

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Ngọc An

**KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH
ỨC CHẾ ENZYME ALPHA GLUCOSIDASE CỦA
LOÀI ĐỊA Y *PARMOTREMA TINCTORUM***

LUẬN VĂN THẠC SĨ
Hóa hữu cơ

NGUYỄN NGỌC AN

HÓA HỮU CƠ

2022

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Ngọc An

**KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH
ỨC CHẾ ENZYME ALPHA GLUCOSIDASE CỦA
LOÀI ĐỊA Y *PARMOTREMA TINCTORUM***

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ
Mã số: 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
Hóa hữu cơ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
TS. Đinh Văn Phúc
PGS. TS. Lê tiến Dũng

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VN**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do – Hạnh phúc**

NHIỆM VỤ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên học viên: NGUYỄN NGỌC AN Mã số học viên: 20803063
Điện thoại: 096.916.9817 Email: ngocan12021997@gmail.com
Chuyên ngành: Hóa hữu cơ Mã số chuyên ngành: 8440114
Lớp: Hóa hữu cơ – 2020B Khóa: 2020B

I. TÊN ĐỀ TÀI: Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme alpha glucosidase của loài địa y *Parmotrema tinctorum*.

II. NHIỆM VỤ VÀ NỘI DUNG:

1. Phân lập, xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất được phân lập từ các phân đoạn cao EA ở địa y *Parmotrema tinctorum*.
2. Thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trên cao chiết và một số hợp chất được phân lập từ cao EA của loài địa y *Parmotrema tinctorum*.

III. NGÀY NHẬN NHIỆM VỤ: 1/3/2022

IV. NGÀY HOÀN THÀNH NHIỆM VỤ: 1/9/2022

V. CÁN BỘ HƯỚNG DẪN:

Hướng dẫn 1:

Họ và tên: Đinh Văn Phúc Học hàm, học vị: TS
Cơ quan công tác: Đại học Duy Tân

Hướng dẫn 2:

Họ và tên: Lê Tiến Dũng Học hàm, học vị: PGS. TS
Cơ quan công tác: Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng Tp.HCM

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 03 tháng 12 năm 2022

Cán bộ hướng dẫn
Hướng dẫn 1 Hướng dẫn 2

Học viên cao học

TS. Đinh Văn Phúc

PGS. TS. Lê Tiến Dũng

Nguyễn Ngọc An

LỜI CAM ĐOAN

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

Tp.HCM, ngày 03 tháng 12 năm 2022

Học viên

Nguyễn Ngọc An

LỜI CẢM ƠN

Luận văn được thực hiện và hoàn thành tại Phòng Hóa hữu cơ, Viện Sinh thái học miền Nam, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

Với tâm lòng trân trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn đến:

☞ **TS. Đinh Văn Phúc** - người thầy đã truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức chuyên môn, luôn theo sát hướng dẫn tận tình, không ngại khó khăn, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất về vật chất lẫn tinh thần để tôi có thể hoàn thiện đề tài một cách thuận lợi nhất có thể.

☞ **PGS. TS. Lê Tiên Dũng** đã chia sẻ những kinh nghiệm quý báu và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trên con đường hoàn thiện tư duy khoa học và thực hiện luận văn.

☞ **TS. Nguyễn Văn Kiều** đã tận tình hướng dẫn và dành thời gian sửa chữa, đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho luận án, luôn quan tâm động viên tôi trên con đường học tập và nghiên cứu khoa học trong nhiều năm qua.

☞ **ThS. Trần Thanh Nhã** cùng các anh chị nghiên cứu sinh, học viên Cao học khác luôn theo sát hỗ trợ, truyền đạt những kiến thức, kỹ năng, kỹ xảo và hướng dẫn tận tình trong suốt khoảng thời gian thực hiện đề tài.

☞ Tất cả quý **Thầy Cô** trong **Bộ Môn Hóa Hữu Cơ – Học viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam** đã truyền đạt kiến thức, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện luận án.

☞ Lời cảm ơn đến toàn thể các bạn trong **Phòng Thí nghiệm Vật liệu Tiên tiến và Tương lai, Viện Nghiên cứu Khoa học Cơ bản và Ứng dụng, trường ĐH Duy Tân.**

☞ **Gia đình** đã luôn động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành tốt trong khoảng thời gian học tập của mình.

*Cuối cùng tôi xin kính chúc mọi người luôn hạnh phúc,
đôi dào sức khỏe và thành công hơn nữa trong công việc.*

Xin chân thành cảm ơn !

Nguyễn Ngọc An

MỤC LỤC

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	1
1.1. GIỚI THIỆU VỀ ĐỊA Y	1
1.2. MÔ TẢ VỀ CHI <i>PARMOTREMA</i>	2
1.3. ĐỊA Y <i>PARMOTREMA TINCTORUM</i>	3
1.3.1. Giới thiệu chung	3
1.3.2. Phân loại	4
1.3.3. Mô tả thực vật	4
1.3.4. Phân bố	5
1.3.5. Thành phần hóa học	5
1.3.6. Hoạt tính sinh học	8
1.3.6.1. Kháng nấm	9
1.3.6.2. Kháng khuẩn	9
1.3.6.3. Kháng virus	9
1.3.6.4. Kháng oxi hóa	9
1.3.6.5. Kháng ung thư	10
1.3.6.6. Khả năng ức chế enzyme	10
1.4. ĐÁI THÁO ĐƯỜNG	10
1.4.1. Khái niệm	10
1.4.2. Phân loại	12
1.4.3. Phương pháp kiểm tra người mắc bệnh và điều trị phổ dụng	13
1.4.3.1. Phương pháp kiểm tra người mắc bệnh	13
1.4.3.2. Phương pháp điều trị Đái tháo đường	14
1.4.4. Enzyme α-glucosidase	15
1.4.4.1. Khái niệm	15
1.4.4.2. Tác nhân ức chế	16
1.4.5. Nhóm hợp chất, hợp chất ức chế enzyme α-glucosidase	16
Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. NGUYÊN LIỆU VÀ HOÁ CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ	19
2.1.1. Nguyên liệu	19

2.1.2. Hóa chất.....	19
2.1.3. Thiết bị và dụng cụ.....	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.2.1. Phương pháp chiết cao, phân lập và phân tách các hợp chất	20
2.2.1.1. Phương pháp chiết cao	20
2.2.1.2. Phương pháp phân lập các hợp chất.....	20
2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất	20
2.2.2.1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)	21
2.2.2.2. Phổ khối (MS).....	21
2.2.2.3. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)	21
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.....	21
2.2.3.1. Nguyên tắc	21
2.2.3.2. Quy trình thực hiện	21
2.2.3.3. Tính toán kết quả.....	22
Chương 3. THỰC NGHIỆM.....	23
3.1. CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU.....	23
3.2. ĐIỀU CHẾ CAO ETYL ACETATE (CAO EA)	23
3.3. TRÍCH LY, CÔ LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT HỮU CƠ.....	23
3.3. THÔNG TIN CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC	26
3.3.1. Hợp chất A1	26
3.3.2. Hợp chất A2	26
3.3.4. Hợp chất A3	26
3.3.3. Hợp chất A4	26
3.3.5. Hợp chất A5.....	27
Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
4.1. NHẬN DANH CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP	28
4.1.1. Biện luận cấu trúc A1	28
4.1.2. Biện luận cấu trúc A2	32
4.1.3. Biện luận cấu trúc A3	36
4.1.4. Biện luận cấu trúc A4	39
4.1.5. Biện luận cấu trúc A5	43

4.1.6. Tổng hợp các hợp chất đã được phân lập.....	47
4.2. KẾT QUẢ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α - GLUCOSIDASE.....	48
Chương 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	50
5.1. KẾT LUẬN.....	50
5.2. KIẾN NGHỊ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO	51
CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ.....	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO	57
PHỤ LỤC	65

DANH MỤC CÁC BẢNG, HÌNH VẼ, SƠ ĐỒ

Bảng

Bảng 1.1. Hoạt tính kháng khuẩn của <i>P. tinctorum</i>	9
Bảng 1.2. Các trường hợp được xem là mắc bệnh đái tháo đường	14
Bảng 4.2. Tổng hợp phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất A1	32
Bảng 4.3. So sánh phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ giữa hợp chất A2 và zeorine	35
Bảng 4.4. Biểu diễn phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất A3 và so sánh phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của A3 và 6α-acetoxyhopan-16β,22-diol	38
Bảng 4.5. So sánh phổ ^1H & $^{13}\text{C-NMR}$ giữa hợp chất A4 và acid belulinic	42
Bảng 4.6. So sánh phổ ^1H & $^{13}\text{C-NMR}$ giữa hợp chất A5 và reticulatin	45
Bảng 4.7. Kết quả phần trăm ức chế và IC_{50} của các cao so với acarbose.....	48

Hình vẽ

Hình 1.1. Các dạng địa y	1
Hình 1.2. Một số loài địa y thuộc chi <i>Parmotrema</i>	2
Hình 1.3. Một số dạng địa y <i>Parmotrema tinctorum</i>	3
Hình 1.4. <i>Parmotrema tinctorum</i>	4
Hình 1.5a. Các hợp chất cô lập từ địa y <i>Parmotrema tinctorum</i>	6
Hình 1.5b. Các hợp chất cô lập từ địa y <i>Parmotrema tinctorum</i>	7
Hình 1.5c. Các hợp chất cô lập từ địa y <i>Parmotrema tinctorum</i>	8
Hình 1.6. Mô hình biểu diễn hoạt động bất thường của Đái tháo đường loại 1 và 2 so với hoạt động bình thường của tuyến tụy.....	13
Hình 3.1. Mẫu địa y thu được từ tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.	23

Sơ đồ

Sơ đồ 1. Các yếu tố dẫn đến sự gia tăng bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường trong nước (Tính đến năm 2017).....	11
Sơ đồ 2. Dự đoán sự gia tăng bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường trên toàn thế giới (Tính đến năm 2021).....	12
Sơ đồ 3. Quy trình chiết xuất từ địa y <i>Parmotrema tinctorum</i>	25

Danh mục các ký hiệu, các chữ cái viết tắt

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Dung môi		
H	<i>n</i> -Hexane	
C	Chloroform	
EA	Ethyl acetate	
EtOH	Ethanol	
M	Methanol	
DMSO- <i>d</i> ₆	DiMethyl SulfOxid - <i>d</i> ₆	
CDCl ₃	Deuterated Chloroform	
Các loại phổ xác định cấu trúc		
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
¹³C-NMR	Carbon (13) Nuclear Magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon C đồng vị 13
¹H-NMR	Hydro (1) Nuclear Magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton đồng vị 1
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương quan giữa H-C qua một nối
H-H COSY	H-H Correlation Spectroscopy	Tương quan giữa H-H
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ hiệu ứng hạt nhân Overhauser
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization-Mass Spectrometry	Khối phổ ion hóa bằng kỹ thuật phun điện phân giải cao
UV-Vis	Ultraviolet Visible Spectroscopy	Phổ tử ngoại- khả kiến
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
FT-MS	Fourier Transform-Mass Spectroscopy	Khối phổ biến đổi Fourier
Đơn vị		
ppm	Part per million	Một phần triệu
g	Gram	Gam
mg	miligram	Miligam

mmol	milimol	Milimol
mL	miliLiter	MiliLít
kg	Kilogram	Kilogam
μg	microgram	Microgam
μL	microLiter	MicroLít
U/mL	International Units per milliLite	1 Đơn vị enzyme trên miliLít

Các ký hiệu trong phổ

δ	Chemical shift	Tín hiệu
<i>s</i>	Singlet	Mũi đơn
<i>brs</i>	Broad singlet	Mũi đơn rộng
<i>d</i>	Doublet	Mũi đôi
<i>dd</i>	Doublet – doublet	Mũi đôi đôi
<i>td</i>	Triplet – doublet	Mũi ba đôi
<i>m</i>	Multiplet	Mũi đa
<i>J</i>	Coupling constant	Hằng số ghép

Các kí hiệu khác

SKLM		Sắc kí lớp mỏng
SKC		Sắc kí cột
CTPT		Công thức phân tử
R_f	Retenion factor	Hệ số lưu giữ
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc kí lớp mỏng
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
RP-18	Reversed Phase C-18	Silica gel pha đảo
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration	nồng độ ức chế 50%
<i>OD</i>	Optical Density	Mật độ quang học
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test	Dung nạp glucose bằng đường uống
SGLT2	Sodium-GLucose Cotransporter 2	Nhóm ức chế kênh đồng vận chuyển natri-glucose
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1	Thuốc đồng vận thụ thể
HbA _{1c}	Haemoglobin A _{1c}	Huyết sắc tố A _{1c}

MỞ ĐẦU

Từ thời kì trung cổ, địa y được các học viên y tế đánh giá cao trong việc điều trị các bệnh, cụ thể: *Lobaria pulmonaria* được sử dụng để điều trị các bệnh về phổi [1], *Parmelia sulcata* là một phương thuốc chữa bệnh sốt rét não [2], *Xanthoria parietina* chữa bệnh vàng da [3], ... Việc sử dụng địa y trong y học dân gian đã tồn tại từ xa xưa cho đến bây giờ [4]. Hơn nữa, địa y cũng được sử dụng để điều chế thực phẩm, mỹ phẩm, xà phòng, nước hoa, các loại tinh dầu và dẫn xuất khác nhau, ... từ các loài *Usnea*, *Evernia*, *Parmelia* và *Ramalina* [5].

Trên thế giới, các nghiên cứu về sự tách chiết các hợp chất từ địa y cho thấy nó chứa một lượng lớn các chất thứ cấp bao gồm depside, depsidone, dibenzofuran, xanthone, terpene. Bên cạnh các nghiên cứu về thành phần hóa học, những công trình khảo sát hoạt tính sinh học cho thấy các chất từ địa y có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư, kháng virus HIV,... [6].

Năm 2006, hệ thực vật ở Việt Nam ước tính có khoảng 1000 loài địa y, có 275 loài đã được thống kê, trong đó 122 loài mới lần đầu tiên được ghi nhận [7]. Một số nghiên cứu cho thấy địa y chứa các hợp chất có cấu trúc hóa học đặc biệt cũng như có khả năng gây độc tế bào ung thư biểu mô ruột kết HTC116, ức chế DNA polymerase. Nghiên cứu trên đối tượng địa y đang là một hướng đi mới mẻ trong hóa học các hợp chất thiên nhiên ở nước ta [7-8]. Những năm gần đây, địa y được xem như một nguồn khảo sát có giá trị, khi các báo cáo về đặc tính hấp thụ kim loại, xử lý chất độc từ môi trường hay hoạt tính sinh học được đánh giá cao và có tiềm năng ứng dụng thực tiễn.

Trong đó, địa y *Parmotrema tinctorum* ở Việt Nam là loài đáng được quan tâm, vì đến nay có rất ít nghiên cứu được đề cập tới [9]. Trong đó, cao chiết từ ethyl acetate và ethanol có thành phần chính là acid usnic, sở hữu cao nhất tiềm năng ức chế các enzyme tiêu hóa carbohydrate và aldose reductase [9]. Nghiên cứu sâu hơn về điều này có thể dẫn đến sự phát triển thuốc chống đực tinh thể do bệnh Đái tháo đường và bệnh võng mạc [10]. Mới đây các kết quả cho thấy loài địa y này có khả năng kháng virus viêm gan C (HCV) [11]. Các hợp chất được công bố chủ yếu là các chất chính trong địa y, ví dụ như các hợp chất phenolic, cho thấy các nghiên cứu chưa tập trung nhiều vào các hợp chất có hàm lượng nhỏ. Với những lý do trên, cùng mong muốn làm đa dạng cơ sở khoa học về thành phần loài và tìm kiếm các hợp chất có nhiều hoạt tính hấp dẫn trong tự nhiên, cung cấp

nguyên liệu cho thử nghiệm sinh học và hóa học, nên loài địa y *Parmotrema tinctorum* được chọn tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trên các cao chiết và các hợp chất tinh khiết phân lập được.

Mục tiêu của đề tài: “Khảo sát thành phần hoá học và hoạt tính ức chế enzyme alpha glucosidase của loài địa y *Parmotrema tinctorum*” là:

- Phân lập các chất tinh khiết từ địa y *Parmotrema tinctorum*.
- Xác định cấu trúc các chất đã phân lập được.
- Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase từ các hợp chất đã được phân lập.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ ĐỊA Y

Địa y là loài thực vật bậc thấp đặc biệt, cộng sinh giữa nấm, tảo và vi khuẩn lam và thường được phân chia thành 3 dạng: Khảm, Sợi, Tảng [12] (**Hình 1.1**). Vì thế, địa y có thể sống được ở nhiều nơi từ vùng khô hạn đến vùng khắc nghiệt [13]. Nhờ khả năng sinh sống đặc biệt đó, dẫn đến sự đa dạng về thành phần hóa học trong hầu hết các loài thuộc sinh vật này [14]. Từ lâu, địa y được sử dụng rộng rãi như những phương thuốc dân gian ở New Zealand, Ấn Độ, Nepal và Trung Quốc [15]. Đến năm 2019, có khoảng 18.500 loài địa y khác nhau đã được mô tả hình thái trên khắp toàn thế giới, với hơn 800 chất chuyển hóa thứ cấp của địa y đã được phát hiện [16]. Nhiều tài liệu tham khảo cho biết địa y thường chứa các loại hợp chất như depside, depsidone, dẫn xuất dibenzofuran, acid usnic, terpenoid, ... Các chất chuyển hóa của địa y đã được chứng minh là có hoạt tính sinh học đa dạng như kháng khuẩn, kháng virus, gây độc tế bào ung thư, kháng u, dị ứng, ức chế tăng trưởng thực vật, chất ức chế enzyme... [15–18]. Ngoài ra, một số chất chuyển hóa địa y có khả năng hoạt động như chất khử trong sản xuất hạt nano đã thu hút nhiều sự chú ý (như sản xuất hạt nano bạc - AgNP) [19].



Xanthoria sp.
Dạng Khảm



Xanthoparmelia sp.
Dạng Tảng



Usnea sp.
Dạng Sợi

Hình 1.1. Các dạng địa y

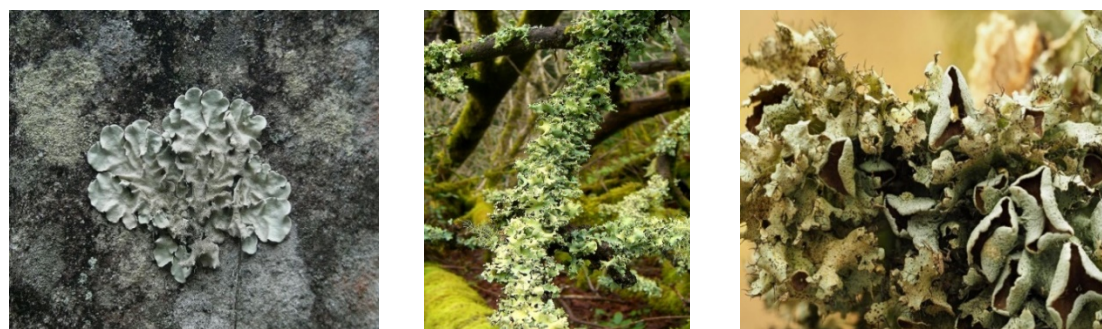
Có nhiều cách phân loại chất địa y, nhưng cách phân loại được sử dụng phổ biến nhất đó là phân loại Shibata, được sửa đổi bởi Shibata và những người đóng góp [4]. Các chất được chia thành bốn loại chuyên ngành:

- ✚ Nguồn gốc shikimic acid: Terphenylquinone và các dẫn xuất axit tetronic.
- ✚ Nguồn gốc mevalonic acid: Triterpenoide.

- ✚ Nguồn gốc axetate-malonate: Acid béo và acid carboxylic phenolic cao hơn.
- ✚ Nguồn gốc amino acid: Dẫn xuất diketopiperazine.

1.2. MÔ TẢ VỀ CHI *PARMOTREMA*

Chi *Parmotrema* là chi lớn thuộc họ Parmeliaceae [20]. Tính đến năm 2016, chi này được xác định chứa khoảng hơn 350 loài [21-22]. Phân bố chủ yếu ở các vùng nhiệt đới, đặc biệt là Quần đảo Thái Bình Dương và Nam Mỹ [23-24].



Parmotrema tinctorum *Parmotrema chinense* *Parmotrema perforatum*

Hình 1.2. Một số loài địa y thuộc chi *Parmotrema*

Qua khảo sát, nhận thấy sự hiện diện của carbohydrate, phenol, flavanoid, tannin, terpenoid, coumarin, saponin và chính điều này có thể là cơ sở cho sự đa dạng về hoạt tính sinh học của loài [9].

Chi *Parmotrema* đặc trưng bởi dạng phiến ngắn và rộng, hiếm khi kéo dài; thùy có lông, vỏ ngoài xốp, bào tử đính hình trụ, rễ ngắn và nhỏ, bao gồm các dạng địa y trung gian giữa chi *Cetraria* và loài *Xanthoparmelia*. Mặt dưới của phiến lá có màu trắng đến đen. Các chuyển hóa thứ cấp ở loài thường được sinh ra trong tủy của cây [25].

Tính đến năm 2013, có 36 loài địa y thuộc chi *Parmotrema* được xác định là ít có báo cáo về phân tích hình thái và khảo sát thành phần hóa học [21], [25], trong đó có một số loài tiêu biểu như:

- *Parmotrema conformatum*
- *Parmotrema dilatatum*
- *Parmotrema lichexanthonicum*
- *Parmotrema mellissii*
- *Parmotrema reticulatum*
- *Parmotrema saccatilobum*
- *Parmotrema sancti-angelii*
- *Parmotrema stuppeum*

- *Parmotrema nilgherrense*
- *Parmotrema planatilobatum*
- *Parmotrema praesorediosum*
- *Parmotrema cristiferum*
- *Parmotrema crocoides*
- *Parmotrema subsidiosum*
- *Parmotrema tinctorum*
- *Parmotrema tsavoense*
- *Parmotrema eciliatum*
- *Parmotrema dilatatum*

1.3. ĐỊA Y *PARMOTREMA TINCTORUM*

1.3.1. Giới thiệu chung

Parmotrema tinctorum (*P. tinctorum*) (**Hình 1.3**) là một trong những loài địa y đặc trưng trong chi *Parmotrema* thuộc dòng địa y Parmeliaceae được tìm thấy phổ biến ở Việt Nam [26]. Trên thế giới, loài địa y này chủ yếu được ứng dụng làm thực phẩm hoặc ứng dụng trong lĩnh vực phân tích và xử lý môi trường [27-34].



Hình 1.3. Một số dạng địa y *Parmotrema tinctorum*

Địa y *P. tinctorum* được sử dụng rộng rãi ở Ấn Độ và Nepal, chủ yếu là làm gia vị và hương liệu thực phẩm [27]. Sinh khối của loài địa y này được nghiên cứu có khả năng hấp phụ uranium(VI), hấp phụ và khử plutonium(VI) thành plutonium(V) [28] và hấp phụ cobalt [29] từ môi trường xung quanh. Ngoài ra, *P. tinctorum* còn được dùng trong việc ứng dụng phân tích chất lượng không khí ở các khu đô thị và rừng ở Brazil thông qua các đặc điểm về các sắc tố quang hợp, đặc điểm hình thái và thành phần kim loại nặng như Pb, Cr, Zn, Hg, ... [30], [31], [32], hay nghiên cứu phân loại mức độ ô nhiễm không khí bởi ngành công nghiệp hóa dầu ở Thái Lan [33-34].

1.3.2. Phân loại [35–37]

Tên khoa học: *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale.

Tên gọi khác: *Parmelia tinctorum*, *Parmelia tinctoria*, Lichen chinensis.

Giới (kingdom): Nấm

Ngành (phylum): Pezizomycotina

Lớp (class): Lecanoromycetes

Bộ (order): Lecanorineae

Họ (family): Parmeliaceae

Chi (genus): *Parmotrema*

Loài (species): *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale

1.3.3. Mô tả thực vật [25], [35], [38]

Địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale là loài địa y có màu xám trắng (hoặc xám xanh) đến xám thẫm, đường kính cơ sở có thể lên đến 18cm. Phiến rộng, thùy phân nhánh không đều có độ rộng 3-25mm, xếp chồng chéo từng phiến hoặc lớp lên nhau, đôi khi xuất hiện thùy đôi. Màng tế bào, đường gân hiện rõ bên ngoài và không có lông phủ. Sinh trưởng cùng nhau nhưng không có mối liên hệ trực tiếp. Phần trung tâm của phiến thường bị rạn nứt và xếp chồng lên nhau. Mặt trên phiến thường có màu xám nhạt, phía dưới có màu xanh thẫm và bóng. Vùng cận biên màu nâu, nâu và đen luân phiên đa dạng hoặc đôi khi hoàn toàn đen, có nếp gấp lại, được giới hạn rõ ràng và mịn màng.



Hình 1.4. *Parmotrema tinctorum* [35]

Quá trình sinh trưởng thuận lợi của loài thường trong các môi trường có độ ẩm cao, môi trường có độ ẩm càng cao thì kích thước địa y càng lớn.

Thành phần giải phẫu vỏ não: K+, C-, KC-, P-; tủy: K-, C-i-, KC+.

1.3.4. Phân bố [39]

Loài địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale phân bố trên đá và cây xanh trong khu vực ẩm ướt của Australia, các vùng nhiệt đới và ôn đới ở Bắc Trung và Nam Mỹ, châu Phi, Nam Á, Đông Á và Indonesia. Trong Châu Đại Dương, ngoài Australia nó cũng được tìm thấy ở đảo quốc Fiji, Papua New Guinea, Vanuatu, Samoa và miền Bắc của New Zealand, nó xuất hiện trên vỏ cây, gỗ và đá từ khu vực ven biển đến rừng núi. Tại Việt Nam chúng được tìm thấy ở nhiều khu vực có khí hậu gần giống vùng ôn đới như khu vực Thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.

1.3.5. Thành phần hóa học

Đến nay, việc phân lập thành phần hóa học của loài địa y *P. tinctorum* chưa được phổ biến:

Nhóm nghiên cứu của Sakurai A. [40] phân lập isolecanoric acid (1) vào năm 1987;

Nhóm nghiên cứu của Czeuczuga, B. và Kashiwadani, H. [41] phân lập flavoxanthin (2) và β -citaurin (3) vào năm 1993.

Nhóm nghiên cứu của Honda N. K. [42] phân lập lecanoric acid (4) và atranorin (5) vào năm 2010.

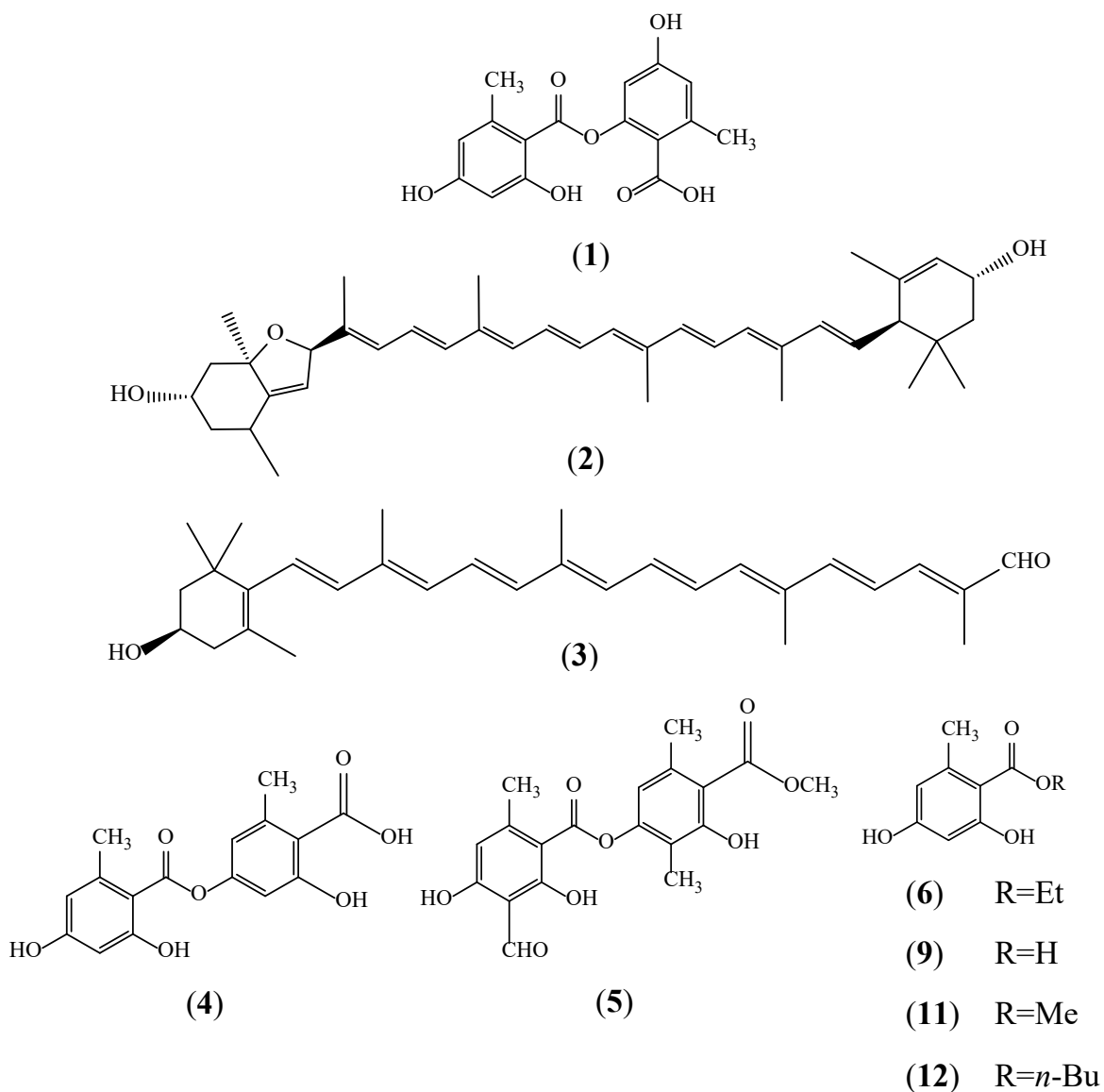
Nhóm nghiên cứu của Santos L. C. [43] phân lập ethyl orsellinate (6) vào năm 2004.

Vào năm 2019, nhóm nghiên cứu Pavan Kumar, P. [44] đã phân lập được 6 hợp chất từ địa y *P.tinctorum*, bao gồm: lecanoric acid (4), atranorin (5), norlobaridone (7), methyl atrate (8), orsellinic acid (9), and salazinic acid (10).

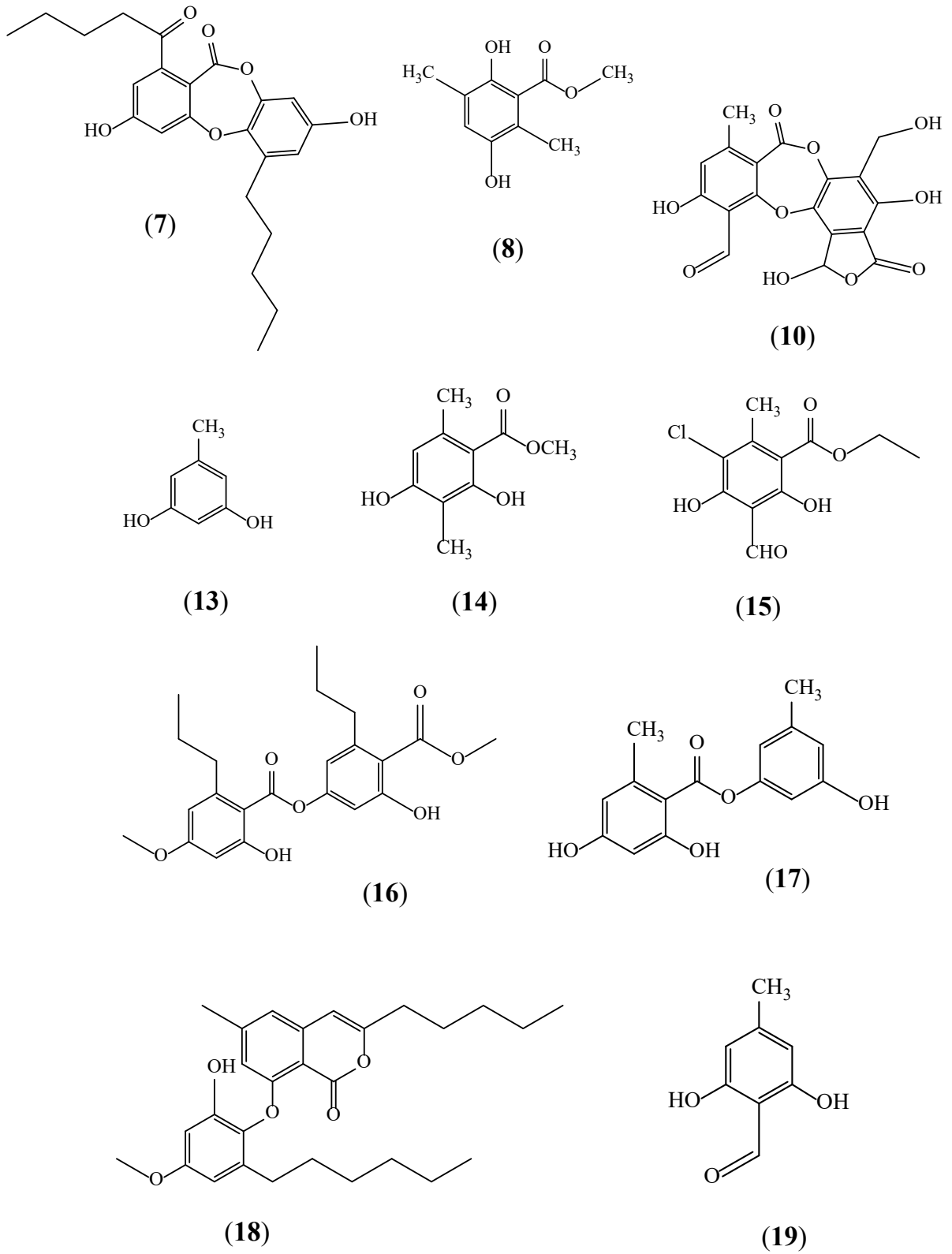
Vào năm 2020, nhóm nghiên cứu Tuan N.T [26] công bố 14 hợp chất được phân lập từ loài *P.tinctorum* bao gồm: atranorin (5), ethyl orsellinate (6), orsellinic acid (9), methyl orsellinate (11), *n*-butyl orsellinate (12), orcinol (13), methyl β -orsellinate (14), methyl haematommate (15), methyl divaricatinatate (16), lecanorin (17), lecanoric acid (4), 8-(2,4-dihydroxygen-6-(2-

oxoheptyl)phenoxygen)-6-hydroxygen-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one (18), atranol (19), ethyl haematommate (20). Ngoài ra, nhóm nghiên cứu Bui, V.-M. [45] đã phân được hai hợp chất phenolic mới: 2-ethylhexyl orsellinate (21) và tinctorinone A (22).

