

BỘ GIÁO DỤC & ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN HÓA HỌC

Trần Thị Thanh Thủy

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CÂY TRONG
CHI *FISSISTIGMA* VÀ *MILIUSA*
HỌ NA (ANNONACEAE).**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2010

I. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

I.1. Ý nghĩa của luận án

Trước nguy cơ bùng nổ nhiều dịch bệnh nguy hiểm, tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học để làm thuốc là một trong các giải pháp hiệu quả đã và đang được các nhà khoa học lựa chọn. Thống kê của các nhà khoa học Mỹ cho thấy các hợp chất tự nhiên, các dẫn xuất và các hợp chất tương tự chiếm trên 50% các dược chất sử dụng làm thuốc; các hợp chất từ thực vật bậc cao cùng các dẫn xuất chiếm khoảng 25% trong tổng số. Trong đó, nhiều đối tượng nghiên cứu được lựa chọn dựa vào các họ thực vật giàu các chất có hoạt tính. Những nghiên cứu trước đây cho thấy họ Na mà đặc biệt là hai chi *Fissistigma* và *Milium* rất giàu các hợp chất flavonoid và alkaloid là những hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học quý báu như hoạt tính gây độc tế bào - chống ung thư, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính với hệ mạch - chống các bệnh tim mạch; hai căn bệnh gây tử vong hàng đầu hiện nay. Do đó, mục đích của luận án là: “Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học của một số cây trong chi *Fissistigma* và *Milium* họ Na (Annonaceae)“.

I.2. Mục tiêu của luận án

Tìm kiếm các hợp chất có cấu trúc hóa học mới cũng như các hợp chất có hoạt tính sinh học lý thú từ các cây Cách thư đa hùng [*Fissistigma polyanthoides* (DC.) Merr.], Cách thư poilanei [*Fissistigma poilanei* (Ast.) Tsiang & P.T.Li] và Song môi tàu (*Milium sinensis* Finet et Gagnep.) thuộc họ Na.

I.3. Những đóng góp mới của luận án

- Từ cây Cách thư đa hùng (*Fissistigma polyanthoides*) đã phân lập được 5 hợp chất flavonoid.

- Đã tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học của cây *Fissistigma poilanei*, phân lập và xác định cấu trúc 7 hợp chất trong đó có hai alkaloid mới. Trước nghiên cứu của chúng tôi chưa có công bố nào về thành phần hóa học của cây này.

- Đã phân lập và xác định cấu trúc của 10 hợp chất trong đó có 1 dihydrochalcon mới từ cây *Milium sinensis*.

- Công bố về hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và gây độc tế bào của các cây nghiên cứu và các hợp chất mới đã phân lập.

I.4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 121 trang với 3 chương, 10 bảng, 52 hình, 123 tài liệu tham khảo và 22 phụ lục gồm 36 hình, 7 bảng. Luận án được bố cục như sau: Mở đầu: 2 trang, Tổng quan: 38 trang, Thực nghiệm: 15 trang, Kết quả và thảo luận: 52 trang, Kết luận: 2 trang, Tài liệu tham khảo: 11 trang, Danh mục công trình liên quan đến luận án: 1 trang.

II. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

Mở đầu: Đề cập tính thực tiễn, ý nghĩa khoa học, mục đích, đối tượng và mục tiêu của luận án.

Chương 1: Tổng quan

Trên cơ sở nghiên cứu tài liệu, chương tổng quan đề cập đến đặc điểm và tình hình nghiên cứu trên thế giới về hai chi *Fissistigma* và *Milium* cũng như các lớp chất là thành phần chính của các cây thuộc chi này.

Tình hình nghiên cứu hóa thực vật của chi *Fissistigma* và *Milium* họ Na.

Các hợp chất aporphin ancaloit: cấu trúc hóa học, sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học.

Các hợp chất flavonoid: cấu trúc hóa học, sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học.

Chương 2: Thực nghiệm

Trình bày về phương pháp nghiên cứu, cách phân lập, hằng số vật lý và số liệu phổ của tất cả các chất thu được từ ba cây *Fissistigma polyanthoides*, *Fissistigma poilanei*, *Milium sinensis*.

Mẫu thực vật: Mẫu thực vật được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ 40°C, xay nhỏ và ngâm chiết 3 lần bằng hỗn hợp dung môi MeOH – H₂O (95 : 5) ở nhiệt độ phòng.

Phân lập các chất: Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm, dịch nước còn lại được chiết lần lượt với các dung môi n-hexan, etyl axetat, n-butanol. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn dịch chiết

tương ứng. Các cặn chiết thu được trong các dung môi tương ứng lần lượt được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột thường, sắc ký cột nhanh với các chất hấp phụ và các hệ dung môi thích hợp.

Xác định cấu trúc hóa học: Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng sự kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ tử ngoại, phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối (EI-, ESI-, HR-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều (COSY, HSQC, HMBC...).

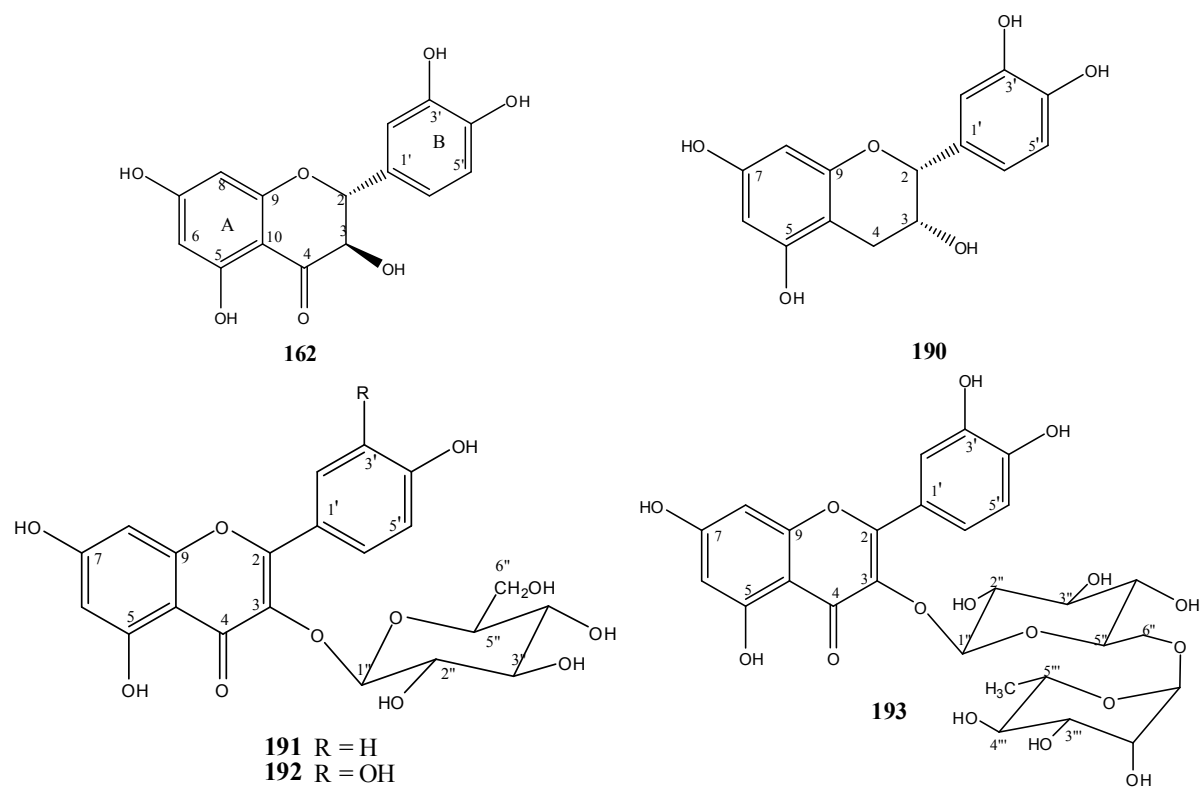
Phương pháp thử hoạt tính sinh học:

- Phương pháp thử hoạt tính vi sinh vật kiểm định
- Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Chương 3: Kết quả và thảo luận

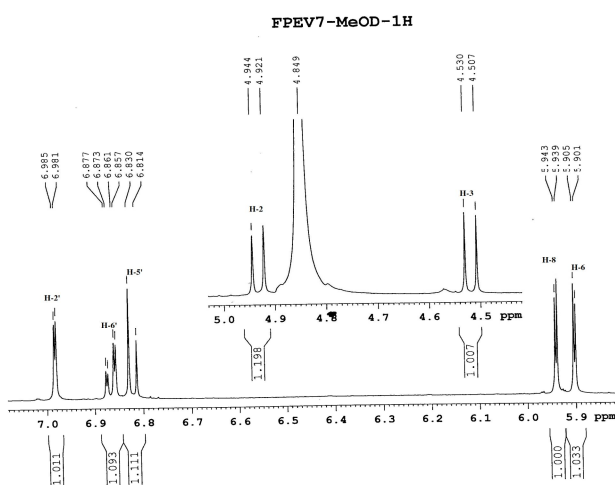
3.1. Các chất phân lập được từ cây *Fissistigma polyanthoides*

Cấu trúc hóa học của 5 hợp chất: taxifolin (**162**), epicatechin (**190**), kaempferol-3-O-glucosit (**191**), quercetin-3-O-glucosit (**192**) và rutin (**193**) được xác định bằng cách kết hợp các phương pháp phổ như: phổ FT-IR, EI-, ESI-MS, phổ ^1H - và ^{13}C - NMR kết hợp phổ 2D NMR hoặc so sánh tài liệu.

