutangula*

Lá loài *B. acutangula* được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50°C, sau đó nghiền nhỏ tạo thành bột. Bột khô (3,0 kg) lá loài *B. acutangula* được đem chiết siêu âm 3 lần với 5 lít methanol mỗi lần chiết trong 3 giờ, rút và lọc cặn chiết sau đó cô quay đuổi dung môi thu được 240 g cặn chiết methanol. Hòa 400 g cặn chiết MeOH được phân bố vào nước và chiết lỏng-lỏng với các dung môi *n*-hexane, dichloromethane thu được ba phân đoạn: cặn *n*-hexane (20,0 g), 16,5 g cặn CH₂Cl₂ dịch nước và cặn không tan.

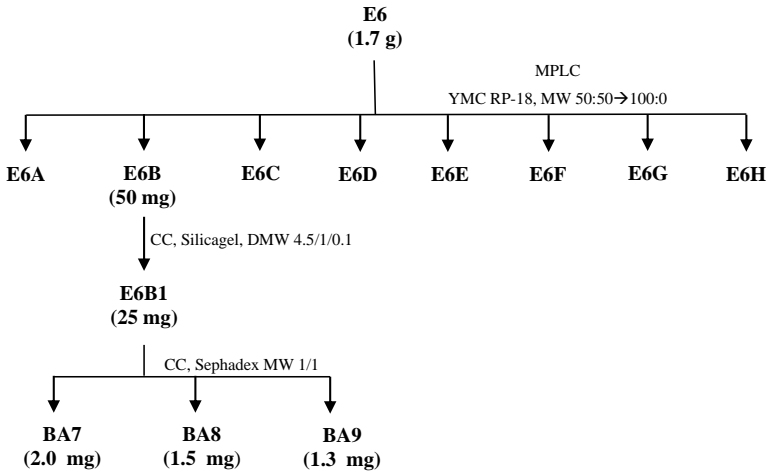


Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn nước W4 mẫu loài *B. acutangula*

Phân đoạn nước được phân tách trên cột diaion chạy gradient với hệ dung môi methanol/nước thu được 4 phân đoạn từ W1→W4. Phân đoạn W4 được phân tách trên cột sắc ký pha đảo YMC MPLC với hệ dung môi methanol:nước (1:1) thu được 7 phân đoạn W4A→W4G. Tiếp tục chạy sắc ký sâu hơn ta thu được 7 hợp chất là **BA1, BA2, BA3, BA4, BA5, BA6, BA10** theo sơ đồ hình 3.2.

Cặn etyl (16.5 g) được sắc ký lỏng trung áp pha thường chạy rửa giải gradient hệ dung môi diclometan:metanol từ 100% diclometan→100% metanol thu được 8 phân đoạn từ E1→E8. Phân đoạn E6 (1.7 g) được phân tách trên máy sắc ký lỏng trung áp MPLC sử dụng cột pha đảo YMC hệ dung môi methanol:nước (1:1) thu được 8 phân đoạn E6A→E6H. Phân đoạn E6B (50 mg) được tiếp tục chạy cột sắc ký pha thường hệ dung môi diclometan:metanol:nước (4.5:1:0.1), sau đó được đưa lên cột

sephadex hệ dung môi methanol:nước (1:1) thu được các hợp chất **BA7** (2.0 mg), **BA8** (1.5 mg) và **BA9** (1.3 mg)



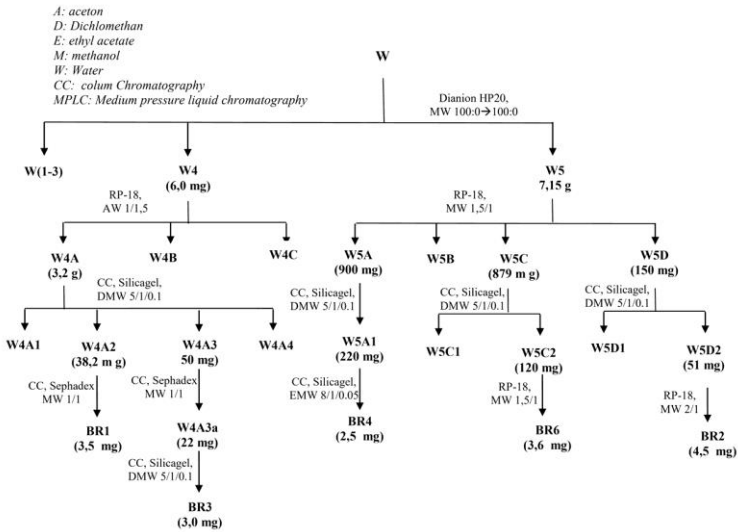
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn etyl mẫu loài *B. acutangula*