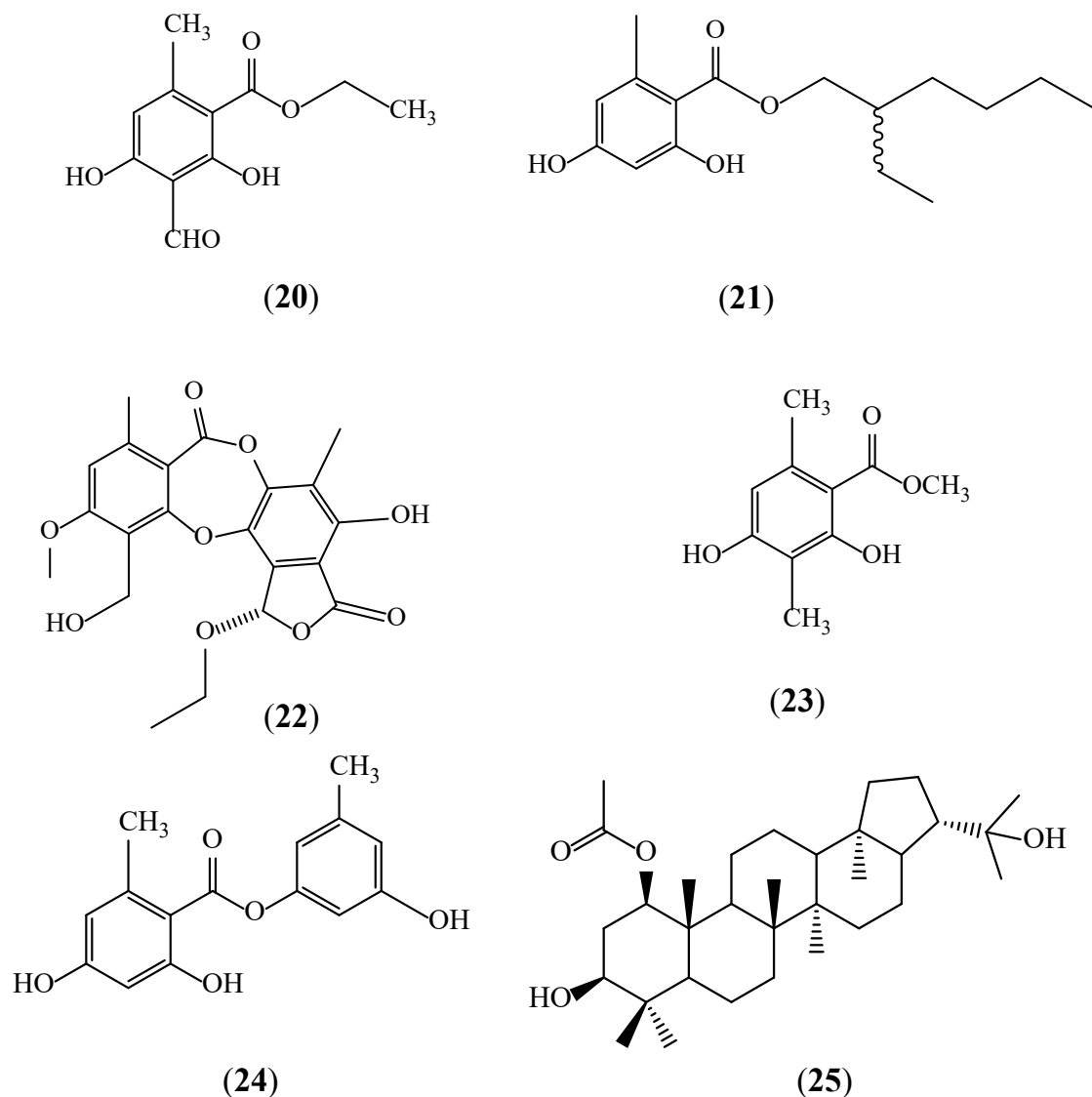
Vào năm 2021, nhóm nghiên cứu Nguyen, T. T. T. [46] đã phân lập 5 hợp chất từ địa y *P.tinctorum* bao gồm: methyl β -orcinol carboxygenlate (23), atranorin (5), lecanorol (24), salazinic acid (10), 1 β -acetoxygenhopan-3 β ,22-diol (25).



Hình 1.5a. Các hợp chất cô lập từ địa y *Parmotrema tinctorum*



Hình 1.5b. Các hợp chất cô lập từ địa y *Parmotrema tinctorum*



Hình 1.5c. Các hợp chất cô lập từ địa y *Parmotrema tinctorum*

1.3.6. Hoạt tính sinh học

Địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale có chứa hợp chất có hoạt tính sinh học atranorin, lecanoric acid, salazinic acid và usnic acid [47]. Với khả năng sinh học đa dạng như kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus, kháng oxy hóa, kháng ung thư và ức chế enzyme,... [9]. Hơn nữa, chiết xuất từ địa y *P. tinctorum* xác nhận có sự hiện diện của carbohydrate, phenol, flavanoid, tannin, terpenoid, coumarin và saponin là những hợp chất cơ sở đánh giá tác dụng sinh học của nó [9].

1.3.6.1. Kháng nấm

Năm 2014, Vivek M.N và cộng sự đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng nấm trên cao methanol của 3 loài địa y là *P. tinctorum*, *P. grayanum*, *P. praesorediosum*, kết quả *P. tinctorum* cho hoạt động ức chế cao nhất trên 2 loại nấm *Candida albicans* và *Cryptococcus neoformans* bằng kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán [48].

1.3.6.2. Kháng khuẩn

Năm 2020, Tuan, NT và các cộng sự đã phân lập 14 hợp chất từ địa y *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. Kết quả cho thấy trong đó có 4 hợp chất có hoạt tính kháng nấm chống lại các chủng *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* và *Pyricularia oryzae* [26]. (**Bảng 1**)

Bảng 1.1. Hoạt tính kháng khuẩn của *P. tinctorum* [26]

Hợp chất	Khả năng ức chế (%) ^[a]		
	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. oryzae</i>
Methyl β -orsellinate	98.33 \pm 1.44	74.20 \pm 2.96	100
Methyl orsellinate	65.83 \pm 2.89	50.33 \pm 1.12	79.79 \pm 1.84
Ethyl orsellinate	53.33 \pm 3.82	51.29 \pm 1.94	44.68 \pm 3.69
<i>n</i> -butyl orsellinate	50.17 \pm 2.89	41.94 \pm 1.94	36.16 \pm 3.19
Score 250EC	100	86.19 \pm 1.97	-
Filia 525SE	-	-	81.31 \pm 1.62

^[a] Kết quả thể hiện giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) (n = 3). Các chất chuẩn là thuốc chống nấm thương mại, cụ thể là Score 250EC (difenoconazole ở 25 μ g / mL) và Filia 525SE (tricyclazole ở 40 μ g / mL và propiconazole ở 12.5 μ g / mL).

1.3.6.3. Kháng virus

Năm 2020, Nguyễn Thị Thu Trâm cùng cộng sự đã khảo sát và nhận thấy các hợp chất cô lập từ loài địa y *Parmotrema tinctorum* (nyl.) Hale khả năng ức chế virus viêm gan C [9].

1.3.6.4. Kháng oxi hóa

Bên cạnh thử nghiệm kháng khuẩn, Vivek M.N và các cộng sự còn tiến hành

khảo sát khả năng kháng oxygen hóa theo phương pháp bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) trên 3 loài thuộc địa y *Parmotrema*. Kết quả cho thấy cao chiết methanol của địa y *P. tinctorum* kháng oxygen hóa yếu ($IC_{50} = 439,06 \mu\text{g/mL}$) so với vitamin C ($IC_{50} = 2,3 \mu\text{g/mL}$) [48].

Năm 2014, nghiên cứu của P. Salin Raj, A. Prathapan và cộng sự đã thử nghiệm khả năng kháng oxygen hóa từ dịch chiết ethyl acetate của *Parmotrema tinctorum* bằng cách nghiên cứu loại bỏ gốc tự do DPPH, ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), superoxide và hydroxyl. Kết quả cho thấy hoạt động kháng gốc tự do DPPH của PTTE ($IC_{50} = 396,83 \pm 2,98 \text{ mg/mL}$), ABTS ($151,34 \pm 1,79 \text{ mg/mL}$), superoxide ($30,29 \pm 1,17 \text{ mg/mL}$) và hydroxyl ($35,42 \pm 1,22 \text{ mg/mL}$) [49].

1.3.6.5. Kháng ung thư

Năm 2010, Bogo D. Và cộng sự đã công bố kết quả thử nghiệm *in vitro* khả năng kháng lại ung thư biểu mô thanh quản, ung thư biểu mô tế bào vú, ung thư biểu mô tế bào thận từ các hợp chất orsellinate phân lập được từ loài địa y *P. tinctorum*. Kết quả cho thấy trong các nhóm orsellinate khảo sát, n-butyl orsellinate có hoạt tính mạnh nhất với $IC_{50} = 7,2 \mu\text{g/mL}$ đối với tế bào ung thư biểu mô thanh quản, $IC_{50} = 14,0 \mu\text{g/mL}$ trên dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào vú và $IC_{50} = 12,6 \mu\text{g/mL}$ trên dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào thận [50].

1.3.6.6. Khả năng ức chế enzyme

Năm 2019, Pavan Kumar, P. cùng các cộng sự đã chứng minh cao acetone của địa y *Parmotrema tinctorum* có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase [44].

Năm 2020, Bui, V.-M cùng các cộng sự đã phân lập được hợp chất tinctorinone từ địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale và hợp chất này có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase [45].

1.4. ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

1.4.1. Khái niệm


Bệnh lý Đái tháo đường là một bệnh rối loạn chuyển hóa mạn tính, đặc trưng bởi sự tăng đường huyết, nguyên nhân chính do tuyến tụy không sản xuất đủ lượng hormone - insulin để điều chỉnh lượng đường trong máu hoặc khi cơ thể không thể sử dụng hiệu quả insulin mà nó tạo ra [51]. Các triệu chứng của tăng

đường huyết rõ rệt bao gồm: Đa niệu, polydipsia^[b], giảm cân, đôi khi bị polyphagia^[c] và giảm thị lực. Suy giảm tăng trưởng do mắc bệnh trước đó và khả năng điều trị đối với một số bệnh nhiễm trùng cũng có thể tăng đường huyết mạn tính [52].

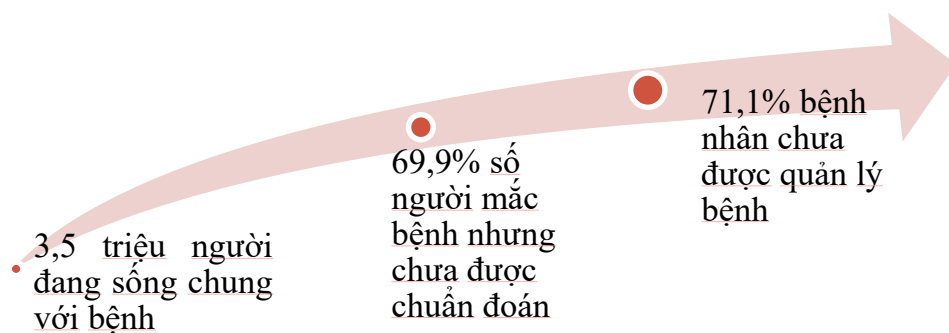
Trong đó: ^[b] Triệu chứng khát nước ở người mắc bệnh Đái tháo đường. Đây là triệu chứng rất phổ biến, nguyên nhân do glucose không đi vào được tế bào, dẫn đến hiện tượng kéo nước ngược từ tế bào ra máu.

^[c] Triệu chứng đói quá mức, nó khác biệt với hiện tượng đói do nhu cầu sinh lý hằng ngày hay hoạt động mạnh trước đó. Cũng là một dạng rối loạn đường huyết so với mức chuẩn ban đầu, gây ra sự rối loạn trong hệ thống tiêu hóa.


Tình hình bệnh Đái tháo đường trong và ngoài nước

 Tình hình bệnh Đái tháo đường ở nước ta. (Theo báo cáo của Bộ y tế vào ngày 15/11/2019)

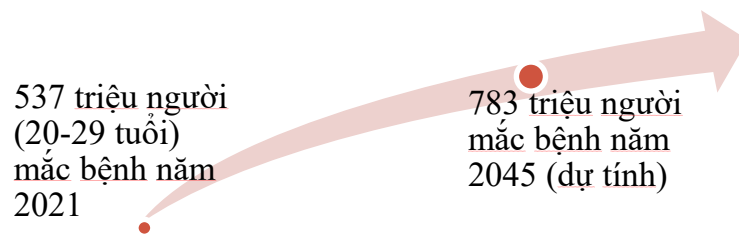
Việt Nam có khoảng 3,5 triệu người sống chung với Đái tháo đường tính đến năm 2017. Theo kết quả nghiên cứu quốc gia năm 2015 của Bộ Y tế, tỷ lệ người bị bệnh nhưng chưa được chẩn đoán là 69,9%. Tỷ lệ bệnh nhân chưa được quản lý bệnh lên tới 71,1% [53]. Những con số trên cho thấy, số người mắc bệnh Đái tháo đường thực tế cao hơn rất nhiều so với số lượng bệnh nhân được cơ sở y tế chuẩn đoán. Dẫn đến hiện tượng khó kiểm soát và chưa thể đưa ra cảnh báo ở mức tối ưu với những người nghi bị hoặc chưa bị.



Sơ đồ 1. Các yếu tố dẫn đến sự gia tăng bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường trong nước (Tính đến năm 2017) [53]

 Tình hình bệnh Đái tháo đường ở ngoài nước. (Theo báo cáo của International Diabetes Federation – IDF vào ngày 9/12/2021)

Theo thống kê của Hiệp hội Đái tháo đường trên toàn thế giới – IDF, năm 2021, thế giới có khoảng 425 triệu người mắc bệnh Đái tháo đường. Con số này ước tính sẽ tăng lên 783 triệu người vào năm 2045. Do số lượng người mắc bệnh không được chẩn đoán chưa kiểm soát được, nên gây ra 7,9 triệu ca tử vong. Đặc biệt, tỉ lệ mắc Đái tháo đường đang tăng nhanh chóng ở các nước thu nhập thấp và trung bình [54]. Vậy có thể dự đoán nước ta có nguy cơ về số người nhiễm bệnh này tăng rất nhanh trong tương lai.



Sơ đồ 2. Dự đoán sự gia tăng bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường trên toàn thế giới (Tính đến năm 2021) [54]

Bộ y tế vào năm 2020 đã đưa ra Quyết định ban hành 7 phác đồ điều trị bệnh Đái tháo đường và yêu cầu các cơ sở y tế và trạm xá trên toàn lãnh thổ đều có chức năng thực hiện nhiệm vụ điều trị bệnh này. Từ đó, cho thấy sự thiết yếu và cấp bách trong việc ngăn chặn căn bệnh này ngay từ đầu. Nguyên nhân chính là do không tuân thủ chế độ ăn uống và luyện tập phù hợp, mà khi nhắc đến ý thức bảo vệ sức khỏe chính bản thân, thì thật sự rất khó giải quyết và thay đổi thói quen sinh hoạt đó.

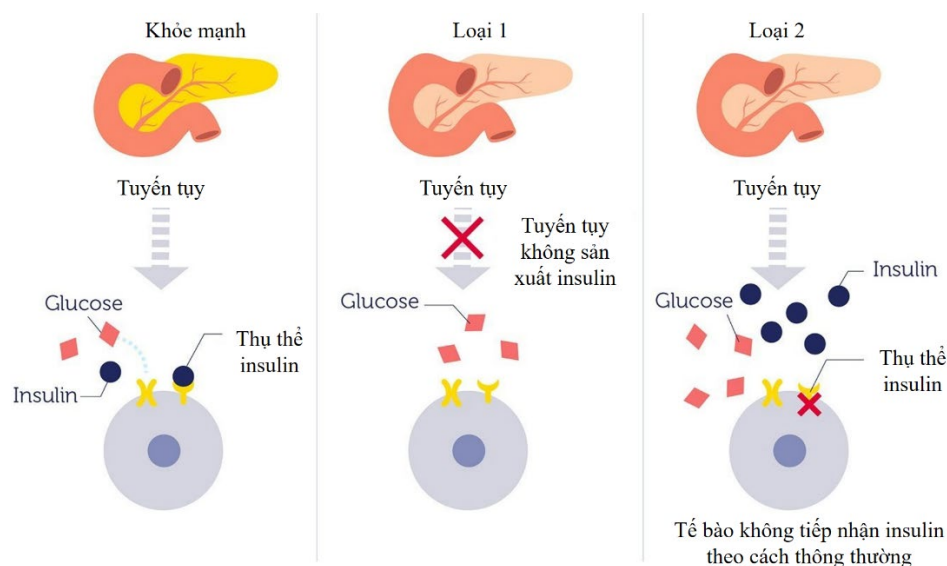
1.4.2. Phân loại

1.4.2.1. Đái tháo đường loại 1 [55]

Loại Đái tháo đường này thường xuất hiện ở trẻ em, ít gặp ở người lớn. Nguyên nhân dẫn đến bệnh Đái tháo đường loại 1 là do cơ thể không thể sản xuất insulin. Do đó, hệ thống miễn dịch của cơ thể nhầm lẫn, nên đã tấn công vào các tế bào trong tuyến tụy làm cho tế bào tuyến tụy không còn sản xuất được insulin. Khi không có insulin, tế bào sẽ không sử dụng được glucose, dẫn đến glucose trong máu sẽ tăng rất cao. Bệnh nhân cần được tiêm insulin để duy trì hoạt động ổn định của cơ thể cho sự sống.

1.4.2.2. Đái tháo đường loại 2 [56]

Đây là loại Đái tháo đường thường gặp nhất. Thông thường với Đái tháo đường loại 2, cơ thể vẫn sản xuất insulin bình thường, nhưng các tế bào không thể sử dụng nó (kháng insulin). Theo thời gian, đường huyết sẽ tăng cao trong máu, cụ thể: Glucose sẽ được vận chuyển vào gan, tế bào cơ và tế bào mỡ. Dẫn đến béo phì và nếu ít vận động thì sẽ làm nguy cơ phát bệnh Đái tháo đường loại 2 diễn ra sớm hơn.



Hình 1.6. Mô hình biểu diễn hoạt động bất thường của Đái tháo đường loại 1 và 2 so với hoạt động bình thường của tuyến tụy [57]

1.4.2.3. Đái tháo đường thai kỳ [58]

Đái tháo đường thai kỳ có cơ chế hình thành đặc thù so với hai loại trên, là do nhau thai – cơ quan nuôi và cung cấp oxy cho em bé – tiết ra các hormone giúp thai nhi phát triển. Một vài hormone trong số này khiến cơ thể thai phụ khó sản xuất hoặc sử dụng insulin hơn (còn gọi là đề kháng insulin). Bệnh thường chấm dứt sau khi sinh. Có thể gây ra các triệu chứng bất thường trong quá trình mang thai. Phụ nữ bị bệnh này trong thai kỳ có nhiều khả năng phát triển thành Đái tháo đường loại 2 sau này.

1.4.3. Phương pháp kiểm tra người mắc bệnh và điều trị phổ dụng

1.4.3.1. Phương pháp kiểm tra người mắc bệnh

🚦 Cách 1. Chuẩn đoán

Bệnh Đái tháo đường được chẩn đoán dựa trên tiền sử (tức là polyuria^[b], polydipsia^[c] và giảm cân bất thường) [59].

Bảng 1.1. Các trường hợp được xem là mắc bệnh Đái tháo đường [59]

Trường hợp	Nồng độ glucose huyết tương tĩnh mạch C_g (mmol/L)	Lưu ý
1	Ngẫu nhiên: $C_g \geq 11,1$ (mmol/L)	Lặp lại xét nghiệm theo yêu cầu
2	Lúc đói: $C_g \geq 7$ (mmol/L)	
3 (Ưu tiên)	Dung nạp 75g glucose sau 2h rồi xét nghiệm $C_g \geq 11,1$ (mmol/L)	OGTT

Lưu ý: Bệnh nhân có thể sử dụng nhiều trường hợp xét nghiệm trực tiếp trên để chuyên viên hoặc bác sĩ chuẩn đoán tỉ lệ chính xác cao hơn.

🚦 Cách 2. Xác định thông số HbA_{1c}

Hemoglobin glycated (HbA_{1c}) ban đầu được xác định là một bệnh huyết sắc tố khác thường có ở bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường. Xét nghiệm HbA_{1c} (hay A_{1c}, glycohemoglobin) là một loại xét nghiệm máu giúp kiểm tra lượng đường gắn với hemoglobin ở các tế bào hồng cầu. Lượng đường sẽ bao bọc xung quanh hemoglobin khi chất này liên kết với glucose. Lượng đường trong máu càng tăng thì lớp bọc này càng dày [60]. HbA_{1c} đã được đưa vào sử dụng lâm sàng vào những năm 1980 và sau đó đã trở thành nền tảng của thực hành lâm sàng [61]. HbA_{1c} phản ánh glucose huyết tương trung bình trong 8 đến 12 tuần trước khi xét nghiệm [62]. Nó có thể được thực hiện bất cứ lúc nào trong ngày và không yêu cầu bất kỳ sự chuẩn bị đặc biệt nào. Đó cũng chính là những ưu điểm để đưa phương pháp này làm nền tảng chuẩn đoán bệnh Đái tháo đường.

Điều kiện để được phép chuẩn đoán theo phương pháp HbA_{1c}: HbA_{1c} 6,5% (tỷ lệ mmol huyết sắc tố bị phủ glucose trên tổng 1mol máu khảo sát ngẫu nhiên, tương ứng ≥ 48 mmol/mol) được khuyến cáo là điểm cắt để chẩn đoán bệnh Đái tháo đường (tức là HbA_{1c} $\geq 6,5\%$ là đủ để chẩn đoán bệnh Đái tháo đường) [59].

Nhược điểm: Nếu giá trị dưới 6,5% (48 mmol/mol) thì chưa thể đưa ra kết luận bệnh nhân có bị bệnh hay không. HbA_{1c} có thể bị ảnh hưởng bởi một loạt các yếu tố di truyền, huyết học và bệnh tật [63].

1.4.3.2. Phương pháp điều trị Đái tháo đường

Trong thực tế, về cách thức điều trị cho mỗi bệnh nhân rất phức tạp và đặc thù, như: Thuộc Đái tháo đường loại nào, độ tuổi, chỉ số HbA_{1c}, tiền sử bệnh, quá trình phát bệnh và đã sử dụng sản phẩm dược điều trị bệnh hay chưa, dị ứng thuốc, cơ chế tác động lên insulin nội hay ngoại tuyến tụy,... Và cả đặc điểm sinh sống ở từng quốc gia [64].

Các bằng chứng trên nhắc lại lần nữa về phương pháp hữu hiệu nhất là phòng chống bệnh ngay trong cuộc sống thường ngày. Việc thay đổi lối sống đối với người bệnh, luyện tập thể dục thể thao thường xuyên, đảm bảo yếu tố dinh dưỡng và sử dụng các sản phẩm thiên nhiên có khả năng ngăn ngừa bệnh trong khẩu phần ăn hoặc thực phẩm hỗ trợ, vẫn là liệu trị liệu an toàn và mang lại hiệu quả cao nhất cho cả người có nguy cơ mắc bệnh lẫn người bệnh.

Các bệnh nhân khi đến cơ sở y tế chuẩn đoán hay kiểm tra bệnh thì đa phần thuộc loại Đái tháo đường không phụ thuộc insulin (Đái tháo đường loại 2). Có nhiều sản phẩm dược có tác dụng làm giảm đường huyết, cụ thể là các nhóm thuốc: Sulfonylurea, glinide, biguanide, pioglitazone (TZD), ức chế enzyme α -glucosidase, nhóm ức chế kênh đồng vận chuyển natri-glucose SGLT2, thuốc đồng vận thụ thể GLP-1. Các nhóm thuốc này đều có ưu và nhược điểm riêng, nhưng trong đó phải kể đến nhóm những sản phẩm ức chế enzyme α -glucosidase với những ưu điểm, như: Được lấy từ nhiều nguồn từ nhiên nhiên, sử dụng thông qua đường uống và các tác dụng phụ có thể chấp nhận trong thời gian trị liệu nhất định. [64]

1.4.4. Enzyme α -glucosidase [65]

1.4.4.1. Khái niệm

Enzyme α -glucosidase là loại chất xúc tác sinh học thường có ở ruột non, với nhiệm vụ chính là phân hủy mỗi nối mạch đường trong cấu tinh bột thành glucose. Sau đó, glucose được hấp thu qua thành ruột để ổn định hàm lượng đường trong máu.

Cơ chế hoạt động: Sau khi vào cơ thể, những carbohydrat được thủy phân thành những phân tử đường đơn bởi những enzyme trong ruột non. Tiến trình phân hóa này đòi hỏi tụy tạng phải tiết ra α -amylase dùng để phá vỡ các phân tử carbohydrat lớn thành oligosaccharid, màng tế bào ruột non lại tiết ra α -glucosidase để tiếp tục thủy phân các oligosaccharide thành các phân tử đường

đơn rồi mới thẩm thấu vào máu. Chức năng chính của enzyme này là xúc tác cho việc cắt đứt liên kết 1,4- α -D-glucoside của cơ chất để giải phóng ra α -D-glucose. Bằng cách kiểm chế sự hoạt động của enzyme α -glucosidase, có thể làm giảm sự thủy giải của carbohydrat và làm chậm sự thẩm thấu glucose vào máu.

1.4.4.2. Tác nhân ức chế

Là chất làm giảm hoạt tính của enzyme do làm giảm ái lực của enzyme với cơ chất hoặc làm enzyme mất khả năng kết hợp với cơ chất.

- Chất ức chế không đặc hiệu: Gây biến tính phân tử enzyme, thậm chí phá hủy protein, tác dụng trên bất kì phân tử enzym nào, thường thì tác dụng đột ngột nhanh, không thuận nghịch.

- Chất ức chế đặc hiệu: Tác dụng vào những trung tâm phản ứng đặc biệt của từng enzyme một. Tùy theo cách tác dụng chia làm hai nhóm: Chất ức chế cạnh tranh và chất ức chế không cạnh tranh.

Việc tìm kiếm các hợp chất ức chế enzyme α -glucosidase có ý nghĩa rất lớn trong các lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm... Đã có rất nhiều hợp chất được tìm thấy trong tự nhiên hoặc tổng hợp có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Tuy nhiên, những tác nhân ức chế enzyme α -glucosidase hiện nay thường gây nhiều phản ứng phụ. Vì vậy, việc tìm kiếm các chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase vẫn đang được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới.

1.4.5. Nhóm hợp chất, hợp chất ức chế enzyme α -glucosidase

Một phương pháp điều trị để điều trị bệnh Đái tháo đường là làm chậm sự hấp thụ glucose thông qua sự ức chế các enzyme α -glucosidase trong các cơ quan tiêu hóa [66]. Hai nhóm hợp chất lớn là flavonoid và alkaloid được xác định chứa nhiều hợp chất ức chế tốt enzyme này. Ngoài ra, nhiều hợp chất đã được nghiên cứu có khả năng ức chế mạnh enzyme α -glucosidase, như: Acarbose và andvoglibose từ vi sinh vật hay nojirimycin và 1-deoxynojirimycin từ thực vật [67]. Trong đó, acarbose được xem là hợp chất đầu tiên sử dụng trong dược phẩm về khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trong điều trị bệnh Đái tháo đường [68]. Khả năng ức chế của hợp chất acarbose được biết là do nó khả năng liên kết trực tiếp với enzyme α -glucosidase làm trì hoãn sự phân cắt polysaccarit thành glucose [69].

Tình kháng thuốc vẫn là vấn đề nan giải trong quy trình hoàn thiện điều trị từ các sản phẩm dược [67]. Vì vậy, sự đa dạng về cấu trúc các hợp chất có khả năng ức enzyme α -glucosidase là điều kiện thuận lợi để giải quyết phần nào đó về tình trạng kháng thuốc.

Nhân xét:

Có rất ít các công bố khoa học về khảo sát thành phần và thử nghiệm hoạt tính sinh học từ loài địa y *Parmotrema tinctorum*. Hơn nữa, các hợp chất đã được xác định chủ yếu là các hợp chất có hàm lượng nhiều trong loài, như các hợp chất phenolic, cho thấy các nghiên cứu chưa tập trung vào các hợp chất chiếm hàm lượng nhỏ. Cao acetone từ địa y *Parmotrema tinctorum* đã được chứng minh có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase [44]. Mặc khác, số lượng các hợp chất phân lập và khảo sát hoạt tính có tính năng ức chế enzyme α -glucosidase từ loài địa y này còn hạn chế [45]. Hơn nữa, vào năm 2021, báo cáo từ nhóm nghiên cứu Ngoc-Hong Nguyen và Bui-Linh-Chi Huynh xác định rằng: Khả năng ức chế hoạt tính của enzyme này từ loài địa y thường không nằm ở các hợp chất phenolic [51]. Vì vậy, việc tìm kiếm các hợp chất có khung cấu trúc mới và khả năng thể hiện hoạt tính cao hơn từ cao etyl acetate của địa y *Parmotrema tinctorum* thì mang tính khả quan và đầy hứa hẹn.

Việc điều trị bệnh Đái tháo đường là rất khó khăn và tốn nhiều thời gian, tiền bạc, nguy hiểm hơn là tiềm tàng nguy cơ bị đột quỵ. Cùng với đó là vấn đề rất dễ tái bệnh nếu không có lối sống lành mạnh và ăn uống khoa học sau điều trị. Vì vậy, nếu ngăn ngừa từ ban đầu để hạn chế các nguyên nhân dẫn đến bệnh hoặc sử dụng các sản phẩm thiên nhiên như là các loại thực phẩm, sản phẩm bổ sung được xác định dựa trên cơ sở khoa học là có tác dụng ngăn ngừa bệnh, thì đó vẫn là phương pháp ngừa bệnh và trị bệnh được ưu tiên hàng đầu.

Theo đó, các phương pháp xét nghiệm y học ra đời đã mang lại những giá trị then chốt trong việc điều trị bệnh, nhưng mỗi phương pháp y học điều trị đều mang những nhược điểm riêng, như:

- Đối với phương pháp chuẩn đoán, dựa vào thông tin bệnh nhân cung cấp có thật sự đúng và đầy đủ, tiền sử bệnh lý, thời gian phát hiện bệnh và quá trình điều trị bệnh có tuân thủ những quy định hay không,... vẫn là những vấn đề luôn diễn ra và cản trở quá trình điều trị. Còn phương pháp xác định

thông số HbA_{1c} sẽ không được áp dụng khi tỷ lệ xét nghiệm HbA_{1c} có giá trị dưới 6,5%.

- Ngoài ra, vẫn còn nhiều khó khăn trong việc giúp toàn bộ người dân có thể tiếp cận các phương pháp y học hiện đại, nhất là những người dân nghèo hoặc các vùng có cơ sở y tế chưa thực sự phát triển.

Do đó rất cần thiết nghiên cứu và phát triển những sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị Đái tháo đường theo cơ chế ức chế α -glucosidase có nguồn gốc từ thiên nhiên, với tính an toàn cao, ít tác dụng phụ và dễ chấp nhận với phần lớn nhân dân lao động, do bởi phải sử dụng trong thời gian dài.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU VÀ HOÁ CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên liệu

Địa y *Parmotrema tinctorum* được thu hái vào tháng 05/2020 tại tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam và được định danh bởi T.S Võ Thị Phi Giao, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

2.1.2. Hóa chất

Dung môi dùng trong ly trích, sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng gồm: Ethanol 96°, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol (Trung Quốc và Việt Nam).

Thuốc thử dùng để phát hiện các vết hữu cơ sắc ký lớp mỏng: acid sulfuric 10% trong ethanol hoặc 5% vanillin / H₂SO₄, hơ nóng trên bếp điện.

Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,04–0,06 mm (240–430 mesh) dùng cho sắc ký cột, Merck.

Silica gel pha đảo Rp-18 có cỡ hạt là 0,03–0,05 mm và hạt gel Sephadex LH-20 dùng cho sắc ký cột.

Sắc ký lớp mỏng tráng sẵn DC - Alufolien F254 (Merck) dùng cho pha thường và Rp-18 F254s (Merck) dùng cho pha đảo.

2.1.3. Thiết bị và dụng cụ

Các dụng cụ dùng để ly trích (erlen, ống nghiệm, pipet pasteur, ...). Cột sắc ký: Cột khô, cột cổ điển.

Máy cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất thấp (Eyela). Bếp cách thủy (Mermmert), tủ sấy (Mermmert), tủ lạnh 4°C.

Máy cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Bruker AM400 FT-NMR Spectrometer, Viện Kiểm nghiệm thuốc Hồ Chí Minh, Phường Cô Giang, Quận 1, Tp. HCM, Việt Nam.

Bình cô quay 100, 250, 500 mL. Cốc thủy tinh 250, 500, 1000 mL.

Giấy lọc Advantec (Nhật Bản).

Ống đong 10, 50, 100 mL.

Đèn UV ở bước sóng 254 - 365 nm, bếp điện từ. Cân phân tích 4 số lẻ Ohaus PA 214C (Mỹ).

Ống vi quản (Kapillaren) chám bản mỏng, kẹp gấp bản mỏng. Bể siêu âm gia nhiệt (Mỹ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp chiết cao, phân lập và phân tách các hợp chất [70]

2.2.1.1. Phương pháp chiết cao

Phương pháp ngâm dầm: Rót dung môi EA vào bình thủy tinh chứa nguyên liệu cho đến khi xấp xấp bề mặt mẫu. Sau đó, dịch chiết được lọc và cô quay ở áp suất thấp để thu hồi dung môi. Tiếp tục rót dung môi mới vào phần cặn còn lại, quá trình chiết được lặp lại thêm 2-3 lần cho đến khi chiết kiệt mẫu.

2.2.1.2. Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký là phương pháp vật lý dùng để tách một hỗn hợp gồm nhiều loại chất ra riêng thành từng loại đơn chất, dựa vào tính ái lực khác nhau của từng chất riêng biệt với với hệ thống sắc ký (hệ thống gồm hai pha: Một pha động và một pha tĩnh). Có nhiều loại sắc ký:

- Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Là phương pháp được thực hiện trên bảng mỏng có tráng sẵn lớp phẳng, độ dày lớp hấp phụ 0,2 mm – cũng chính là pha tĩnh.

- Sắc ký cột (CC)

Phương thức thực hiện: Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường, pha đảo.

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

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

2.2.2.1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ NMR được đo trên máy: Máy Bruker AM400 FT-NMR Spectrometer của Viện kiểm nghiệm thuốc Hồ Chí Minh. Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm:

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: **HSQC** và **HMBC**.
- Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi: Acetone – d_6 , CD_3OD hoặc $\text{DMSO-}d_6$.

2.2.2.2. Phổ khối (MS)

MS - Phổ khối cung cấp những thông tin về khối lượng của các ion sinh ra từ phân tử. Phổ **MS** được đo tại Viện kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh.