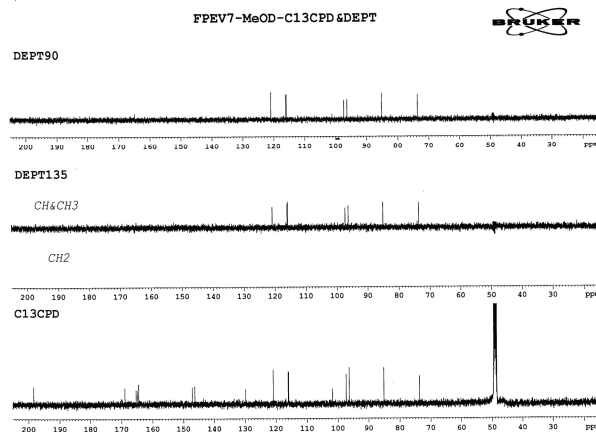


3.1.1. Các flavonoid

* **Taxifolin (162)**: Công thức phân tử của chất **162** được xác định là $C_{15}H_{12}O_7$ dựa vào phổ ESI-MS (pic $[M+H]^+$ ở m/z 305) và phổ ^{13}C -NMR. Phổ IR cho thấy sự có mặt của các nhóm hydroxy và nhóm cacbonyl (ν_{max} 3454 và 1650 cm^{-1}). Phổ ^{13}C -NMR chỉ ra sự có mặt của 15C đặc trưng cho khung dihydroflavonol: 1 nhóm cacbonyl (198,4 ppm), 7C bậc 4, 7CH trong đó có 5 nhóm CH nhân thơm (96,3 – 121,0 ppm). Trên phổ 1H -NMR, hai tín hiệu duplet ở δ_H 5,94 và 5,90 ($J = 2\text{ Hz}$) của 2 proton ở vị trí meta gợi ý rằng 2 vị trí C-5 và C-7 trên vòng A đã bị thế. Cụm tín hiệu của 3 proton nhân thơm ở δ_H 6,98 (1H, d, 2 Hz), 6,82 (1H, d, 8Hz), 6,86 (1H, dd, 2, 8 Hz) cho thấy rằng vị trí C-3' và C-4' trên vòng B cũng đã thế. Hai tín hiệu duplet ở δ_H 4,52 và 4,93 ppm ($J = 11,5\text{ Hz}$) ứng với tín hiệu cộng hưởng của H-3 và H-2. Phân tích các số liệu phổ, so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận chất **162** là taxifolin.



Hình 3.1.3: Phổ 1H -NMR của hợp chất **162**



Hình 3.1.4: Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **162**

* **(-)-Epicatechin (190)**: Phổ 1H - và ^{13}C -NMR cho thấy chất **190** có khung flavan: sự có mặt của nhóm CH_2 ở δ_C 28,3 và hai nhóm metin có gắn với oxy ở δ_H 4,65 (d, $J = 4,5\text{ Hz}$), δ_C 78,1 và δ_H 4,02 (m), δ_C 65,0 cùng với sự vắng mặt tín hiệu cacbonyl. Ngoài ra các tín hiệu proton và cacbon thơm của vòng A và B tương tự như của chất **162**. Cấu trúc của **190** được xác định là (-)-epicatechin khi so sánh các số liệu phổ của **190** với tài liệu.

Bảng 3.1: Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) của hai chất **162**, **190**

Vị trí	162 (CD_3OD)		190 (DMSO-d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)
2	85,1 (C)	4,93 d (11,5)	78,1 (CH)	4,65 d (4,5)
3	73,7 (C)	4,52 d (11,5)	65,0 (CH)	4,02 m
4	198,4 (C)	-	28,3(CH ₂)	2,69 dd (2, 6) 2,48 dd (3, 6)
5	165,3 (C)	-	156,6 (C)	-
6	97,4 CH)	5,94 d (2)	95,2 (CH)	5,89 d (2)
7	168,9 (C)	-	156,3 (C)	-
8	96,3 (CH)	5,90 d (2)	94,2 (CH)	5,73 d (2)
9	164,1 (C)	-	155,8 (C)	-
10	101,8 (C)	-	98,6 (C)	-
1'	129,9 (C)	-	130,7 (C)	-
2'	115,9 (CH)	6,98 d (2)	115,0 (CH)	6,89 d (1)
3'	146,3 (C)	-	144,5 (C)	-
4'	147,1 (C)	-	144,6 (C)	-
5'	116,1 (CH)	6,82 d (8)	114,8 (CH)	6,68 d (8)
6'	120,9 (CH)	6,86 dd (2, 8)	118,0 (CH)	6,65 dd (1, 8)

3.1.2. Các flavonoid glycosit

* ***Kaempferol-3-O- β -D-glucosit* (191)**: Từ số liệu phổ ESI-MS (pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở m/z 449) kết hợp với phổ $^{13}\text{C-NMR}$, công thức phân tử của **191** được xác định là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ chỉ ra sự có mặt của 21C, ngoài 5 tín hiệu CH và 1 nhóm CH_2 của đơn vị đường, phần aglycon với 15C gồm có 1 nhóm carbonyl (δ_{C} 177,6), 8C bậc bốn và 6 nhóm CH của vòng thom (93 - 164 ppm) rất đặc trưng cho khung flavonoid. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy hai tín hiệu duplet ở δ_{H} 6,20 và 6,43 với $J = 2$ Hz của hai proton ở vị trí meta, chứng tỏ rằng vòng A đã bị thế ở hai vị trí C-5 và C-7. Hai tín hiệu duplet kép với cường độ cho mỗi tín hiệu là 2H ở δ_{H} 8,03 và 6,88 cho thấy vị trí C-4' của vòng B cũng bị thế. Đơn vị đường trong **191** được xác định là β -glucose dựa vào độ dịch chuyển hóa học và hằng số tương tác của tín hiệu carbon và proton anome ở δ_{C} 101,03; δ_{H} 5,45 ($J = 7,5$ Hz).

* ***Quercetin-3-O- β -D-glucosit* (192)**: Phổ ESI-MS của chất **192** cho pic $[\text{M} + \text{H}]^+$ ở m/z 465 ứng với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$. Phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-}$

NMR của chất **192** hoàn toàn tương tự như của **191**, cũng là một flavonoid được glucosid hóa ở C-3. Chất **192** có thêm một nhóm thế hydroxy ở vị trí C-3' trong vòng B. Điều này được thể hiện qua tín hiệu của các proton của H-2' (7,58, d, J = 2 Hz), H-5' (6,84, d, J = 9 Hz) và H-6' (7,58, dd, J = 2; 9 Hz) và sự xuất hiện thêm một cacbon bậc bốn, cũng như sự tăng 16 đơn vị khối lượng của phân tử chất **192** so với **191** trên phổ ESI-MS. Các số liệu phổ ¹H- và ¹³C- NMR của **192** hoàn toàn đồng nhất với số liệu phổ của quercetin-3-O-β-D-glucosid trong tài liệu.

Bảng 3.2: Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) của các chất **191**, **192**, **193**

Vị trí	191 (CD ₃ OD)		192 (CD ₃ OD)		193 (CD ₃ OD)	
	δ _C	δ _H (J = Hz)	δ _C	δ _H (J = Hz)	δ _C	δ _H (J = Hz)
Aglycon						
2	156,5 (C)	-	156,3 (C)	-	158,5 (C)	-
3	133,3 (C)	-	133,3 (C)	-	135,6 (C)	-
4	177,6 (C)	-	177,4 (C)	-	179,4 (C)	-
5	161,3 (C)	-	161,2 (C)	-	162,9 (C)	-
6	98,8 (CH)	6,20 d (2)	98,6 (CH)	6,20 d (2)	99,9 (CH)	6,22 d (2,0)
7	164,3 (C)	-	164,2 (C)	-	165,9 (C)	-
8	93,8 (CH)	6,43 d (2)	93,5 (CH)	6,40 d (2)	94,8 (CH)	6,41 d (2,0)
9	156,4 (C)	-	156,1 (C)	-	159,3 (C)	-
10	104,1 (C)	-	104,0 (C)	-	105,6 (C)	-
1'	121,0 (C)	-	121,6 (C)	-	123,1 (C)	-
2'	131,0 (CH)	8,03 dd (2, 7)	115,2 (CH)	7,58 d (2)	117,7 (CH)	7,69 d (2)
3'	115,2 (CH)	6,88 dd (2,7)	144,8 (C)	-	145,8 (C)	-
4'	160,1 (C)	-	148,4 (C)	-	149,8 (C)	-
5'	115,2 (CH)	6,88 dd (2,7)	116,2 (CH)	6,84 d (9)	116,1 (CH)	6,90 d (8,5)
6'	131,0 (CH)	8,03 dd (2, 7)	121,6 (CH)	7,58 dd (2, 9)	123,7 (CH)	7,65 dd (8,5; 2)
Phản đường						
1''	101,0 (CH)	5,45 d (7,5)	101,0 (CH)	5,45 d (7,5)	104,7 (CH)	5,12 d (7,5)
2''	74,3 (CH)	3,12 - 3,50	74,1 (CH)	3,08 - 3,33	75,7 (CH)	3,50 - 3,25
3''	76,5 (CH)	3,12 - 3,50	76,5 (CH)	3,08 - 3,33	78,2 (CH)	3,50 - 3,25
4''	70,0 (CH)	3,12 - 3,50	70,0 (CH)	3,08 - 3,33	71,4 (CH)	3,50 - 3,25
5''	77,6 (CH)	3,12 - 3,50	77,5 (CH)	3,08 - 3,33	77,2 (CH)	3,50 - 3,25
6''	61,0 (CH ₂)	3,12 - 3,50	61,0 (CH ₂)	3,08 - 3,33	68,6 (CH ₂)	3,82 dd (11;1,5) 3,50 - 3,25
1'''	-	-	-	-	102,4 (CH)	4,54 d (1,5)
2'''	-	-	-	-	72,1 (CH)	3,66 dd (3,5; 2)
3'''	-	-	-	-	72,3 (CH)	3,56 dd (3,5; 9,5)
4'''	-	-	-	-	73,9 (CH)	3,50 - 3,25
5'''	-	-	-	-	69,5 (CH)	3,50 - 3,25
6'''	-	-	-	-	17,9 (CH ₃)	1,14 d (6,5)