3.1.2. Phân lập các hợp chất từ loài *B. racemosa*

Lá loài *B. racemosa* được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50°C, sau đó nghiền nhỏ tạo thành 5,5 kg bột. Bột khô của lá loài *B. racemosa* được đem chiết 3 lần siêu âm với 5 lít methanol 3 giờ, cặn chiết sau đó được cô quay đuôi dung môi nhận được cặn chiết methanol (190 g). Hòa 190 g cặn chiết MeOH được phân bố vào nước và chiết lỏng-lỏng với các dung môi *n*-hexane, ethyl acetate thu được ba phân đoạn: cặn *n*-hexane (13,5 g), 15,0 g cặn ethyl acetate, dịch nước và một phần cặn không tan.

Phần nước được lọc hết cặn không tan trước khi đưa lên cột diaion HP-20 và rửa giải trước tiên bằng nước để loại bỏ phần đường và muối vô cơ. Tiếp theo rửa giải bằng hệ dung môi gradient với hệ dung môi lần lượt là 100% nước → methanol:nước (25:75) → methanol:nước (50:50) → methanol:nước (25:75) → methanol 100% thu được 5 phân đoạn ký hiệu từ W1 → W5. Tiếp tục chạy sắc kí sâu

hơn ta thu được 5 hợp chất **BR1, BR2, BR3, BR4, BR6** theo sơ đồ hình 3.5.



Hình 3.5. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ dịch nước mẫu loài *B.racemosa*

Cặn etyl axetat (E, 15 g) được phân tách thành 6 phân đoạn, E1-E6, sử dụng MPLC với cột nhồi silica gel pha thường và pha động gradient nồng độ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ từ 50/1 đến 1/1 (v/v). Phân đoạn E3 (3.48 g) tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, 2/1, 3/1 và 10/1) thu được 5 phân đoạn nhỏ, E3A-E3E. Phân đoạn E3C (0.9 g) tiếp tục được phân tách thành 3 phân đoạn nhỏ hơn, E3C1-E3C3, sử dụng cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường và hệ dung môi rửa giải EtOAc/MeOH (17/1, v/v). Phân đoạn E3C3 (22 mg) được tinh chế bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo và hệ dung môi rửa giải $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1.5/1), sau đó tinh chế tiếp trên cột Shephadex LH-20 CC sử dụng pha động $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1.5/1) thu được hợp chất **BR5** (5 mg). Phân đoạn E2 (2.1 g) được phân tách thành 3 phân đoạn nhỏ, E2A-E2C, sử dụng sắc ký cột nhồi silica gel pha đảo và pha động là $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3/1). Phân đoạn E2A (1.6 g) tiếp

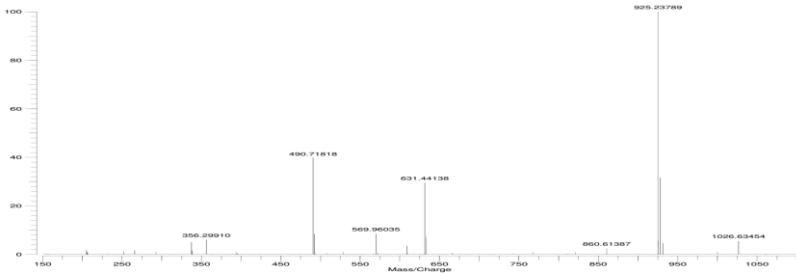
tục được phân tách thành hai phân đoạn nhỏ hơn E2A1 và E2A2 sử dụng cột nhồi silica gel pha thường và hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1). Các hợp chất **BR7** (6.0 mg) và **BR8** (4.8 mg) được tinh chế từ phân đoạn E2A1 (0.8 g) trên cột sắc ký với chất hấp phụ pha đảo và pha động là acetone/ H_2O (2/1), sau đó tinh chế tiếp trên cột sắc ký nhồi silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1).