2.2.2.3. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)

FT-IR – Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier cung cấp một vài chi tiết về cấu trúc phân tử của mẫu. Phổ **FT-IR** được đo tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase [71]

2.2.3.1. Nguyên tắc

α -glucosidase có vai trò xúc tác sự thủy giải disaccharide tại liên kết α -D-glucose thành monosaccharide, từ đó làm tăng mức glucose máu. Thuốc ức chế α -glucosidase đã được sử dụng trong điều trị Đái tháo đường type 1 và 2. Hoạt tính ức chế α glucosidase được xác định thông qua việc đo lường sự tiết p-nitrophenol từ p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside. Khi cho chất thử nghiệm vào phản ứng, nếu chất có khả năng ức chế α -glucosidase thì lượng p-nitrophenol tạo ra giảm so với mẫu đối chứng, do đó làm giảm giá trị OD405.

2.2.3.2. Quy trình thực hiện

Hoạt tính ức chế α -glucosidase của tất cả các hợp chất phân lập được xác định bằng phương pháp tương tự có sự điều chỉnh từ Ramadhan [72]. Các α -glucosidase (0,2 U/mL) và cơ chất (5,0 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) đã được hòa tan trong dung dịch đệm natri phosphat 100 mM pH=6,9. Chất ức chế (50 μL) đã được xác định trước bằng α -glucosidase ở 37°C

trong 20 phút, và sau đó chất nền ($40 \mu\text{L}$) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng enzyme được thực hiện ở 37°C trong 20 phút và dừng lại bằng cách thêm Na_2CO_3 $0,2 \text{ M}$ ($130 \mu\text{L}$). Hoạt tính của enzyme được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ ở 405nm . Acarbose được sử dụng làm chứng dương.

2.2.3.3. Tính toán kết quả

Phần trăm ức chế α -glucosidase được tính theo công thức:

$$I\% = \left(1 - \frac{ODt}{ODc}\right) \times 100\%$$

ODt: Mật độ quang mẫu thí nghiệm sau khi đã trừ blank (không có α -glucosidase).

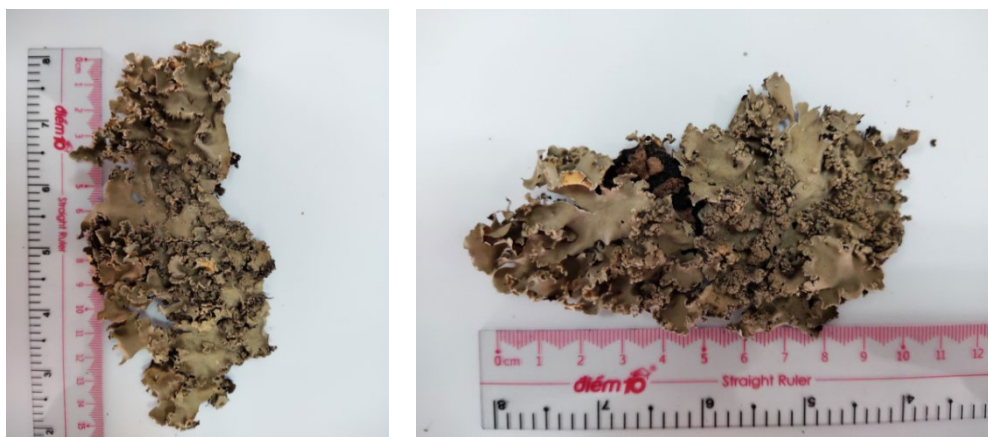
ODc: Mật độ quang mẫu đối chứng sau khi đã trừ blank (không có α -glucosidase).

Giá trị IC_{50} (nồng độ chất thử nghiệm ức chế 50% α -glucosidase) được xác định dựa trên đường chuẩn giá trị mật độ quang của mẫu ở các nồng độ khác nhau (Sử dụng phần mềm Prism với $R^2 > 0,9$).

Chương 3. THỰC NGHIỆM

3.1. CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU

Nguyên liệu được sử dụng cho nghiên cứu là toàn bộ loài địa y *Parmotrema tinctorum* (thân, rễ, lá) được thu hái vào tháng 5 tại tỉnh Lâm Đồng. Cây được định danh bởi T.S Võ Thị Phi Giao, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam (**Hình 3.1**). Tiêu bản được lưu giữ tại Viện Khoa học vật liệu ứng dụng – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 3.1. Mẫu địa y thu được từ tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

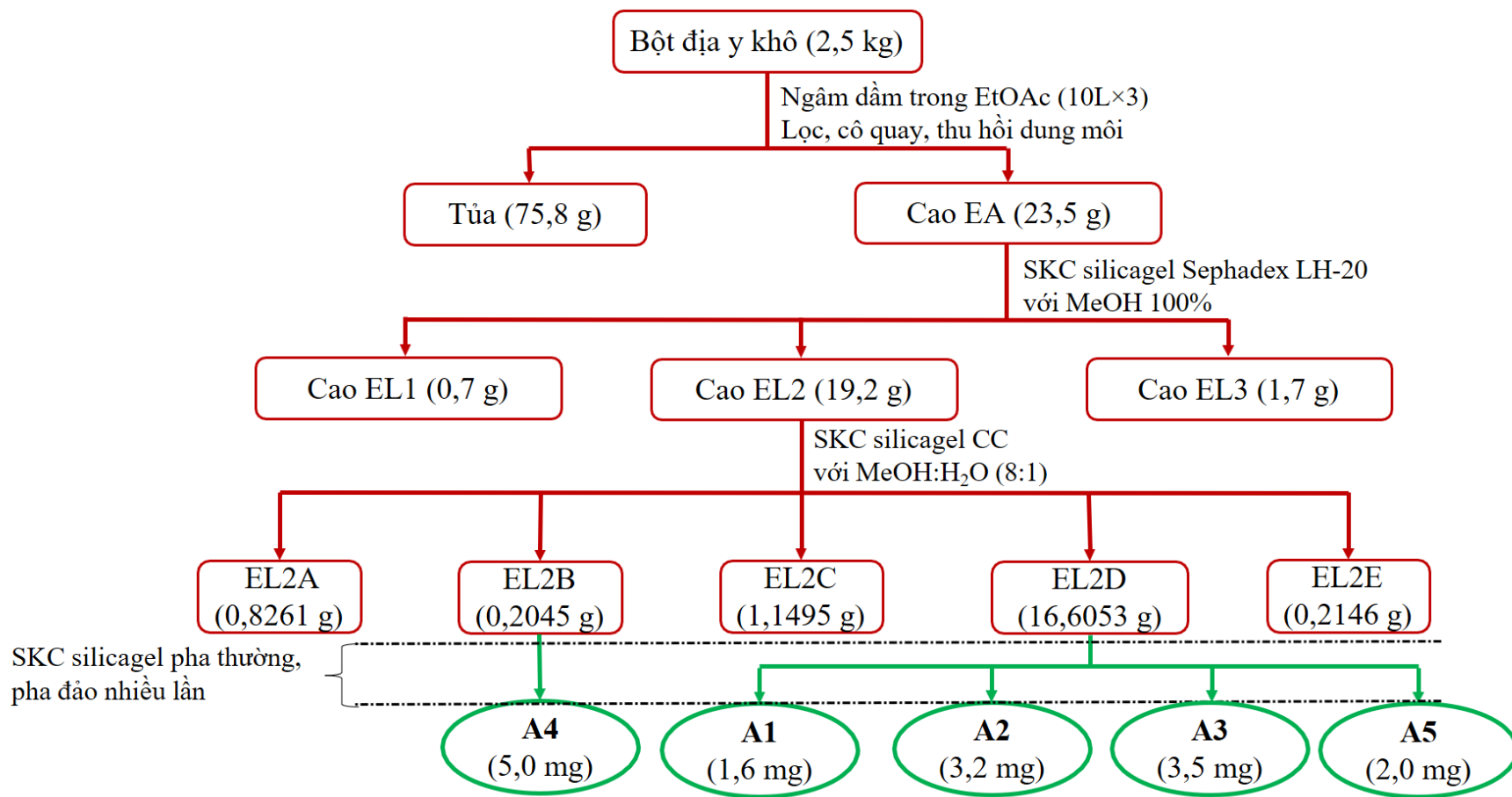
3.2. ĐIỀU CHẾ CAO ETYL ACETATE (CAO EA)

Mẫu địa y *Parmotrema tinctorum* (2,5 kg) được loại bỏ phần hư, sâu, rửa sạch, hong gió và sấy đến khô (60-80°C). Sau đó được xay nhuyễn và trích kiệt bằng phương pháp ngâm với EA ở nhiệt độ phòng (3 x 10L), chiết và lọc sau 24 giờ. Dịch chiết EA được đuổi dung môi dưới áp suất thấp thu được cao EA thô (23,5g) và phần tủa không tan (75,8g).

3.3. TRÍCH LY, CÔ LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT HỮU CƠ

Tiến hành sắc ký lọc gel Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi methanol (100%) đối với phần cao EA thô (23,5 g), thu được EL1 (0,7 g) và EL2 (19,2 g). Phân đoạn EL2 được sắc ký gel với dung môi MeOH:H₂O (8: 1) thu được 5 phân đoạn EL2A-E. Phân đoạn EL2B, được cho qua SKC Silicagel với hệ dung môi là H:EA:C (85: 15: 1), thu được hợp chất **A4**. Tiếp tục thực hiện SKC Silicagel phân đoạn EL2D (16,6 g) với hệ dung môi H:EA:C:AC (6: 0.2: 0,2: 0,2) phân lập được 3 hợp chất (**A1**, **A2**, **A3**). Cũng từ phân đoạn EL2D, hợp chất **A5** được cô lập từ SKC Silica gel pha đảo với hệ dung môi Me:H₂O (95: 5). Toàn bộ quá

trình trên được theo dõi bằng sắc kí lớp mỏng với thuốc thử hiện hình là soi đèn UV, sau đó dùng dung dịch acid sulfuric 10% chứa vanillin, rồi hơ nóng trên bếp điện từ. Căn cứ vào kết quả sắc kí bản mỏng, các lợ từ cột sắc ký được gom lại thành nhiều phân đoạn. Tiếp tục thực hiện sắc ký điều chế và tinh chế các chất. Kết quả SKC silicagel trên cao EA được trình bày trong **Sơ đồ 3**.



Sơ đồ 3. Quy trình chiết xuất từ địa y *Parmotrema tinctorum*

Từ cây địa y *Parmotrema tinctorum* đã cô lập được 5 hợp chất, có kí hiệu lần lượt là: **A1, A2, A3, A4 và A5**.

3.3. THÔNG TIN CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

Có 5 hợp chất được phân lập theo sơ đồ tách chiết trên, các tinh chất được xác định thông qua các đặc điểm và phổ xác định cấu trúc như sau:

3.3.1. Hợp chất A1

Hợp chất **A1** (1,6 mg) cô lập được từ phân đoạn EL2D (**Sơ đồ 3**), có những đặc điểm sau:

TLC với hệ giải ly: H:EA:C:Me (40: 2: 2: 2) với $R_f = 0,5$;

Hệ dung môi sử dụng trong SKC silica gel: H:EA:C:Me (50: 2: 2: 2)

Phổ **IR**, **MS**, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), **HMBC**, **HSQC**, **COSY** và **NOESY**: Xem lần lượt **Phụ lục 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 8**.

3.3.2. Hợp chất A2

Hợp chất **A2** (3,2 mg) cô lập được từ phân đoạn EL2D (**Sơ đồ 3**), có những đặc điểm sau:

TLC với hệ giải ly: H:EA:C:Me (40: 2: 2: 2) với $R_f = 0,6$

Hệ dung môi sử dụng trong SKC silica gel: H:EA:C:Me (60: 2: 2: 2)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$), $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$), **HMBC**, **HSQC**, **COSY**: Xem lần lượt **Phụ lục 9, 10, 11, 12, 13**.

3.3.4. Hợp chất A3

Hợp chất **A3** (3,5 mg) cô lập được từ phân đoạn EL2D (**Sơ đồ 3**), có những đặc điểm sau:

Dạng chất: Dạng bột, màu trắng.

TLC với hệ giải ly: H:EA:C (70: 25: 5) với $R_f = 0,5$

Hệ dung môi sử dụng trong SKC: H:EA:C (80: 17: 3)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), **HMBC**, **HSQC** và **COSY**: Xem lần lượt **Phụ lục 14, 15, 16, 17 và 18**.

3.3.3. Hợp chất A4

Hợp chất **A4** (5,0 mg) cô lập được từ phân đoạn EL2B (**Sơ đồ 3**), có những đặc điểm sau:

Dạng chất: Bột mịn, màu trắng.

TLC với hệ giải ly: H:EA:Acetic acid (70: 30: 0,1) với $R_f = 0,55$

Hệ dung môi sử dụng trong SKC: H:EA:Acetic acid (85: 15: 1)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Acetone – d_6), $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone – d_6) và **HMBC**: Xem **Phụ lục 19, 20 và 21**.

3.3.5. Hợp chất A5

Hợp chất **A5** (2,0 mg) cô lập được từ phân đoạn EL2D (**Sơ đồ 3**), có những đặc điểm sau:

Dạng chất: Bột vô định hình, màu trắng.

TLC với hệ giải ly: Me:H₂O (90: 10) với $R_f = 0,65$

Hệ dung môi sử dụng trong SKC pha đảo: Me:H₂O (95: 5)

Phổ **MS**, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) và **HMBC**: Xem lần lượt **Phụ lục 22, 23, 24 và 25**.

Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. NHẬN DANH CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP

Từ chiết xuất cao EA của cây địa y *Parmotrema tinctorum* đã cô lập được các hợp chất triterpenoid, ký hiệu là: **A1**, **A2**, **A3**, **A4** và **A5**. Các chất được xác định cấu trúc bởi các phương pháp phổ nghiệm, kết hợp so sánh với tài liệu đã công bố.

Sau đây là phần biện luận cấu trúc các hợp chất.

4.1.1. Biện luận cấu trúc A1

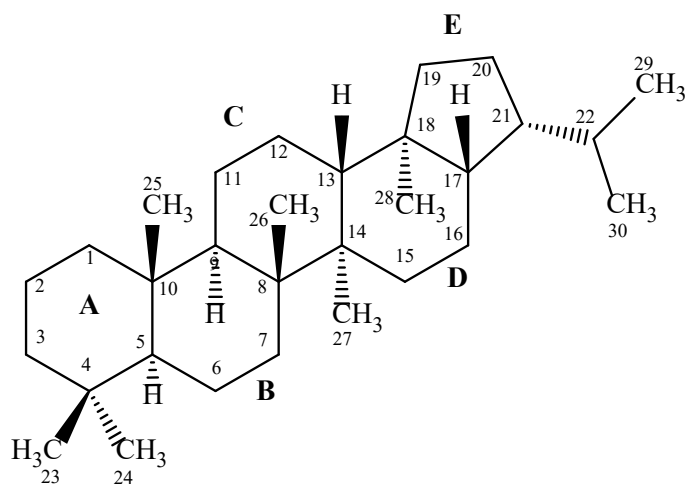
Phổ IR (**KBr**, ν_{\max} , cm^{-1}) cho các đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl –OH ở 3564; nhóm carbonyl $>\text{C}=\text{O}$ ở 1739 và 1709; nhóm oxymethyl C–O ở 1032 và 968.

Phổ khối lượng phân giải cao **HR-ESI-MS** cho thấy mũi ion phân tử giả tại m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 597.3794$ tương ứng với CTPT là $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7\text{Na}$ (giá trị phân tử khối tính toán là 597.3767).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ ppm) của hợp chất **A1** cho thấy các tín hiệu: Có 2 proton oximethine ở δ_{H} 4.66 (1H, *dd*, $J = 4.8$ và 11.6 Hz, H-1) và δ_{H} 4.58 (1H, *dd*, $J = 4.4$ và 12.4 Hz, H-3); 6 proton methine ở δ_{H} 2.36 (1H, *m*, H-21); δ_{H} 2.33 (1H, *m*, H-22), δ_{H} 1.23 (1H, *m*, H-17), δ_{H} 1.32 (1H, *m*, H-13), δ_{H} 1.47 (1H, *m*, H-9), δ_{H} 0.75 (1H, *d*, $J = 2.8$ và 11.2 Hz, H-5); 20 proton trên carbon bậc IV ở khoảng δ_{H} 0.83-1.00 (*s*) và 3 proton methylene bậc I nằm ở δ_{H} 1.13 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-29) và 16 proton methylene ở δ_{H} 1.89 (1H, *m*, H-2a), δ_{H} 1.66 (1H, *m*, H-2b), δ_{H} 1.54 (2H, *m*, H-6), δ_{H} 1.40 (1H, *m*, H-7a), δ_{H} 1.20 (1H, *m*, H-7b), δ_{H} 1.45 (1H, *m*, H-11a), δ_{H} 1.30 (1H, *m*, H-11b), δ_{H} 1.31 (2H, *m*, H-15), δ_{H} 1.48 (2H, *m*, H-16), δ_{H} 1.52 (1H, *m*, H-19a), δ_{H} 0.89 (1H, *m*, H-19b), δ_{H} 1.86 (1H, *m*, H-20a), δ_{H} 1.62 (1H, *m*, H-20b); và 6 proton trên carbon bậc I ở δ_{H} 2.02 (3H, *s*, H-34), δ_{H} 1.97 (3H, *s*, H-32).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3 , δ ppm) của hợp chất **A1** cho thấy có 34 carbon, trong đó: Có 3 carbon carbonyl –CO– ở δ_{C} 182.0 (C30), δ_{C} 170.3 (C31) và δ_{C} 170.5 (C33). Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu của 2 carbon oxymethine $>\text{CH}-\text{O}-$ ở δ_{C} 80.5 (C1) và δ_{C} 76.5 (C3).

Thông qua các mũi dao động $^{13}\text{C-NMR}$, có thể dự đoán: Khung cơ sở của **A1** là dẫn xuất triterpenoid - pentacyclic triterpene (trừ 9 carbon methyl và 3 carbon carbonyl, thì có nhiều nhất là 22 carbon tham gia xây dựng cấu trúc khung cơ sở). Dựa vào đặc điểm các tín hiệu trên phổ và tài liệu [73] có thể xác định đây là khung hopan.

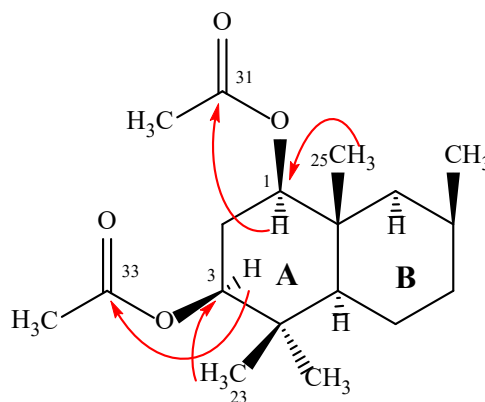


Khung cấu trúc hopan

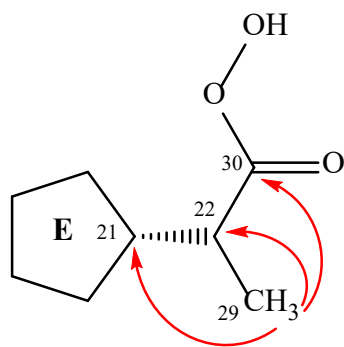
Phổ **HMBC** ngoài việc cho biết cho thấy các tương tác nhằm xác định lại về cấu trúc khung chính và vị trí các nhóm thế methyl lên khung, còn có thêm các tương tác để xác định vị trí các carbon còn lại, như sau:

- Tương tác giữa proton methyl ở 2 vị trí δ_{H} 2.02 (3H, *s*, H-34) và δ_{H} 1.97 (3H, *s*, H-32) với 2 carbon carbonyl lần lượt tại δ_{C} 170.5 (C33) và δ_{C} 170.3 (C31). Chứng tỏ sự xuất hiện của 2 nhóm acetyl $\text{CH}_3\text{CO}-$.

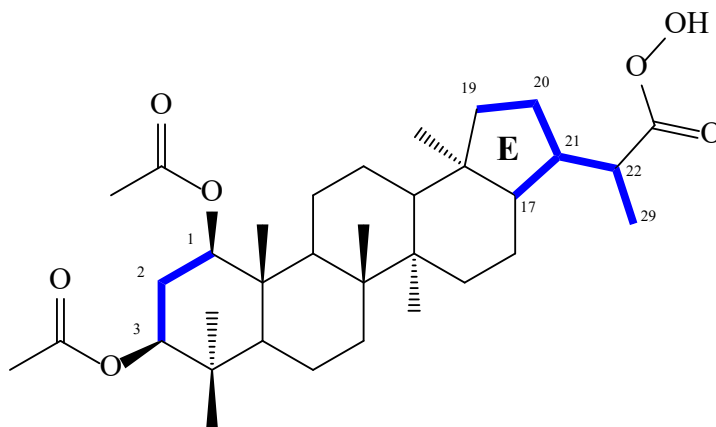
- Tương tác giữa proton của 2 nhóm thế methyl ở δ_{H} 0.83 (6H, *s*, H-23) và δ_{H} 1.00 (3H, *s*, H-25) với 2 carbon methine kề nguyên tử oxygen ở δ_{C} 76.5 (C3) và δ_{C} 80.5 (C1). Từ đó xác định vị trí 2 nhánh acetyl nằm tại C1 và C3 ở khung cơ sở.



- Sau khi trừ tất cả số carbon từ khung terpenoids và các nhóm thế methyl thì còn 3 carbon: 1 carbon methyl CH_3 -, 1 carbon methine và 1 carbon carboxyl. Cấu trúc được dự đoán có thể là nhánh 21-(isopropionic)yl $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$. Dựa vào phổ khối **MS** nhận thấy còn dư xấp xỉ 16 đvC. Vì vậy, dự đoán có khả năng cao là cấu trúc của nhóm peracide $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOOH}$. Ngoài ra, phổ **HMBC** còn giúp khẳng định cấu trúc nhánh trên, thông qua tương tác giữ proton methyl ở δ_{H} 1.13 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-29) với carbon methine ở δ_{C} 42.3 (C22) và carbon carbonyl ở δ_{C} 182.0 (C30); và vị trí nhánh nằm trên khung **E** tại vị trí C21 do xuất hiện tương tác với carbon methine ở δ_{C} 42.7 (C21).

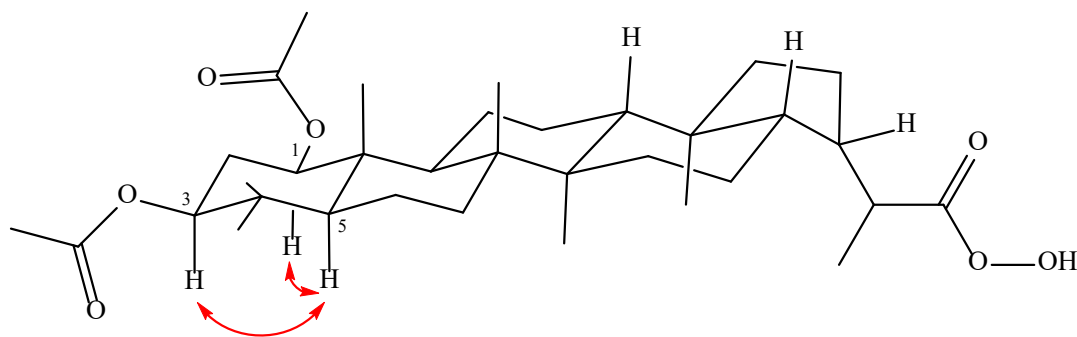


Bên cạnh đó, phổ **COSY** cho biết các tín hiệu tương tác các proton trên 2 carbon liên kết (thông qua dao động 3 trục). Từ đó giúp khẳng định lại khung cấu trúc hợp chất **A1**, cụ thể: Dấu hiệu tín hiệu tương tác từ 2 chiều của proton methylene ở δ_{H} 1.89 (H-2a) và 1.66 (H-2b) với proton methine ở δ_{H} 4.66 (H-1) và 4.58 (H-3). Giúp xác nhận 1 lần nữa vị trí 2 nhóm thế acetyl lên khung cơ sở. Mặc khác, hằng số ghép và đặc điểm mũi dao động proton ở phổ $^1\text{H-NMR}$ cũng khẳng định lần nữa điều đó. Tương tự, là sự xuất hiện của các dấu hiệu để cũng cố vị trí nhóm thế và xác định lần nữa số lượng carbon khung vòng **E**.

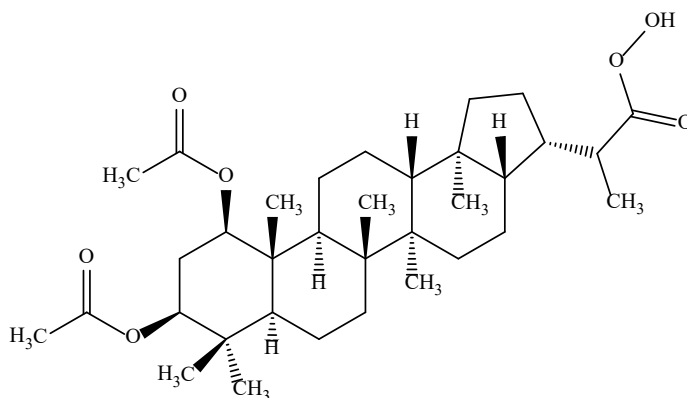


Phổ FT-IR của hợp chất **A1** còn cho thấy tín hiệu hiện diện của nhóm hydroxyl –OH tự do và được kéo dài đỉnh với giá trị 3564 và 3293 cm^{-1} , các dao động uốn kéo dài của nhóm carbonyl tại giá trị 1739 và 1709 cm^{-1} , đã khẳng định lại sự xuất hiện của nhóm chức năng peracide –COOOH. Ngoài ra, còn nhận thấy carbon của nhóm peracide có sự khác biệt khi dịch chuyển hóa học ở vùng từ trường thấp hơn so với carbon của nhóm carbonyl, (C_{30}) δ_C 182.0 thay vì 184.0 .

Đối với hóa học lập thể tương đối của C-1 và C-3, hằng số ghép tăng của H-1 ($J = 11.6$ và 4.8 Hz) và H-3 ($J = 12.4$ và 4.4 Hz) đã xác định các vị trí của nhóm thế proton oxymethine nằm ở trục (axial) so với khung cấu trúc ghế **A**. Hơn nữa, sự định hướng *syn* (cùng phía so với mặt phẳng khung **A**) từ dữ liệu phổ NOESY tại các vị trí proton ở δ_H 4.66 (1H, H-1), δ_H 4.58 (1H, H-3) và δ_H 0.75 (1H, H-5), khẳng định lần nữa tính lập thể của các nhóm thế trên khung vòng **A**.



Từ các phân tích nêu trên, kết hợp kiểm tra trên Scifinder, hợp chất **A1** được xác định là **hợp chất mới**, được đặt tên là tinctoride A.



Hợp chất tinctoride A

Bảng 4.1. Tổng hợp phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **A1**

Carbon	Phổ $^1\text{H-NMR}$	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$	Carbon	Phổ $^1\text{H-NMR}$	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
	δ_{H} , mult (J , Hz)	δ_{C}		δ_{H} , mult (J , Hz)	δ_{C}
1	4.66 <i>dd</i> (4.8, 11.6)	80.5	18	-	44.4
2	1.89 <i>m</i> 1.66 <i>m</i>	30.1	19	1.52 <i>m</i> 0.89 <i>m</i>	41.0
3	4.58 <i>dd</i> (4.4, 12.4)	76.5	20	1.86 <i>m</i> 1.62 <i>m</i>	26.7
4	-	37.9	21	2.36 <i>m</i>	42.7
5	0.75 <i>m</i>	52.9	22	2.33 <i>m</i>	42.3
6	1.54 <i>m</i>	17.9	23	0.83 <i>s</i>	28.0
7	1.40 <i>m</i> 1.20 <i>m</i>	33.1	24	0.83 <i>s</i>	16.2
8	-	42.3	25	1.00 <i>s</i>	13.0
9	1.47 <i>m</i>	50.8	26	0.94 <i>s</i>	17.0
10	-	42.1	27	0.90 <i>s</i>	16.7
11	1.45 <i>m</i> 1.30 <i>m</i>	23.0	28	0.70 <i>s</i>	15.8
12	1.47 <i>m</i> 1.32 <i>m</i>	23.9	29	1.13 <i>d</i> (6.4)	17.8
13	1.32 <i>m</i>	48.7	30	-	182.0
14	-	42.1	31	-	170.3
15	1.18 <i>m</i>	33.5	32	1.97 <i>s</i>	21.3
16	1.45 <i>m</i>	19.9	33	-	170.5
17	1.23 <i>m</i>	53.8	34	2.02 <i>s</i>	21.9

Tất cả được đo trong dung môi hòa tan là CDCl_3

4.1.2. Biện luận cấu trúc **A2**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO} - d_6$, δ ppm) của hợp chất **A2** cho thấy các tín hiệu: Có 2 proton hydroxyl ở δ_{H} 3.82 (1H, *d*, $J = 6.4$ Hz, OH-6) và δ_{H} 3.81 (1H, *s*, OH-22); 1 proton oxymethine ở δ_{H} 3.75 (1H, *m*, $J = 10.4$ và 6 Hz, H-6); 5 proton methine ở δ_{H} 0.74 (1H, *s*, H-5), δ_{H} 1.21 (1H, *m*, H-9), δ_{H} 1.34 (1H, *m*, H-13); δ_{H} 1.37 (1H, *m*, H-17), δ_{H} 2.10 (1H, *m*, H-21); 20 proton methylene nằm trong khoảng δ_{H} 0.70-2.00 (*m*) và 24 proton methyl được xác định tại δ_{H} 1.11 (1H, *s*, H-23), δ_{H} 1.07 (1H, *s*, H-30), δ_{H} 1.03 (1H, *s*, H-29); δ_{H} 0.98 (1H, *s*, H-26), δ_{H} 0.94 (1H, *s*, H-24), δ_{H} 0.92 (1H, *s*, H-27), δ_{H} 0.81 (1H, *s*, H-25), δ_{H} 0.71 (1H, *s*, H-28).

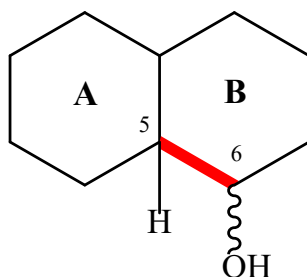
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) của hợp chất **A2** cho thấy có 30 đỉnh, tương ứng với 30 carbon, trong đó: Có 1 carbon oxymethine $>\text{CH-O-}$ ở δ_{C} 66.6 (C6) và 1 carbon bậc III kề nguyên tử oxygen ở δ_{C} 71.6 (C22). Thông qua các mũi tín hiệu $^{13}\text{C-NMR}$, có thể dự đoán: Sự hiện diện của bộ khung triterpene loại hopan [73].

Phổ **HMBC** cho biết ngoài các tương tác proton đến carbon của khung hopan, thì còn thể hiện các dấu hiệu tương tác nhằm xác định vị trí các nhóm hydroxyl như sau:

Proton methyl ở δ_{H} 0.98 (1H, *s*, H-26) tương tác với các carbon ở δ_{C} 44.7 (C7), δ_{C} 42.1 (C8) và δ_{C} 49.3 (C9); Proton methyl ở δ_{H} 0.81 (1H, *s*, H-25) tương tác với các carbon ở δ_{C} 39.9 (C1), δ_{C} 42.3 (C10), δ_{C} 49.3 (C9) và tín hiệu yếu với δ_{C} 60.0 (C5). Proton methyl ở δ_{H} 0.92 (1H, *s*, H-27) tương tác với các carbon ở δ_{C} 48.9 (C13), δ_{C} 41.5 (C14) và δ_{C} 33.9 (C15). Proton methyl ở δ_{H} 0.71 (1H, *s*, H-28) tương tác với các carbon ở δ_{C} 48.9 (C13), δ_{C} 53.8 (C17), δ_{C} 43.6 (C18) và δ_{C} 41.5 (C19). Ngoài ra, còn cho biết tương tác qua lại giữa 2 proton methyl đến các vị trí carbon của chúng ở δ_{C} 36.7 (C23), δ_{C} 22.0 (C24) và với các carbon ở vị trí δ_{C} 43.6 (C3), δ_{C} 33.3 (C4) và δ_{C} 60.0 (C5). Cho phép xác định các nhóm methyl thế lên khung hopan tại các vị trí (C4) \times 2, C10, C8, C14, C18.

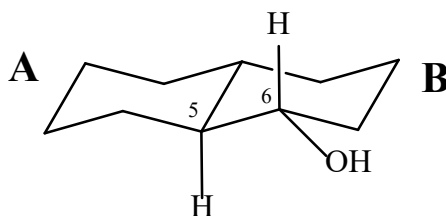
Sau khi trừ các tính hiệu ở $^{13}\text{C-NMR}$ được xác định như trên thì còn dư 2 nhóm methyl và 1 carbon kề nguyên tử oxygen ở vùng từ trường thấp. Dự đoán sự xuất hiện cấu trúc nhóm thế (2-hydroxyl)isopropyl. Điều này còn được khẳng định thông qua tương tác qua lại từ các proton của 2 nhóm methyl ở δ_{H} 1.03 (1H, *s*, H-29) và δ_{H} 1.07 (1H, *s*, H-30) đến carbon ở vị trí thế của chúng và các carbon tại δ_{C} 50.4 (C21) và δ_{C} 71.6 (C22). Qua đó, nhóm (2-hydroxyl)isopropyl được xác định thế tại vị trí C21, khẳng định cấu trúc **A2** mang bộ khung diplopterol.

Xuất hiện tương tác từ proton hydroxyl ở δ_{H} 3.82 (1H, *d*, OH-6) tới carbon ở δ_{C} 66.6 (C6), δ_{C} 60.0 (C5) và δ_{C} 44.7 (C7). Ngoài ra, phổ **COSY** cho thấy tín



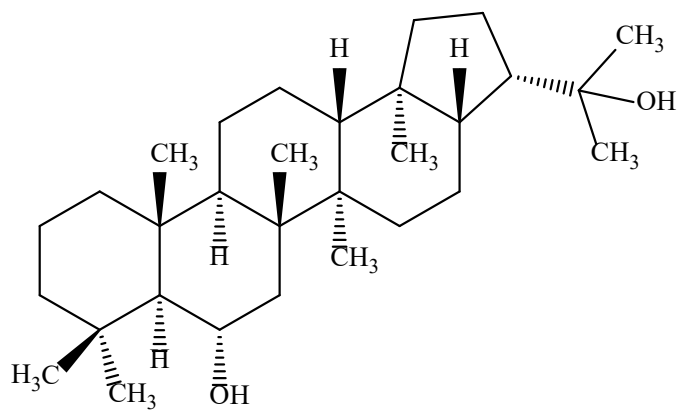
hiệu tương quan gần giữa 2 proton thông qua trục carbon ở δ_H 3.82 (1H, *d*, OH-6) và δ_H 0.74 (1H, *d*, H-5). Chứng minh vị trí nhóm thế hydroxyl trên khung hopan tại vị trí C6. Proton hydroxyl ở δ_H 3.81 (1H, *s*, H-22) xuất hiện tương tác đến carbon ở δ_C 71.6 (C22), δ_C 50.4 (C21), δ_C 28.9 (C29), δ_C 30.8 (C30). Từ đó, cho phép xác định vị trí nhóm thế của nhóm hydroxyl này thuộc vị trí carbon C22.