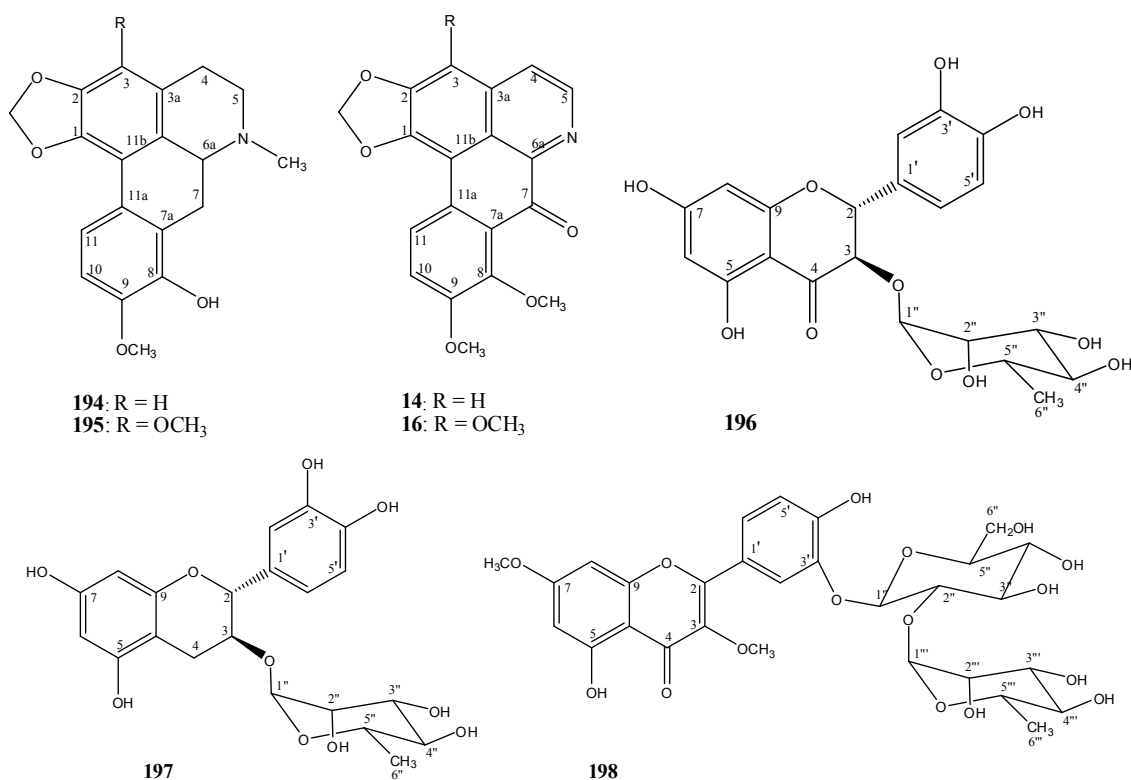
* **Quercetin-3-rutinosit (rutin) (193)**: Phổ ESI-MS của chất **193** cho pic $[M+H]^+$ ở m/z 611 ứng với công thức phân tử $C_{27}H_{30}O_{16}$. Các số liệu cộng hưởng từ hạt nhân 1H - và ^{13}C - NMR cho phép xác định hai gốc đường tương ứng là rhamnosyl và glucosyl thông qua các tín hiệu proton anome ở δ_H 4,84 ($J = 1,5$ Hz) và 5,12 ($J = 7,5$ Hz) cùng với các tín hiệu nhận dạng của nhóm methyl và metylen ở δ_C 17,9 (C-6''') và 68,6 (C-6''). Số liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR phần aglycon rất phù hợp với cấu trúc của quercetin. So sánh với tài liệu đã công bố cho phép kết luận chất **193** là quercetin-3-rutinosit hay còn được gọi là rutin.

3.1.3. Nhận xét về thành phần hóa học của cây *F. polyanthoides*: Flavonoit là lớp chất chính có trong cây. Các hợp chất này có hoạt tính oxy hóa, kháng viêm... Điều này phần nào giải thích được công dụng của cây Cách thư đa hùng trong y học cổ truyền.

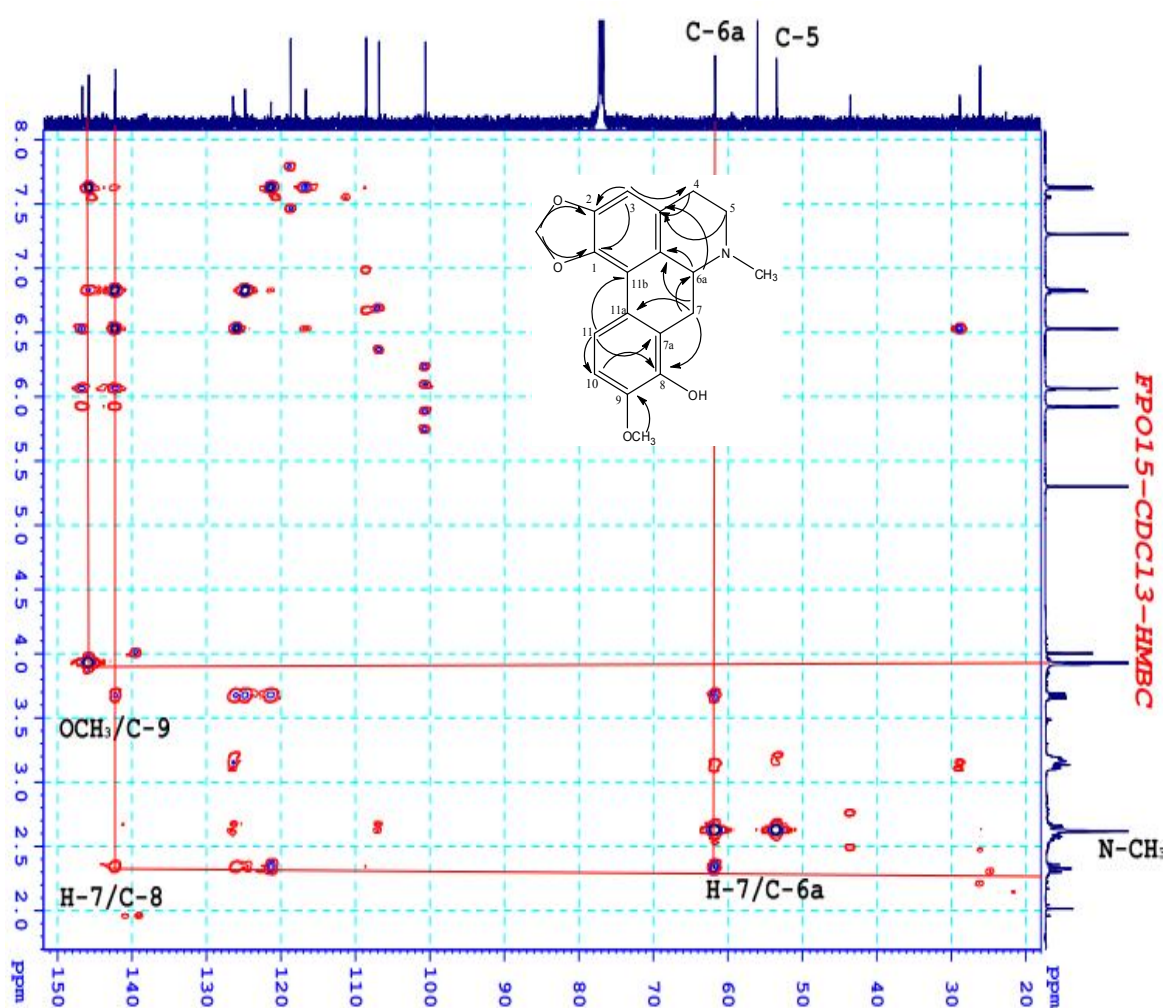
3.2. Các chất phân lập được từ cây *Fissistigma poilanei*

3.2.1. Các aporphin ancaloit

Từ lá và cành cây *F. poilanei*, 4 hợp chất aporphin ancaloit và 3 hợp chất flavonoit glycosit đã được phân lập.



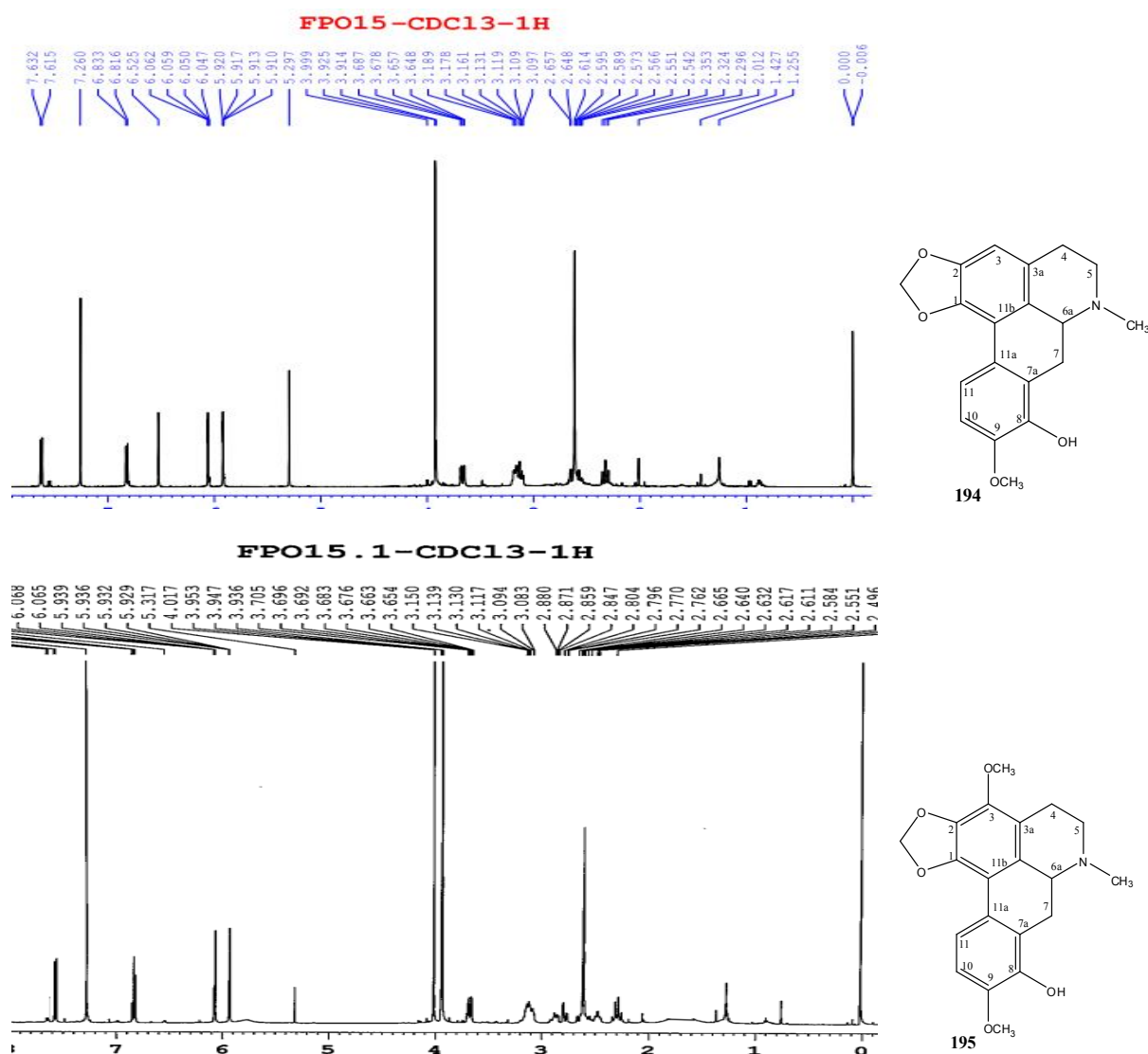
* **8-Hydroxy-9-methoxy-1,2-metylendioxyaporphin (194)**: Công thức phân tử của chất **194** là $C_{19}H_{19}NO_4$ được suy ra từ phổ HR-ESI MS (pic $[M + H]^+$ ở $m/z = 326,13887$). Phổ 1H -NMR chỉ ra tín hiệu của nhóm N-metyl (δ_H 2,61), nhóm methoxy (δ_H 3,92), hai proton của nhóm metyendioxy (δ_H 5,92 và 6,06), tín hiệu singlet của proton vòng thơm (δ_H 6,53) và cặp tín hiệu của 2 proton thơm có tương tác $J = 8,5$ Hz (δ_H 7,62 và 6,82). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT có 19 tín hiệu cacbon bao gồm một nhóm N-metyl tại δ_C 43,6, nhóm methoxy tại δ_C 56,1, bốn nhóm metylen tại δ_C 100,6; 26,2; 28,9; 53,5; bốn nhóm CH cùng 9 nguyên tử cacbon bậc 4.