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

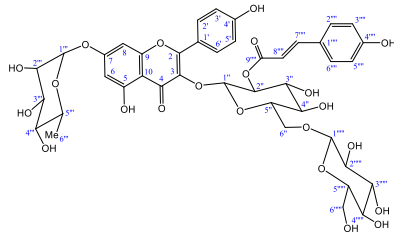
4.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ loài *B. acutangula*

4.1.1. Hợp chất BA1: barringoside A (chất mới)

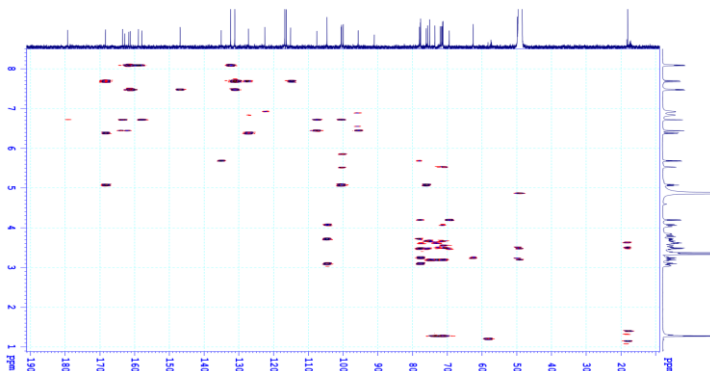
Hợp chất **BA1** có dạng chất rắn màu vàng nhạt với CTPT $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{O}_{22}$, được chứng minh bằng phổ HR-ESI-MS với pic ion giả phân tử xuất hiện tại m/z 925,23789 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



Hình 4.1.1.a. Phổ HR-ESI-MS của BA1



Hình 4.1.1.b. Cấu trúc hóa học của BA1



Hình 4.1.1.f. Phổ HMBC của BA1

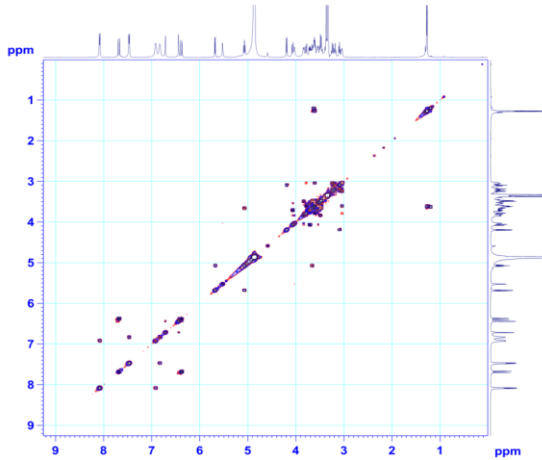
Bảng 4.1.1. Giá trị phổ NMR của BA1 và các chất so sánh

C	^a δ _C	^b δ _C	δ _C ^{c,d}	δ _H ^{c,e} dạng tín hiệu (<i>J</i> = Hz)	HMBC (H → C)
Aglycon					
2		159,3	158,9	-	
3		135,6	135,1	-	
4		179,6	179,3	-	
5		163,3	162,8	-	
6		100,7	100,5	6,44 s	5, 7, 8, 10
7		163,6	163,5	-	
8		95,9	95,7	6,71 s	4, 6, 7, 9, 10
9		158,0	157,9	-	
10		107,5	107,6	-	
1'		122,5	122,5	-	
2'		132,5	132,4	8,08 d (8,0)	2, 4', 6'
3'		116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
4'		161,8	161,7	-	
5'		116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
6'		132,5	132,4	8,08 d (8,0)	
Glcl					
1''	101,0	103,5	100,5	5,68 d (8,0)	3
2''	75,8	75,8	75,6	5,07 dd (8,0, 9,0)	9''''