- Về lập thể, hằng số ghép proton $J_{H-5, H-6} = 6$ Hz ở δ_H 3.75 (1H, *m*, H-6) và δ_H 0.74 (1H, *d*, H-5) biểu thị tương tác trái phía so với khung vòng (axial-axial). Từ đó cho phép xác định lập thể của nhánh hydroxyl tại C6 theo hướng α (vị trí xiên - equatorial) cùng phía so với proton tại C5 đã được xác định tính lập thể từ trước.



Phổ **HSQC** cho biết mối tương quan giữa tín hiệu proton và carbon nối trực tiếp với proton đó. Theo đó, khẳng định lại lần nữa các vị trí của proton trên khung cấu trúc hợp chất **A2**.

Tóm tắt các dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, **COSY**, **HMBC**, **HSQC** và so sánh với tài liệu [74]. Khẳng định rằng **A2** là **6 α -22diol hopan (zeorine)**.



Hợp chất zeorine

Bảng 4.2. So sánh phổ ^1H và ^{13}C -NMR giữ hợp chất **A2** và **zeorine**

Vị trí carbon	A2 (DMSO- d_6)		Zeorine (DMSO- d_6)	
	^1H -NMR δ_{H} ppm (<i>mũi</i> , số H) 400 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 100 MHz	^1H -NMR δ_{H} ppm (<i>mũi</i> , số H) 400 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 100 MHz
1	0.76 & 1.57 (<i>m</i> , 1H)	39.7	0.77 & 1.56 (<i>m</i> , 1H)	39.5
2	1.32 & 1.51 (<i>m</i> , 1H)	18.0	1.32 & 1.51 (<i>m</i> , 1H)	18.1
3	1.15 & 1.28 (<i>m</i> , 1H)	43.6	1.14 & 1.28 (<i>m</i> , 1H)	43.5
4		33.3		33.3
5	0.74 (<i>d</i> , 1H)	60.0	0.73 (<i>d</i> , 1H)	60.0
6	3.71-3.78 (<i>m</i> , 1H)	66.6	3.75 (<i>m</i> , 1H)	66.5
7	1.38 (<i>m</i> , 1H)	44.7	1.38 (<i>m</i> , 1H)	44.7
8		42.1		42.1
9	1.21 (<i>m</i> , 1H)	49.3	1.21 (<i>m</i> , 1H)	49.3
10		38.6		38.5
11	1.27 & 1.50 (<i>m</i> , 1H)	20.6	1.27 & 1.50 (<i>m</i> , 1H)	20.5
12	1.35 & 1.48 (<i>m</i> , 1H)	23.5	1.35 & 1.48 (<i>m</i> , 1H)	23.6
13	1.34 (<i>m</i> , 1H)	48.9	1.34 (<i>m</i> , 1H)	48.9
14		41.5		41.4
15	1.18 & 1.37 (<i>m</i> , 1H)	33.9	1.17 & 1.36 (<i>m</i> , 1H)	33.9
16	1.53 & 1.93 (<i>m</i> , 1H)	21.3	1.53 & 1.93 (<i>m</i> , 1H)	21.3
17	1.37 (<i>m</i> , 1H)	53.8	1.37 (<i>m</i> , 1H)	53.8
18		43.6		43.5
19	0.88 & 1.46 (<i>m</i> , 1H)	40.9	0.88 & 1.45 (<i>m</i> , 1H)	40.9
20	1.48 & 1.65 (<i>m</i> , 1H)	26.1	1.48 & 1.64 (<i>m</i> , 1H)	26.0
21	2.10 (<i>m</i> , 1H)	50.4	2.10 (<i>m</i> , 1H)	50.3
22		71.6		71.5
23	1.11 (<i>s</i> , 3H)	36.7	1.12 (<i>s</i> , 3H)	36.6
24	0.94 (<i>s</i> , 3H)	22.0	0.95 (<i>s</i> , 3H)	22.0
25	0.81 (<i>s</i> , 3H)	17.0	0.82 (<i>s</i> , 3H)	16.9
26	0.98 (<i>s</i> , 3H)	18.1	0.98 (<i>s</i> , 3H)	18.0

27	0.92 (<i>s</i> , 3H)	16.8	0.92 (<i>s</i> , 3H)	16.8
28	0.71 (<i>s</i> , 3H)	15.9	0.71 (<i>s</i> , 3H)	15.8
29	1.03 (<i>s</i> , 3H)	28.9	1.04 (<i>s</i> , 3H)	29.0
30	1.07 (<i>s</i> , 3H)	30.9	1.08 (<i>s</i> , 3H)	30.8

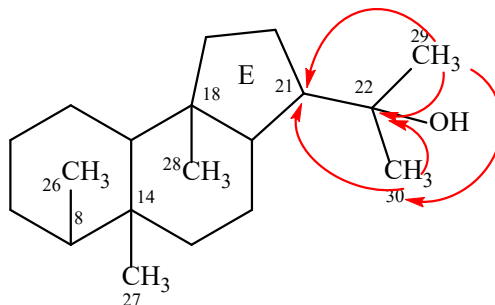
4.1.3. Biện luận cấu trúc A3

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ ppm) của hợp chất **A3** cho thấy các tín hiệu: Có 2 proton methine trên carbon mang oxygen ở δ_{H} 5.19-5.26 (1H, *m*, $J=2.0$, 5.2 và 10.7 Hz, H-6) và δ_{H} 4.08-4.11 (1H, *m*, $J=4.8$ và 1.6 Hz, H-16); 4 proton methine ở δ_{H} 1.51 (1H, *brs*, H-17), δ_{H} 2.48-2.55 (1H, *m*, H-20), δ_{H} 2.48-2.55 (1H, *m*, H-21) và δ_{H} 1.135 (1H, *s*, H-5); 1 proton methylene ở δ_{H} 1.51 (1H, *s*, H-7) và 27 proton methyl được xác định tại δ_{H} 1.03 (1H, *s*, H-23), δ_{H} 1.19 (1H, *s*, H-30), δ_{H} 1.29 (1H, *s*, H-29); δ_{H} 1.13 (1H, *s*, H-26), δ_{H} 1.85 (1H, *s*, H-24), δ_{H} 1.04 (1H, *s*, H-27), δ_{H} 0.93 (1H, *s*, H-25), δ_{H} 0.78 (1H, *s*, H-28) và δ_{H} 2.03 (1H, *s*, 6-COMe).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3 , δ ppm) của hợp chất **A3** cho thấy có 32 đỉnh có cường độ tín hiệu tương đương nhau cần khảo sát, tương ứng với 32 carbon, trong đó: Có 1 carbon nhóm carbonyl $-\text{CO}-$ ở δ_{C} 71.9 (C6). Hơn nữa, còn xuất hiện 2 carbon methine $>\text{CH}-\text{O}-$ và 1 carbon bậc III $>\text{C}<_{\text{O}}$ kề nguyên tử oxygen lần lượt ở δ_{C} 71.9 (C6), δ_{C} 67.0 (C16) và δ_{C} 74.9 (C22). Thông qua các tín hiệu mũ $^{13}\text{C-NMR}$, có thể dự đoán: Sự hiện diện của bộ khung triterpene loại hopan (hay hopanoide) [69].

Phổ **HMBC** ngoài việc xác định lại vị trí các nhóm thế trên khung cơ sở hopan như vị trí C10, C8, C14, C18 và C4, tương tự như phần biện luận cấu trúc **A1**, thì còn thể hiện các dấu hiệu tương quan nhằm xác định vị trí thế khác trên khung như sau:

- Nhánh (2-hydroxyl)isopropyl được xác định cấu trúc thông qua tương tác qua lại giữa proton methyl ở δ_{H} 1.19 (1H, *s*, H-30), δ_{H} 1.29 (1H, *s*, H-29) và đặc



điểm dịch chuyển về vùng từ trường thấp của carbon nối trực tiếp với nguyên tố có độ âm điện cao. Hơn nữa, còn cho phép xác định vị trí của nhánh thông qua các tương tác các proton của 2 nhóm methyl đến carbon δ_C 50.9 (C21).

- Nhánh acetyl CH_3CO - còn lại được xác định thông qua tương tác từ các proton methyl độ dịch chuyển về vùng từ trường thấp đặc trưng cho carbon carbonyl ở δ_C 170.4 (6-COOMe) và tương tác từ proton methyl δ_H 2.03 (1H, 6-COMe) với chính carbon carbonyl đó.

- Ngoài ra, phổ **HMBC** còn cho biết các tín hiệu nhiễu và tạp qua các tương tác không thuộc cấu trúc cần xác định.

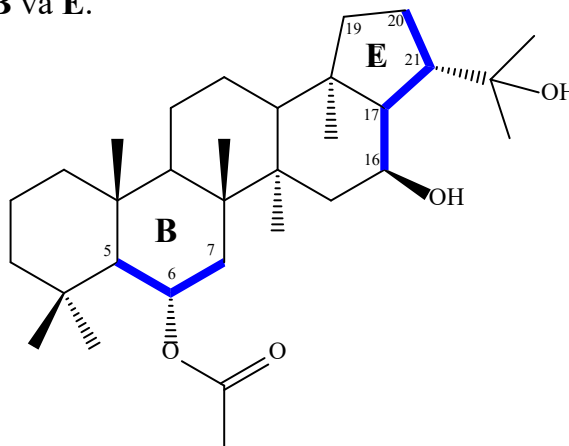
Phổ **HSQC** ngoài cho thấy các tương quan 2 chiều về các carbon có chứa proton, thì còn giúp xác định ngược lại có 7 carbon không chứa proton dựa trên các tín hiệu đã được xác định rõ từ phổ ^{13}C -NMR. Từ đó, giúp xác định lại cấu trúc khung vòng khi chưa thể xác định hoàn toàn các tín hiệu proton methine và methylene ở phổ ^1H -NMR.

Kết hợp với phổ **COSY**, có thể khẳng định lại các vị trí carbon trên khung vòng **E** khi các dấu hiệu tương tác giữa 2 proton trên 2 carbon kế cận được thể hiện rõ trên phổ, như:

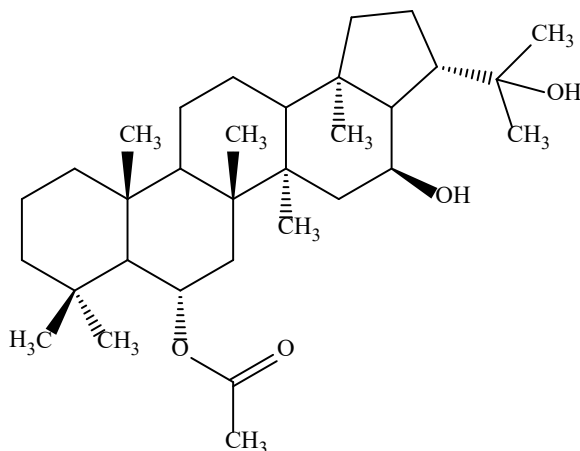
- Tương tác proton giữa proton ở δ_H 2.48-2.55 (H-21) với các proton ở δ_H 1.51 (H-17) và δ_H 2.48-2.55 (H-20). Cùng với đó là dấu hiệu tương tác giữa δ_H 1.51 (H-17) với 4.08-4.11 (H-16).

- Ngoài ra, còn cho biết dấu hiệu tương tác giữa proton ở δ_H 5.19-5.26 (1H, *m*, H-6) với các proton ở δ_H 1.135 (H-5) và δ_H 1.51 (H-7).

Xác định lại lần nữa vị trí nhóm thế và tín hiệu proton, carbon trên phổ NMR ở khung cấu trúc vòng **B** và **E**.



Tóm tắt các dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, COSY, HMBC, HSQC và so sánh với tài liệu [75]. Khẳng định rằng **A3** là **6 α -acetoxyhopan-16 β ,22-diol**.



Hợp chất 6 α -acetoxyhopan-16 β ,22-diol.

Bảng 4.3. Biểu diễn phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất **A3** và so sánh phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **A3** và 6 α -acetoxyhopan-16 β ,22-diol.

Carbon	A3 (DMSO- d_6)		6 α -acetoxyhopan-16 β ,22-diol (DMSO- d_6)
	$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} ppm (mũ, số H) 400 MHz	$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} ppm 100 MHz	$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} ppm 100 MHz
1		40.4	40.2
2		18.1	18.4
3		43.9	43.8
4		33.6	33.2
5	1.14 (s, 1H)	58.6	58.4
6	5.19-5.26 (m, 1H)	71.9	71.8
7	1.51 (s, 1H)	41.1	40.9
8		42.9	42.8

9		49.5	49.3
10		39.7	39.5
11		20.6	20.9
12		23.7	23.5
13		49.5	48.5
14		44.2	44.1
15		43.6	43.5
16	4.08-4.11 (<i>m</i> , 1H)	67.0	66.8
17	1.50-1.51 (<i>brs</i> , 1H)	61.0	60.7
18		45.8	45.7
19		41.8	41.6
20	1.83-1.87 (<i>m</i> , 1H)	27.9	27.8
21	2.48-2.55 (<i>m</i> , 1H)	50.9	50.8
22		74.9	74.4
23	1.03 (<i>s</i> , 3H)	36.4	36.3
24	0.85 (<i>s</i> , 3H)	22.2	22.1
25	0.93 (<i>s</i> , 3H)	17.3	17.1
26	1.13 (<i>s</i> , 3H)	18.5	18.4
27	1.04 (<i>s</i> , 3H)	17.2	17.0
28	0.78 (<i>s</i> , 3H)	18.5	18.0
29	1.29 (<i>s</i> , 3H)	28.9	27.0
30	1.19 (<i>s</i> , 3H)	31.2	31.2
6-COOMe		170.4	171.3
6-COOMe	2.03 (<i>s</i> , 3H)	22.2	22.1

4.1.4. Biện luận cấu trúc A4

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) của hợp chất **A4** cho thấy các mũi tín hiệu proton sau: Có 2 proton exo-methylene ở δ_{H} 5.57 và 4.59 (1H, *brs*, H-29a,b); 1 proton oxymethine ở δ_{H} 3.01-3.09 (1H, *m*, $J=12.0$ và 4.0 Hz, H-3); 2 tín hiệu proton methine ở δ_{H} 3.10-3.14 (1H, *m*, $J=4.0$ Hz, H-19), δ_{H} 2.23-2.28 (1H, *m*, $J=12.0$ và 4.0 Hz, H-13); 6 tín hiệu proton methyl với cường độ tín hiệu cao và nằm vùng từ trường cao ở δ_{H} 1.70 (3H, *s*, H-30), δ_{H} 1.40 (3H, *s*, H-23), δ_{H} 1.01 (3H, *s*, H-27), δ_{H} 0.96 (3H, *s*, H-26), δ_{H} 0.85 (3H, *s*, H-24) và δ_{H} 0.75 (3H, *s*, H-25); cùng các proton methine và methylene còn lại nằm trong vùng δ_{H} 1.10-2.20.

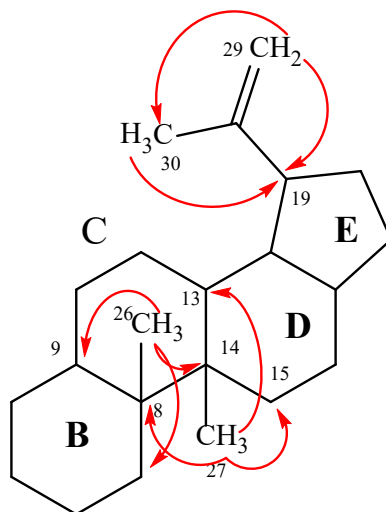
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) của hợp chất **A4** cho thấy có 30 tín hiệu carbon, trong đó: Có 1 carbon carbonyl $-\text{CO}-$ ở δ_{C} 177.5 (C28); 1 carbon tứ cấp $>\text{C}=\text{C}$ ở δ_{C} 151.6 (C20) và 1 carbon methine $-\text{CH}=\text{C}$ ở δ_{C} 110.0 (C29)

nằm ở vùng từ trường thấp đặc trưng cho 2 nguyên tử carbon olefine và 1 carbon methine kề nguyên tử oxygen >CH-O- ở δ_C 78,6 (C3).

Thông qua số lượng và tần số các mũi dao động ^{13}C và $^1\text{H-NMR}$: Dự đoán khung cơ sở là dẫn xuất triterpenoide (C_{30} – pentacyclic triterpene. Hơn nữa, vị trí C19 liên kết trực tiếp với nhóm hydrocarbon \rightarrow Nhận định là loại khung lupan [76]).

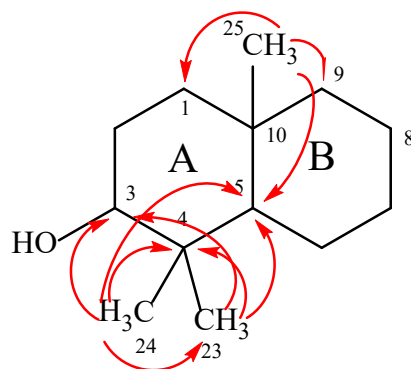
Phổ **HMBC** cho thấy các tín hiệu tương quan 2 chiều, tương tác từ proton đến carbon lân cận, giúp xác định vị trí tương đối của các nhóm thế lên khung cơ sở như sau:

- Do không có sự tương tác proton nhóm methyl đặc trưng của khung lupan lên các carbon olefin và hằng số ghép ở H-19 là $J_{\text{H-21, H-19}} = 4 \text{ Hz}$, có thể xác định liên kết π không thuộc cấu trúc khung vòng. Cùng với đó là các tương tác của 2 proton olefin đến carbon methyl ở δ_C 19.1 (C30). Giúp xác định nhánh là prop-1-en-2-yl. Hơn nữa các proton methyl ở δ_H 1.70 (3H, *s*, H-30) và proton olefin lại có cùng tương tác với carbon methine ở δ_C 48.0 (C19). Cho phép xác định nhánh prop-1-en-2-yl được đính tại vị trí C19 ở khung vòng **E**. Ngoài ra, proton methyl ở δ_H 0.95 (3H, *s*, H-26) tương tác với carbon tứ cấp ở δ_C 43.2 (C14) và methine ở δ_C 51.5 (C9). Proton methyl ở δ_H 1.01 (3H, *s*, H-27) thể hiện tương tác với ba carbon, gồm: 1 carbon tứ cấp ở δ_C 41.5 (C8), 1 carbon methine δ_C 39.0 (C13) và 1 carbon methylene ở δ_C 30.7 (C15). Qua đó xác định nhánh methyl tại vị trí C9 và C14.

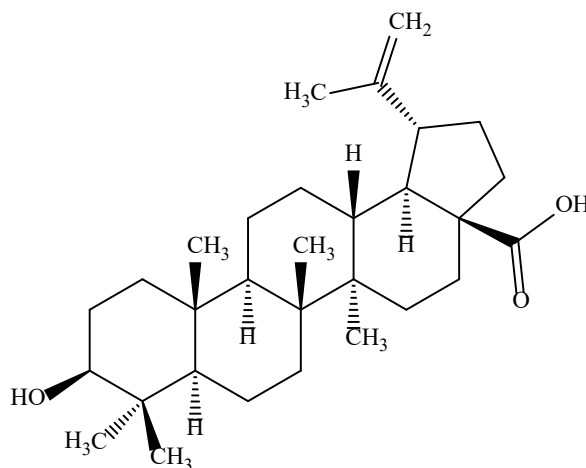


- Proton methyl ở δ_H 0.85 (3H, *s*, H-25) lại có tương tác với carbon ở δ_C 39.6 (C1), ở δ_C 56.3 (C5) và δ_C 51.5 (C9). Các proton methyl ở δ_H 0.75 (3H, *s*, H-24)

và δ_H 1.40 (3H, s, H-23) cùng tương tác với các carbon ở ở δ_C 78,6 (C3), δ_C 39.6 (C4) và δ_C 56.3 (C5). Cho phép xác định vị trí của 1 nhánh methyl tại C10 và 2 nhánh tại C4. Từ đó, khẳng định lại cấu trúc khung cần khảo sát là terpenoide loại lupan với nhánh hydroxyl tại C3 và có xuất hiện liên kết π ở nhánh prop-1-en-2-yl.



Qua việc phân tích kết hợp các phổ và tóm tắt các dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, HMBC và so sánh với tài liệu [77]. Khẳng định rằng **A4** là **3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (Acid betulinic)**.



Hợp chất acid betulinic

Bảng 4.4. So sánh phổ ^1H & ^{13}C -NMR giữa hợp chất **A4** và **acid belulinic**

Vị trí carbon	A4 (Acetone- d_6)		Acid belulinic (DMSO- d_6)	
	^1H -NMR δ_{H} ppm (mũ, số H) 400 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 100 MHz	^1H -NMR δ_{H} ppm (mũ, số H) 400 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 100 MHz
1		39.6		39.1
2		28.3		28.0
3	3.01-3.08 (<i>m</i> , 1H)	78.6	2.95-2.98 (<i>m</i> , 1H)	77.7
4		39.6		39.4
5		56.3		55.8
6		19.5		18.8
7		36.2		34.8
8		41.5		40.9
9		51.5		49.5
10		38.0		37.6
11		21.7		21.3
12		26.4		25.9
13	2.31-2.38 (<i>m</i> , 1H)	39.0	2.21-2.24 (<i>m</i> , 1H)	38.5
14		43.2		42.9
15		30.7		30.1
16		32.8		32.6
17		56.8		56.3
18		49.9		50.8
19	3.07-3.14 (<i>m</i> , 1H)	48.0	2.91-2.94 (<i>m</i> , 1H)	47.5
20		151.6		151.2
21		31.3		31.0
22		37.5		37.2
23	0.96 (<i>s</i> , 3H)	28.6	0.87 (<i>s</i> , 3H)	28.9
24	0.75 (<i>s</i> , 3H)	16.5	0.65 (<i>s</i> , 3H)	16.8
25	0.85 (<i>s</i> , 3H)	16.1	0.76 (<i>s</i> , 3H)	16.6

26	0.95 (<i>s</i> , 3H)	16.6	0.93 (<i>s</i> , 3H)	15.3
27	1.01 (<i>s</i> , 3H)	15.0	0.87 (<i>s</i> , 3H)	16.6
28		177.5		178.1
29	4.72 (<i>s</i> , 1H, C-29a)	110.0	4.69 (<i>brs</i> , 1H, C-29a)	110.4
	4.59 (<i>s</i> , 1H, C-29b)		4.56 (<i>brs</i> , 1H, C-29b)	
30	1.70 (<i>s</i> , 3H)	19.1	1.64 (<i>s</i> , 3H)	19.8
CH, CH ₂	1.10-1.80 (<i>m</i> , 26H)		1.15-1.85 (<i>m</i> , 26H)	

4.1.5. Biện luận cấu trúc A5

Phổ khối lượng phân giải cao **HR-ESI-MS** cho thấy mũi ion phân tử giả tại m/z : $[M-H]^-$ 665.5110 tương ứng với CTPT là $C_{43}H_{69}O_5-H$ (giá trị phân tử khối tính toán là 665.5145).

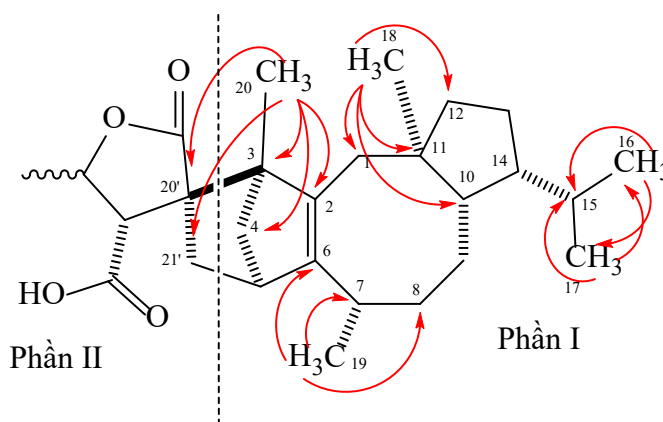
Phổ ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃, δ ppm) của hợp chất **A5** cho thấy các tín hiệu: Có 1 proton oxymethine ở δ_H 4.41-4.46 (1H, *td*, $J = 8$ và 4.8 Hz, H-18'); 3 proton methine ở δ_H 2.68-2.70 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-19'), δ_H 2.87-2.88 (1H, *brd*, $J = 3.0$ Hz, H-5); δ_H 2.50-2.59 (1H, *m*, H-7); 20 proton methylene nằm trong khoảng δ_H 0.70-2.00 (*m*); 18 proton methyl được xác định tại δ_H 2.14 (3H, *s*, H-1'), δ_H 0.86-0.87 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-16), δ_H 0.75 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-17); δ_H 0.73 (3H, *s*, H-18), δ_H 0.96-0.98 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, H-19), δ_H 1.23 (1H, *s*, H-20). Đặc biệt, sự xuất hiện 1 đỉnh cao vùng δ_H 1.20 – 1.30 ppm, xác định lại có sự hiện diện chuỗi aliphatic.

Phổ ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) của hợp chất **A5** cho thấy có 43 tín hiệu carbon cần khảo sát, trong đó: Có 2 carbon carbonyl –CO– ở δ_C 210.0 (C2') và δ_C 180.3 (C23') và 1 carbon carbonyl lactone δ_C 175.2 (C22'). Ngoài ra, sự xuất hiện của 2 carbon carbon olefin ở δ_C 150.4 (C6) và δ_C 141.1 (C2). Đặc biệt là cường độ tín hiệu cao của nhóm tín hiệu trong khoảng δ_C 29.5 đến 30.0 ppm cho phép dự đoán chuỗi aliphatic.

Dựa vào đặc điểm cấu trúc xuất hiện chuỗi aliphatic, nên chia cấu trúc hợp chất **A5** thành 2 phần là: Phần I là diterpene và phần II là γ-butyrolactone aliphatic acid.

Phổ **HMBC** cho biết cho thấy các tương tác nhằm xác định cấu trúc khung chính và vị trí các nhóm thế methyl lên khung, như sau:

- Phần I: Xuất hiện tín hiệu tương tác giữa proton methyl ở vị trí δ_H 0.74 (*s*, H-18) với 2 carbon methylene và 2 carbon methine lần lượt tại δ_C 46.4 (C11), δ_C 48.1 (C10), δ_C 40.3 (C1) và δ_C 41.9 (C12). Proton methyl tại δ_H 1.23 (*s*, H-20) có tương tác đến các 2 carbon tứ cấp, 1 carbon methylene và 1 carbon olefin lần lượt δ_C 61.5 (C3), δ_C 58.7 (C20'), 51.1 (C4) và 141.0 (C2). Proton methyl tại δ_H 1.23 (*s*, H-20) có tương tác đến các 2 carbon tứ cấp, 1 carbon methylene và 1 carbon olefin lần lượt δ_C 61.5 (C3), δ_C 58.7 (C20'), 51.1 (C4) và 141.0 (C2). Các proton trên 2 nhóm methyl δ_H 0.86-0.87 (*d*, H-16) và δ_H 0.73-0.75 (*d*, H-17) có tương tác qua lại đến carbon trên vị trí thế của chúng và cùng tương tác đến 2 carbon methine ở δ_C 28.5 (C15) và δ_C 47.4 (C14), xác định có sự hiện diện nhánh isopropyl. Qua đó xác định vị trí các nhóm thế 3 nhóm thế methyl và 1 nhánh isopropyl tại các vị trí lần lượt là: C3, C7, C11 và C14.

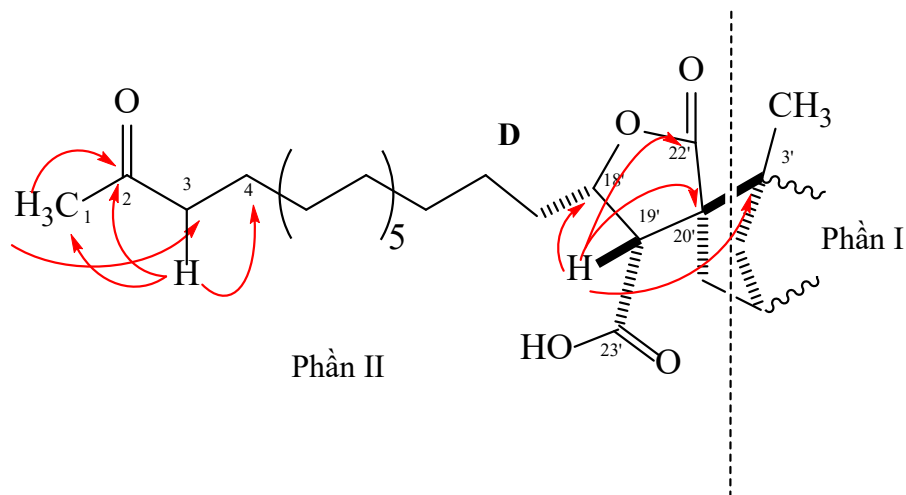


- Ngoài các tương tác nhóm thế lên khung Phần I, **HMBC** còn có tín hiệu tương tác trên khung, như sau: Proton methylene tại δ_H 2.26-2.28 (*d*, H-4a) tương tác đến carbon 2 carbon olefin ở δ_C 150.4 (C6) và δ_C 141.1 (C2). Xác định cầu nối carbon tại C3 và C5. Môi liên kết cấu trúc giữ phần I và phần II thông qua tương tác từ proton methyl ở δ_H 1.23 (3H, *s*, H-20) đến carbon δ_C 58.7 (C20') và proton methine ở δ_H 2.87-2.88 (*d*, H-5) đến carbon δ_C 58.7 (C20'), δ_C 39.1 (C21').

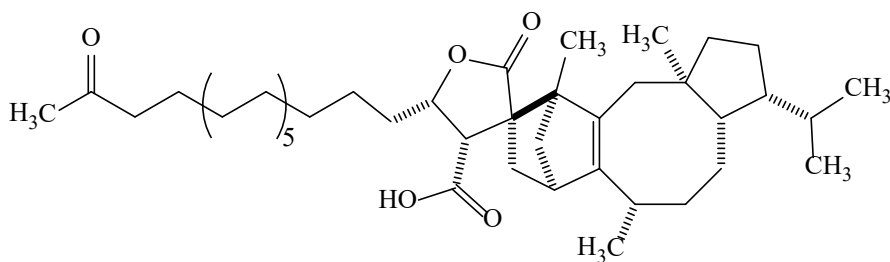
- Kết hợp những thông tin từ phổ **HMBC** cùng với việc so sánh tín hiệu phổ **¹H-NMR** với tài liệu [78] thấy có sự tương đồng về khung cấu trúc plagiospirolides.

- Phần II: Tương quan từ proton methyl δ_H 2.14 (*s*, H-1') đến carbon carbonyl ở δ_C 210.0 (C2') và carbon methylene ở δ_C 44.0 (C3'). Tín hiệu từ proton

methylene δ_H 2.40-2.43 (*t*, H-3') đến carbon methyl, carbonyl, methylene lần lượt ở δ_C 29.6 (C1'), δ_C 210.0 (C2') và δ_C 24.1 (C4'). Thông tin từ số lượng proton lấy từ nhóm methyl có cường độ tín hiệu cao ở phổ $^1\text{H-NMR}$, kết hợp với khối phổ **MS**. Nhận định một lần nữa sự xuất hiện chuỗi aliphatic, cuối chuỗi là nhóm methylketone và mạch gồm 17 carbon. Ngoài ra, còn xác định vị trí nhóm carboxylic nằm tại C19' thông qua đặc điểm methyl tín hiệu và hằng số ghép của proton methine ở δ_H 2.68-2.70 (*d*, $J_{\text{H-18}'} = 8.4$ Hz, H-19'), cùng với đó là tương tác từ proton đó đến các carbon δ_C 79.1 (C18'), δ_C 58.7 (C20'), δ_C 61.5 (C3) và δ_C 175.2 (C22'). Hơn nữa, hằng số ghép và tín hiệu proton methine δ_H 4.41-4.46 (*td*, $J = 8$ và 4.8 Hz, H-18'), cùng với tương quan từ proton này đến carbon δ_C 175.2 (C22'). Những dữ liệu trên cho phép xác định khung **D** thuộc vòng lactone. Qua đó, cũng xác định được chuỗi aliphatic được gắn trên C18'.



Qua việc phân tích kết hợp các phổ và tóm tắt các dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, **HMBC** và so sánh với tài liệu [51]. Khẳng định rằng **A5** là **reticulatin**.