Hình 3.2.8: Phổ HMBC của hợp chất 194

Tương tác của các proton gần nhau giữa H-4/H-5, H-6a/H-7, H-6a-H7 và H-10/H-11 được thể hiện rõ trên phổ COSY. Thông qua việc phân tích các phổ HSQC và HMBC, cấu trúc của **194** được xác định là 8-hydroxy-9-methoxy-1,2-metylendioxyaporphin.

* *(-)-8-Hydroxy-3,9-dimethoxy-1,2-methylendioxyaporphin (195)*: Phổ HR-ESI MS cho pic $[M + H]^+$ tại m/z 356,1496 tương ứng với công thức phân tử $C_{20}H_{22}NO_5$. Phổ 1H -NMR của **195** gần như trùng với phổ **194** ngoại trừ một vài sự thay đổi. Tín hiệu singlet của H-3 (δ_H 6,53) trên phổ **194** không xuất hiện trên phổ của **195** mà thay vào đó là sự xuất hiện của một nhóm methoxy nữa tại δ_H 4,02. Điều này cho thấy vị trí C-3 đã được thế bởi nhóm methoxy. Sự thay thế đó gây nên sự dịch chuyển δC -3 của **195** về phía trường thấp (106,9 \rightarrow 139,5) đồng thời δC -2 (146,7 \rightarrow 135,2) và δC -3a (126,4 \rightarrow 119,1) lại thay đổi về phía trường cao. Các tín hiệu của các vị trí carbon khác gần như tương tự với hợp chất **194**. Đây cũng là hợp chất lần đầu được phân lập từ tự nhiên.



Hình 3.2.9: Phổ 1H -NMR của hợp chất **194** và **195**

Bảng 3.3 : Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) của hai chất **194**, **195**

Vị trí	194 (CDCl_3)		195 (CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)
1	142,3 (C)	-	142,2 (C)	-
2	146,7 (C)	-	135,2 (C)	-
3	106,9 (CH)	6,52 s	139,5 (C)	-
3a	126,4 (C)	-	119,1 (C)	-
4	28,9 (CH_2)	3,16m 2,65 m	22,7 (CH_2)	3,14 m 2,77 m
5	53,5 (CH_2)	3,11 m 2,55 m	53,5 (CH_2)	3,09 m 2,50 m
6a	61,8 (CH)	3,17 dd (4,5; 15)	61,8 (CH)	3,15 m
7	26,2 (CH_2)	3,67 dd (4,5; 15) 2,32 t (15)	27,5 (CH_2)	3,68 dd (4,5; 15) 2,29 t (15)
7a	121,4 (C)	-	124,9 (C)	-
8	142,3 (C)	-	142,2 (C)	-
9	145,8 (C)	-	145,3 (C)	-
10	108,6 (CH)	6,82 d (8,5)	108,7 (CH)	6,81 d (8,5)
11	118,7 (CH)	7,62 d (8,5)	118,1 (CH)	7,57 d (8,5)
11a	124,8 (C)	-	126,5 (C)	-
11b	116,7 (C)	-	111,3 (C)	-
11c	126,4 (C)	-	127,2 (C)	-
O- CH_2 -O	100,6 (CH_2)	6,10 d (1,5) 5,92 d (1,5)	100,7 (CH_2)	6,07 d (1,5) 5,92 d (1,5)
9 - OCH_3	56,1 (CH_3)	3,93 s	56,1 (CH_3)	3,94 s
3- OCH_3	-	-	59,5 (CH_3)	4,02 s
N- CH_3	43,6 (CH_3)	2,61 s	45,9 (CH_3)	2,61 s

*** Oxocrebanin (14) và kuafumin (16):**

Hợp chất **14** và **16** thu được dưới dạng hỗn hợp kết tinh màu đỏ với tỷ lệ 2,7 : 1 được suy ra từ đường tích phân trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hỗn hợp có đặc trưng nổi bật của hợp chất oxoaporphin với sự có mặt của nhóm xeton tại C-7 (δ_{C} 181,8). Phổ $^1\text{H-NMR}$ thể hiện các cặp tín hiệu của hai chất theo tỷ lệ với cùng dạng vạch và độ dịch chuyển hóa học. Điểm phân biệt giữa chúng là sự xuất hiện tín hiệu proton thơm H-3 tại δ_{H} 7,10 đối với hợp chất **14** và tín hiệu của nhóm metoxy tại δ_{H} 4,25 đối với hợp chất **16**. Nhóm thế metoxy tại C-3 của chất **16** được khẳng định bởi sự khác biệt rõ ràng về độ dịch chuyển hóa học của H-4 ($\Delta\delta = 0,37$)

giữa **14** và **16**. Cuối cùng, cấu trúc của **14** được xác định là oxocrebanin và **16** là kuafumin thông qua việc so sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ với tài liệu tham khảo.

3.2.2. Các flavonoid glycosit

* **Astilbin (196)**: Chất **196** cho pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở m/z 451 trong phổ ESI-MS, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ chỉ ra sự có mặt của 21 nguyên tử cacbon, ngoài 5 tín hiệu CH và 1 nhóm CH_3 của đơn vị đường, phần aglycon với 15C gồm có 1 nhóm cacbonyl liên hợp (δ_{C} 196,0), 7 C bậc bốn và 7 nhóm CH trong đó có 5 nhóm CH của vòng thơm (93,0 – 164,0 ppm) đặc trưng cho khung flavonol. Số liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ phần aglycon rất phù hợp với cấu trúc của taxifolin. Đơn vị đường trong chất **196** được xác định là $\alpha\text{-L-rhamnose}$ bằng độ dịch chuyển hóa học và hằng số tương tác của tín hiệu cacbon và proton anome ở δ_{C} 102,1; δ_{H} 4,09 ($J = 1,5$ Hz). Đơn vị rhamnose được kết nối với phần aglycon ở vị trí C-3 thể hiện qua tương tác giữa H-1'' với C-3 trên phổ HMBC. Dựa vào các phổ 1D-, 2D-NMR kết hợp với các tài liệu đã công bố, chất **196** được xác định: (2R,3R)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanon-3-O- $\alpha\text{-L-rhamnosit}$ hay còn gọi là astilbin.

* **(+)-Catechin-3-O- $\alpha\text{-L-rhamnosit}$ (197)**: Phổ ESI-MS của chất **197** cho pic $[\text{M} + \text{H}]^+$ ở m/z 439 ứng với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. Phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy đây là một flavan rhamnosit: nhóm CH_2 ở δ_{C} 28,0 và hai nhóm methin có gắn với oxy ở δ_{H} 4,63 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_{C} 81,1 và δ_{H} 3,96 m, δ_{C} 76,0 cùng với sự vắng mặt tín hiệu cacbonyl. Ngoài các tín hiệu nêu trên, phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **197** rất tương tự như phổ của chất **196**. Các số liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **197** hoàn toàn đồng nhất với số liệu phổ của (+)-catechin 3-O- $\alpha\text{-L-rhamnopyranosit}$. Chất này đã được tách ra từ cây *Erythroxylum novogranatense*.

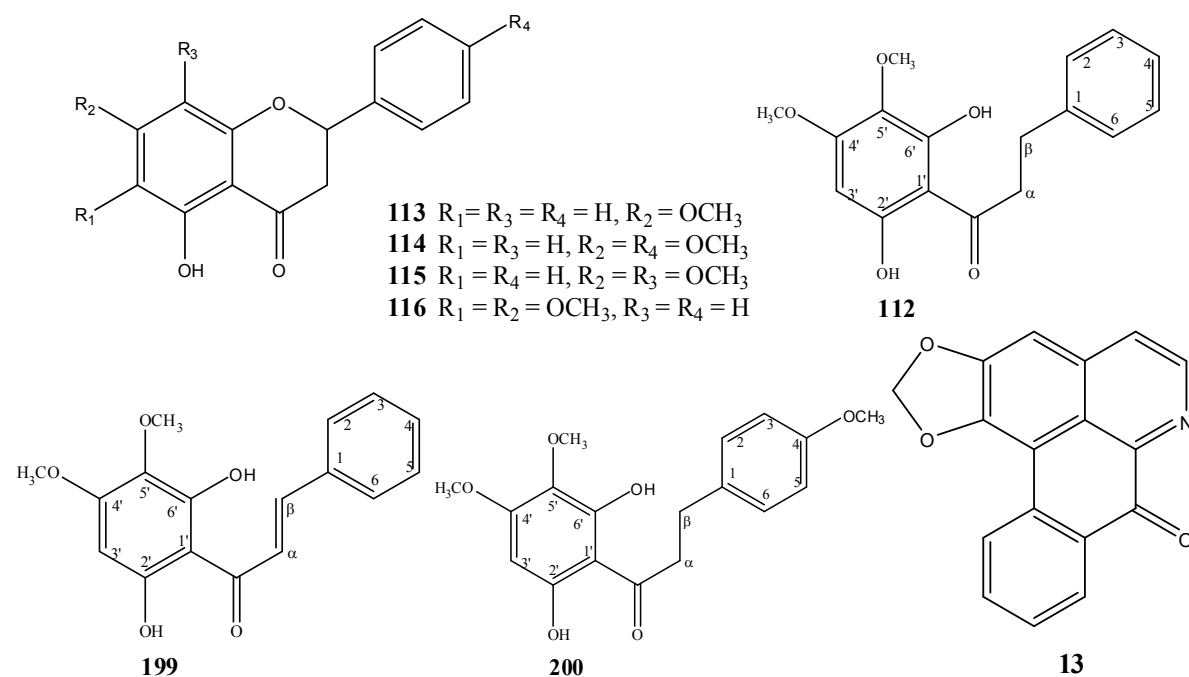
* **Quercetin-3,7-dimetylete-3'-O- $\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-\beta\text{-D-glucopyranosit}$ (198)**: Hợp chất **198** cho pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở m/z 639 trong phổ ESI-MS, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{16}$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy các tín hiệu vùng nhân thơm ở δ_{H} 7,77 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,68 (1H, dd, J

