

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

————— √√√ —————

LÊ THỊ HỒNG NHUNG

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC VÀ THĂM DÒ HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA LOÀI THÔNG LÁ ĐỆT (*PINUS KREMPFII* LECOMTE) VÀ
NGŨ GIA BÌ HƯƠNG (*ACANTHOPANAX TRIFOLIATUS* L. MERR.)**

**Chuyên ngành : Hóa học hữu cơ
Mã số: 62.44.27.01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

HÀ NỘI - 2014

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Trịnh Thị Thủy
2. TS. Nguyễn Thanh Tâm

Phản biện 1: PGS.TS. Phan Văn Kiệt

Phản biện 2: PGS. TS. Trần Thị Như Mai

Phản biện 3: GS. TS. Đinh Thị Ngọ

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện, họp tại:

Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày 8 tháng 11 năm 2014

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia Việt nam

Thư viện Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam

I. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

I.1. Đặt vấn đề

Việt Nam có nguồn thực vật rất phong phú và đa dạng. Theo các số liệu thống kê của Tổ chức Bảo tồn Thiên nhiên Thế giới (IUCN), hệ thực vật Việt Nam có trên 12.000 loài và khoảng 4.000 loài được sử dụng trong dân gian làm thuốc chữa bệnh. Tuy nhiên hầu hết các loài cây thuốc này được dùng theo kinh nghiệm dân gian. Vì vậy, việc nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các đối tượng này để tạo cơ sở khoa học nhằm bảo tồn các giá trị truyền thống trong y học dân tộc và phát huy các tiềm năng của chúng theo hướng hiện đại là việc làm cần thiết.

Loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) thuộc chi *Pinus*, họ Pinaceae. Loài này mới chỉ có một công bố trên thế giới từ 1966 và là loài đặc hữu của Việt Nam, một thực vật cổ “hóa thạch sống” hiếm hoi còn sót lại cho đến ngày nay. Việc nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài Thông lá dẹt ngoài ý nghĩa về khoa học còn có ý nghĩa rất lớn về mặt xã hội.

Loài Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) thuộc chi *Acanthopanax*, họ Araliaceae. Ngay từ những năm 80 của thế kỷ trước, đã có nhiều công trình công bố về thành phần hóa học của cây này. Nhiều hợp chất triterpene acid có khung lupan với hàm lượng khá cao đã được phân lập và xác định. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công trình khoa học nào về nghiên cứu tổng hợp các dẫn xuất triterpene từ cây này được công bố.

Do đó, luận án được thực hiện với tên đề tài: “Nghiên cứu hoá học và thăm dò hoạt tính sinh học của loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) và Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* L.Merr.)”.

I.2. Mục tiêu của luận án

- Nghiên cứu thành phần hóa học của loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte).

- Nghiên cứu chiết tách các chất, đặc biệt là các triterpene khung lupane có hàm lượng cao từ Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* L.Merr.) để làm nguyên liệu cho quá trình chuyển hóa.
- Tổng hợp các dẫn xuất từ các triterpene phân lập được.
- Khảo sát hoạt tính sinh học như khả năng kháng chủng *Bacillus subtilis*, khả năng gây độc với một số dòng tế bào ung thư, khả năng chống oxi hóa của các dịch chiết và các chất phân lập được làm cơ sở khoa học định hướng cho việc nghiên cứu ứng dụng các hợp chất này trong công nghệ hóa dược.

I.3. Những đóng góp mới của luận án

- Đây là lần đầu tiên loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) được nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học ở Việt Nam.

- Từ rễ Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) đã phân lập và xác định được cấu trúc của 7 hợp chất, trong đó 2 chất Galangin (**PK4**), Isolariciresinol (**PK7**) lần đầu phân lập từ loài này.

- Từ thân và lá của loài Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) đã phân lập và xác định cấu trúc của một **hợp chất mới** là 11 α ,23-dihydroxy-3-oxo-lup-20(29)-ene-28-oic acid (**AT3**).

- Bằng các phản ứng chuyển hóa ở các vị trí khác nhau đã tổng hợp được **23 dẫn xuất mới** từ 2 hợp chất có hàm lượng lớn **AT1** và **AT2** phân lập được từ loài Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.).