Hợp chất reticulatin

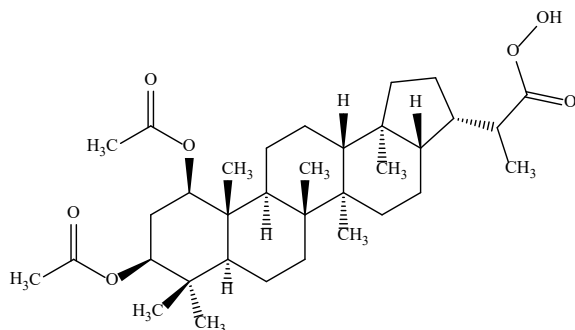
Bảng 4.5. So sánh phổ ^1H & ^{13}C -NMR giữa hợp chất **A5** và **reticulatin**

Vị trí carbon	A5 (CDCl₃)		Reticulatin (CDCl₃)	
	^1H -NMR δ_{H} ppm (<i>mũi</i> , số H) 400 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 100 MHz	^1H -NMR δ_{H} ppm (<i>mũi</i> , số H) 500 MHz	^{13}C -NMR δ_{C} ppm 125 MHz
1	2.09 (<i>s</i> , 2H)	40.3	2.09 (<i>s</i> , 2H)	40.3
2		141.0		141.1
3		61.5		61.5
4a	2.26-2.28 (<i>d</i> , 1H)	51.1	2.27 (<i>d</i> , 1H)	51.2
4b			1.35 (<i>m</i> , 1H)	
5	2.87-2.88 (<i>d</i> , 1H)	40.8	2.87 (<i>d</i> , 1H)	40.8
6		150.4		150.4
7	2.50-2.59 (<i>m</i> , 1H)	30.4	2.56 (<i>m</i> , 1H)	30.4
8a		36.9	1.45 (<i>m</i> , 1H)	37.0
8b			1.34 (<i>m</i> , 2H)	
9a		24.1	1.48 (<i>m</i> , 1H)	24.2
9b			1.34 (<i>m</i> , 2H)	
10		48.1	1.79 (<i>m</i> , 1H)	48.2
11		46.4		46.4
12		41.9	1.38 (<i>m</i> , 1H)	41.9
13	1.40-1.44 (<i>m</i> , 3H)	21.8	1.43 (<i>m</i> , 3H)	21.0
14		47.4	2.08 (<i>m</i> , 1H)	47.6
15		28.5	1.70 (<i>m</i> , 2H)	28.6
16	0.86-0.87 (<i>d</i> , 3H)	23.6	0.87 (<i>d</i> , 3H)	23.6
17	0.73-0.75 (<i>d</i> , 3H)	19.0	0.74 (<i>d</i> , 3H)	19.1
18	0.74 (<i>s</i> , 3H)	21.8	0.75 (<i>s</i> , 3H)	21.8
19	0.96-0.98 (<i>d</i> , 3H)	18.2	0.98 (<i>d</i> , 3H)	18.2
20	1.23 (<i>s</i> , 3H)	13.4	1.23 (<i>s</i> , 3H)	13.4
1'	2.14 (<i>s</i> , 3H)	29.6	2.13 (<i>s</i> , 3H)	29.7
2'		210.0		209.9
3'	2.40-2.43 (<i>t</i> , 2H)	44.0	2.41 (<i>t</i> , 2H)	44.0
4'		24.1	1.51 (<i>m</i> , 2H)	24.1
5'-15'	1.24-1.29 (<i>m</i> , 24H)	29.5	1.24-1.29 (<i>m</i> , 24H)	29.5
16'		25.4		25.5

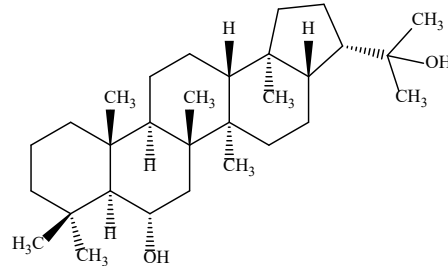
17'a		35.3	1.70 (<i>m</i> , 2H)	35.3
17'b			1.61 (<i>m</i> , 1H)	
18'	4.41-4.46 (<i>td</i> , 1H)	79.1	4.44 (<i>td</i> , 1H)	79.3
19'	2.68-2.70 (<i>d</i> , 1H)	52.8	2.67 (<i>d</i> , 1H)	52.9
20'		58.7		58.6
21'a	2.15-2.18 (<i>dd</i> , 1H)	39.1	2.16 (<i>dd</i> , 1H)	39.2
21'b	2.08 (<i>m</i> , 1H)		2.08 (<i>m</i> , 1H)	
22'		175.2		174.2
23'		180.3		180.4

4.1.6. Tổng hợp các hợp chất đã được phân lập

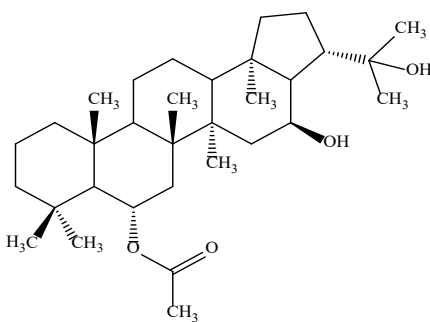
Từ cao EA của địa y *Parmotrema tinctorum* đã tinh chế và cô lập được 5 hợp chất với các công thức cấu tạo sau đây:



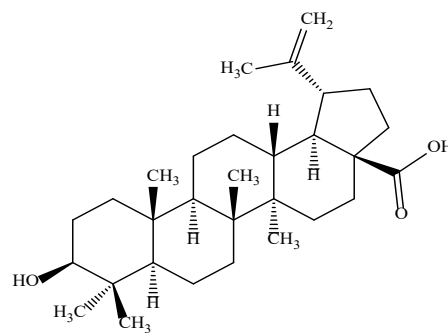
Tinctoride A (A1) – Hợp chất mới



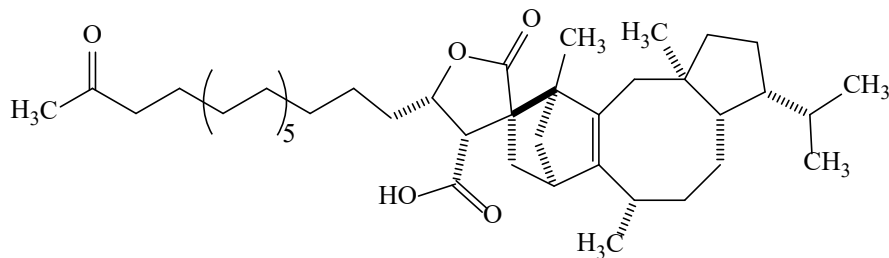
Zeorin (A2)



6α-acetoxypohan-16β,22-diol (A3)



Betulinic acid (A4)



Reticulatin (A5)

Trong đó bao gồm: 3 chất (**A3**, **A4**, **A5**) đã được xác định từ trước trong loài từ trước, 1 chất (**A2**) chưa được phát hiện trong loài địa y *Parmotrema tinctorum* trước đây và 1 chất (**A1**) là hợp chất mới.

4.2. KẾT QUẢ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE

Bảng 4.6. Kết quả IC_{50} của các hợp chất đã cô lập so với acarbose

Hợp chất A	α -Glucosidase, IC_{50} (μM) ^[d]
1	Không hoạt tính
2	258,87 \pm 23,12
3	Không hoạt tính
4	Không hoạt tính
5	3,90 ^[e]
Acarbose	108,08 \pm 3,87

^[d] IC_{50} các giá trị được trình bày là các giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) ($n=3$).

^[e] Giá trị theo tài liệu [79], so với IC_{50} (Acarbose) = 165 μM .

Lưu ý: Chỉ có 4 hợp chất (**A1**, **A2**, **A3** và **A4**) được thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase tại một thời điểm. Do hàm lượng hợp chất **A5** cô lập rất ít (2,0 mg) và không thể cô lập thêm như hợp chất **A1** trong thời gian thực nghiệm, nên không thể cùng 4 hợp chất còn lại thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase tại cùng một thời điểm, nhưng việc sử dụng cùng phương pháp và địa điểm nghiên cứu thử nghiệm, vẫn có thể đánh giá định tính về khả năng hoạt động ức chế mạnh enzyme α -glucosidase của hợp chất **A5**.

Nhận xét: Một trong bốn hợp chất thuộc nhóm triterpenoids được thử nghiệm tại cùng một thời điểm (hợp chất **A2**, IC_{50} = 258,87 μM) thể hiện hoạt động ức chế enzyme α -glucosidase so với acarbose (IC_{50} = 108,08 μM). Ngoài ra, theo các nghiên cứu trước đây [80], hợp chất **A2** cho thấy hoạt động ức chế α -glucosidase cao nhất trong số các hợp chất xuất hiện nhiều ở địa y. Trong khi đó định hướng 6 β -OH (một đồng phân của hợp chất **A2** làm giảm hoạt động ức chế α -glucosidase [81]). Từ đó cho thấy, sự ảnh hưởng lập thể của nhóm

hydroxyl ở C6 trong khung hopan đóng vai trò quan trọng khi đánh giá hoạt tính ức chế enzyme này. Qua khảo sát, hợp chất **A3** và **A4** có hoạt tính ức chế kém đối với enzyme α -glucosidase, lần lượt là $39,91 \pm 3,30$ (%) và $25,21 \pm 3,49$ (%) tại nồng độ thử nghiệm nên không tính được giá trị IC_{50} , cho thấy đặc điểm khung cấu trúc của các hợp chất triterpenoides (lupan và hopan) ít quyết định đến hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

Tuy nhiên, chiết xuất từ *P. tinctorum* cho thấy sự ức chế α -glucosidase là đáng kể [49]. Cấu trúc lactone trong khung cấu trúc hợp chất **A5** có thể là nguyên nhân chính ảnh hưởng đến sự ức chế mạnh enzyme α -glucosidase khi hợp chất tinctorinone [45] cũng mang đặc điểm này. Vậy hợp chất **A5** có thể thuộc thành phần có khung cấu trúc chính trong hoạt tính ức enzyme α -glucosidase ở địa y *Parmotrema tinctorum* khi IC_{50} đạt giá trị $3,90 \mu M$ so với chất chuẩn acarbose $IC_{50} = 165 \mu M$ [79].

Chương 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. KẾT LUẬN

Luận án thực hiện nghiên cứu hóa học trên loài địa y thuộc chi *Parmotrema* (họ Parmeliaceae), mọc ở Việt Nam là *Parmotrema tinctorum*. Loài này được thu hái ở tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam; được nhận danh khoa học bởi T.S Võ Thị Phi Giao, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Loài này hiện tại rất ít được nghiên cứu ở Việt Nam.

Việc nghiên cứu trên loài cây này đã đạt một số kết quả như sau:

☞ Về kết quả khảo sát thành phần hóa học từ cao EA của địa y *Parmotrema tinctorum*:

Thực hiện các phương pháp chiết pha rắn kết hợp với sắc ký cột trên silica gel và sắc ký điều chế, từ các phân đoạn **EL2** đã cô lập được 5 hợp chất. Sử dụng các phương pháp hóa lý hiện đại như **FT-IR**, **ESI-MS**, **NMR** kết hợp so sánh với số liệu trong tài liệu tham khảo đã xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất này, cụ thể: **A2** - 6 α -22diol hopan (zeorin); **A3** - 6 α -acetoxylupan-16 β ,22-diol; **A4** - (3 β)-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (Acid betulinic); **A5** – reticulatin. Trong đó, **A2** được xác định là mới – chưa được tìm thấy trước đây ở địa y *Parmotrema tinctorum*. Ngoài ra, còn có một hợp chất peracid mới – chưa được tìm thấy từ trước đến nay và qua nghiên cứu xác định được hợp chất này có xuất hiện với một lượng nhỏ ở loài địa y *Parmotrema tinctorum*, đó là: **A1** – tinctoride A.

☞ Về kết quả khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Các hợp chất cô lập từ cao EA của địa y *Parmotrema tinctorum* được kiểm tra hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả thu được các hợp chất **A1** không thể hiện khả năng ức chế, hợp chất **A3** và **A4** thể hiện khả năng ức chế rất yếu với loại enzyme này. Trong khi đó, hợp chất **A2** và **A5** là những hợp chất đáng quan tâm về khả năng hoạt động ức chế hoạt tính enzyme α -glucosidase. Qua các công bố gần nhất, tạm thời khẳng định hợp chất **A5** chứa nhóm cấu trúc chức năng có khả năng hoạt động ức chế mạnh hoạt tính enzyme α -glucosidase.

5.2. KIẾN NGHỊ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Khảo sát tiếp trên các phân đoạn còn lại thuộc cao EA và các cao thành phần khác từ loài địa y *Parmotrema tinctorum*.

Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trên các cao và hợp chất cô lập được. Nhằm đưa ra những so sánh khách quan trên cơ sở khoa học, là tiền đề quan trọng để nhận định lại nhóm hợp chất có cấu trúc spiroterpenoid (như hợp chất C₄₃-A5) có thuộc thành phần chính hoạt động nổi bật trong hoạt tính chống lại enzyme α -glucosidase từ loài địa y *Parmotrema tinctorum* hay không? Từ đó xác định hoạt động ức chế enzyme này là do hợp chất hay nhóm hợp chất nào trong địa y *Parmotrema tinctorum*. Ngoài ra, còn thử nghiệm thêm một số phương pháp khác trong việc xác định khả năng ức chế hoạt tính enzyme α -glucosidase, để có bằng chứng rõ ràng hơn thay vì chỉ sử dụng một cách thử nghiệm.

Khảo sát thêm một số loài địa y để đưa ra cái nhìn tổng quan và có hệ thống về loài địa y *Parmotrema tinctorum* nói riêng và nhiều loài thuộc chi *Parmotrema* nói chung, trên lãnh thổ Việt Nam.

CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

Le-Thuy-Thuy-Trang Hoang, Thanh-Nha Tran, Thi-Phi-Giao Vo, Hoang-Vinh-Truong Phan, Phan-Si-Nguyen Dong, Dinh-Tri Mai, **Ngoc-An Nguyen**, Thi-Minh-Suong Huynh, Hong Truong Luu, Tien-Dung Le, Minh-Trung Dao, and Van-Kieu Nguyen. “*Tinctoride A, a novel hopan-type triterpenoic peracid from the thallus of lichen Parmotrema tinctorum (Despr. Ex Nyl.) Hale*”. Journal of Chemistry, 2022, Article ID 9092098. (2022) (ISI, Q2, IF = 3.241).

Research Article

Tinctoride A, a New Hopan-Type Triterpenoic Peracid from the Thallus of Lichen *Parmotrema Tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale

Le-Thuy-Thuy-Trang Hoang ¹, Thanh-Nha Tran ¹, Thi-Phi-Giao Vo,^{2,3}
Hoang-Vinh-Truong Phan,^{4,5} Phan-Si-Nguyen Dong,⁶ Dinh-Tri Mai,^{6,7} Ngoc-An Nguyen,⁶
Thi-Minh-Suong Huynh,⁸ Hong Truong Luu,⁹ Tien-Dung Le,¹⁰ Minh-Trung Dao ¹
and Van-Kieu Nguyen ^{4,5}

¹Department of Environmental Engineering, Thu Dau Mot University, Binh Duong, Vietnam

²Department of Ecology-Evolutionary Biology, University of Science, 227 Nguyen Van Cu Str., Dist. 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Vietnam National University Ho Chi Minh City, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Vietnam

⁴Institute of Fundamental and Applied Sciences, Duy Tan University, Ho Chi Minh City 700000, Vietnam

⁵Faculty of Natural Sciences, Duy Tan University, Da Nang 550000, Vietnam

⁶Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

⁷Institute of Chemical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁸University of Natural Resources and Environment Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁹Southern Institute of Ecology, Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, 1D, TL29 Street, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

¹⁰Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence should be addressed to Van-Kieu Nguyen; nguyenvankieu2@duytan.edu.vn

Received 25 January 2022; Revised 3 March 2022; Accepted 17 March 2022; Published 11 April 2022

Academic Editor: Erick Gutiérrez-Grijalva

Copyright © 2022 Le-Thuy-Thuy-Trang Hoang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A new hopan-type triterpenoic peracid, tinctoride A (1), together with three known compounds, zeorin (2), 6 β ,22-dihydroxyhopane (3), and ergosterol peroxide (4), was isolated from *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. Their chemical structures were identified by extensive 1D and 2D NMR analysis and high-resolution mass spectroscopy and compared with those reported in the literature. The enzyme inhibitory potential of compounds 1–3 against α -glucosidase was investigated, exhibiting nil to weak inhibitory activity.

1. Introduction

Lichens, which are symbiotic organisms having the characteristics of mycobionts and fungi, comprise 17,000 species distributed from tropical to polar regions [1–3]. This unique ability produces various chemical constituents that are found in most of these organisms [4]. Previous chemical investigations of lichens have confirmed the presence of many kinds of aromatic secondary metabolites, such as depsides, depsidones, dibenzofuranes, xanthonones, and anthraquinones [5]. Most of these compounds are unique to lichens, but some

can also be obtained from fungi and plants [2]. Biological markers have indicated that lichens have potent antioxidant, anticancer, antiarthritic, anti-inflammatory, antihuman immunodeficiency virus (anti-HIV), and antiherpes simplex virus 1 (anti-HSV-1) activities [4, 5].

Parmotrema tinctorum (Despr. ex Nyl.) Hale (Parmeliaceae) (lichenised Ascomycota) is a foliose lichen growing abundantly in various countries, commonly on rocks and trees in moist tropical and temperate areas [6, 7]. The extract of *P. tinctorum* exhibits significant α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase inhibition [7], and some isolated

compounds manifest moderate in advanced glycation end product formation inhibition activities [8]. However, only a few publications have reported the chemical investigation of *P. tinctorum*, resulting in the isolation of some monoaromatic and aromatic compounds [8–12].

The present paper reports the results of the isolation and elucidation of a new triterpenoid (1) and three known compounds (2–4) from *P. tinctorum*. Moreover, the enzyme inhibitory activity of compounds 1–3 against α -glucosidase is described.

2. Materials and Methods

2.1. General Experimental Procedure. Column chromatography (CC) was performed on 60–120-mesh silica gel. The IR spectra were measured on Frontier FTIR/NIR spectrometers (Perkin Elmer, USA). NMR spectra (1D and 2D) were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR. HRESIMS were recorded on a Bruker MicrOTOF-Q II mass spectrometer. Thin-layer chromatography was carried out on precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ or silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck). Spots were visualized by spraying with 5% vanillin in acidic aqueous solution, followed by heating.

2.2. Plant Material. The thalli of lichen *P. tinctorum* were collected in the Lam Dong province of Vietnam in May 2020. The scientific name of the plant was identified by Dr. Vo Thi Phi Giao, Faculty of Biology-Biotechnology, University of Science, National University, Ho Chi Minh City, Vietnam. A voucher specimen PHH0011338 was deposited in the Herbarium of the University of Science, Ho Chi Minh City Vietnam National University (PHH).

2.3. Isolation and Purification. The air-dried roots (2.5 kg) were extracted exhaustively with ethyl acetate (10 L \times 3) and methanol (10 L \times 3) at room temperature. The filtered solution was evaporated under reduced pressure to afford two crudes: E (105.2 g) and M (135.5 g). Crude E was washed with ethyl acetate to yield the liquid EL (23.5 g) and precipitate EP (75.8 g). EL was applied to Sephadex LH-20 and eluted with methanol to obtain EL1–3, and EL2 was then fractionated using C-18 silica gel CC with a gradient system of water-methanol (1 : 8), affording five fractions (EL2A–E). Fraction EL2D (16.6 g) was selected for further fractionation by silica gel CC, using a solvent system consisting of n-hexane/ CHCl_3 /ethyl acetate/acetone (4 : 0.2 : 0.2 : 0.2) to afford fractions EL2D1–D5. Subfraction EL2D3 (1.43 g) was rechromatographed by silica gel CC using an n-hexane/ CHCl_3 /ethyl acetate/acetone (5 : 0.2 : 0.2 : 0.2) solvent system, affording compounds 1 (1.6 mg) and 4 (25.0 mg). Fraction EL2D1 (0.63 g) was rechromatographed to afford compounds 2 (3.2 mg) and 3 (5.2 mg), by the same procedure used for EL2D3.

2.3.1. Tinctoride A (1). Colorless gum; IR (KBr, cm^{-1}): 3564, 2925, 2849, 1739, 1709, 1459, 1374, 1247, 1032; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.66 (1H, dd, $J = 4.8, 11.6$ Hz, H-1), 4.58 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz, H-3), 2.36 (1H, m, H-21), 2.33 (1H, m, H-22), 2.02 (3H, s, H-34), 1.97 (3H, s, H-32),

1.89 (1H, m, H-2a), 1.86 (1H, m, H-20a), 1.66 (1H, m, H-2b), 1.62 (1H, m, H-20a), 1.54 (2H, m, H-6), 1.52 (1H, m, H-19a), 1.48 (2H, m, H-16), 1.47 (2H, m, H-9, H-12a), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-20a), 1.40 (1H, m, H-7a), 1.32 (2H, m, H-12b, H-13), 1.31 (2H, m, H-15), 1.30 (1H, m, H-11b), 1.23 (1H, m, H-17), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.13 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 1.00 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-27), 0.89 (1H, m, H-19b), 0.83 (6H, s, H-23, H-24), 0.75 (1H, d, $J = 2.8, 11.2$ Hz, H-5), 0.70 (3H, s, H-28); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 182.0 (C-30), 170.5 (C-33), 170.3 (C-31), 80.5 (C-1), 76.5 (C-3), 53.8 (C-17), 52.9 (C-5), 50.8 (C-9), 48.7 (C-13), 44.4 (C-18), 42.7 (C-21), 42.3 (C-22), 42.3 (C-8), 42.1 (C-14), 42.1 (C-10), 41.0 (C-19), 37.9 (C-4), 33.5 (C-15), 33.1 (C-7), 30.1 (C-2), 28.0 (C-23), 26.7 (C-20), 23.9 (C-12), 23.0 (C-11), 21.9 (C-34), 21.2 (C-32), 19.9 (C-16), 17.9 (C-6), 17.8 (C-29), 17.0 (C-26), 16.7 (C-27), 16.2 (C-24), 15.8 (C-28), 13.0 (C-25); HRESIMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^{+597.3794}$ for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7\text{Na}$ (calcd. 597.3767).

2.4. α -Glucosidase Activity Test. The α -glucosidase inhibitory activity of the compounds was investigated using a method from Wan et al. [13]. All samples were examined in triplicate at different concentrations to obtain the IC_{50} value of each compound. The mean values and standard deviations were retained. Briefly, 120 μL of extract were preincubated with 20 μL of α -glucosidase (1 unit/mL) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C for 15 min. The reaction was then initiated by adding 20 μL of 5 mM para-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) in 0.1 M potassium phosphate buffer, and the mixture was further incubated for 15 min. The reaction was terminated by the addition of 80 μL of 0.2 M Na_2CO_3 in 0.1 M potassium phosphate buffer, and the absorbance of the mixture was recorded at 405 nm. The results were expressed as % inhibition of enzyme activity and calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right] \times 100. \quad (1)$$

3. Results and Discussion

3.1. Structural Elucidation. The ethyl acetate extract of *P. tinctorum* was separated by CC over silica gel normal phase and reversed-phase RP C-18, and sephadex LH-20 to afford a new triterpene, tinctoride A (1), and three known compounds, zeorin (2) [14], 6 β ,22-dihydroxyhopane (3) [15], and ergosterol peroxide (4) [16] (Figure 1).

Compound 1 was purified as a colorless gum with molecular formula $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7$, as assumed by the sodiated molecular ion peak at m/z 597.3794 (calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7 + \text{Na}$, 597.3767) on the HRESI mass spectrum. The ^{13}C NMR and HSQC spectra of 1 revealed 34 carbon signals, including 9 methyl, 9 methylene, 8 methine, and 8 quaternary carbons. In addition, the ^1H NMR spectrum showed six singlets (δ_{H} 1.00, 0.94, 0.90, 0.83×2 , 0.70) and one doublet (δ_{H} 1.13, d, 6.4), and the key HMBC correlations were observed from six methyl groups, H₃-23 (δ_{H} 0.83), H₃-24 (δ_{H} 0.83), H₃-25 (δ_{H} 1.00), H₃-26 (δ_{H} 0.94),

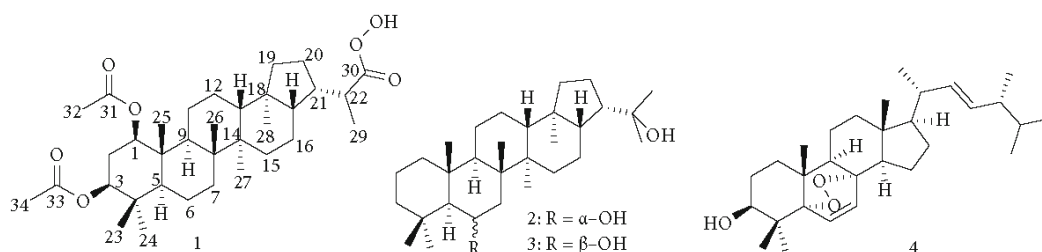


FIGURE 1: Chemical structure of compounds 1-4.

H₃-27 (δ_{H} 0.90), and H₃-28 (δ_{H} 0.70), to their attached quaternary carbons C-4 (δ_{C} 37.9), C-4, C-10, C-8 (δ_{C} 42.3), C-14 (δ_{C} 42.1), and C-18 (δ_{C} 44.4), respectively, suggesting that 1 was a hopan-type triterpenoid [17], related to the known metabolites 2, 3. In addition, the HMBC correlations from the methyl protons at δ_{H} 2.02 (H₃-34) to C-33 (δ_{C} 170.5) and δ_{H} 1.97 (H₃-32) to C-31 (δ_{C} 170.3) suggested the occurrence of two acetoxy carbonyl groups located at C-1 and C-3, respectively, which was further backed up by the HMBC crosspeak of the oxymethine proton H-1 (δ_{H} 4.66) to C-31 and H-3 (δ_{H} 4.58) to C-33. Furthermore, the key HMBC of the doublet methyl H₃-29 (δ_{H} 1.13, d, $J = 6.4$ Hz) to C-21 (δ_{C} 42.7), C-22 (δ_{C} 42.3), and C-30 (δ_{C} 182.0) indicated that a methyl group belonging to the isopropyl moiety located at C-21 (ring E) was oxidated to a carboxyl function (Supplementary material Figure S1). The FTIR spectrum of compound 1 also revealed the presence of free OH, OH stretching, C=O stretching, and OH bending vibrations of the peracid functional group at 3564, 3293, 1739, and 1459 cm^{-1} , respectively [18], indicating a peracid moiety located at C-30, which was further clearly evidenced by the value of its chemical shift at δ_{C} 182.0, instead of approximately 184 ppm in the case of an acid function [15], and also by the molecular formula C₃₄H₅₄O₇ from the HRESI mass spectrum. In addition, the chromatography experiment between 1 and the crude fraction revealed that 1 was a minor substance in *P. tinctorum* (Supplementary material Figure S2).

As to the relative stereochemistry of C-1 and C-3, the elevated coupling constant of H-1 ($J_{\text{H-1,H-2}} = 11.6$, 4.8 Hz) and H-3 ($J_{\text{H-2,H-3}} = 12.4$, 4.4 Hz) determined the axial position of both of these oxymethine protons. Furthermore, the syn-orientation (β -orientation) of H-1 (δ_{H} 4.66), H-3 (δ_{H} 4.58), and H-5 (δ_{H} 0.75) was definitely indicated by pair-to-pair NOESY interactions (Supplementary material Figure S1). From all the above data, compound 1, namely, tinctoride A, was readily elucidated as 1 β ,3 β -diacetoxy-21 α -hopan-29-oic peracid.

3.2. α -Glucosidase Inhibition Assay. The enzyme inhibition of compounds 1-3 against α -glucosidase was evaluated (Supplementary material Table S1). Triterpenoids 1-3 exhibited weak (compound 2, IC₅₀ 258.87 μM) or no (compounds 1 and 3) α -glucosidase inhibitory activity compared with acarbose (positive control, IC₅₀ 108.08 μM). Among these compounds, 2 showed the highest α -glucosidase inhibitory activity, similar to that reported in the previous study [19],

while the 6 β -OH orientation of compound 3 led to a decrease in its α -glucosidase inhibitory activity, in spite of its molecular formula being closely related to compound 2. It is worth noting that the stereochemistry of C-6 hydroxyl substitutions in hopan-type triterpenoids could play an important role in their α -glucosidase inhibitory activities. The extract of *P. tinctorum*, however, displayed significant α -glucosidase inhibition [7], which indicates that the hopan-type triterpenoids are not the most potent α -glucosidase inhibitory component in the ethyl acetate fraction of *P. tinctorum*. Due to the reports of various phenolic compounds [6, 8, 9, 11, 12], further isolation of other compounds from the ethyl acetate fraction, such as phenolic compounds or other types of triterpenoids, will be important research for the discovery of active compounds against α -glucosidase.

4. Conclusions

Three hopan-type terpenoids, including one new peracid, tinctoride A, and two known compounds, zeorin (2) and 6 β ,22-dihydroxyhopane (3), together with ergosterol peroxide (4), were isolated from the lichen *P. tinctorum*. Their chemical structures were identified by extensive 1D and 2D NMR analysis and high-resolution mass spectroscopy and compared with those reported in the literature. To the best of our knowledge, compound 1 is a new peracid, while compounds 2-4 have not previously been isolated from *P. tinctorum*. Compounds 1-3 displayed nil or weak inhibitory activity against α -glucosidase.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the supplementary information file.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Acknowledgments

This research is funded by Thu Dau Mot University, Binh Duong Province, Vietnam under the grant number DT.21.1-035.

Supplementary Materials

Supplementary material relating to this article is available online, alongside Table S1 and Figures S1–S10. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] T. H. Duong, B. L. C. Huynh, W. Chavasiri et al., “New erythritol derivatives from the fertile form of *Rocella montagnei*,” *Phytochemistry*, vol. 137, pp. 156–164, 2017.
- [2] W. H. Fam, J. Latip, and B. L. Din, “Direct discrimination of *Parmotrema tinctorum* from various location by Fourier transform infrared spectroscopy,” *AIP Conference Proceedings*, vol. 1614, pp. 347–350, 2014.
- [3] M. I. Käffer, A. T. Lemos, M. A. Apel, J. V. Rocha, S. M. de Azevedo Martins, and V. M. F. Vargas, “Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in southern Brazil,” *Environmental Pollution*, vol. 163, pp. 24–31, 2012.
- [4] K. S. Z. Ahmed, S. S. Z. Ahmed, and A. Thangakumar, “Therapeutic effect of *Parmotrema tinctorum* against complete Freund’s adjuvant-induced arthritis in rats and identification of novel Isophthalic ester derivative,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 112, no. 2019, pp. 108646–108657, 2019.
- [5] T. I. B. Lopes, R. G. Coelho, N. C. Yoshida, and N. K. Honda, “Radical-scavenging activity of orsellinates,” *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 56, no. 11, pp. 1551–1554, 2008.
- [6] L. F. C. de Oliveira, P. C. C. Pinto, M. P. Marcelli, H. F. Dos Santos, and H. G. M. Edwards, “The analytical characterization of a depside in a living species: spectroscopic and theoretical analysis of lecanoric acid extracted from *Parmotrema tinctorum* Del. Ex Nyl. lichen,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 920, no. 1–3, pp. 128–133, 2009.
- [7] P. Salin Raj, A. Prathapan, J. Sebastian et al., “*Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an in vitro study,” *Natural Product Research*, vol. 28, no. 18, pp. 1480–1484, 2014.
- [8] P. Pavan Kumar, B. Siva, A. Anand et al., “Isolation, semi-synthesis, free-radicals scavenging, and advanced glycation end products formation inhibitory constituents from *Parmotrema tinctorum*,” *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 22, no. 10, pp. 976–988, 2020.
- [9] V. M. Bui, T. H. Duong, T. A. M. Nguyen et al., “Two new phenolic compounds from the Vietnamese lichen *Parmotrema tinctorum*,” *Natural Product Research*, pp. 1–6, 2020.
- [10] I. S. Rojas, B. Lotina-Hennsen, and R. Mata, “Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts,” *Journal of Natural Products*, vol. 63, no. 10, pp. 1396–1399, 2000.
- [11] N. T. T. Tram, V. T. Huyen, and R. Pascal, “Study on chemical constituents of the lichen *Parmotrema tinctorum* (nyl.) Hale (Parmeliaceae),” *Journal of Science and Technology*, vol. 56, no. 4, pp. 434–440, 2018.
- [12] N. T. Tuan, N. P. Dam, and M. V. Hieu, “Chemical constituents of the lichen *Parmotrema tinctorum* and their antifungal activity,” *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 56, no. 2, pp. 315–317, 2020.
- [13] L. S. Wan, C. P. Chen, Z. Q. Xiao et al., “In vitro and in vivo anti-diabetic activity of *Swertia kouitchensis* extract,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, no. 3, pp. 622–630, 2013.
- [14] S. Ahmad, S. Riyanto, M. Sukari, M. Rahmani, and A. Ali, “Hopane and lupane triterpenes from leaves and stem bark of *Aegle marmelos* (Rutaceae),” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 25, no. 8, pp. 4591–4594, 2013.
- [15] A. G. Gonzalez, C. Betancor, J. A. Salazar, and R. Hernández, “6 β ,22-Dihydroxyhopane, a new triterpene from the fern *Cheilanthes marantae*,” *Phytochemistry*, vol. 15, no. 12, pp. 1996–1997, 1976.
- [16] D. S. Kim, N. I. Baek, S. R. Oh et al., “Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 20, no. 3, pp. 201–205, 1997.
- [17] N. T. Tuan, M. Van Hieu, N. Q. C. Thanh et al., “Novel hopanoic acid and depside from the lichen *Dirinaria appplanata*,” *Records of Natural Products*, vol. 14, no. 4, pp. 248–255, 2020.
- [18] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, John Wiley & Sons, 2004.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Garden M.P., 2010, *Guide to the Medicinal Plant Garden*, Indiana Medical History Museum, 46222 (317), pp. 22.
2. Gandhi A.D., Murugan K., Umamahesh K., et al., 2019, Lichen *Parmelia sulcata* mediated synthesis of gold nanoparticles: An eco-friendly tool against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*, *Environ Sci Pollut Res*, 26(23), pp. 23886–23898.
3. Huneck S., 1999, *The significance of lichens and their metabolites*, *Naturwissenschaften*, 86(12), pp. 559–570.
4. Barrington E.J.W. and Willis A.J., 1974, *The biology of lichens: Contemporary biology*, 2nd edition, Edward Arnold, London.
5. Ingólfssdóttir K., 2002, *Usnic acid*, *Phytochemistry*, 61(7), pp. 729–736.
6. Võ Thị Phi Giao, 2003, *Địa y khảm trên rừng ở khu bảo tồn thiên nhiên Bình Châu – Phước Bửu: Thành phần loài và đặc điểm sinh thái*, Luận Văn Thạc Sĩ Sinh Học Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên Tp. Hồ Chí Minh.
7. Lê Hoàng Duy, 2012, *Chemical study of common lichens in the south of Vietnam*, Thesis Dr Philos Kobe Pharm Univ.
8. Dương Thúc Huy, 2016, *Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của 4 loài địa y thu hái tại miền nam Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp Hồ Chí Minh.
9. Tram N.T.T., Huyen V.T., and Pascal R., 2018, Study on chemical constituents of the lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Vietnam J Sci Technol*, 56(4), pp. 434–440.
10. Salin Raj P., Prathapan A., Sebastian J., et al., 2014, *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an *in vitro* study, *Nat Prod Res*, 28(18), pp. 1480–1484.
11. Nguyễn Thị Thu Trâm, L.S.J., 2020, Khảo sát khả năng ức chế virus viêm gan C của các hợp chất cô lập từ loài địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Tạp Chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*, 56(1A), pp. 69–74.

12. Ranković B. and Kosanić M., 2015, *Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites*, Lichen Secondary Metabolites, Springer International Publishing, Cham, pp. 1–26.
13. Yousuf S., Choudhary M.I., and Atta-ur-Rahman, 2014, *Lichens*, Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier, pp. 223–259.
14. Syed Zameer Ahmed K., Ahmed S.S.Z., Thangakumar A., et al., 2019, Therapeutic effect of *Parmotrema tinctorum* against complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats and identification of novel Isophthalic ester derivative, *Biomed Pharmacother*, 112, pp. 108646.
15. Malhotra S., Subban R., and Singh A., 2008, Lichens-role in traditional medicine and drug discovery, *Internet J Altern Med*, 5(2), pp. 1–5.
16. Boustie J. and Grube M., 2005, Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites, *Plant Genet Resour*, 3(2), pp. 273–287.
17. Micheletti A.C., Beatriz A., Lima D.P. de, et al., 2009, Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler: Isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica, *Quím Nova*, 32, pp. 12–20.
18. Boustie J., Tomasi S., and Grube M., 2011, Bioactive lichen metabolites: Alpine habitats as an untapped source, *Phytochem Rev*, 10(3), pp. 287–307.
19. Mie R., Din L.B., Samsudin M.W., et al., 2014, *Secondary metabolite isolated from Ramalina dumeticola and its application for silver nanoparticles production*, Selangor, Malaysia, pp. 213–217 and 213–217.
20. Lumbsch H.T. and Huhndorf S.M., 2010, Myconet Volume 14. Part One. Outline of Ascomycota—2009. Part Two, *Notes on Ascomycete Systematics*, Nos. 4751–5113. *Fieldiana Life Earth Sci*, 1, pp. 1–64.
21. Kukwa M., Bach K., Sipman H., et al., 2012, Thirty-six species of the lichen genus *Parmotrema* (Lecanorales, Ascomycota) new to Bolivia, *Pol Bot J*, 57, pp. 243–257.
22. Lücking R., Hodkinson B.P., and Leavitt S.D, 2017, The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera, *The Bryologist*, 119(4), pp. 361.