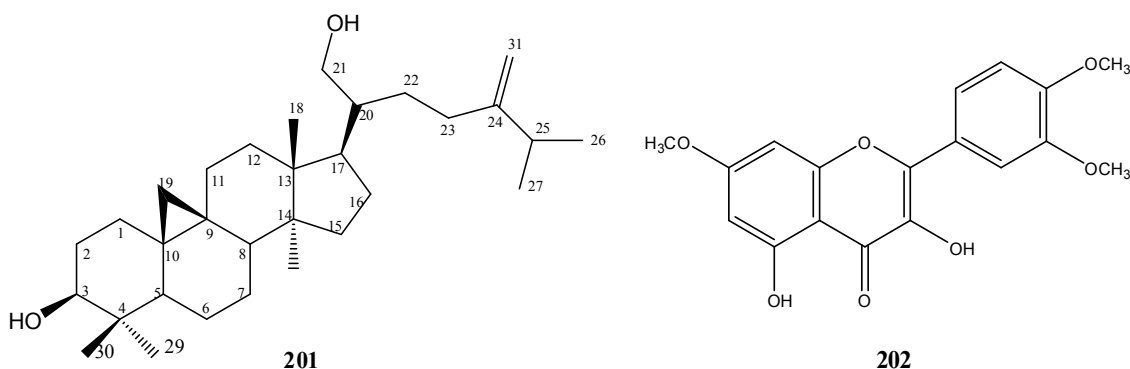
= 8,5 và 2,0 Hz), 6,99 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,79 (1H, J = 2,0 Hz) và 6,35 (1H, d, J = 2,0 Hz). Các tín hiệu này được gán cho H-2', H-6', H-5', H-8 và H-6 tương ứng. Bên cạnh đó, hai tín hiệu singlet tại δ_H 3,80 và 3,85 chỉ ra sự có mặt của 2 nhóm metoxy. Tín hiệu ở δ_H 5,24 (1H, d, J = 1,5 Hz) và 5,07 (1H, d, J = 7,5 Hz) tương ứng với các proton anome của các gốc rhamnosyl và glucosyl. Phần rhamnosyl liên kết với gốc glucosyl ở vị trí C-2'' được thể hiện ở sự dịch chuyển của tín hiệu C-2'' về phía trường thấp (δ_C 77,0) và của tín hiệu C-1'' về phía trường cao (δ_C 99,2) trong phổ ^{13}C -NMR. So sánh với tài liệu đã công bố cho phép rút ra kết luận chất **198** là quercetin-3,7-dimetylete-3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosit. Hợp chất này được phân lập lần đầu tiên từ cây *Dasymaschalon sootepense*, họ Annonaceae.

3.2.3. Nhận xét về thành phần hóa học của cây *F. poilanei*: Cây *F. poilanei* mang đặc điểm chung với các cây khác cùng chi *Fissistigma*: giàu aporphin ancaloit và flavonoit – những lớp chất có hoạt tính sinh học. Từ đây định hướng cho việc nghiên cứu hoạt tính của 2 hợp chất mới.

3.3. Các chất phân lập được từ cây *Milium sinensis*

Từ lá và cành cây *Milium sinensis*, đã phân lập được 10 hợp chất: flavanon (4 hợp chất), chalconoit (3 hợp chất) cùng một số chất khác (1 triterpen, 1 oxoaporphin ancaloit và 1 flavon).





3.3.1 Các hợp chất flavanon

* **Pinostrobin (113)**: Công thức phân tử $C_{16}H_{14}O_4$ của chất **113** được đưa ra dựa vào việc phân tích dữ liệu phổ EI-MS ($[M]^+ = 270$) kết hợp với phổ NMR. Dải hấp thụ ở 1644 cm^{-1} trên phổ IR cho biết sự có mặt của nhóm cacbonyl liên hợp. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện 16 tín hiệu gồm 5C bậc 4 và 1 nhóm cacbonyl liên hợp ($195,7\text{ ppm}$), 7 nhóm CH nhân thơm ($94 - 128\text{ ppm}$), 1 nhóm metylen ($43,3\text{ ppm}$) và 1 nhóm metoxy ($55,6\text{ ppm}$) (bảng 3.6). Vùng nhân thơm trên phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ cụm tín hiệu của 5 proton ở $\delta_{\text{H}} 7,36 - 7,45$ và hai tín hiệu duplet ở $\delta_{\text{H}} 6,06$ ($J = 2\text{ Hz}$) và $6,02$ ($J = 2\text{ Hz}$) cho thấy rằng vòng A của chất **113** đã bị thế ở vị trí 5, 7 trong khi vòng B không bị thế. Tín hiệu OH ở $\delta_{\text{H}} 12,01$ đặc trưng cho nhóm OH ở C-5 (có liên kết cầu hidro nội phân tử), như vậy nhóm metoxy thế ở C-7. Cụm 3 tín hiệu duplet kép $\delta_{\text{H}} 5,39$ (H-2, $J = 13$ và 2 Hz); $2,80$ (H-3a, $J = 17$ và 2 Hz) và $3,06$ (H-3b, $J = 17$ và 13 Hz) được xem là “vân tay” nhận dạng của nhóm hợp chất khung flavanon. Từ việc phân tích các phổ kết hợp so sánh tài liệu cho phép xác định chất **113** là 5-hydroxy-7-metoxy-flavanon hay còn gọi pinostrobin.

* **5-Hydroxy-7,4'-dimetoxy-flavanon (114)**: Các dữ liệu phổ cho thấy chất **114** cũng có cấu trúc khung flavanon tương tự như chất **113**. Chất **114** có khối lượng phân tử lớn hơn chất **113** là 30 đơn vị khối, điều này gợi ý phân tử có gắn thêm 1 nhóm metoxy. Giả thiết này được khẳng định thêm qua việc xuất hiện tín hiệu của nhóm metoxy ở $\delta_{\text{C}} 55,7$ và $\delta_{\text{H}} 3,83$ trên phổ $^{13}\text{C-}$ và $^1\text{H-NMR}$, tương ứng. Nhóm metoxy này được thế vào vị trí 4' trên vòng B thể hiện qua sự dịch chuyển của C-4' về phía trường thấp ($\delta_{\text{C}} 160,1$). Tín hiệu của 4 proton nhân thơm thuộc vòng B của chất **114** chia thành 2

duplet ở δ_H 7,38 ($J = 8,5$ Hz) và 6,95 ($J = 8,5$ Hz) trên phổ 1H -NMR một lần nữa khẳng định giả thiết trên. Các dữ liệu phổ phù hợp với chất đã công bố là: 5-hydroxy-7,4'-dimetoxy-flavanon.

Bảng 3.6: Số liệu phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) của các chất **113**, **114**, **115**, **116**

Vị trí C	113	114	115	116
2	79,2	79,0	79,2	79,6
3	43,3	43,2	43,4	43,4
4	195,7	196,0	196,0	196,3
5	164,1	164,2	159,9	155,1
6	95,1	95,1	93,1	130,7
7	168,0	168,1	161,6	161,0
8	94,2	94,3	129,9	91,7
9	162,8	162,9	153,6	158,7
10	103,1	103,2	103,0	103,1
1'	138,4	130,5	138,5	138,3
2'	126,1	127,7	126,0	126,1
3'	128,8	114,3	128,8	128,9
4'	128,8	160,1	128,7	129,0
5'	128,8	114,3	128,8	128,9
6'	126,1	127,7	126,0	126,1
7-OCH ₃	55,6	55,6	56,3	56,1
4'- OCH ₃	-	55,7	-	-
8-OCH ₃	-		61,3	-
6-OCH ₃	-		-	60,8

* **5-Hydroxy-7,8-dimetoxy-flavanon (115)** và **5-hydroxy-6,7-dimetoxy-flavanon (116)**: Chất **115** và chất **116** cùng có giá trị m/z của ion phân tử là 300 ứng với công thức phân tử $C_{17}H_{16}O_5$. Hai chất này có phổ 1H - và ^{13}C -NMR hoàn toàn tương tự nhau. Cả hai chất đều có cấu trúc cơ bản giống chất **113** và có thêm 1 nhóm metoxy thế vào vị trí 6 hoặc 8 trên vòng A của khung flavanon (bảng 3.6, 3.7). Khi có thêm nhóm metoxy ở vị trí 6 hoặc 8 thì độ dịch chuyển hóa học của C-5 và C-9 đều chuyển dời về phía trường cao. Nếu nhóm thế ở vị trí 6 thì ảnh hưởng lên C-5 sẽ mạnh hơn C-9 và ngược lại nếu nhóm thế ở vị trí C-8 thì ảnh hưởng lên C-9 sẽ mạnh hơn C-5. Qua việc phân tích phổ kết hợp tham khảo các tài liệu đã công bố chúng tôi xác định cấu trúc của chất **115** là 5-hydroxy-7,8-dimetoxy-flavanon và chất **116** là 5-hydroxy-6,7-dimetoxy-flavanon.