C	^a δ _C	^b δ _C	δ _C ^{c,d}	δ _H ^{c,e} dạng tín hiệu (<i>J</i> = Hz)	HMBC (H → C)
3''	76,3	77,9	76,0	3,66 t (9,0)	
4''	71,0	71,4	71,5	3,47 t (9,0)	
5''	77,6	77,9	78,1	3,55 m	
6''	68,6	69,5	69,5	3,71 dd (6,0, 12,0) 4,07 br d (12,0)	
<i>Rha</i>					
1'''		100,0	99,9	5,52 s	7
2'''		71,6	71,7	4,03 br s	
3'''		72,0	72,0	3,80 br d (9,0)	
4'''		73,5	73,6	3,49 t (9,0)	
5'''		71,3	71,2	3,62 ^f	
6'''		18,2	18,0	1,27 d (6,0)	4''', 5'''
<i>p-coumaric acid</i>					
1''''	127,2		127,2	-	
2''''	131,2		131,2	7,47 d (8,0)	4''''', 7''''
3''''	116,8		116,8	6,83 d (8,0)	
4''''	161,1		161,2	-	
5''''	116,8		116,8	6,83 d (8,0)	
6''''	131,2		131,2	7,47 d (8,0)	
7''''	146,9		146,9	7,68 d (16,0)	
8''''	115,2		115,1	6,39 d (16,0)	1''''', 7''''', 9''''
9''''	168,5		168,4	-	
<i>Glc2</i>					
1'''''		104,6	104,6	4,19 d (7,5)	6''
2'''''		75,1	75,0	3,09 dd (7,5, 9,0)	
3'''''		77,8	77,8	3,18 t (9,0)	
4'''''		71,3	71,3	3,24 t (9,0)	
5'''''		77,7	77,7	3,04 m	
6'''''		62,5	62,6	3,61 ^f /3,79 br d (11,5)	

^aδ_C của quercetin 3-*O*-[2''-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][β-D-glucopyranosyl(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-glucoside [76], ^bδ_C của kaempferol 3-*O*-

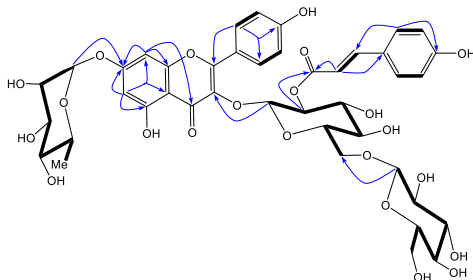
β -[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)D-glucopyranoside]-7-O- α -L-rhamnopyranoside [77], $^{\circ}$ đo trong CD₃OD, $^{\text{d}}$ 125 MHz, $^{\text{e}}$ 500 MHz, $^{\text{f}}$ tín hiệu bị che lấp.



Hình 4.1.1.g. Phổ COSY của **BA1**

Dữ liệu phổ NMR của **BA1** biểu hiện một flavonoid triglycoside với sự xuất hiện 03 proton anome tại δ_{H} 5,68 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1''), 5,52 (1H, br s, H-1''') và 4,19 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'''''), có tương tác HSQC với các carbon anome tương ứng tại δ_{C} 100,5 (C-1''), 100,0 (C-1''') và 104,7 (C-1''''') chứng minh cho 03 đơn vị đường. Phân tích cụ thể các tương tác trên phổ HSQC cho phép gán chính xác các tín hiệu carbon với các proton liên kết trực tiếp với chúng. Từ kết quả phổ HSQC, kết hợp phân tích phổ COSY với các tương tác H-1'' (δ_{H} 6,58)/H-2'' (δ_{H} 5,07)/H-3'' (δ_{H} 3,66)/H-4'' (δ_{H} 3,47)/H-5'' (δ_{H} 3,55)/H-6'' (δ_{H} 3,71 và 4,07), H-1''' (δ_{H} 5,52)/H-2''' (δ_{H} 4,03)/H-3''' (δ_{H} 3,80)/H-4''' (δ_{H} 3,49)/H-5''' (δ_{H} 3,62)/H-6''' (δ_{H} 1,27) và H-1'''' (δ_{H} 4,19)/H-2'''' (δ_{H} 3,09)/H-3'''' (δ_{H} 3,18)/H-4'''' (δ_{H} 3,24)/H-5'''' (δ_{H} 3,04)/H-6'''' (δ_{H} 3,61 và 3,79), cho phép xác định được số liệu $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ tại tất cả các vị trí của 03 đơn vị đường như ở Bảng 4.1.1. Ngoài ra, sự xuất hiện của 2 proton thơm có tương tác *meta* [δ_{H} 6,44 (H-6) và 6,71 (H-8), mỗi tín hiệu