- Đây là kết quả mới về hoạt tính gây độc tế bào, kháng chủng *Bacillus subtilis* và chống oxi hóa của một số dịch chiết, hợp chất phân lập và tổng hợp được từ hai loài nghiên cứu. Đặc biệt, dẫn xuất N-[24-nor-3 α ,11 α -diacetoxy-lup-20(29)-ene-28-oyl]-1,9-diaminononane (**AT22**) có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên các dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (Lu), ung thư vú (MCF7) với $IC_{50} = 3,65 \div 4,42 \mu\text{g/ml}$.

I.4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 144 trang với 4 chương, 20 sơ đồ, 21 bảng, 48 hình, 100 tài liệu tham khảo và phụ lục.

Luận án được bố cục như sau: Mở đầu (2 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (29 trang); Chương 2: Nguyên liệu, hóa chất và phương pháp nghiên cứu (7 trang); Chương 3: Thực nghiệm (25 trang); Chương 4: Kết quả và thảo luận (58 trang); Bảng tổng hợp các hợp chất phân lập và chuyển hóa hóa học từ 2 loài nghiên cứu (6 trang); Kết luận và kiến nghị (2 trang); Danh mục các công trình khoa học đã công bố trong khuôn khổ luận án (2 trang); Những đóng góp mới của luận án bằng tiếng Anh (1 trang); Tài liệu tham khảo (12 trang). Ngoài ra còn có 59 trang phần Phụ lục với các hình phổ và kết quả hoạt tính sinh học.

II. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

MỞ ĐẦU: Đề cập tính cần thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án.

Chương 1. TỔNG QUAN

Phần Tổng quan tài liệu tập hợp và phân tích các nghiên cứu trong nước và quốc tế về các vấn đề liên quan đến nội dung luận án:

- Đặc điểm thực vật và tình hình nghiên cứu về loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) và Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* L.Merr.)

- Các hợp chất flavonoid.
- Các hợp chất triterpene khung lupane.
- Chuyển hóa hóa học hợp chất triterpene khung lupane và hoạt tính sinh học của chúng.

Chương 2: NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

Mẫu rễ Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) được thu hái tại tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam vào tháng 8 năm 2012. Tên khoa học do TS. Nguyễn

Tiến Hiệp xác định và Tiêu bản số CPC-4711 được lưu giữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu cây Ngũ gia bì hương (*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) được thu hái ở Mai Châu, Tỉnh Hòa Bình, Việt Nam vào tháng 10 năm 2009. Tên khoa học do CN. Ngô Văn Trại, Viện Dược liệu, Bộ Y tế xác định. Tiêu bản được lưu giữ tại Phòng Tổng hợp hữu cơ, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hóa chất và thiết bị được liệt kê đầy đủ trong luận án.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết tách: Các phương pháp nghiên cứu chủ yếu gồm: chiết ở nhiệt độ phòng, chiết phân lớp, sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột...

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất: Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng cách kết hợp giữa các phương pháp phổ hiện đại như phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối (ESI-, HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY ...).

Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học:

* Hoạt tính gây độc tế bào: các dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATCC, gồm có: ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (Lu), ung thư vú (MCF7).

* Hoạt tính kháng khuẩn *Bacillus subtilis* (Bs) ATCC 6633.

* Hoạt tính chống oxy hóa: Thực hiện theo phương pháp DPPH.

Chương 3: THỰC NGHIỆM

Trình bày về cách phân lập, tổng hợp và liệt kê tính chất, hằng số vật lý như tính tan, điểm nóng chảy (đnc), năng suất quay cực ($[\alpha]_D$)..., số liệu phổ của các chất thu được từ hai đối tượng nghiên cứu.

3.1. Loài Thông lá dẹt

Đã tiến hành xác định thành phần của cặn chiết *n*-hexane bằng phương pháp GC-MS.

Đã phân lập được 7 hợp chất (**PK1-PK7**) từ hai cặn chiết ethyl acetate và *n*-butanol.

3.2. Loài Ngũ gia bì hương

Đã phân lập được 3 hợp chất (**AT1-AT3**) từ cặn chiết dichloromethane, trong đó **AT1**, **AT2** thu được với hàm lượng tương đối cao.

Từ hai hợp chất **AT1**, **AT2** đã chuyển hóa hóa học được 23 dẫn xuất mới.

Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính gây độc tế bào các cặn chiết và một số chất phân lập được.

Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả từ loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte)

4.1.1. Thành phần hóa học của cặn *n*-hexane

Cặn chiết *n*-hexane thu được từ rễ loài Thông lá dẹt chiếm 0,27% (so với lượng mẫu rễ khô), có đặc điểm sánh, trong và màu vàng nhạt, có mùi đặc trưng của tinh dầu thông. Khảo sát sơ bộ bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy cặn chiết *n*-hexane chủ yếu là chất kém phân cực, vì vậy cặn chiết này được tập trung xác định thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký khí gắn khối phổ (GC-MS) và cho kết quả ở **Bảng 4.1**.

Bảng 4.1. Kết quả phân tích thành phần hóa học của cặn chiết *n*-hexane bằng phương pháp GC-MS

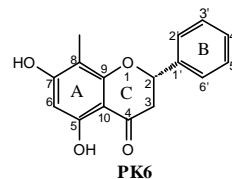
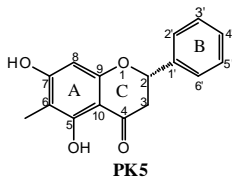
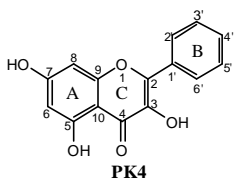
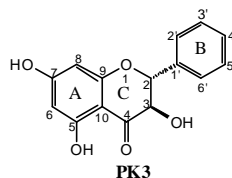
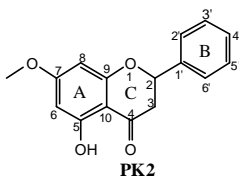
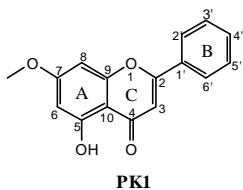
TT	Hợp chất	Thời gian lưu (RT, phút)	Hàm lượng (%)
1	α -terpineol	13,332	1,02
2	1- <i>tert</i> -butyl-1,5-cyclooctadiene	20,038	0,23
3	α -amorphene	20,839	0,22
4	δ -cadiene	21,962	0,28
5	Nerolidol	22,871	13,79
6	α -copaene	24,839	1,10
7	Farnesol	22,022	0,50

8	(E,E)- α -farnesene	25,354	1,08
9	α -bisabolol	25,640	0,63
10	Caryophylla-2(12),6(13)-dien-5-one	26,310	0,32
11	(+) α -atlantone	27,580	2,31
12	Todomatuic acid	33,079	4,10
13	Trans-Octadec-9-enoic acid	34,486	0,98
14	Octadecanoic acid	34,875	0,43
15	O-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-phenylethene	36,260	8,18

Theo số liệu ở **Bảng 4.1**, từ căn chiết *n*-hexane đã xác định được 15 hợp chất, trong đó có mặt của α -terpineol (1,02%), một hợp chất đặc trưng của tinh dầu thông và chất thơm như nerolidol (13,79%).

4.1.2. Các chất phân lập được từ căn ethyl acetate

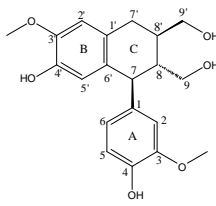
Từ căn chiết EtOAc, đã phân lập được 6 chất **PK1-PK6** sạch. Cả sáu chất này đều hấp thụ ánh sáng dưới đèn tử ngoại (254nm) và hiện màu vàng hoặc đỏ với thuốc thử Vanilin/H₂SO₄ khi hơi nóng và được dự đoán là các hợp chất flavonoid. Bằng các phương pháp phổ (cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối, phổ hồng ngoại) và so sánh với các số liệu đã công bố 6 hợp chất phân lập được từ loài Thông lá dẹt được xác định là: Tectochrysin (**PK1**), Pinostrobin (**PK2**), Pinobanksin (**PK3**), Galangin (**PK4**), Strobopinin (**PK5**), Cryptostrobin (**PK6**).



4.1.3. Chất phân lập được từ căn *n*-butanol

Từ căn *n*-butanol đã phân lập được chất Isolariciresinol (**PK7**).

Hợp chất **PK7** dạng chất rắn màu trắng đã phân lập được từ căn chiết *n*-BuOH. Kết hợp dữ liệu phổ ^1H -, ^{13}C -NMR và pic ion phân tử ở m/z 383,1470 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán cho công thức $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{Na}^+$ là 383,1465) ở phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS), đã xác định được công thức phân tử của chất **PK7** là $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$.