Bảng 3.7: Số liệu phổ ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) của các chất **113, **114**, **115**, **116****

H	113	114	115	116
2	5,39 (dd, 13, 2)	5,37 (dd, 13, 3)	5,48 (dd, 12, 3)	5,42 (dd, 13, 3)
3	2,80 (dd, 17, 2)	2,80 (dd, 17, 3)	2,80 (dd, 17, 3)	2,80 (dd, 17, 3)
	3,06 (dd, 17, 13)	3,10 (dd, 17, 13)	3,10 (dd, 17, 12)	3,10 (dd, 17, 13)
6	6,06 (d, 2)	6,07 (d, 2)	6,12 (s)	-
8	6,02 (d, 2)	6,04 (d, 2)	-	6,13 (s)
2'	7,36 - 7,45 (m)	7,38 (d, 8,5)	7,36 - 7,48 (m)	7,38 - 7,48 (m)
3'		6,95 (d, 8,5)		
4'		-		
5'		6,95 (d, 8,5)		
6'		7,38 (d, 8,5)		
5-OH		12,01		
7-OCH ₃	3,79 (s)	3,80 (s)	3,89 (s)	3,88 (s)
4'-OCH ₃	-	3,83 (s)	-	-
8-OCH ₃	-	-	3,79 (s)	-
6-OCH ₃	-	-	-	3,85 (s)

3.3.2. Các hợp chất chalconoit

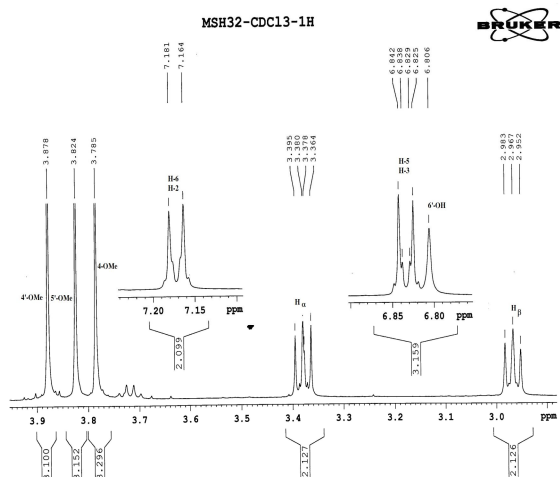
* *Pashanon* (**2',6'-dihydroxy-4',5'-dimetoxy chalcon**) (**199**): Phổ hồng ngoại chỉ ra sự có mặt của nhóm cacbonyl liên hợp (1645 cm^{-1}). Công thức phân tử của chất **199** được xác định là $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$ dựa vào dữ liệu phổ NMR và phổ EI-MS. Các dữ liệu này cũng cho thấy chất **199** có cấu trúc đặc trưng của một chalcon. Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 17 tín hiệu gồm 7 cacbon bậc 4 trong đó có 1 tín hiệu của nhóm cacbonyl liên hợp (192,4 ppm), 6 nhóm CH nhân thơm (92,8 – 128,9 ppm), 2 nhóm olephin (126,7 và 143,4 ppm) và 2 nhóm metoxy (55,6 và 61,4 ppm). Hai tín hiệu duplet ở độ dịch chuyển 7,86 ($J = 15,5\text{ Hz}$) và 8,14 ($J = 15,5\text{ Hz}$) trên phổ ^1H -NMR đặc trưng cho hai proton ở vị trí α và β của khung chalcon. Tín hiệu singlet ở δ_{H} 13,88 là dấu hiệu nhận biết của nhóm hydroxy tạo liên kết cầu hidro với nhóm cacbonyl, cho phép xác định nhóm OH này ở vị trí 2'. Cụm 5 tín hiệu ở δ_{H} 7,38 – 7,64 chỉ ra rằng vòng B trong khung của chất **199** không bị thế. Vị trí của các nhóm thế trên vòng A được khẳng định lại qua phân tích phổ HMBC thông qua các tương tác giữa proton của OH-2' với C-1', C-2' và C-3'; giữa H-3' với C-1', C-5'. Từ đó cho phép kết luận chất **199**

là: 2',6'-dihydroxy-4',5'-dimetoxy chalcon hay còn gọi là pashanon. Chất này đã được phân lập từ cây *Didymocarpus pedicellata*, họ Na (Annonacea) và cây *Onychium auratum*.

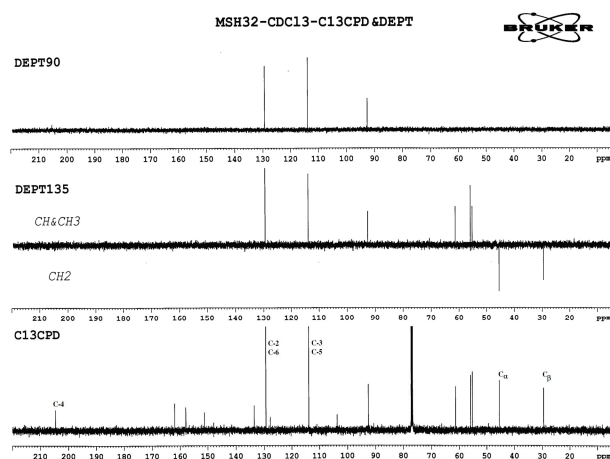
* **Dihydropashanon (112)**: Chất **112** có khối lượng phân tử 302 phù hợp với công thức $C_{17}H_{18}O_5$. Phổ 1H -NMR cho thấy tín hiệu của nhóm $-CH_2-$ ở δ_H 3,03 và 3,42 (t, $J = 8,0$ Hz), hai nhóm metoxy ở δ_H 3,83 và 3,88, tín hiệu singlet của một proton nhân thơm ở δ_H 6,06, các tín hiệu của vòng phenyl ở δ_H 7,21 – 7,31. Giống như chất **199**, trên phổ 1H -NMR của chất **112** cũng xuất hiện tín hiệu của nhóm hydroxy tại δ_H 13,41. Các số liệu trên gợi ý rằng đây là một hợp chất 2'-hydroxy-dihydrochalcon với hai nhóm thế hydroxy, hai nhóm thế metoxy trên vòng A. Phổ ^{13}C -NMR của chất **112** có rất nhiều điểm chung với chất **199** (bảng 3.8), ngoại trừ sự khác nhau về độ dịch chuyển hóa học ở C α và C β cùng với sự dịch chuyển về phía trường thấp của nhóm cacbonyl ($\Delta\delta = 12,1$ ppm). Chất này được phân lập lần đầu tiên từ cây *Lindera erythrocarpa*, họ Long não (Lauraceae).

* **2',6'-Dihydroxy-4',5',4-trimetoxy-dihydrochalcon (200)**

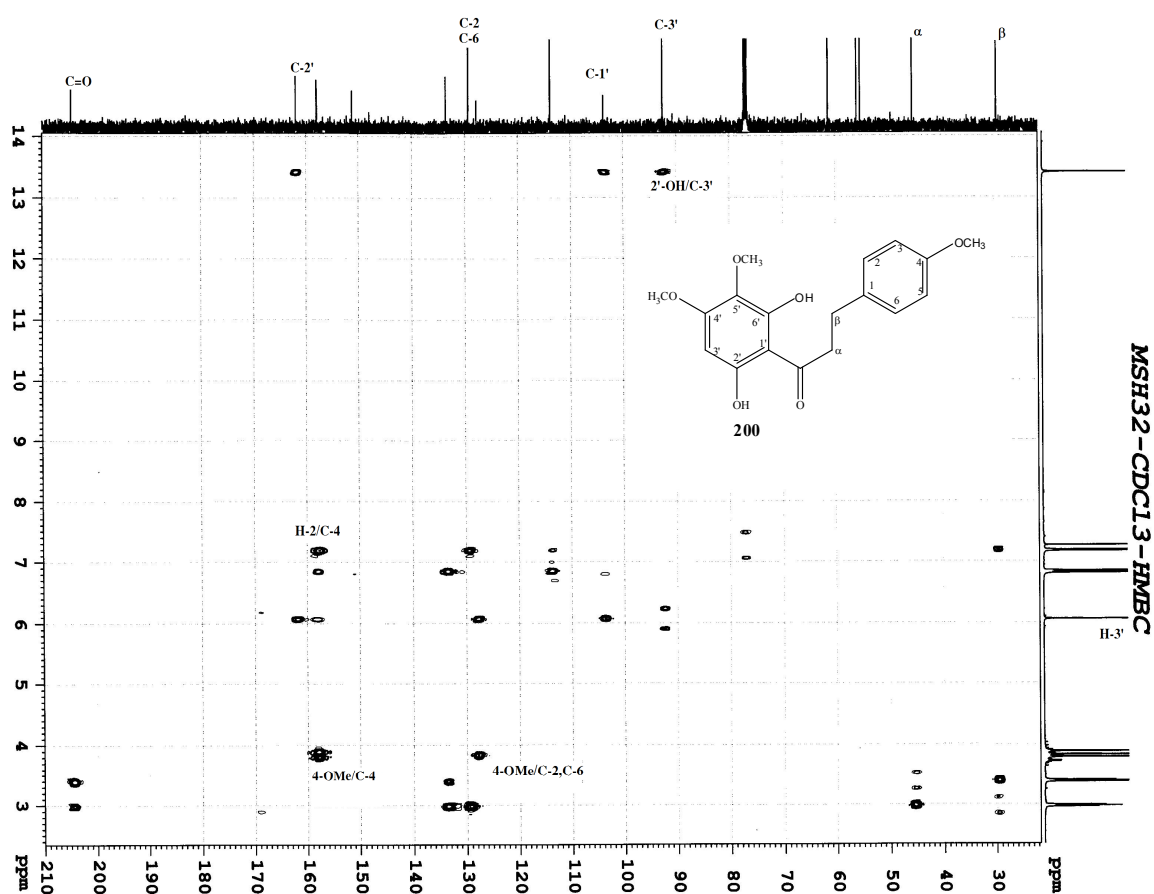
Chất **200** cho pic $[M-H]^-$ tại m/z 331,11889 trên phổ HR-ESI MS, giá trị tính toán lý thuyết cho $C_{18}H_{19}O_6^-$ là 331,11871. Từ đó suy ra công thức phân tử của hợp chất **200** là $C_{18}H_{20}O_6$. Các dữ liệu phổ cho thấy chất **200** có cấu trúc khung dihydrochalcon tương tự như chất **112**. Sự chênh lệch 30 đơn vị khối trong khối lượng phân tử hai chất gợi ý rằng phân tử **200** có thêm 1 nhóm metoxy. Giả thiết này được khẳng định thêm qua việc xuất hiện tín hiệu của nhóm metoxy ở δ_C 55,3 và δ_H 3,78 trên phổ ^{13}C - và 1H -NMR, tương ứng. Nhóm metoxy được thế vào vị trí 4 trên vòng B thể hiện qua sự dịch chuyển của C-4 về phía trường thấp (**200** δ_C 157,9) so với chất **112** (δ_C 126,0). Tín hiệu của 4 proton nhân thơm thuộc vòng B của chất **200** chia thành 2 triplet kép ở δ_H 7,18 (dt, $J = 8,5; 2$ Hz) và 6,84 (dt, $J = 8,5; 2$ Hz) trên phổ 1H -NMR. Nhận định trên được khẳng định thông qua tương tác của nhóm metoxy ở δ_H 3,78 với δ_C 129,4 (C-2, C-6); δ_H 3,78 với δ_C 157,9 (C-4) trên phổ HMBC.