[1H, br s] và bốn proton thuộc vòng thơm có tương tác *ortho* [δ_{H} 8,08 (H-2' và H-6') và 6,92 (H-3' và H-5'), mỗi tín hiệu 2H, d, $J = 8,0$ Hz] đặc trưng cho cấu trúc khung kaempferol. Các giá trị phổ ^1H và ^{13}C NMR của **BA1** tương tự các giá trị của kaempferol 3-*O*- β -[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)D-glucopyranoside]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside [77], ngoài việc có thêm các tín hiệu thuộc một nhóm *trans-p*-coumaroyl tại δ_{C} 127,3 (C-1'''), 131,2 (C-2''' và C-6'''), 116,8 (C-3''' và C-5'''), 161,3 (C-4'''), 146,9 (C-7'''), 115,2 (C-8''') và 168,4 (C-9''')/ δ_{H} 7,47 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2''' và H-6'''), 6,83 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3''' và H-5'''), 7,68 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7''') và 6,39 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8''').

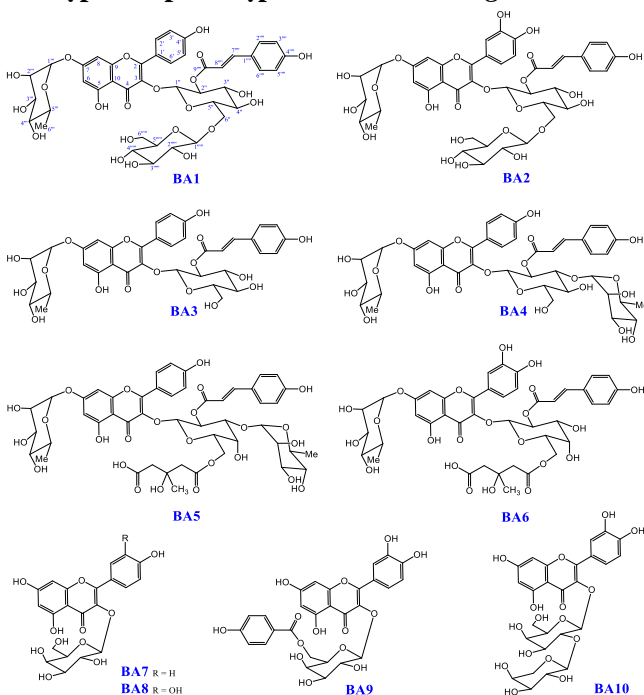


Hình 4.1.1.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA1**

Phân tích cụ thể các tín hiệu trên các phổ COSY và HMBC (hình 4.1.1.h) khẳng định chính xác cấu trúc hóa học của **BA1**. Các vị trí gắn của đường glucose đầu tiên tại C-3, đường rhamnose tại C-7 và đường glucose thứ hai tại C-6'' được xác định bằng các tương tác xa HMBC của các proton anome H-1'' (δ_{H} 5,68) với C-3 (δ_{C} 135,1), H-1''' (δ_{H} 5,52) với C-7 (δ_{C} 163,5) và H-1'''' (δ_{H} 4,19) với C-6'' (δ_{C} 69,5). Ngoài ra, giá trị phổ ^{13}C NMR tại các vị trí của đơn vị đường glucose thứ nhất của **BA1** (bảng III.1) tương tự các giá trị của quercetin 3-*O*-[2''-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside [76] kết hợp với sự dịch chuyển rất mạnh về hướng vùng trường thấp của proton H-2'' tại δ_{H} 5,07 cho phép xác định vị trí ester hóa của nhóm *trans-p*-

coumaroyl tại C-2''. Nhận định này được xác nhận thêm bằng tương tác xa HMBC (hình II.1.h) của H-2'' (δ_{H} 5,07) với C-9'''' (δ_{C} 168,4). Như vậy, cấu trúc hóa học của **BA1** được chứng minh là kaempferol 3-O-[2''-O-(E)-p-coumaroyl][β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -D-glucopyranoside]-7-O- α -L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside A.