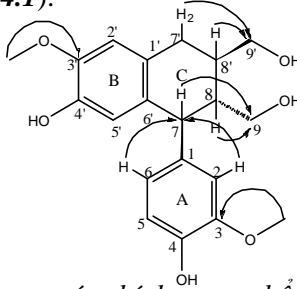


PK7

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy chất **PK7** có tín hiệu của 20 nguyên tử cacbon, bao gồm 7 cacbon bậc 4 (7xCq) trong đó có bốn cacbon bậc 4 nối với oxy (oxy-quaternary carbon, δ_{C} 145,1 - 148,9 ppm); 8 nhóm methine (8xCH) trong đó có 5 nhóm methine của vòng thơm (δ_{C} 112,3 - 123,1); 3 nhóm methylene (3xCH₂), trong đó có 2 nhóm oxymethylene (δ_{C} 62,3; 66,0 ppm); 1 tín hiệu có cường độ lớn gấp đôi của 2 nhóm methoxy (δ_{C} 56,36 ppm, 2xC). Phổ ^1H -NMR của **PK7** phù hợp với số liệu phổ ^{13}C -NMR và DEPT. Sự xuất hiện các tín hiệu proton ở δ_{H} 6,68 (1H, *br s*, H-2) và hai proton có tương tác *ortho* ở δ_{H} 6,76 (1H, *d*, $J = 8,0$, H-5) 6,63 (1H, *d*, $J = 8,0$, H-6) cho thấy chất này có chứa vòng thơm bị thế ở C-1, C-3 và C-4. Ngoài ra, hai singlet ở δ_{H} 6,22 (1H, *s*, H-5') và 6,66 (1H, *s*, H-2') cho biết vòng B bị thế ở bốn vị trí C-1', C-3', C-4' và C-6'. Kết hợp các dữ liệu phổ cho thấy hợp chất này có những dữ liệu phổ đặc trưng của lớp chất lignan có vòng thơm gắn tại C-7.

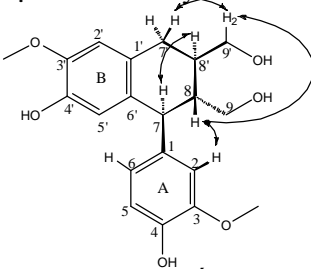
Vị trí chính xác của các nhóm hydroxyl methylene, methoxy được xác định qua tương tác ở phổ HMBC. Dựa vào sự tương tác mạnh của H-7' với C-9'; H-8' với C-9' và H-7 với C-9; H-8 với C-9 cho thấy có một nhóm hydroxyl methylene gắn vào C-8'; nhóm thứ hai gắn với C-8. Hai

nhóm methoxy được xác định ở vị trí C-3 và C-3' dựa trên sự tương tác proton của nhóm methoxy với C-3 và C-3'. Bên cạnh đây, có thể khẳng định vòng A gắn với vòng C tại C-7 thông qua tương tác của H-2 với C-7; H-6 với C-7. (**Hình 4.1**).

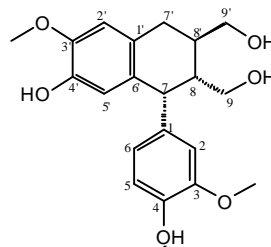


Hình 4.1. Một số tương tác chính trong phổ HMBC của chất **PK7**

Cấu hình tương đối của các trung tâm bất đối (C^*) được xác định dựa vào hằng số tương tác trong phổ 1H -NMR và dữ liệu phổ NOESY. Tương tác của H-7' β /H₂-9' và H-8/ H₂-9' trên phổ NOESY cho thấy nhóm hydroxyl methyl ở C-8' có cấu hình *b*. Tương tác của H-7/ H-8' cũng cho thấy nhân thơm gắn với C-7 có cấu hình *b*. Điều này được khẳng định thêm qua độ chuyển dịch khác nhau của C-7 ($\Delta\delta_C$ -1,67 ppm) so với cấu hình *a* của đồng phân **PK7a** (**Bảng 4.2**). Bên cạnh tương tác H-2/H-8 ở phổ NOESY thì tín hiệu doublet của H-7 (δ_H 3,79 *d*) và H-8 (δ_H 1,79 *tt*) trên phổ 1H -NMR cho cùng một hằng số tương tác lớn ($J = 11$ Hz), cho thấy hai proton này ở khác phía đối với nhau, và khẳng định được nhóm methylene ở C-8 có cấu hình *a*.



Hình 4.2. Một số tương tác chính trong phổ NOESY của chất **PK7**



Hình 4.3. Chất burselianin (**PK7a**)

Dữ liệu phổ của chất **PK7** hoàn toàn phù hợp với phổ của