23. Blanco O., Crespo A., Divakar P.K., et al., 2005, Molecular phylogeny of parmotreoid lichens (Ascomycota, Parmeliaceae), *Mycologia*, 97(1), pp. 150–159.
24. Crespo A., Kauff F., Divakar P.K., et al., 2010, Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence, *TAXON*, 59(6), pp. 1735–1753.
25. Jayalal U., Divakar P.K., Joshi S., et al., 2013, The Lichen Genus *Parmotrema* in South Korea, *Mycobiology*, 41(1), pp. 25–36.
26. Tuan N.T., Dam N.P., Van Hieu M., et al., 2020, Chemical Constituents of the Lichen *Parmotrema Tinctorum* and their Antifungal Activity, *Chem Nat Compd*, 56(2), pp. 315–317.
27. Upreti D.K., Divakar P.K., and Nayaka S., 2005, Commercial and ethnic use of lichens in India, *Econ Bot*, 59(3), pp. 269–273.
28. Ohnuki T., Aoyagi H., Kitatsuji Y., et al., 2004, Plutonium(VI) accumulation and reduction by lichen biomass: correlation with U(VI), *J Environ Radioact*, 77(3), pp. 339–353.
29. Ohnuki T., Sakamoto F., Kozai N., et al., 2003, Micro-pixe study on sorption behaviors of cobalt by lichen biomass, *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater At*, 210, pp. 407–411.
30. Port R.K., Käffer M.I., and Schmitt J.L., 2018, Morphophysiological variation and metal concentration in the thallus of *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale between urban and forest areas in the subtropical region of Brazil, *Environ Sci Pollut Res*, 25(33), pp. 33667–33677.
31. Käffer M.I., Lemos A.T., Apel M.A., et al., 2012, Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil, *Environ Pollut*, 163, pp. 24–31.
32. Käffer M.I., de Azevedo Martins S.M., Alves C., et al., 2011, Corticolous lichens as environmental indicators in urban areas in southern Brazil, *Ecol Indic*, 11(5), pp. 1319–1332.
33. Boonpeng C., Sriviboon C., Polyiam W., et al., 2018, Assessing atmospheric pollution in a petrochemical industrial district using a lichen-air quality index (LiAQI), *Ecol Indic*, 95, pp. 589–594.

34. Boonpeng C., Polyiam W., Sriviboon C., et al., 2017, Airborne trace elements near a petrochemical industrial complex in Thailand assessed by the lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale, *Environ Sci Pollut Res*, 24(13), pp. 12393–12404.
35. Spielmann A.A. and Marcelli M.P., 2009, *Parmotrema* s.l. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) from Serra Geral slopes in central Rio Grande do Sul state, Brazil, *Hoehnea*, 36(4), pp. 551–595.
36. Massalongo A.B., 1860, *Esame comparativo di alcuni generi di licheni*, G. Antonelli.
37. Hale M.E., 1974, *New combinations in the lichens genus Parmotrema massalongo*. 28(4), pp. 334-339.
38. Shiromi P.S.A.I., Hewawasam R.P., Jayalal R.G.U., et al., 2021, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Two Sri Lankan Lichens, *Parmotrema rampoddense*, and *Parmotrema tinctorum* against Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Evid Based Complement Alternat Med*, pp. 2021.
39. GBIF Backbone Taxonomy, 2021, Overview *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale, *Classification in GBIF Secretariat*.
40. Sakurai A. and Goto Y., 1987, Chemical Studies on the Lichen. I. The Structure of Isolecanoric Acid, a New ortho-Depside Isolated from *Parmelia tinctorum* Despr., *Bull Chem Soc Jpn*, 60(5), pp. 1917–1918.
41. Czezugha B. and Kashiwadani H., 1993, Carotenoids of *Parmotrema tinctorum* and *Rimelia clavulifera* (Parmeliaceae, lichens) from various localities in Japan, *Bull Natl Sci Mus Ser B Bot*.
42. Honda N.K., Pavan F.R., Coelho R.G., et al., 2010, Antimycobacterial activity of lichen substances, *Phytomedicine*, 17(5), pp. 328–332.
43. Santos L.C., Honda N.K., Carlos I.Z., et al., 2004, Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens, *Fitoterapia*, 75(5), pp. 473–479.
44. Pavan Kumar P., Siva B., Anand A., et al., 2020, Isolation, semi-synthesis, free-radicals scavenging, and advanced glycation end products formation inhibitory

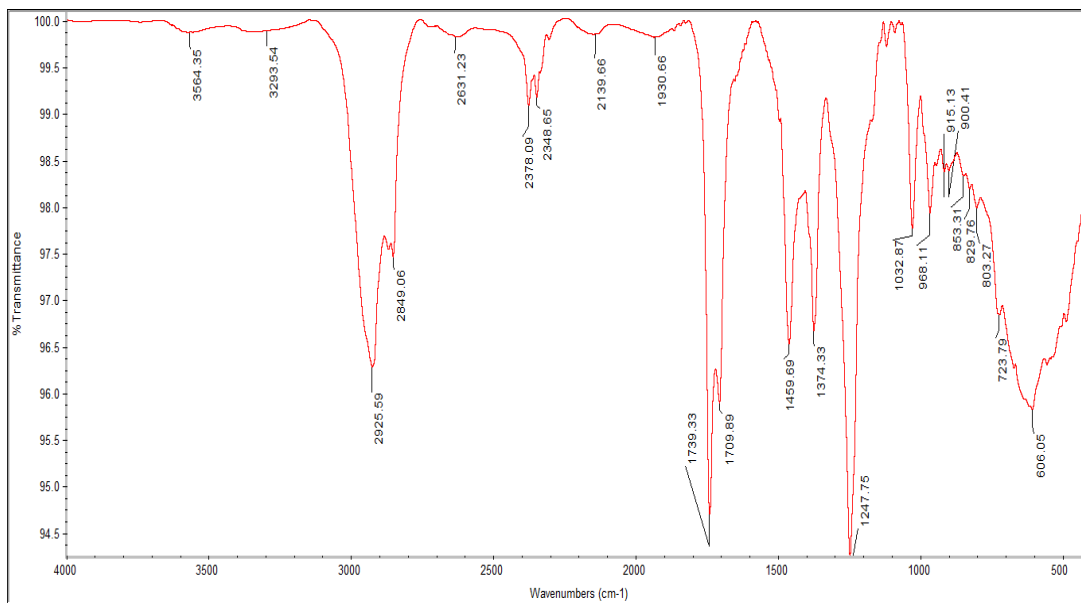
- constituents from *Parmotrema tinctorum*, *J Asian Nat Prod Res*, 22(10), pp. 976–988.
45. Bui V.-M., Duong T.-H., Nguyen T.-A.-M., et al, 2020, Two new phenolic compounds from the Vietnamese lichen *Parmotrema tinctorum*, *Nat Prod Res*, pp. 1–6.
 46. Nguyen T.T.T., Vo T.T.D., Tran Y.H., et al., 2021, Photoprotective activity of lichen extracts and isolated compounds in *Parmotrema tinctorum*, *Biointerface Res Appl Chem*, 11(5), pp. 12653–12661.
 47. Neeraj V., Bc B., H P., et al, 2011, Bactericidal Activity of Some Lichen Secondary Compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*, *Int J Drug Dev Res*, 3(3), pp. 222-232.
 48. Vivek M.N., Kambar Y., Manasa M., et al., 2014, Radical scavenging and antibacterial activity of three *Parmotrema* species from Western Ghats of Karnataka, India, *Journal of Applied Pharmaceutical Science (JAPS)*, 4(3), pp. 86-91.
 49. Salin Raj P., Prathapan A., Sebastian J., et al., 2014, *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an *in vitro* study, *Nat Prod Res*, 28(18), pp. 1480–1484.
 50. Bogo D., Matos M. de F.C., Honda N.K., et al., 2010, *In vitro* Antitumour Activity of Orsellinates, *Z Für Naturforschung C*, 65(1–2), pp. 43–48.
 51. Petersmann A., Müller-Wieland D., Müller U.A., et al., 2019, Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127(01), pp. 1–7.
 52. American Diabetes Association, 2004, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 27(suppl_1), pp. 5–10.
 53. Cổng thông tin điện tử, Bộ Y tế Việt Nam, 2019, Việt Nam có khoảng 3,5 triệu người sống chung với đái tháo đường, Link: https://moh.gov.vn/hoat-dong-cua-lanh-dao-bo/-/asset_publisher/k206Q9qkZOqn/content/viet-nam-co-khoang-3-5-trieu-nguoi-song-chung-voi-ai-thao-uong.
 54. International Diabetes Federation, 2021, Diabetes facts & figures, Link: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>.

55. Atkinson M.A., Eisenbarth G.S., and Michels A.W, 2014, Type 1 diabetes, *The Lancet*, 383(9911), pp. 69–82.
56. Olokoba A.B., Obateru O.A., and Olokoba L.B., 2012, Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends, *Oman Med J*, 27(4), pp. 269–273.
57. DNA in the new, 2017, DNA Type 2 Diabetes Test, Did You Know DNA..., Link: <https://www.didyouknowdna.com/product/dna-type-2-diabetes-test/>.
58. McIntyre H.D., Catalano P., Zhang C., et al., 2019, Gestational diabetes mellitus, *Nat Rev Dis Primer*, 5(1), pp. 47.
59. Organization W.H., 2011, *Use of glycated haemoglobin (HbA_{1c}) in diagnosis of diabetes mellitus: Abbreviated report of a WHO consultation*, World Health Organization.
60. Rahbar S., Blumenfeld O., and Ranney H.M., 1969, Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus, *Biochem Biophys Res Commun*, 36(5), pp. 838–843.
61. Massi-Benedetti M., 2006, Changing targets in the treatment of type 2 diabetes, *Curr Med Res Opin*, 22(sup2), pp. 5–13.
62. Nathan D.M., Turgeon H., and Regan S., 2007, Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time, *Diabetologia*, 50(11), pp. 2239–2244.
63. Gallagher E.J., Le Roith D., and Bloomgarden Z., 2009, Review of hemoglobin A_{1c} in the management of diabetes: A_{1c} in the management of diabetes, *J Diabetes*, 1(1), pp. 9–17.
64. Bộ trưởng Bộ Y tế, Ban hành kèm theo Quyết định số 3319/QĐ-BYT, 2017, Hướng dẫn chuẩn đoán và điều trị Đái tháo đường típ 2.
65. Naquvi K.J., Ahamad J., Mir S.R., et al, 2011, Review on role of natural alpha-glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus, *Int J Biomed Res*, 2(6), pp. 374–380.
66. Kim K.Y., Nam K.A., Kurihara H., et al, 2008, Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*, *Phytochemistry*, 69(16), 2820–2825.

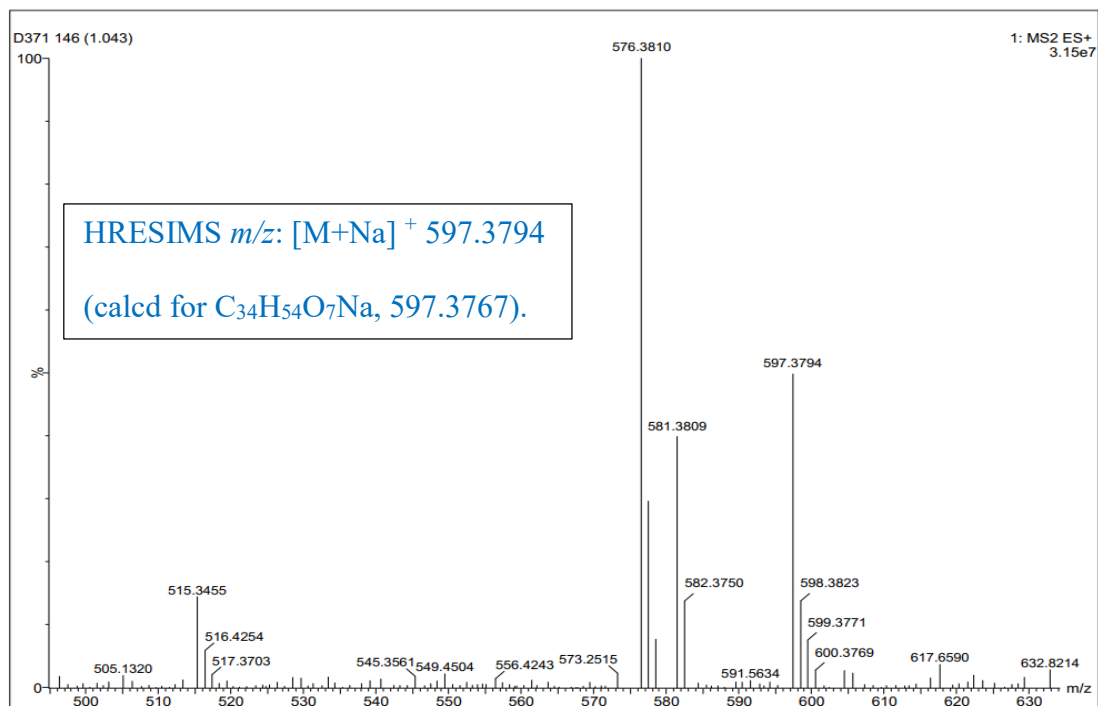
67. Kumar S., Narwal S., Kumar V, et al, 2011, α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev*, 5(9), 19–29.
68. Goda T., Yamada K., Sugiyama M., et al., 1982, Effect of sucrose and acarbose feeding on the development of streptozotocin-induced diabetes in the rat, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 28(1), 41–56.
69. Drucker D.J. and Nauck M.A., 2006, The incretin system: Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes, *The Lancet*, 368(9548), 1696–1705.
70. Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, GS. TS trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh, pp. 29-54.
71. Wan L., Chen C., Xiao Z., et al., 2013, *In vitro* and *in vivo* anti-diabetic activity of *Swertia kouitchensis* extract, *J Ethnopharmacol*, 147(3), pp. 622–630.
72. Ramadhan R. and Phuwapraisirisan P., 2015, New arylalkanones from *Horsfieldia macrobotrys*, effective antidiabetic agents concomitantly inhibiting α -glucosidase and free radicals, *Bioorg Med Chem Lett*, 25(20), pp. 4529–4533.
73. Tuan N.T., Hieu M.V., Thanh N.Q.C., et al., 2020, Novel Hopanoic Acid and Depside from the Lichen *Dirinaria applanata*, *Rec Nat Prod*, 14(4), pp. 248–255.
74. König G.M. and Wright A.D., 1999, ^1H and ^{13}C -NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds, *Phytochem Anal*, 10(5), pp. 279–284.
75. Elix J., Whitton A., and Jones A., 1982, Triterpenes from the lichen genus *Phycia*, *Aust J Chem*, 35(3), pp. 641.
76. Mutai C., Bii C., Vagias C., et al., 2009, Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes, *J Ethnopharmacol*, 123(1), pp. 143–148.
77. Noviany and Osman H., 2021, Structure Elucidation of Betulinic Acid from *Sesbania grandiflora* Root, *J Phys Conf Ser*, 1751, pp. 012090.
78. Kato N., Wu X., Nishikawa H., et al., 1994, Total synthesis of optically active plagiospirolides A and B: Highly stereoselective biomimetic Diels–Alder reaction, *J Chem Soc Perkin Trans 1*, (8), pp. 1047–1053.

79. Duong T.-H., Nguyen V.-K., Sichaem J., et al, 2022, Reticulatin, a novel C₄₃ - spiroterpenoid from the lichen *Parmotrema reticulatum* growing in Vietnam, *Nat Prod Res*, 36(14), pp. 3705–3712.
80. V. Karunaratne, V. M. Thadhani, S. N. Khan, and M. Iqbal Choudhary, 2014, Potent α -glucosidase inhibitors from the lichen *Cladonia* species from Sri Lanka, *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 42(1), pp. 95–98.
81. Hoang L.-T.-T.-T., Tran T.-N., Vo T.-P.-G., et al., 2022, Tinctoride A, a New Hopan-Type Triterpenoic Peracid from the Thallus of Lichen *Parmotrema Tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale, *J Chem*, 2022, pp. 1–4.

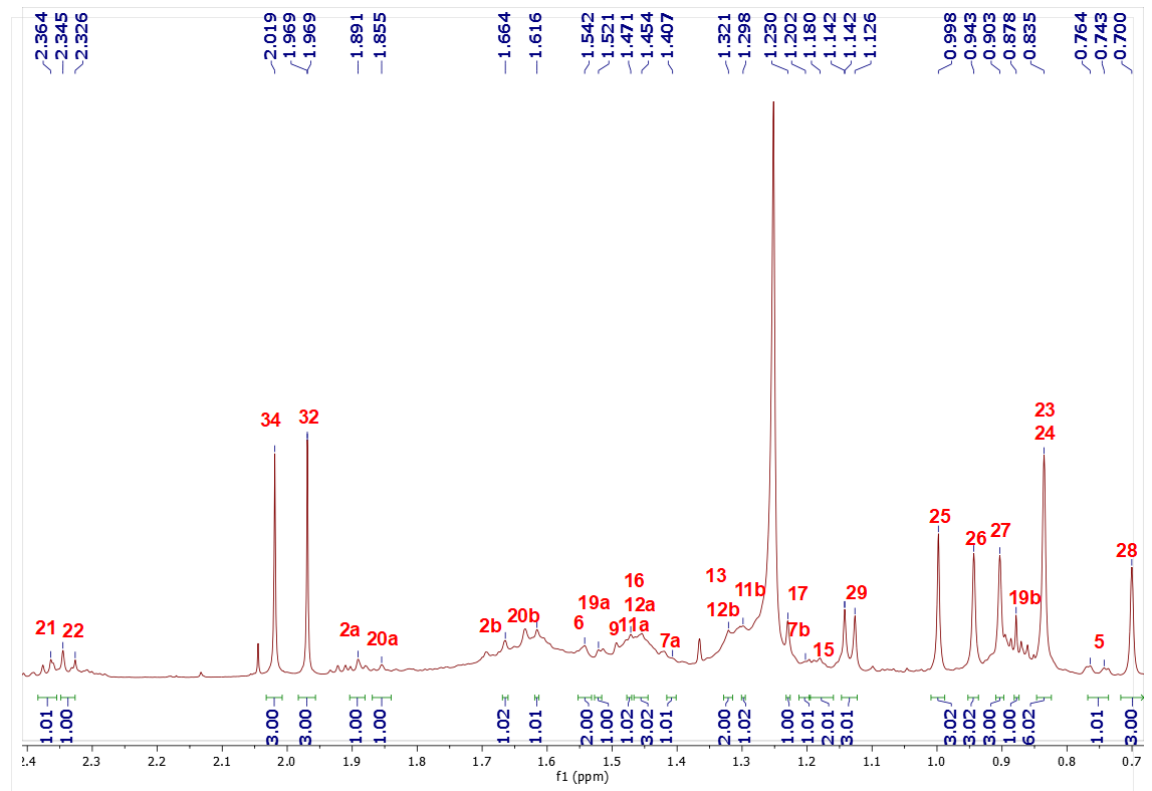
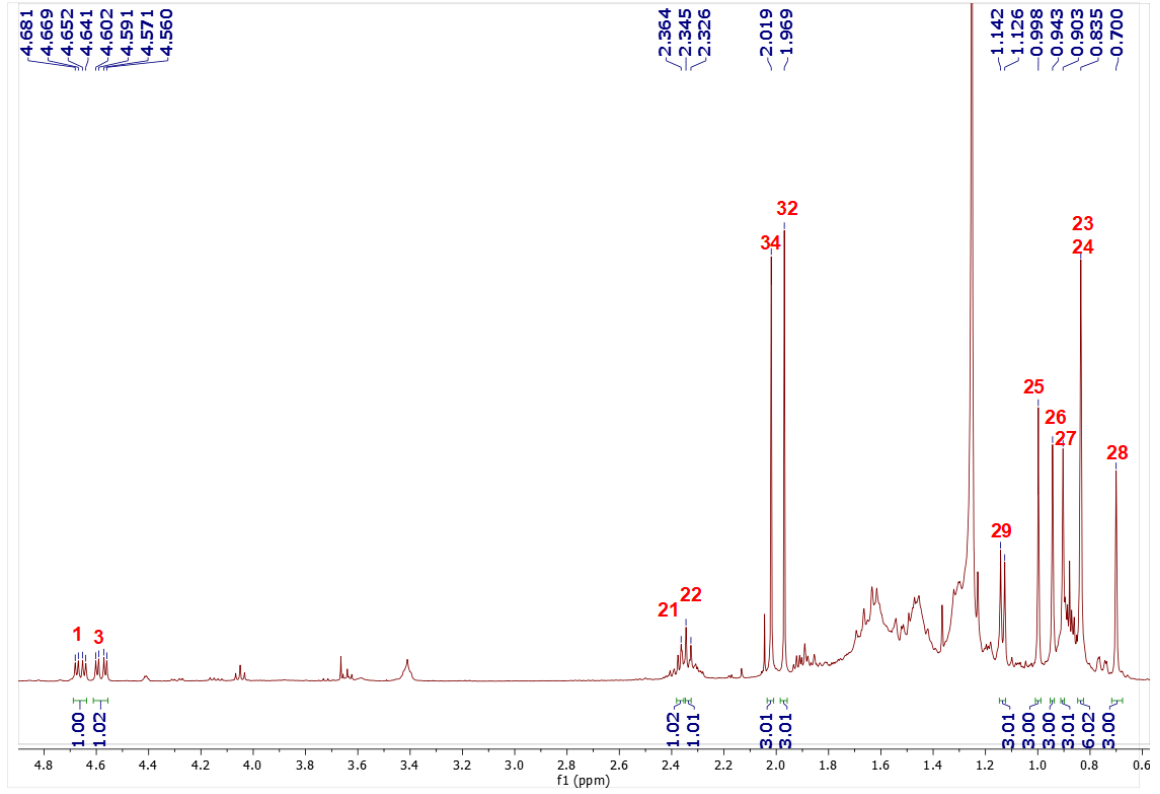
PHỤ LỤC



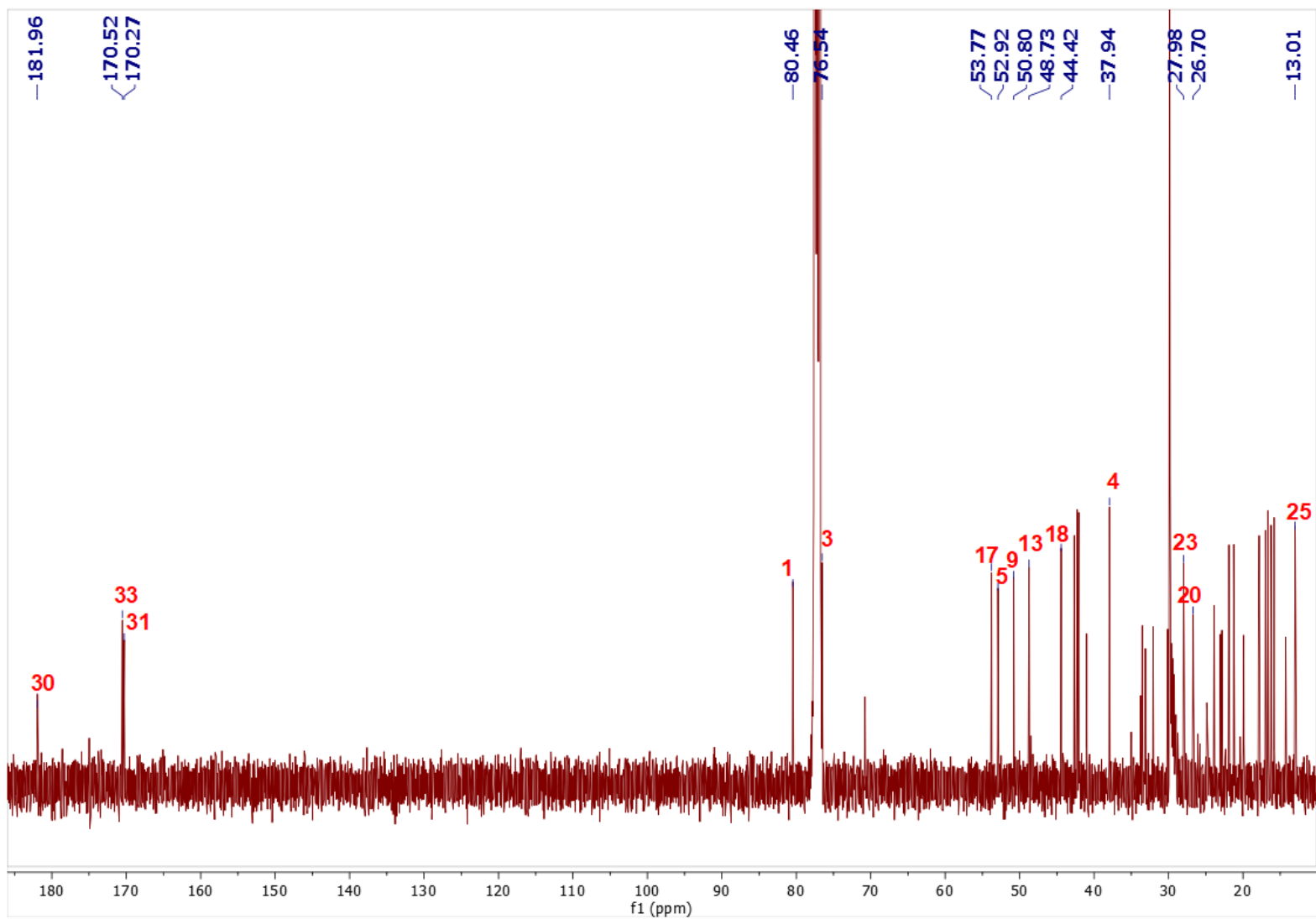
Phụ lục 1. Phổ IR hợp chất A1



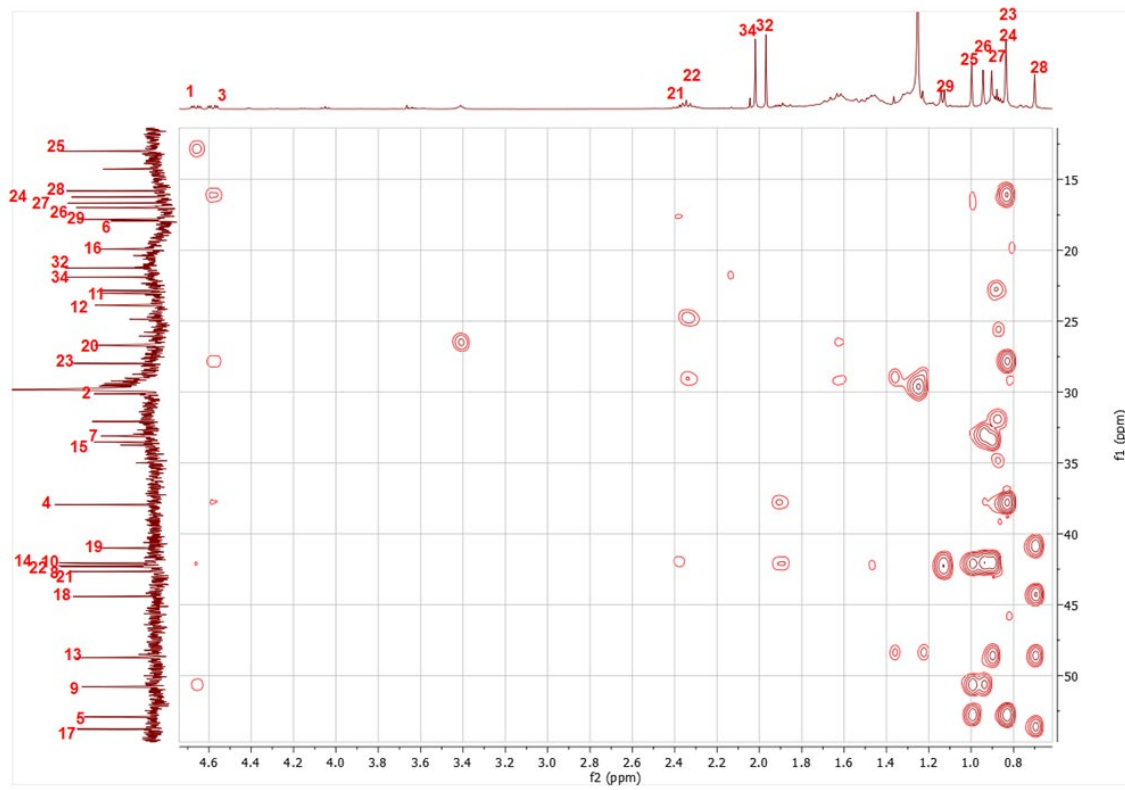
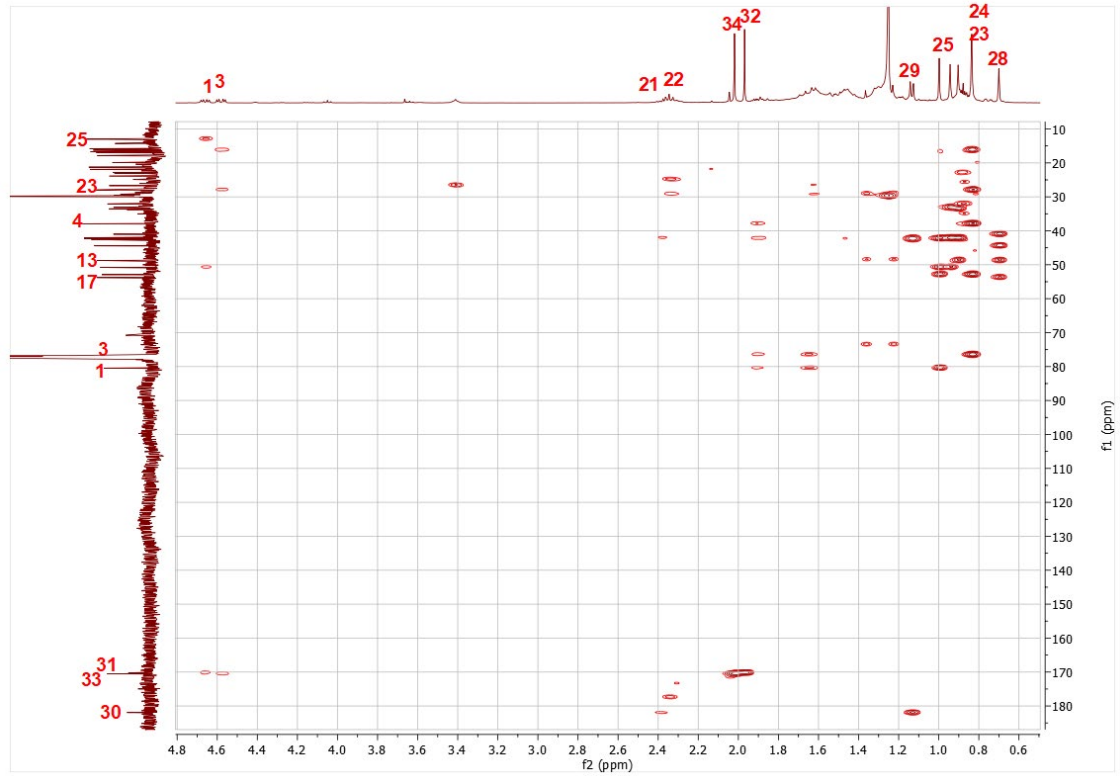
Phụ lục 2. Phổ MS hợp chất A1



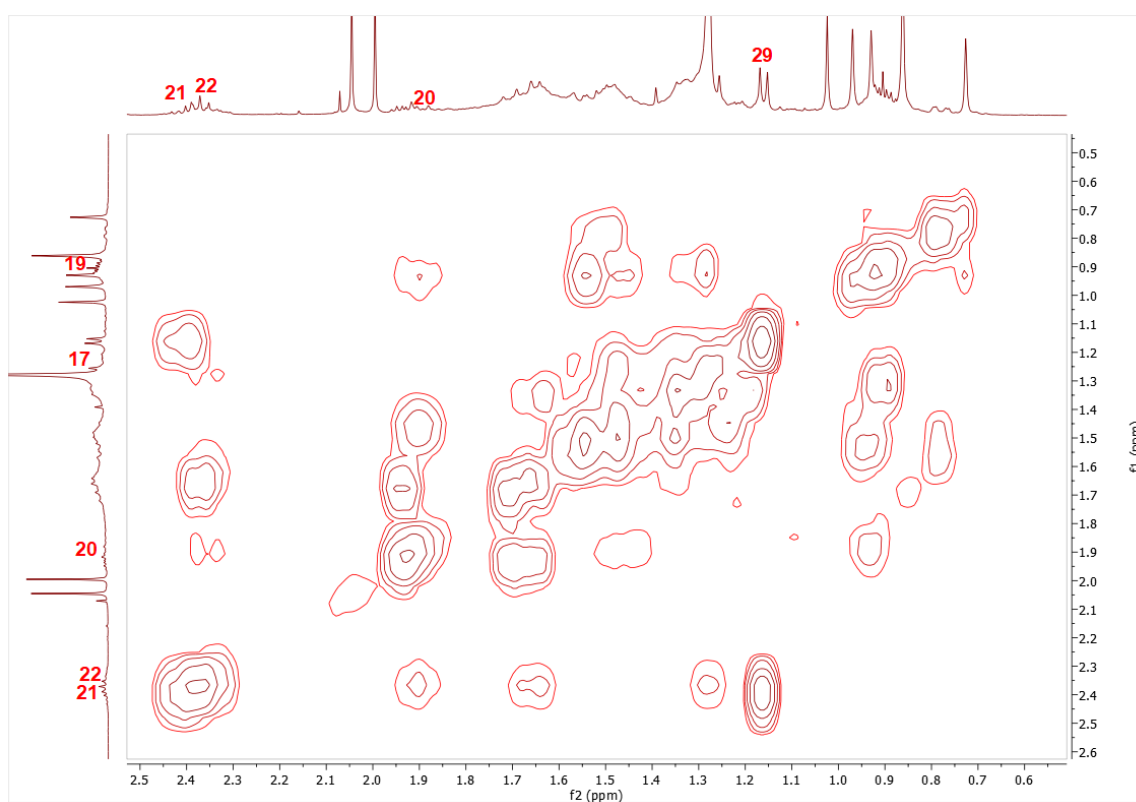
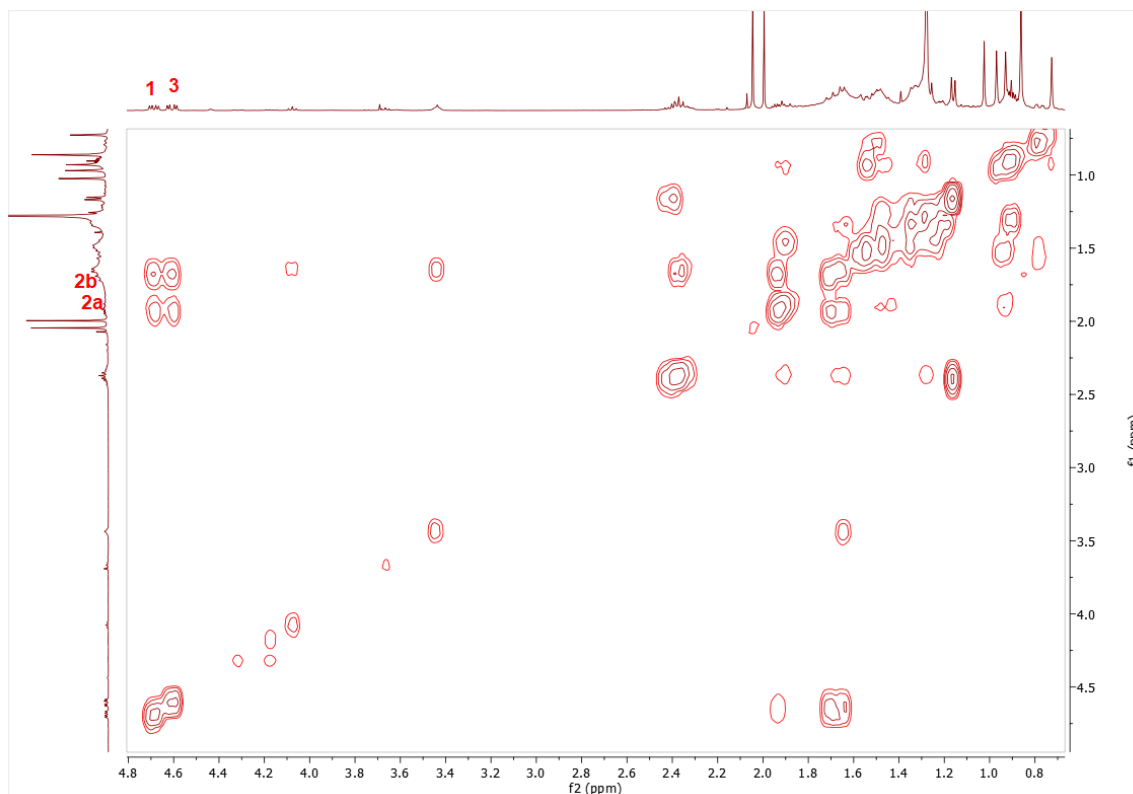
Phụ lục 3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất A1