Hình 3.3.7: Phổ ^1H -NMR của hợp chất **200**



Hình 3.3.8: Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **200**



Hình 3.3.10: Phổ HMBC của chất **200**

Qua việc phân tích các phổ hai chiều HSQC, HMBC cấu trúc của **200** được xác định là 2',6'-dihydroxy-4',5',4'-trimethoxy-dihydrochalcon. Theo tra cứu của chúng tôi, cho đến nay chưa có tài liệu nào công bố

về việc phân lập hợp chất này từ tự nhiên. Do vậy, đây là một hợp chất mới từ cây *Milium sinensis*.

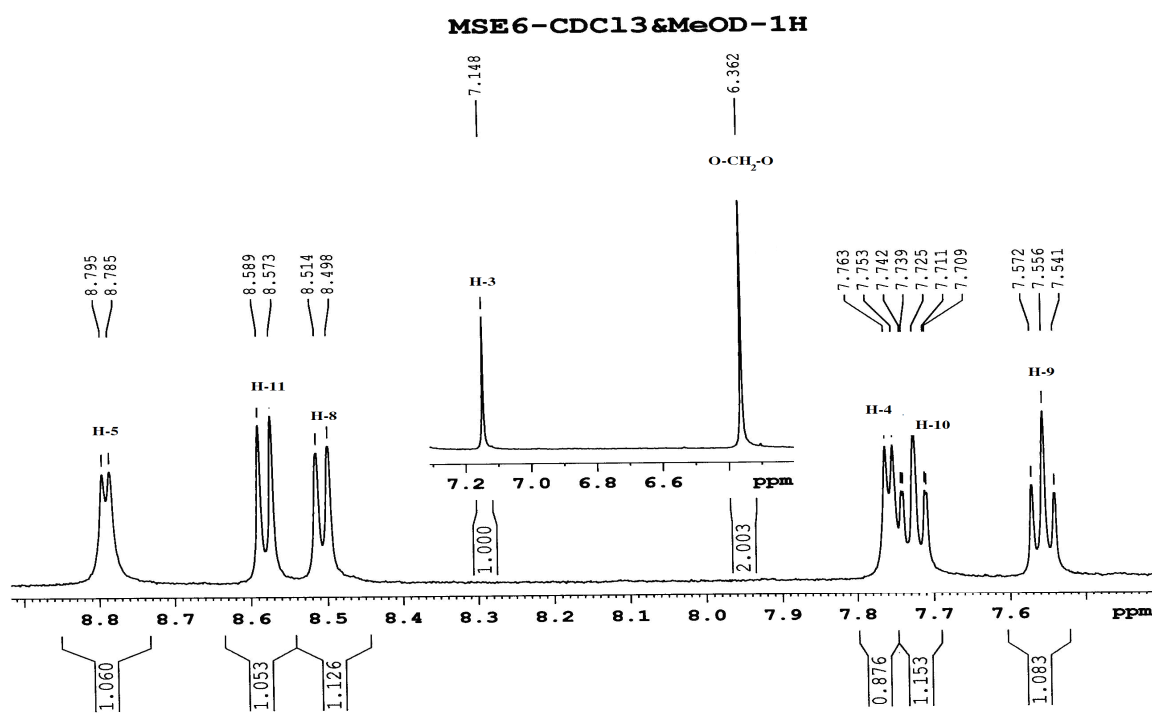
Bảng 3.8: Số liệu phổ ^{13}C -NMR (125 MHz) và ^1H -NMR (500 MHz) của các chất **112, 199, 200** (CDCl_3)

Vi trí	δ_{C}			δ_{H}		
	112	199	200	112	199	200
1	141,6	135,5	133,6	-	-	-
2	128,4	128,6	129,4	7,26 – 7,31	7,64 (dd, 8, 2,5)	7,18 (dt, 8,5; 2)
3	128,5	128,9	113,9		7,38 (t, 8)	6,84 (dt, 8,5; 2)
4	126,0	130,2	157,9	7,21 (tt, 8,5; 1,5)	7,39 (m)	-
5	128,5	128,9	113,9	7,26 – 7,31	7,38 (t, 8)	6,84 (dt, 8,5; 2)
6	128,4	128,6	129,4		7,64 (dd, 8; 2,5)	7,18 (dt, 8,5; 2)
1'	103,8	104,3	103,8	-	-	-
2'	162,0	163,1	162,0	-	-	-
3'	92,6	92,8	92,6	6,07 (s)	6,10 (s)	6,06 (s)
4'	158,0	158,3	158,0	-	-	-
5'	127,8	128,0	127,8	-	-	-
6'	151,2	151,0	151,2	-	-	-
C=O	204,5	192,4	204,6			
C α	45,3	126,7	45,5	3,42 (t, 8)	7,86 (d, 15,5)	3,38 (t, 8)
C β	30,5	143,4	29,6	3,03 (t, 8)	8,14 (d, 15,5)	2,97 (t, 8)
5'-OMe	61,4	61,4	61,4	3,83 (s)	3,86 (s)	3,83 (s)
4'-OMe	56,0	56,0	56,0	3,89 (s)	3,90 (s)	3,89 (s)
4-OMe	-	-	55,3	-	-	3,78 s
6'-OH				6,77 (s)	6,93 (s)	6,80 (s)
2'-OH				13,41 (s)	13,88 (s)	13,40 (s)

* **24-Metylcycloartan-3 β ,21-diol (201)**: Phổ EI-MS chất **201** cho pic $[\text{M}]^+$ tại m/z 456, tương ứng với công thức $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Phổ IR gợi ý sự có mặt của nhóm hydroxy (3350 cm^{-1}) và của liên kết đôi (1650 cm^{-1}). Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 31 cacbon gồm 6 nhóm methyl, 13 nhóm CH_2 , 6 nhóm CH và 6 cacbon bậc 4. Phân tích phổ ^1H - và ^{13}C -NMR cho thấy đây là một hợp chất thuộc khung cycloartan, thể hiện rõ ở tín hiệu 2 proton H-19 của vòng cyclopropan δ_{H} 0,31 và 0,54 (2H, d, $J = 4,5\text{ Hz}$). Cấu hình của nhóm hydroxy này được xác định là β dựa vào tín hiệu của H-3 tại δ_{H} 3,26 (m). Hai tín hiệu proton tại δ_{H} 3,71 (1H, d, $J = 5,5\text{ Hz}$) và 3,60 (1H, dd, $J = 10$ và 4 Hz) chỉ ra một nhóm methylhydroxy ở δ_{C} 62,5. Hai cacbon sp^2 cộng hưởng tại δ_{C} 156,6 và 106,3 (CH_2) tương ứng với một liên kết đôi $>\text{C} = \text{CH}_2$ (δ_{H} 4,72 và 4,67). Kết quả phân tích phổ cho thấy các số liệu phổ của

chất **201** phù hợp với số liệu của 24-metylcycloartan-3 β ,21-diol. Chất này đã được phân lập từ cây *Lithocarpus polystacha*, họ Sồi (Fagaceae).

* **Liriodenin (13)**: Phổ EI-MS của chất **13** cho pic ion phân tử tại $m/z = 275 [M]^+$ ứng với công thức phân tử $C_{17}H_{19}NO_3$. Phổ 1H -NMR cho thấy các tín hiệu của proton thơm từ 7,15 đến 8,85 ppm và một tín hiệu singlet của 2 proton ở δ_H 6,36 - đặc trưng cho proton của nhóm dioxymetylen của khung oxoaporphin ancaloit. Điều này thể hiện rõ hơn trên phổ ^{13}C -NMR với sự có mặt của tín hiệu cacbon tương ứng ở $\delta_C = 102,5$ và đặc biệt là tín hiệu của nhóm xeton tại C-7 ($\delta_C = 182,3$). Việc chỉ xuất hiện các tín hiệu proton thơm trên phổ proton cho thấy các vị trí trên khung là chưa thế. Cặp tín hiệu ở δ_H 8,79 và 7,76 với $J = 5$ Hz rất đặc trưng cho H-5 và H-4. Bốn proton còn lại với hằng số $J = 8$ Hz là các proton của vòng D trong khung. Từ việc phân tích các số liệu phổ kết hợp với so sánh tài liệu, cấu trúc của **13** được xác định là liriodenin.



Hình 3.3.11: Phổ 1H -NMR của hợp chất **13**

***3,5-Dihydroxy-7,3',4'-trimetoxyflavon (202)**: Pic phân tử m/z 344 của hợp chất **202** trên phổ EI-MS ứng với công thức $C_{18}H_{16}O_7$. Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 18 tín hiệu gồm 10 cacbon bậc 4 trong đó có 1 tín hiệu của nhóm cacbonyl liên hợp (175,2 ppm), 5 nhóm CH nhân thơm (92,3 - 123,5

ppm), 3 nhóm metoxy (56,1; 56,0; 55,9 ppm). Vùng nhân thơm trên phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra tín hiệu của 5 proton ở δ_{H} 7,84 – 6,38. Hai tín hiệu duplet ở δ_{H} 6,50 ($J = 2$ Hz) và 6,38 ($J = 2$ Hz) gợi ý rằng vòng A đã bị thế ở hai vị trí C-5 và C-7. Tín hiệu OH ở δ_{H} 11,71 đặc trưng cho OH có liên kết cầu hidro nội phân tử ở vị trí C-5. Ba tín hiệu proton còn lại thuộc về vòng B có δ_{H} 7,83 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz), 7,79 (d, $J = 2,0$ Hz), 7,01 (d, $J = 8,0$ Hz) được gán cho H-6', H-2', H-5'. Ba tín hiệu đơn ở δ_{H} 3,99; 3,97 và 3,90 thuộc về 3 nhóm metoxy. Tóm lại, các dữ liệu phổ của **202** phù hợp với chất đã công bố là 3,5-dihydroxy-7,3',4'-trimetoxylavon được phân lập lần đầu vào năm 1972 từ cây *Lurrea cuneifolia* Cav.

3.3.4. Nhận xét về thành phần hóa học của cây *M. sinensis*: Cây cũng có cùng đặc điểm với các cây đã nghiên cứu cùng chi *Milium* là giàu flavonoid. Bên cạnh đó, thành phần của cây còn có chứa ancaloit và triterpen.

3.4. Kết quả thử hoạt tính sinh học

3.4.1. Kết quả thử hoạt tính vi sinh vật kiểm định

Các dịch chiết và một số hợp chất tách được từ các cây *F. polyanthoides*, *F. poilanei*, *M. sinensis* đã được thử hoạt tính vi sinh vật kiểm định trên 2 chủng gram (-): *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *E. coli* (Ec); 4 chủng gram (+): *Staphylococcus aureus* (Sa), *Bacillus subtilis* (Bs), *Lactobasillus fermentum* (Lf), *Enterococcus faecium* (Ef) và 1 chủng nấm: *Candida albicans* (Ca.).