4.1.2. Các hợp chất phân lập từ loài *B. acutangula*



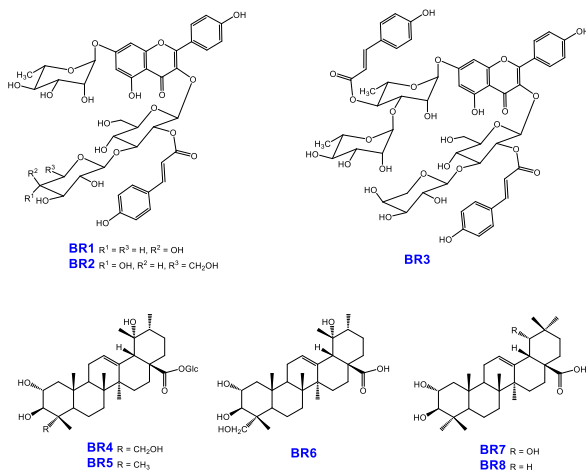
Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. acutangula*

Sử dụng kết hợp các phương pháp phổ, tác giả đã chứng minh được cấu trúc hóa học của 10 hợp chất từ loài chiết đồ - *B. acutangula* bao gồm: 6 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa có cấu trúc hóa học mới và được gọi tên là barringoside A-F (**BA1-BA6**). Các hợp chất đã biết là kaempferol 3-O- β -D-galactopyranoside (**BA7**), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside

(**BA8**), quercetin 3-*O*- β -D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) và quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galacto-pyranoside (**BA10**).

4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài *B. racemosa*

Sử dụng kết hợp các phương pháp phổ, tác giả đã chứng minh được cấu trúc hóa học của 8 hợp chất từ loài chiết chùm - *B. racemosa* trong đó có 3 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa có cấu trúc hóa học mới và phức tạp được đặt tên là barringside G-I (**BR1-BR3**) và 5 dẫn xuất triterpen là niga-ichigoside F1 (**BR4**), rosamultin (**BR5**), 23-hydroxytormentic acid (**BR6**), arjunic acid (**BR7**) và maslinic acid (**BR8**).



Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. racemosa*

4.3. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập

4.3.1. Hoạt tính kháng viêm

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm cho thấy, trong số 18 chất sạch được nghiên cứu, chỉ có 2 hợp chất là **BA9** và **BR3** thể hiện hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào

RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} tương ứng là $20,00 \pm 1,68$ và $52,48 \pm 1,04 \mu M$.

Bảng 4.3.1. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO của 18 hợp chất

STT	Ký hiệu	Giá trị IC_{50} (μM)	STT	Ký hiệu	Giá trị IC_{50} (μM)
1	BA1	>100	11	BR1	>100
2	BA2	>100	12	BR2	>100
3	BA3	>100	13	BR3	52.48 ± 1.04
4	BA4	>100	14	BR4	>100
5	BA5	>100	15	BR5	>100
6	BA6	>100	16	BR6	>100
7	BA7	>100	17	BR7	>100
8	BA8	>100	18	BR8	>100
9	BA9	20.00 ± 1.68	19	Cardamonin*	$2,2 \pm 0,27$
10	BA10	>100			

**chất đối chứng dương*

Như vậy, có hợp chất **BA9** và **BR3** có thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO kháng viêm. Hợp chất **BA9** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} là **$20.00 \pm 1.68 (\mu M)$** , có thể được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo theo hướng đánh giá cơ chế tác động. Đây cũng là thử nghiệm đầu tiên ức chế sản sinh NO của hợp chất **BA9** này.

4.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào

18 hợp chất đã phân lập được tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 02 dòng tế bào ung thư người là LNCaP (tuyến tiền liệt) và MCF-7 (vú). Kết quả thu được cho thấy: Các chất **BA8**, **BR6** và **BR7** thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 29.98 - 84.99 μM trên hai dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Các mẫu còn lại chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu cao nhất là 100 μM .