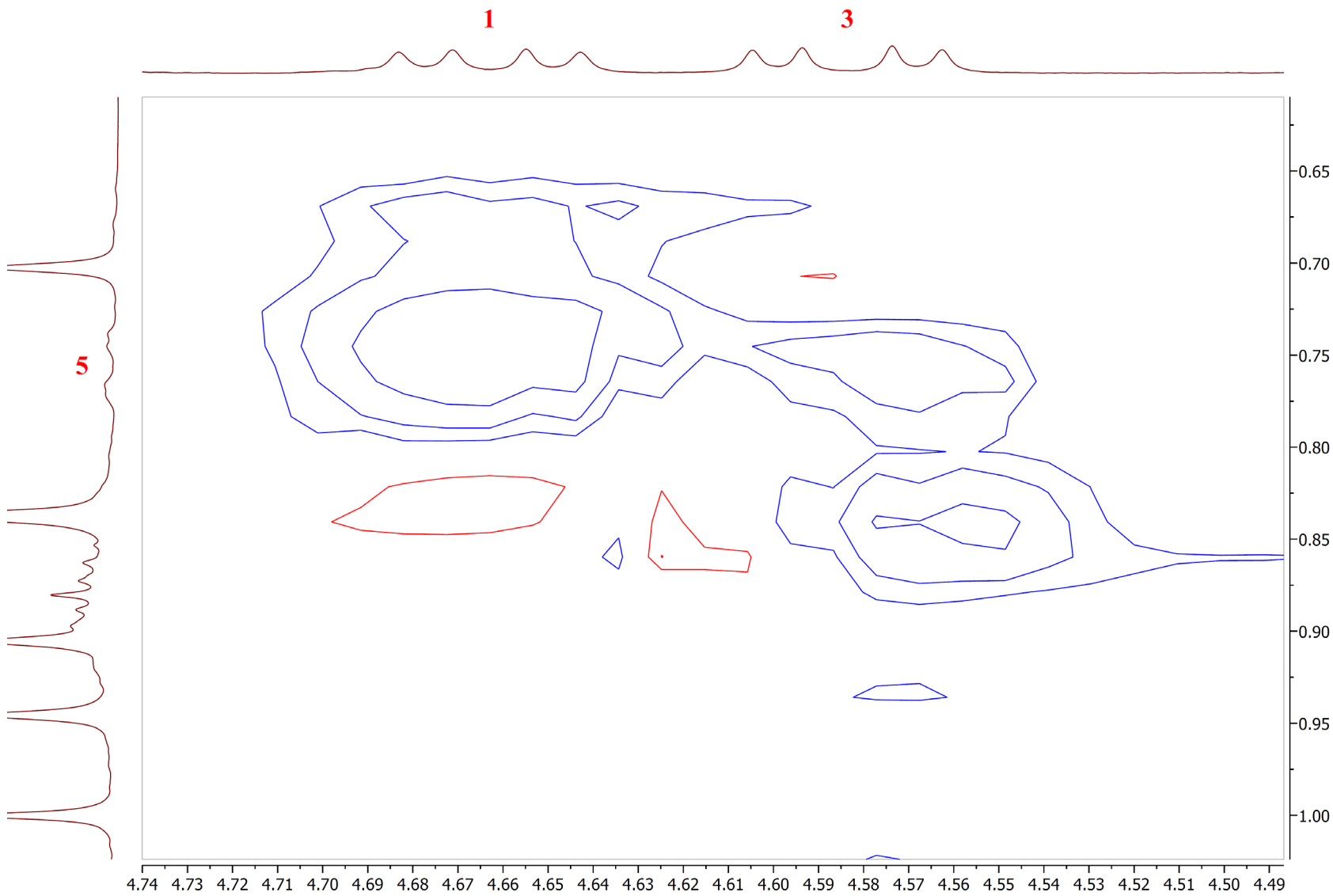
Phụ lục 4. Phổ ^{13}C -NMR hợp chất A1



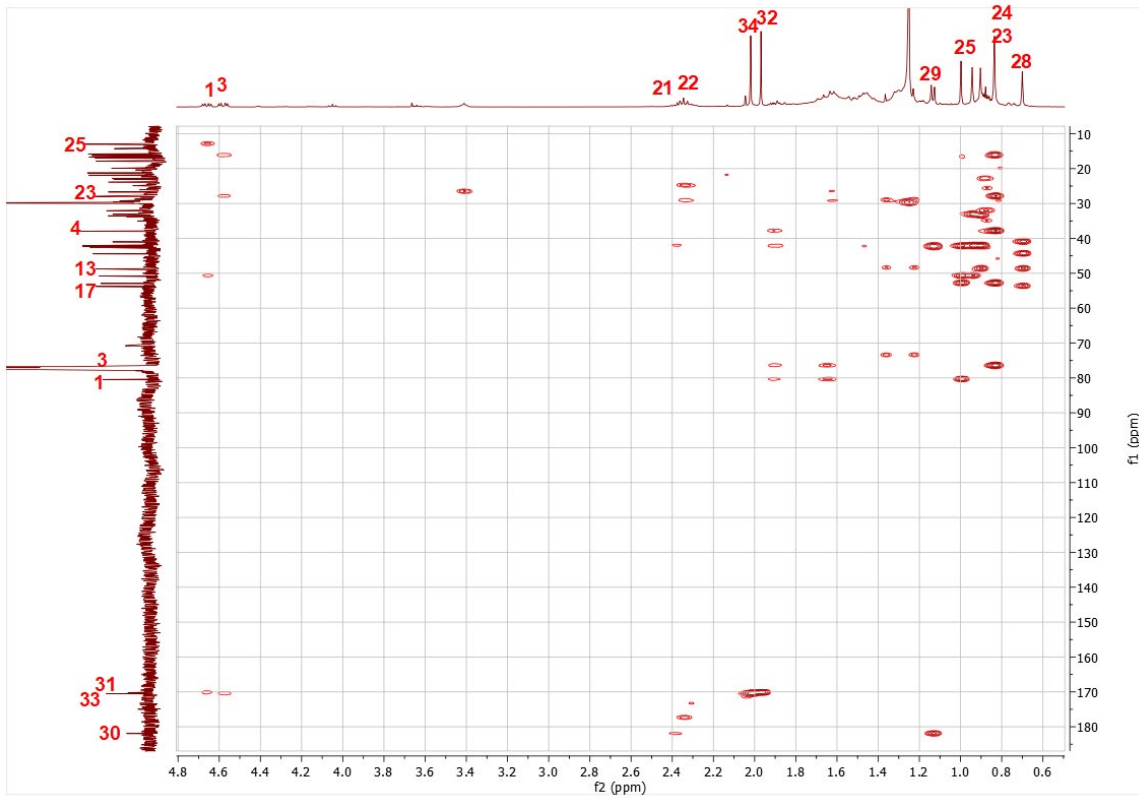
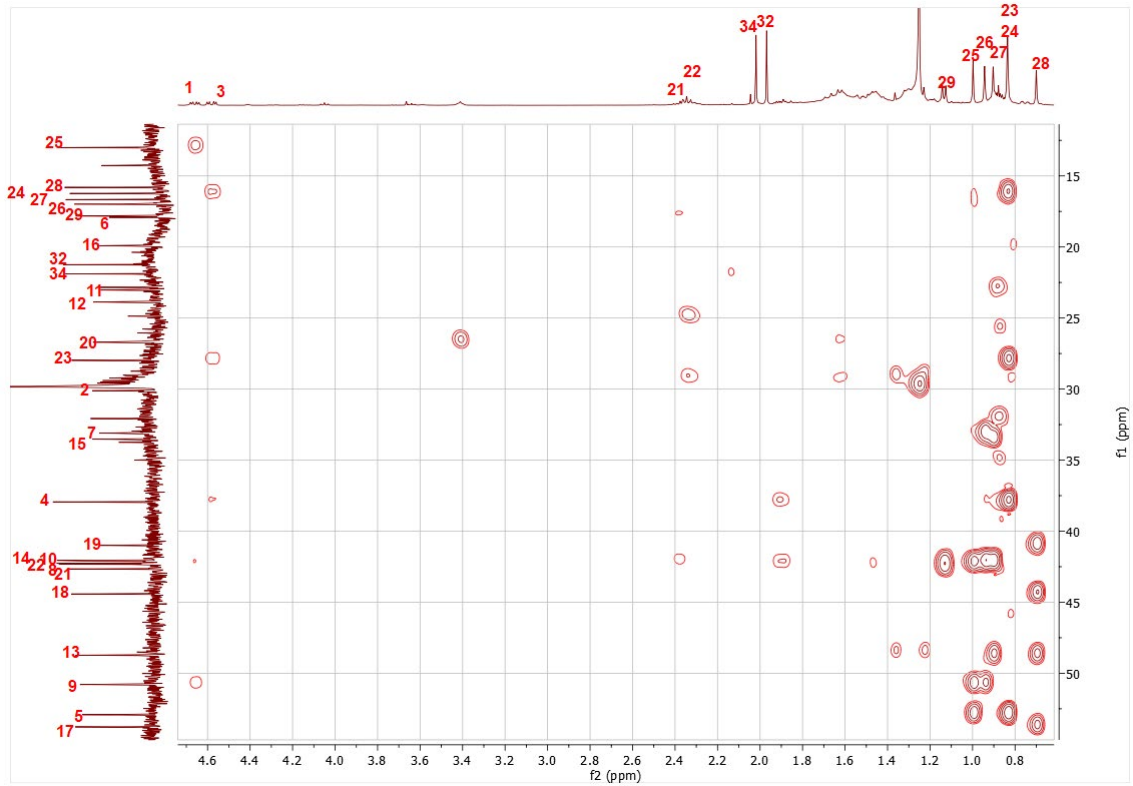
Phụ lục 5. Phổ HMBC hợp chất A1



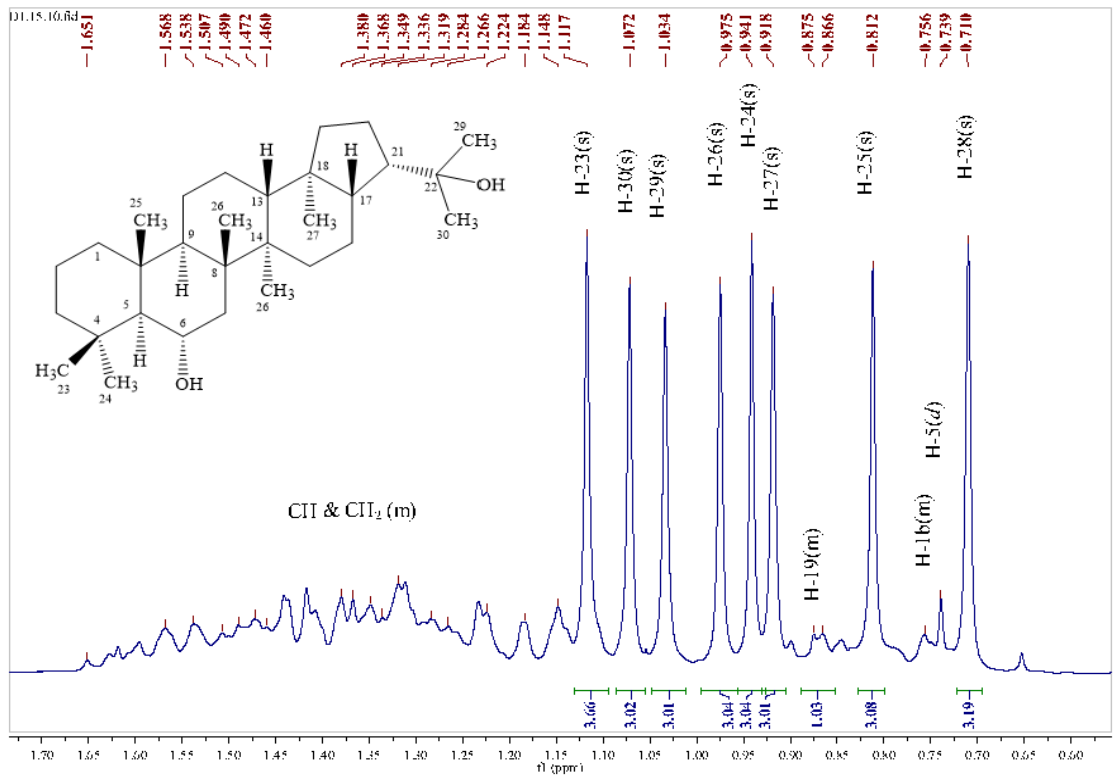
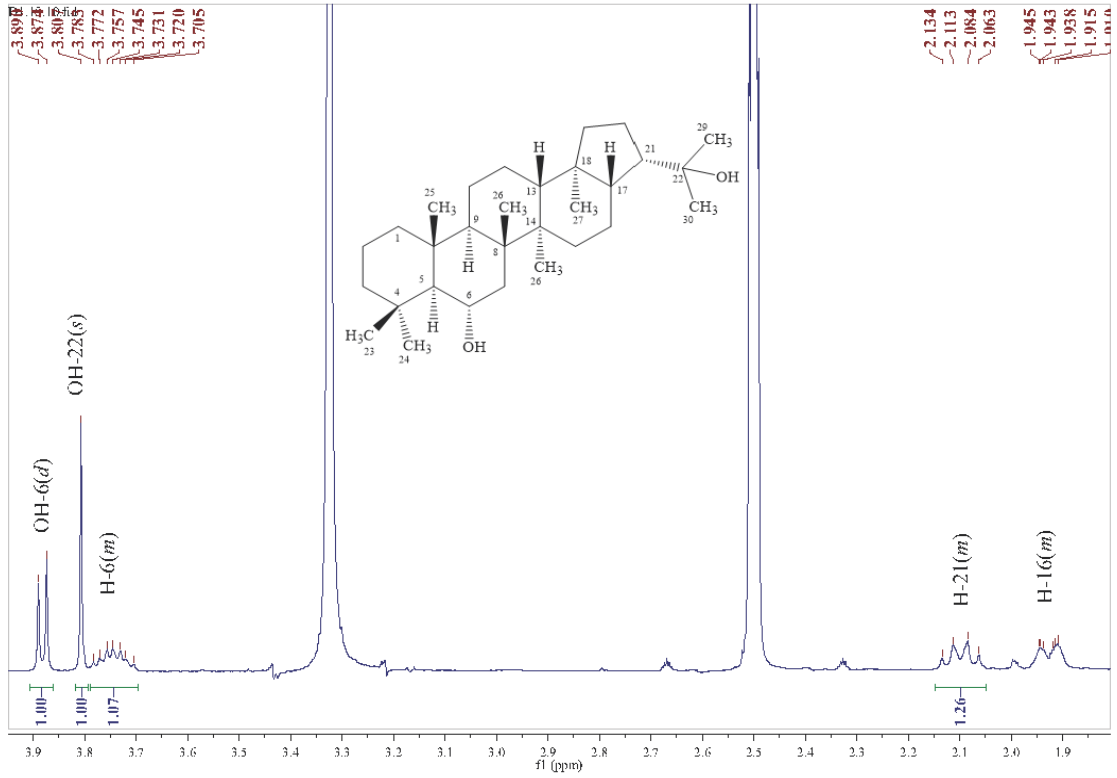
Phụ lục 6. Phổ COSY hợp chất A1



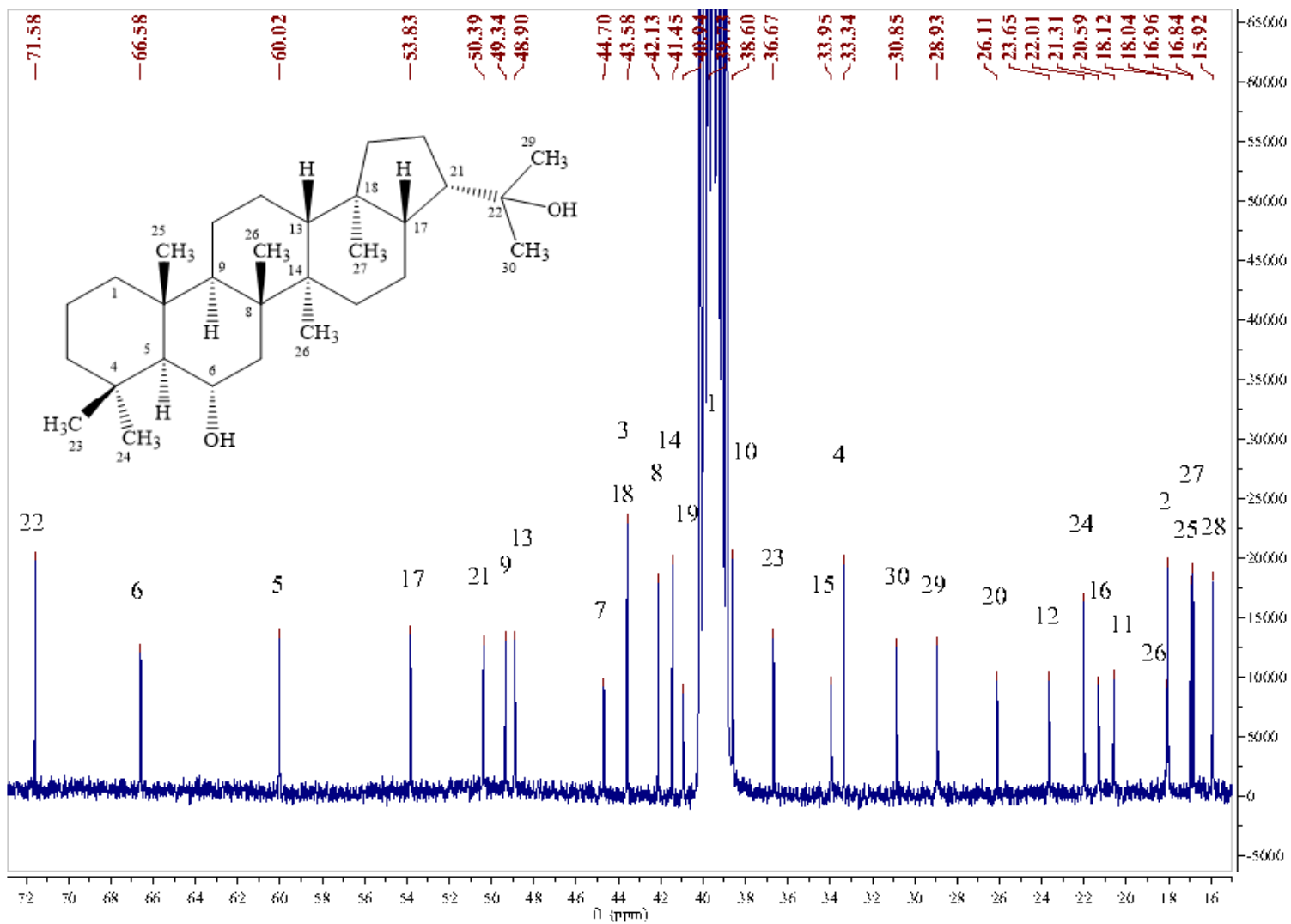
Phụ lục 7. Phổ NOESY hợp chất A1



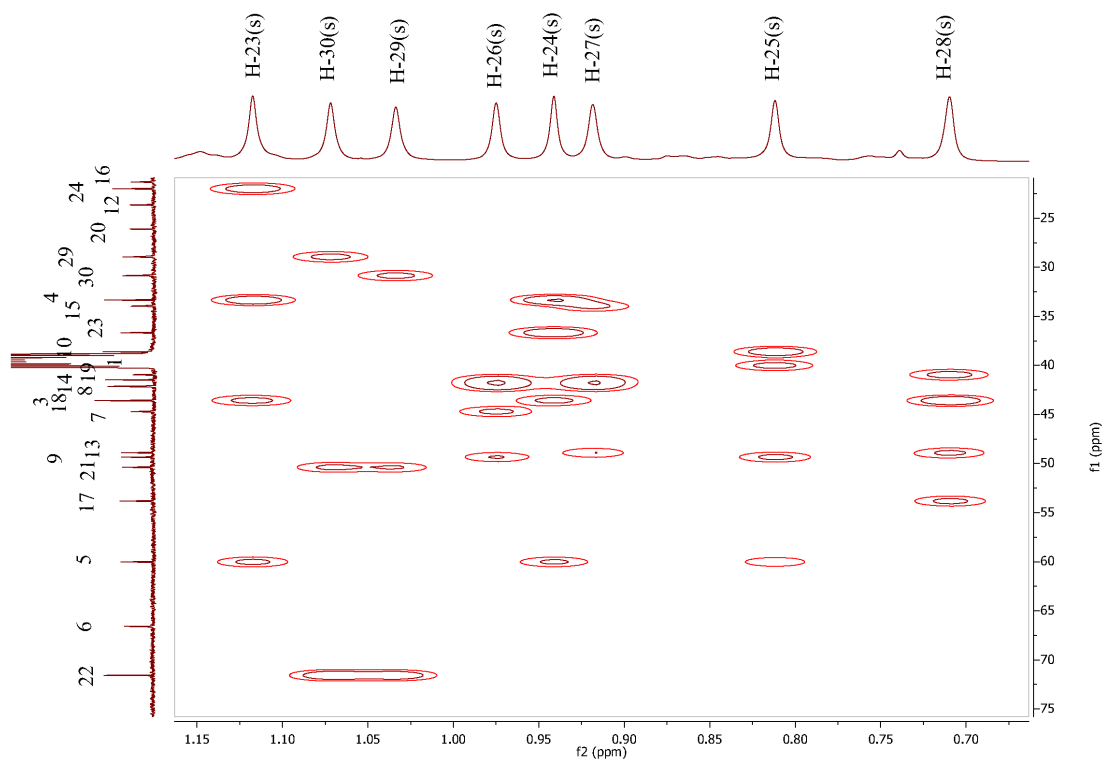
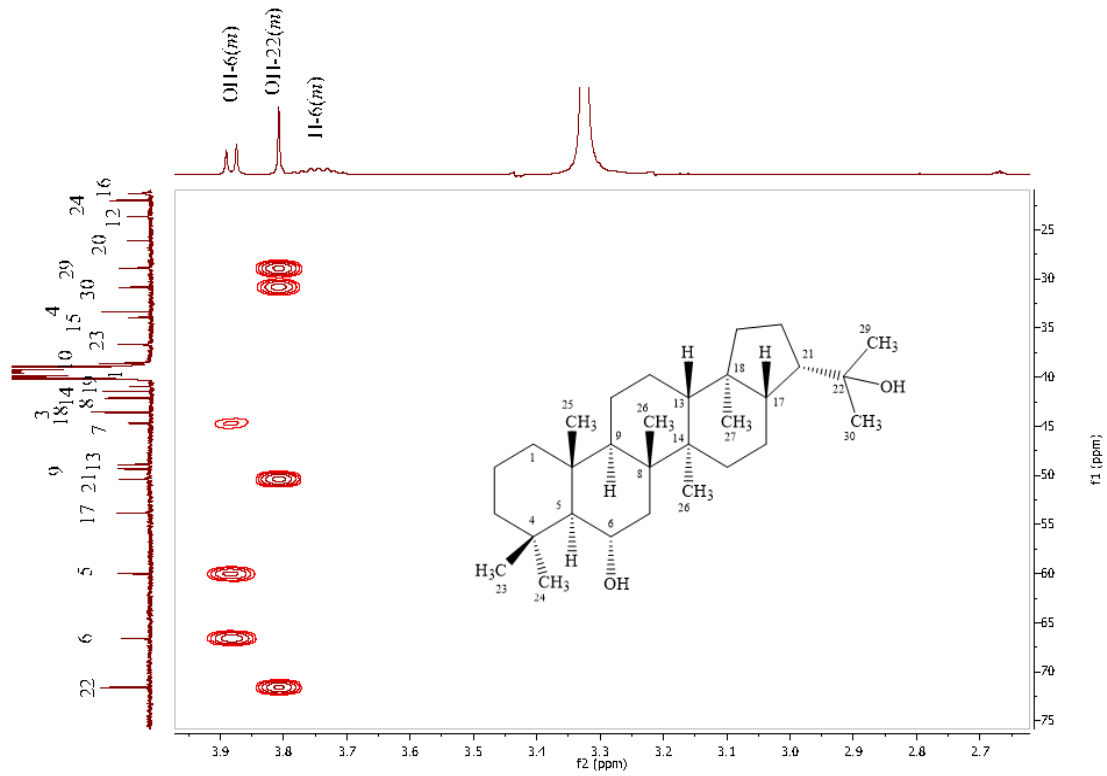
Phụ lục 8. Phổ HSQC hợp chất A1



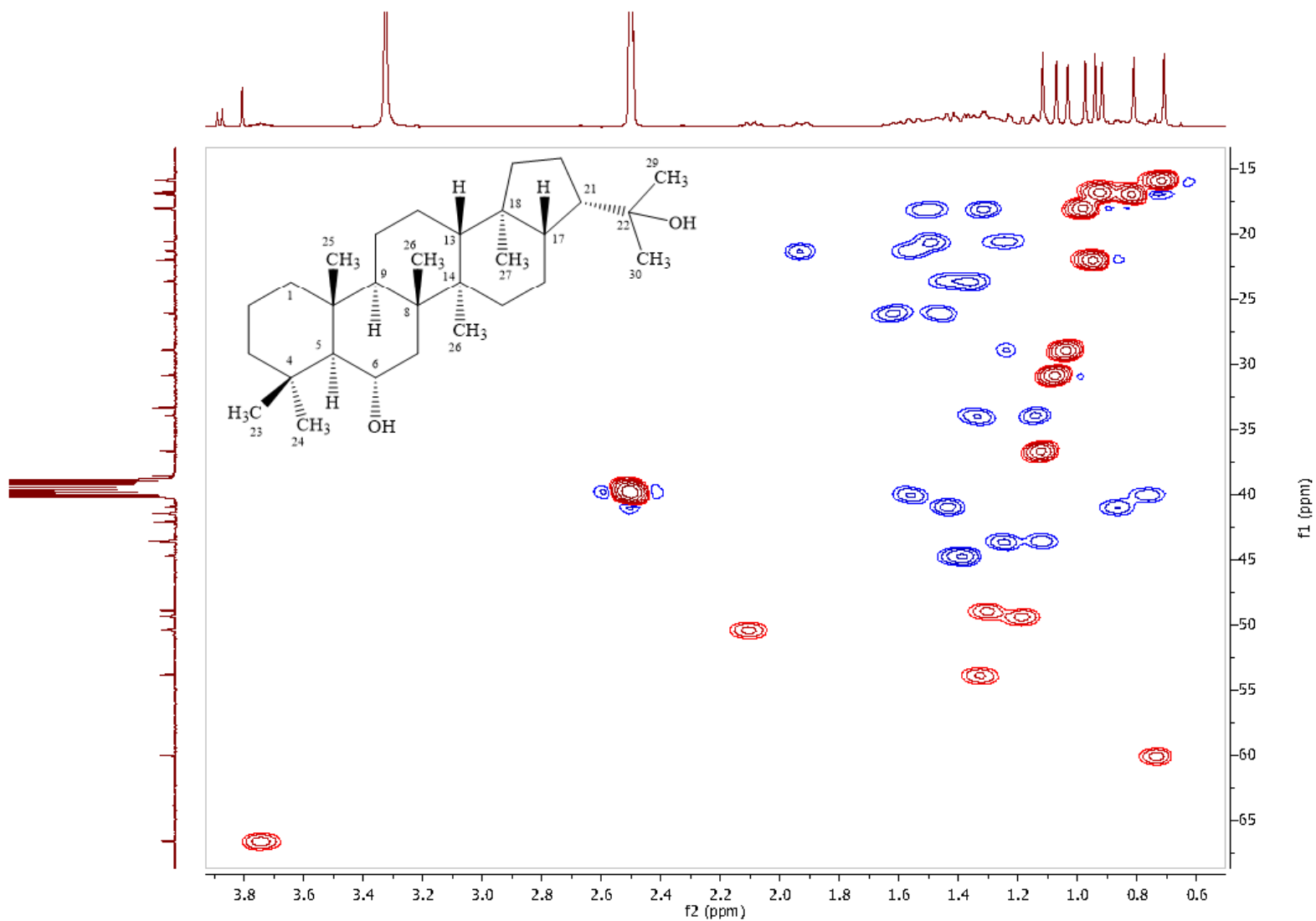
Phụ lục 9. Phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất A2



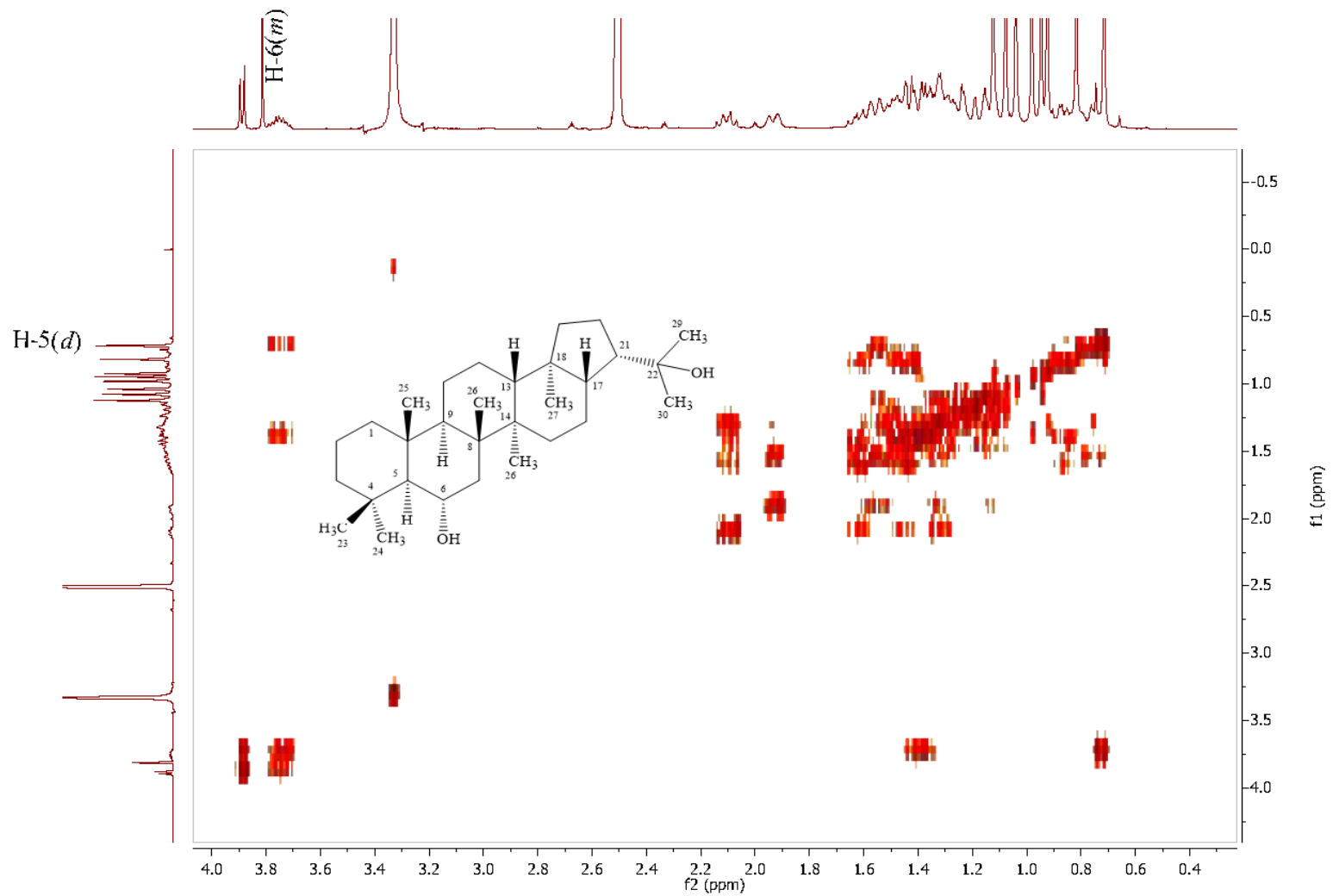
Phụ lục 10. Phổ ^{13}C - NMR hợp chất A2