Kết quả cho thấy dịch chiết etyl axetat của cây *M. sinensis* có hoạt tính đối với chủng vi sinh gram (+): *Staphylococcus aureus*. Hai aporphin ancaloit mới từ cây *F. poilanei*, là các hợp chất **194**: (-)-8-hydroxy-9-metoxyl-1,2-metylendioxyaporphin và **195**: (-)-8-hydroxy-3,9-dimetoxyl-1,2-metylendioxyaporphin có hoạt tính kìm hãm sự phát triển của một số chủng vi sinh vật. Chất **194** có hoạt tính đối với 2 chủng gram (+): *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* với giá trị IC_{50} lần lượt là 14,8 và 18,7 $\mu\text{g/ml}$. Chất **195** cũng có hoạt tính với 2 chủng này với giá trị IC_{50}

tương ứng là 15,5 và 29,8 µg/ml. Bên cạnh đó, chất **195** còn có hoạt tính với 2 chủng *Lactobasillus fermentum*, *Enterococcus faecium* với giá trị IC₅₀ tương ứng là 38,8 và 41,4 µg/ml. Đáng chú ý là chất **13** (liriodenin) từ cây *Milium sinensis*; hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế đối với cả 4 chủng vi khuẩn gram (+) và chủng nấm men *C. albicans*. Trong đó, hoạt tính ức chế mạnh với 2 chủng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* với giá trị IC₅₀ tương ứng là 0,59 và 0,68 µg/ml.

Bảng 3.9: Kết quả thử hoạt tính vi sinh vật kiểm định

STT	Tên mẫu	Tên chủng vi sinh vật kiểm định						
		Lf IC ₅₀ (µg/ml)	Ef IC ₅₀ (µg/ml)	Sa IC ₅₀ (µg/ml)	Bs IC ₅₀ (µg/ml)	Ec IC ₅₀ (µg/ml)	Pa IC ₅₀ (µg/ml)	Ca IC ₅₀ (µg/ml)
Cây <i>F. polyanthoides</i>								
1	Cặn n-hexan	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
2	Cặn EtOAC	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
3	Cặn BuOH	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Cây <i>F. poilanei</i>								
4	Cặn n-hexan	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
5	Cặn EtOAC	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
6	Cặn BuOH	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Cây <i>Milium sinensis</i>								
7	Cặn n-hexan	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
8	Cặn EtOAC	> 256	> 256	153	> 256	> 256	> 256	> 256
9	Cặn BuOH	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Chất sạch								
10	Chất 194	> 128	> 128	14,8	18,7	> 128	> 128	> 128
11	Chất 195	38,8	41,4	15,5	29,8	> 64	> 64	> 64
12	Chất 200	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
13	Chất 202	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
14	Chất 13	8,95	10,18	0,59	0,68	> 256	> 256	6,94

3.4.2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết và một số hợp chất tách được từ các cây *F. polyanthoides*, *F. poilanei* và *M. sinensis* cũng đã được thử trên 4 dòng tế bào ung thư người là: ung thư biểu mô KB; ung thư gan Hep G2; ung thư phổi LU; ung thư vú MCF – 7.

Dịch chiết n-hexan và etyl axetat của cây *M. sinensis* có hoạt tính với cả 4 dòng tế bào, trong đó có hoạt tính tốt hơn đối với dòng tế bào Hep G2.

Đáng chú ý là cả 2 aporphin ancaloit mới từ cây *F. poilanei*, là chất **194** và **195** đều có hoạt tính đối với cả 4 dòng tế bào ung thư. Trong đó, hợp chất **194** thể hiện hoạt tính mạnh nhất với dòng tế bào MCF – 7 với IC_{50} là 4,11 $\mu\text{g/ml}$ trong khi hợp chất **195** có hoạt tính gây độc mạnh với dòng tế bào Hep G2 (IC_{50} 3,39 $\mu\text{g/ml}$).

Chất **13**, liriodenin, một oxoaporphin ancaloit từ cây *M. sinensis* cũng thể hiện hoạt tính đối với cả 4 dòng tế bào ung thư, trong đó hoạt tính mạnh với hai dòng tế bào KB và MCF – 7 với IC_{50} tương ứng là 2,30 và 2,89 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 3.10: Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

STT	Tên mẫu	Tên dòng tế bào			
		MCF 7 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Lu IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	HepG ₂ IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	KB IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Cây <i>F. polyanthoides</i>					
1	Cặn n-hexan	>128	-	-	>128
2	Cặn EtOAC	>128	-	-	>128
3	Cặn BuOH	>128	-	-	>128
Cây <i>F. poilanei</i>					
4	Cặn n-hexan	>128	>128	62,24	59,87
5	Cặn EtOAC	>128	-	-	>128
6	Cặn BuOH	>128	-	-	>128
Cây <i>Milium sinensis</i>					
7	Cặn n-hexan	86,60	78,33	36,72	82,04
8	Cặn EtOAC	72,52	75,09	42,50	59,13
9	Cặn BuOH	>128	-	-	>128
Chất sạch					
10	Chất 194	4,11	7,20	6,30	8,86
11	Chất 195	7,85	8,51	3,59	7,05
12	Chất 200	>128	>128	>128	>128
13	Chất 202	>128	>128	>128	>128
14	Chất 13	2,89	6,66	5,23	2,30

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Từ cây Cách thư đa hùm (*Fissistigma polyanthoides*) đã phân lập được 5 hợp chất là các flavonoid là: taxifolin (**162**), -(-)-epicatechin (**190**),

kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosit (191), quercetin-3-O- β -D-glucopyranosit (192) và rutin (193).

2. Từ lá và cành của cây Cách thư poilanei (*Fissistigma poilanei*) đã phân lập được 7 hợp chất thuộc khung aporphin ancaloit và flavonoit gồm: 8-hydroxy-9-metoxi-1,2-metylendioxyaporphin (194), 8-hydroxy-3,9-dimetoxi-1,2-metylendioxyaporphin (195), hỗn hợp của oxocrebanin (14) và kuafumin (16), astilbin (196), catechin-3-O- α -L-rhamnopyranosit (197) và quercetin-3,7-dimetoxi-3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosit (198). Trong đó, **chất 194 và 195 là hai hợp chất mới**. Đây là các kết quả nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học của cây *F. poilanei*.

3. Từ lá và cành của cây Song môi tàu (*Milium sinensis*), đã phân lập được 10 hợp chất gồm 4 flavanon, 3 chalconoit, 1 triterpen, 1 oxoaporphin ancaloit và 1 flavon. Đó là: pinostrobin (113), 5-hydroxy-7,4'-dimetoxi-flavanon (114), 5-hydroxy-7,8-dimetoxi-flavanon (115), 5-hydroxy-6,7-dimetoxi-flavanon (116), dihydropashanon (112), pashanon (199), 2',6'-dihydroxy-4',5',4-trimetoxi-dihydrochalcon (200), 24-metylcycloartan-3 β ,21-diol (201), liriodenin (13), 3,5-dihydroxy-7,3',4'-trimetoxi-flavon (202). Trong đó, **chất 200 là hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên**.

4. Các dịch chiết và một số hợp chất phân lập được từ 3 cây nghiên cứu trên đã được thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính gây độc tế bào. Kết quả cho thấy chất mới 194 có hoạt tính ức chế đối với 2 chủng gram (+): *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (IC₅₀: 14,8; 18,7 μ g/ml). Chất mới 195 có hoạt tính ức chế với các chủng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Lactobasillus fermentum*, *Enterococcus* (IC₅₀: 15,5; 29,8; 38,8; 41,4 μ g/ml). Cả hai ancaloit mới đều có hoạt tính ức chế đối với cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Hợp chất 194 thể hiện hoạt tính mạnh nhất với dòng tế bào ung thư vú MCF – 7 (IC₅₀: 4,11 μ g/ml) trong khi hợp chất 195 có hoạt tính gây độc mạnh với dòng tế bào ung thư gan Hep G2 (IC₅₀ 3,39 μ g/ml). Bên cạnh hoạt tính ức chế khá mạnh sự phát triển của 4 chủng vi khuẩn gram (+) và chủng nấm *C. albicans*, hợp chất

13 - liriodenin - cũng thể hiện hoạt tính đối với cả 4 dòng tế bào ung thư, trong đó hoạt tính ức chế mạnh với hai dòng ung thư biểu mô KB và ung thư vú MCF – 7 (IC₅₀: 2,30; 2,89 µg/ml).

KIẾN NGHỊ

Nên tiếp tục nghiên cứu sâu, rộng hơn về hoạt tính sinh học của các chất mới được phát hiện là **194**, **195** và liriodenin (**13**).

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Thị Thanh Thủy, Trần Đức Quân, Phạm Thị Ninh, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Trần Văn Sung, 2009. Nghiên cứu thành phần hóa học cây Cách thu đa hùm [*Fissistigma polyanthoides* (DC.) Merr.] họ Na (Annonaceae). Tạp chí Hóa học, T.47 (4A) tr 455 – 458.
2. Tran Thi Thanh Thuy, Tran Duc Quan, Nguyen Thi Hoang Anh, Tran Van Sung, 2008. Aporphine and Oxoaporphine from *Fissistigma poilanei* (Ast) Tsiang & P. T. Li (Annonaceae). International Scientific Conference on “Chemistry for Development and Intergration”- Proceeding, Publishing House for Science and Technology, Hanoi, Vietnam, 9/2008, 234-239.
3. Trần Thị Thanh Thủy, Trần Đức Quân, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Trần Văn Sung, 2007. Flavonol glucosit và flavan từ cây Cách thu đa hùm [*Fissistigma polyanthoides* (DC.) Merr.] họ Na (Annonaceae). Tạp chí Hóa học, T.45 (6A) tr 162 – 165.
4. Tran Thi Phuong Thao, Nguyen Vu Anh, Ho Ngoc Anh, Tran Duc Quan, Nguyen Thi Hoang Anh, Tran Thi Thanh Thuy, Tran Van Sung; Chemical studies on the two Vietnamese medicinal plants, *Fissistigma petelotii* and *Fissistigma polyanthoides* (Annonaceae). Proceeding of 6. Vietnam-Japan Joint Symposium for Biotechnology and Material Science, Cantho, Vietnam, **2/2008**, 12-18.
5. Trần Thị Thanh Thủy, Trần Đức Quân, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Trần Văn Sung, 2009. Flavonol glycosit từ cây Cách thu poilanei [*Fissistigma poilanei* (Ast.) Tsiang & P.T.Li] họ Na (Annonaceae). Tạp chí Hóa học 47 (4), 434 - 437.