Bảng 4.3.2. Kết quả tác dụng gây độc tế bào ung thư của các chất

Dòng tế bào	Giá trị IC ₅₀ (µM) của hợp chất			
	BA8	BR6	BR7	Ellipticine*
LNCaP	41,76±4,86	29,98±2,40	58,58±5,08	1,91±0,08
MCF-7	54,11±5,67	37,11±2,07	84,99±7,37	1,99±0,12

*chất đối chứng dương

KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu về thành phần hóa học

Sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 10 hợp chất từ loài chiết đỏ - *Barringtonia acutangula* và 08 hợp chất từ loài chiết chùm - *Barringtonia racemosa*

+ Từ loài chiết đỏ -*Barringtonia acutangula*: 10 hợp chất flavonoid glycoside trong đó có 6 hợp chất mới đặt tên là barringoside A-F (**BA1-BA6**) và 4 hợp chất đã biết là kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside (**BA7**), quercetin-3-*O*-β-D-galactopyranoside (**BA8**), quercetin 3-*O*-β-D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) và quercetin 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-galacto-pyranoside (**BA10**).

+ Từ loài chiết chùm - *Barringtonia racemosa*: 3 hợp chất flavonoid glycoside mới đặt tên là barringoside G-I (**BR1-BR3**) và 05 hợp chất đã biết là niga-ichigoside F1 (**BR4**), rosamultin (**BR5**), 23-hydroxytormentonic acid (**BR6**), arjunic acid (**BR7**) và maslinic acid (**BR8**).

Các hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa được phát hiện lần đầu tiên từ các loài thuộc chi *Barringtonia*.

2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm của tất cả các hợp chất phân lập được thông qua ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả cho thấy 2 hợp chất là quercetin 3-*O*-β-D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) và barringoside I (**BR3**) thể hiện hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào

RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} tương ứng là $20,00 \pm 1,68$ và $52,48 \pm 1,04 \mu M$.

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 02 dòng tế bào ung thư người là LNCaP (tuyến tiền liệt) và MCF-7 (vú) của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả thu được cho thấy chỉ có các hợp chất quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside (**BA8**), 23-hydroxytormentonic acid (**BR6**) và arjunic acid (**BR7**) thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 29.98 - 84.99 μM trên hai dòng tế bào ung thư được thử nghiệm.

KIẾN NGHỊ

Hợp chất quercetin 3-*O*- β -D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galactopyranoside (**BA9**) thể hiện hoạt tính kháng viêm khá tốt thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} là $20,00 \pm 1,68 \mu M$ nên cần tiến hành các nghiên cứu tiếp theo để xác định cơ chế tác dụng. Các hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa đã phân lập được có cấu trúc hóa học độc đáo, do đó cần mở rộng nghiên cứu thêm các loại hoạt tính khác để định hướng cho các nghiên cứu ứng dụng.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 06 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa mới từ loài chiếc đỏ - *Barringtonia acutangula* là barringoside A-F (**BA1-BA6**) và 03 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa mới là barringoside G-I (**BR1-BR3**) từ loài chiếc chùm - *B. racemosa*.

2. Lần đầu tiên phân lập được và công bố các chất thuộc nhóm flavonoid glycoside bị acyl hóa từ các loài thuộc chi *Barringtonia*.

3. Lần đầu tiên phát hiện ra hợp chất quercetin 3-*O*- β -D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galactopyranoside (**BA9**) thể hiện hoạt tính kháng viêm khá tốt thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} là $20,00 \pm 1,68 \mu M$.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Le Thi Vien, **Quach Thi Thanh Van**, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi thanh Huong, Nguyen Thi Kim Thuy, Nguyen The Cuong, Nguyen Hai Dang, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Phan Van Kiem, Chau Van Minh. *Flavonoid glycosides from Barringtonia acutangula*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2017**, 27, 3776–3781.
2. **Quach Thi Thanh Van**, Le Thi Vien, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi Thanh Huong, Nguyen The Cuong, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Huy Thuan, Nguyen Hai Dang, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Phan Van Kiem and Chau Van Minh. *Acyated flavonoid glycosides from Barringtonia racemosa*, Natural Product Research, **2020**, 34(9), 1276–1281.
3. **Quach Thi Thanh Van**, Le Thi Vien, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi Thanh Huong, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh. *Structural elucidation of four flavonoid glycosides from Barringtonia acutangula*, Vietnam Journal of Chemistry, **2018**, 56(2), 187-190.
4. **Quach Thi Thanh Van**, Le Thi Vien, Tran Thi Hong Hanh, Phan Thi Thanh Huong, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh. *Triterpenoid derivatives from Barringtonia racemosa*, Vietnam Journal of Chemistry, **2019**, 57(1), 96-100.