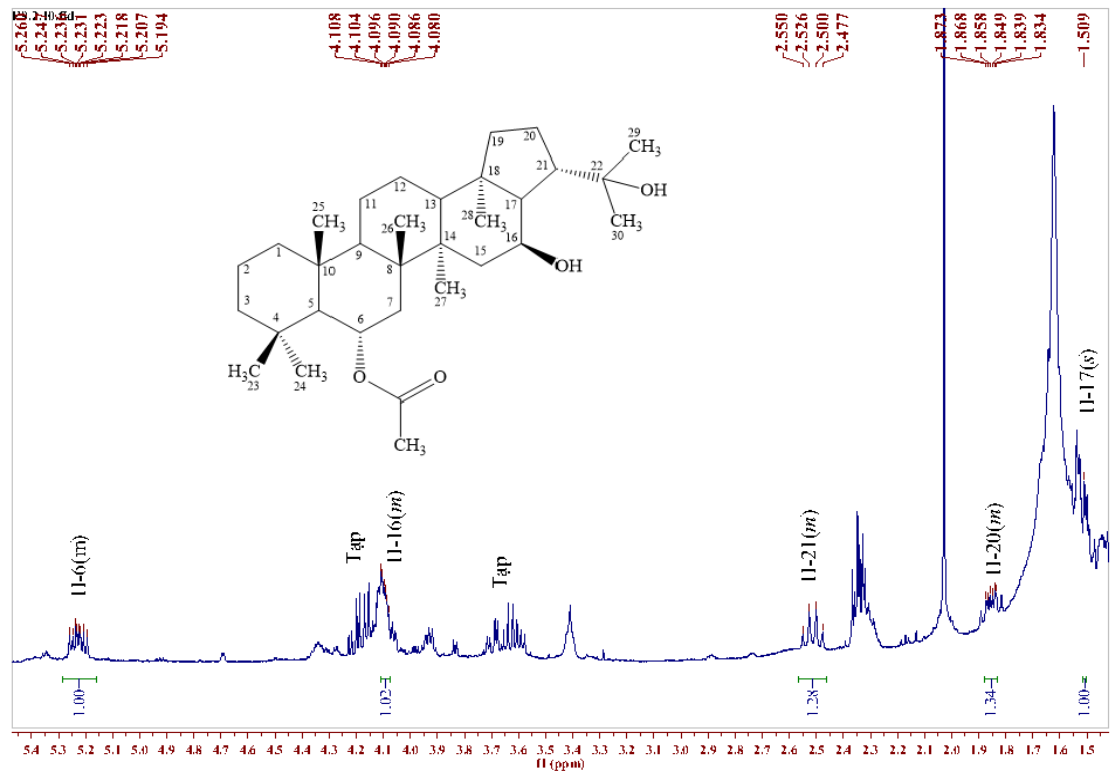
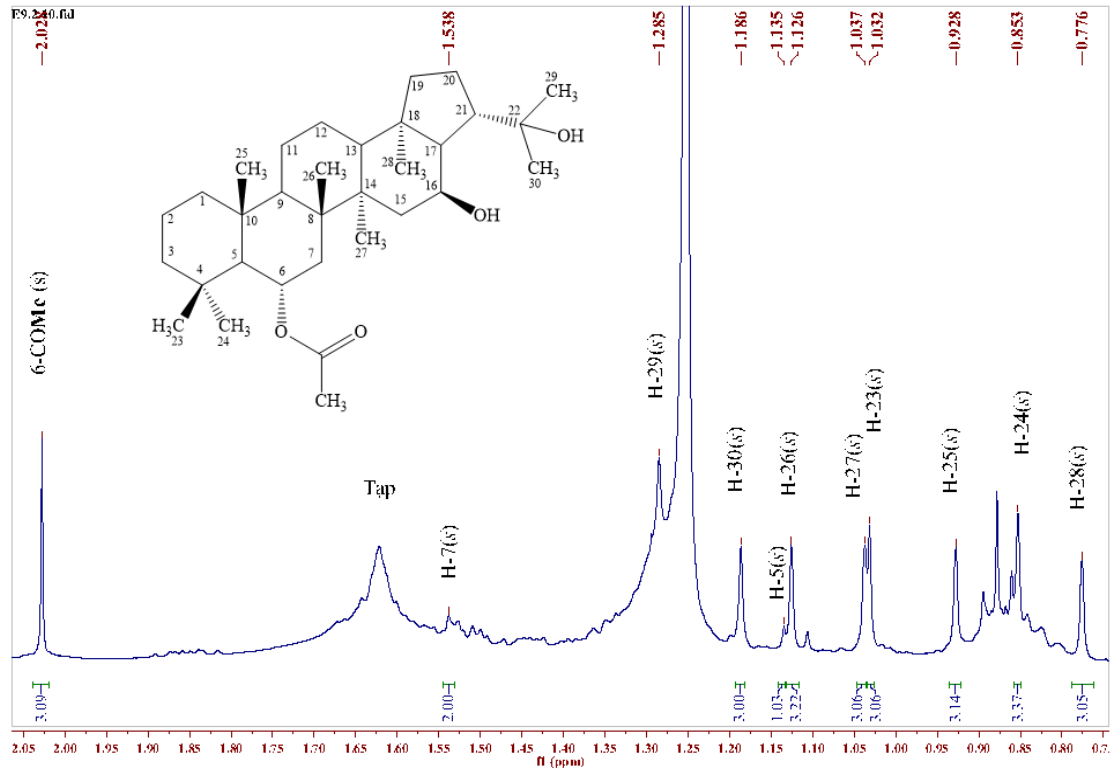
Phụ lục 11. Phổ HMBC hợp chất A2



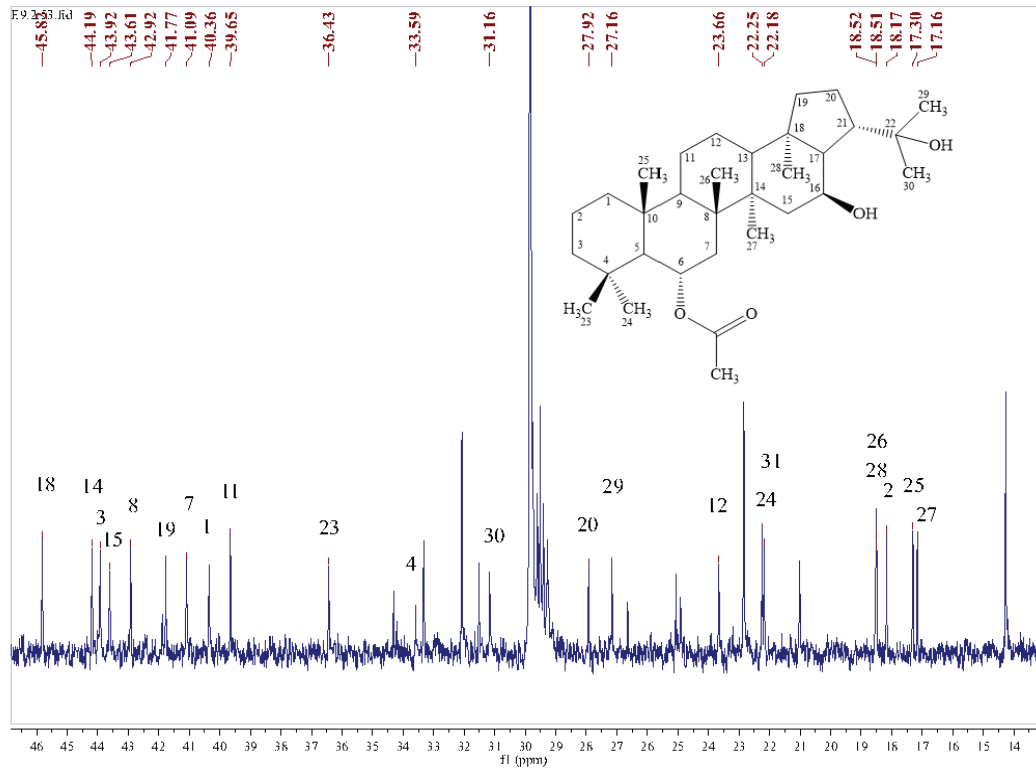
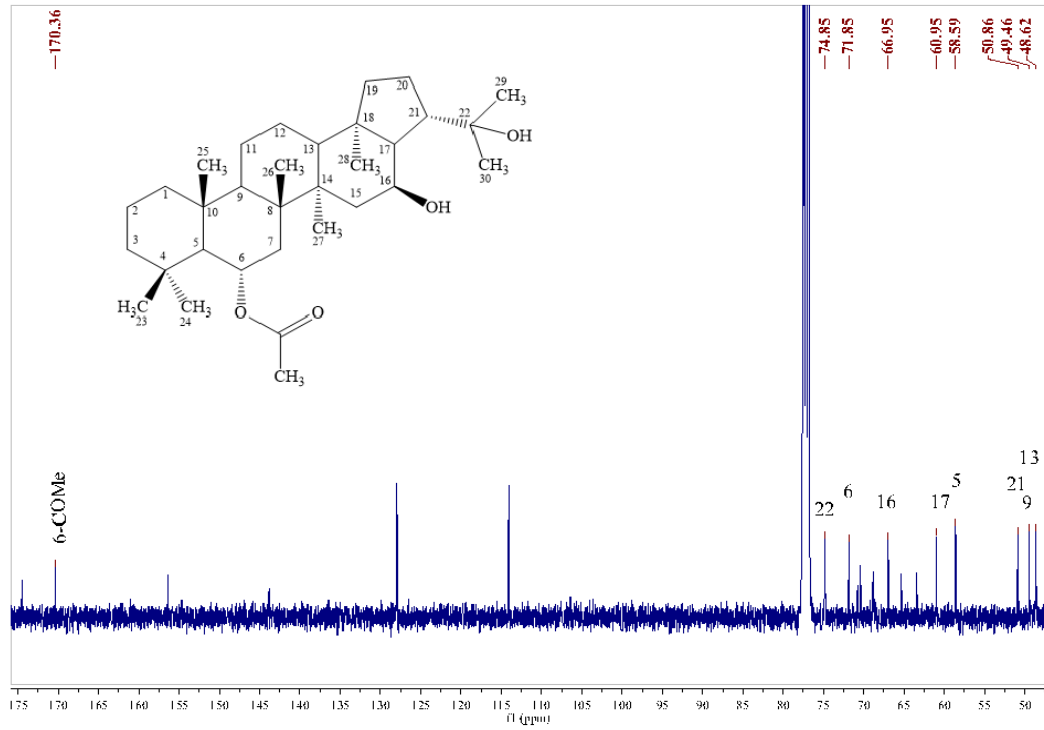
Phụ lục 12. Phổ HSQC hợp chất A2



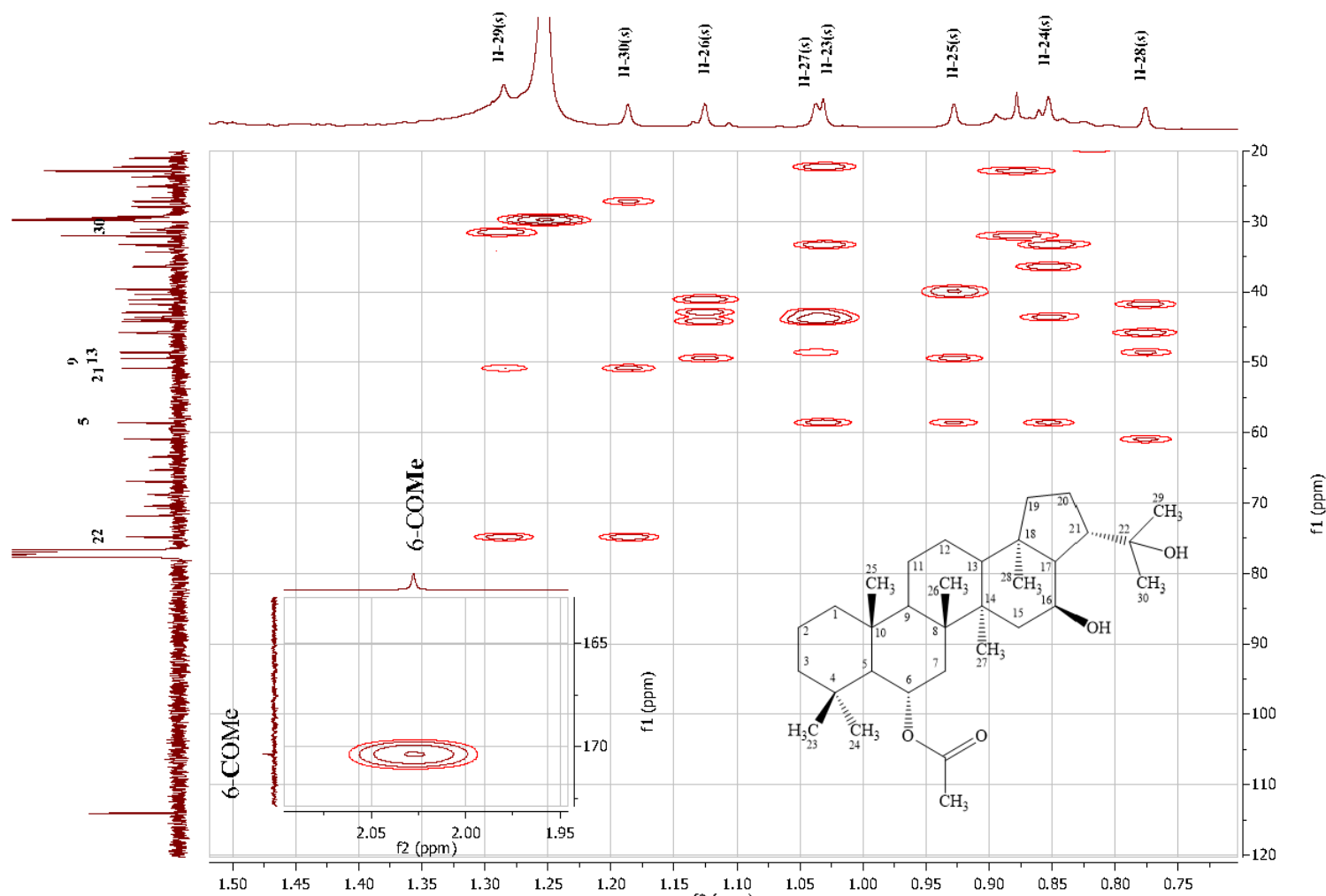
Phụ lục 13. Phổ COSY hợp chất A2



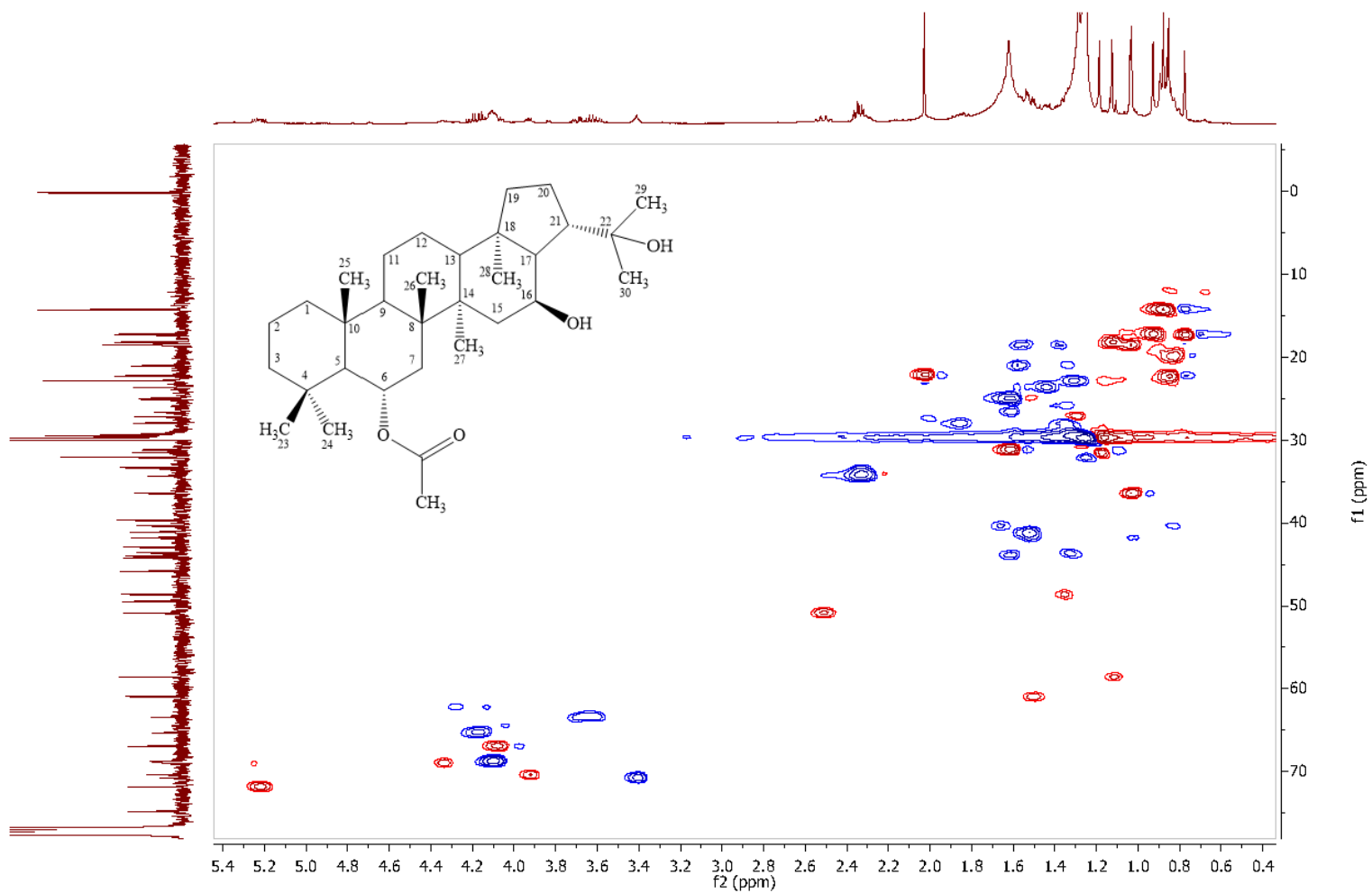
Phụ lục 14. Phổ ¹H-NMR hợp chất A3



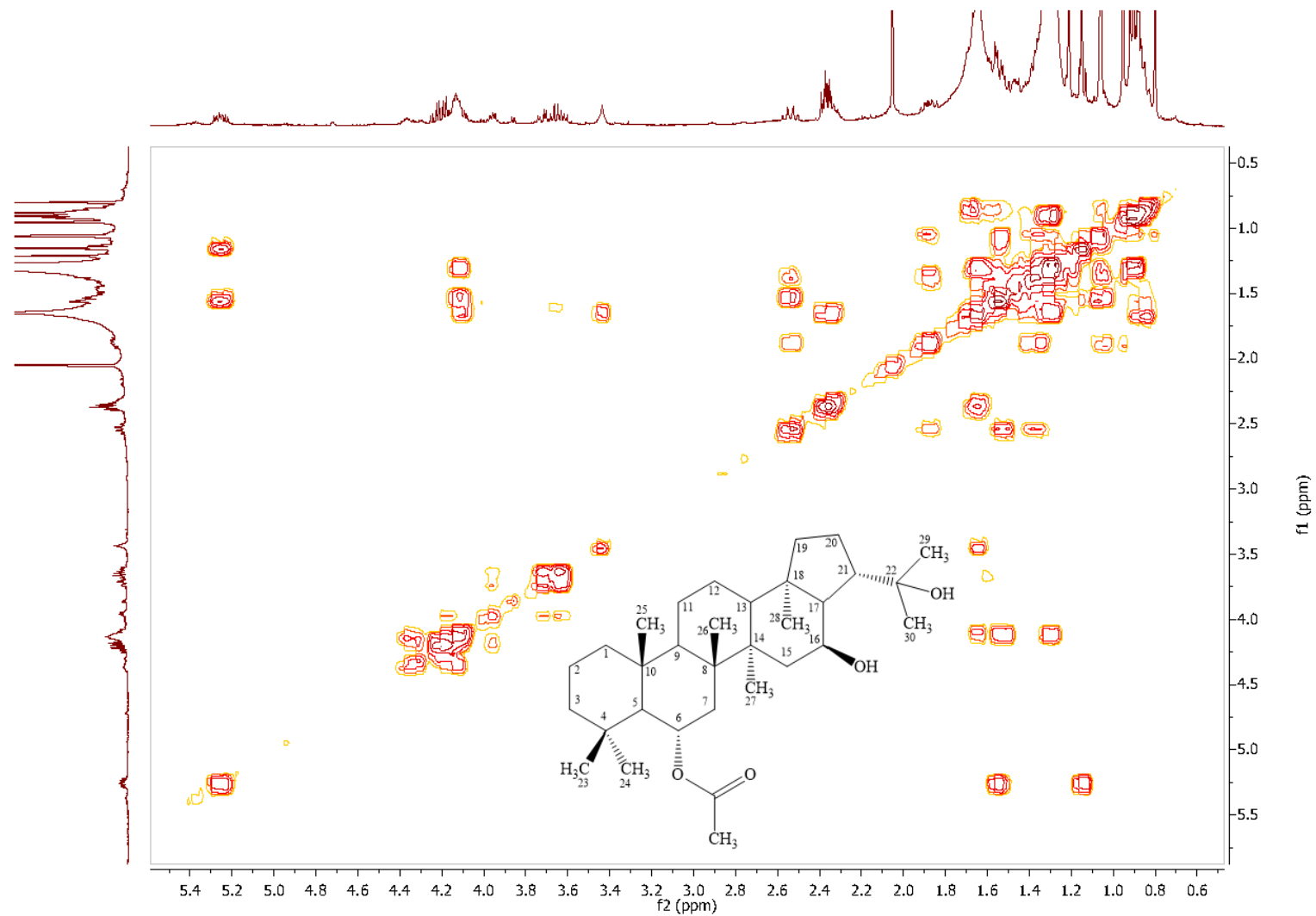
Phụ lục 15. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ hợp chất A3



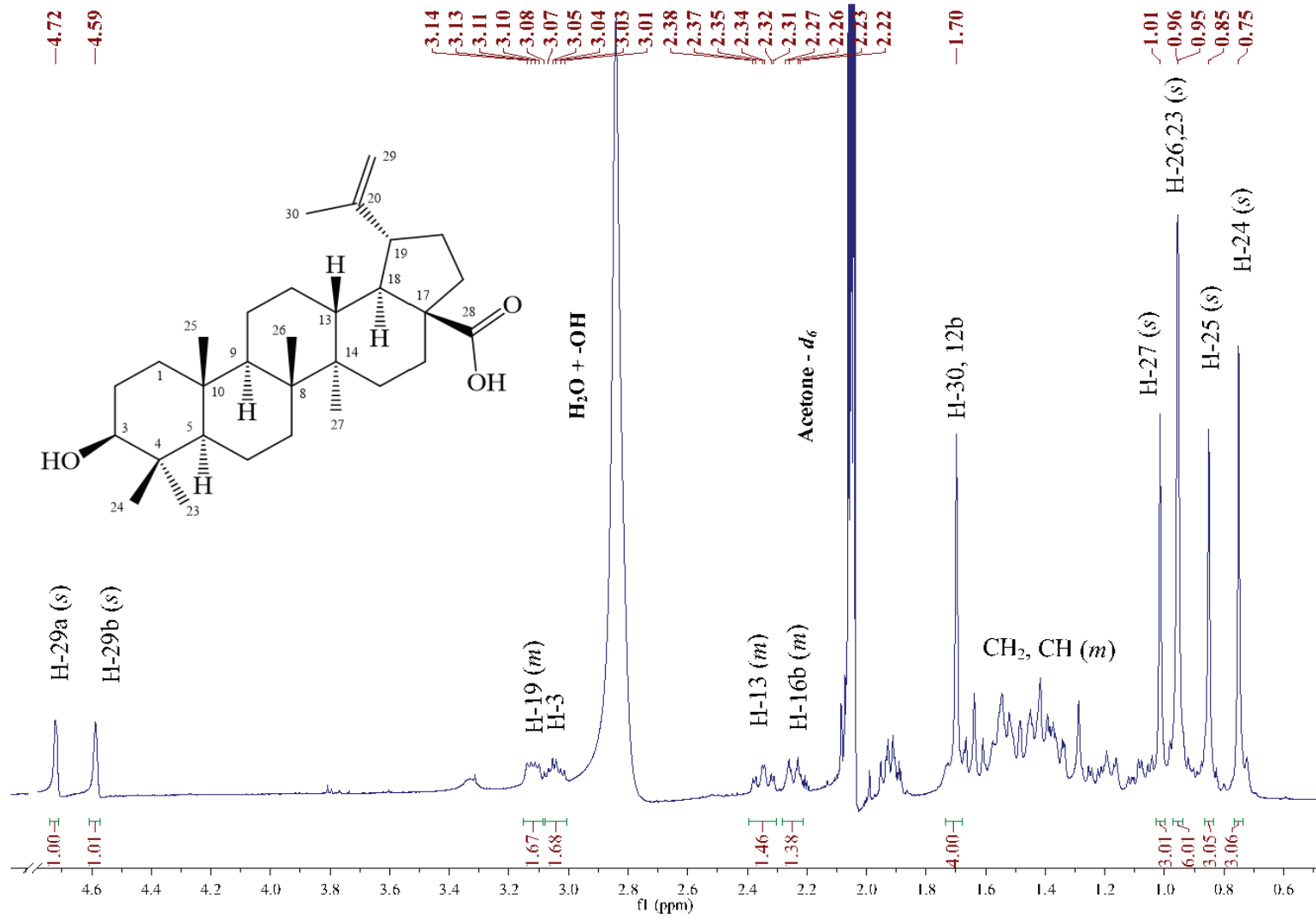
Phụ lục 16. Phổ HMBC hợp chất A3



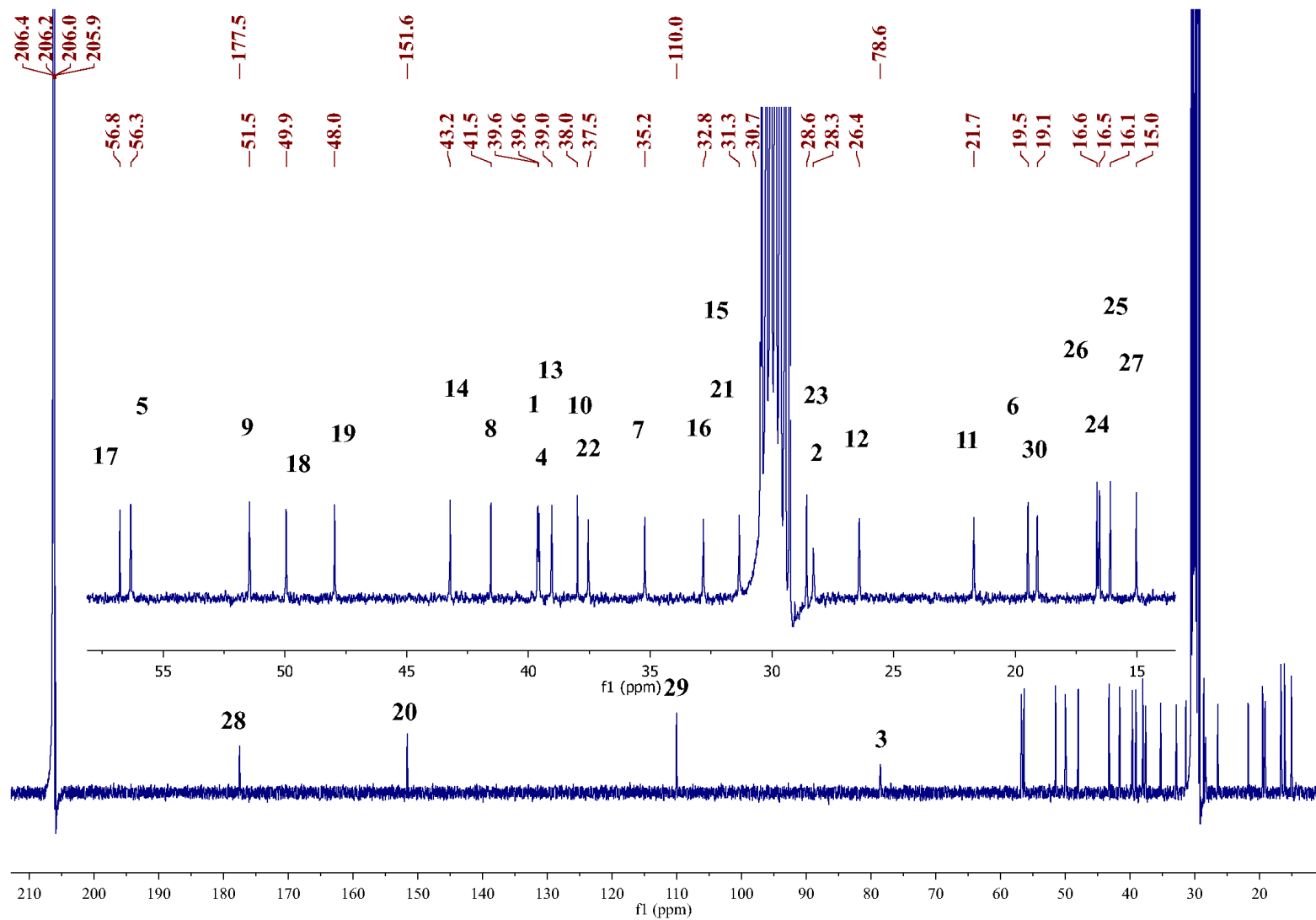
Phụ lục 17. Phổ HSQC hợp chất A3



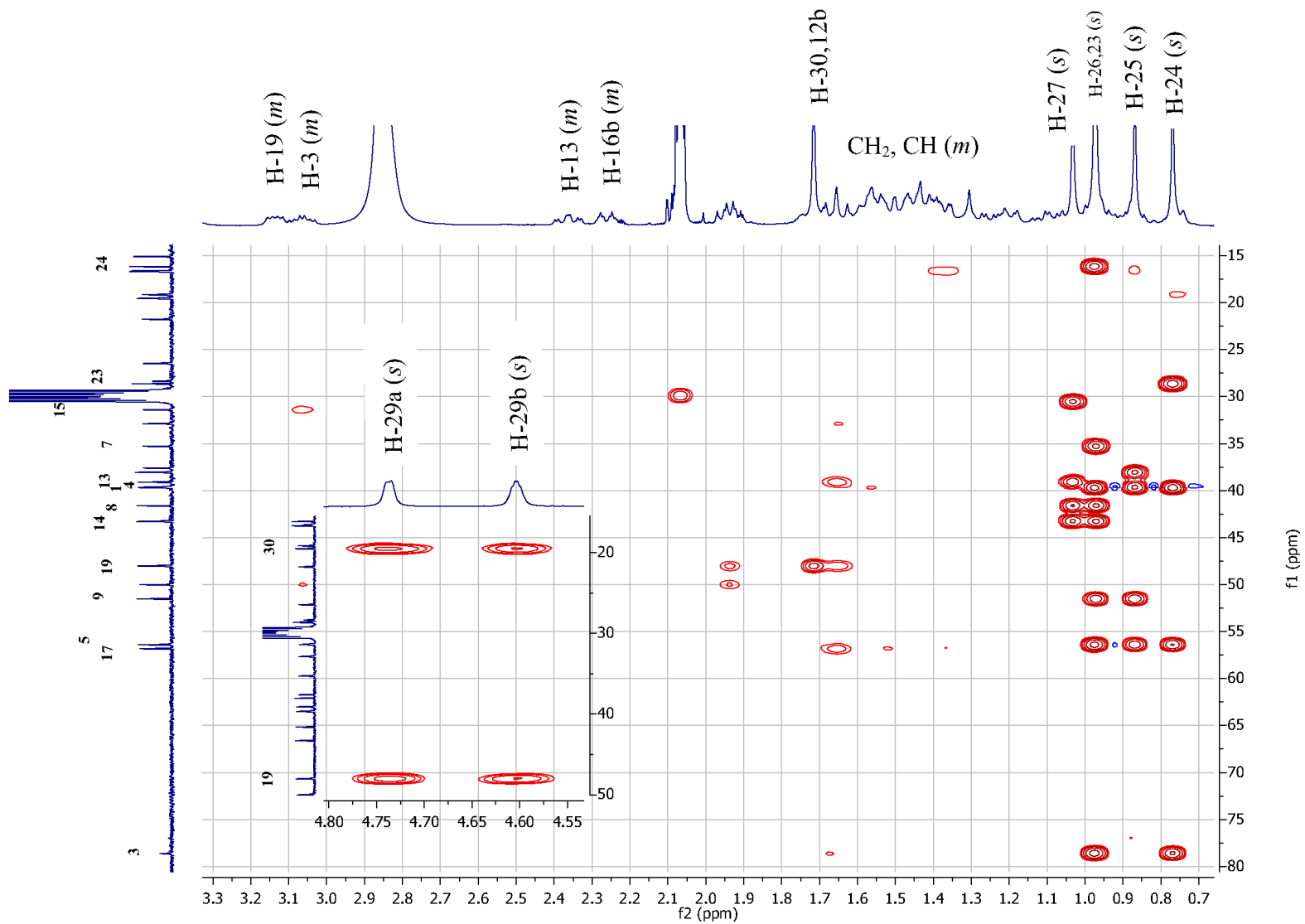
Phụ lục 18. Phổ COSY hợp chất A3



Phụ lục 19. Phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất A4



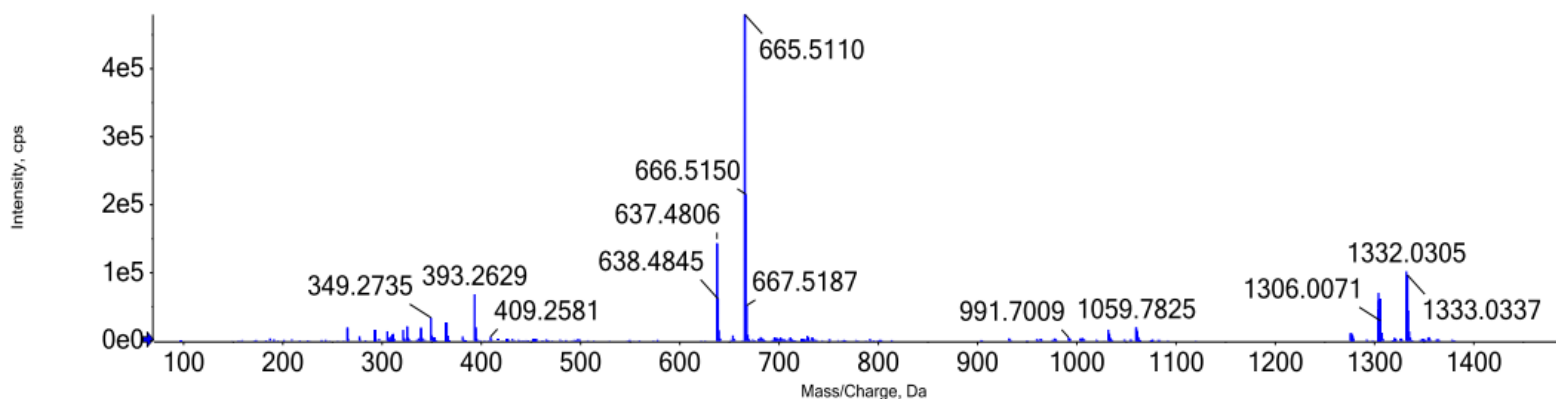
Phụ lục 20. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ hợp chất A4



Phụ lục 21. Phổ HMBC hợp chất A4

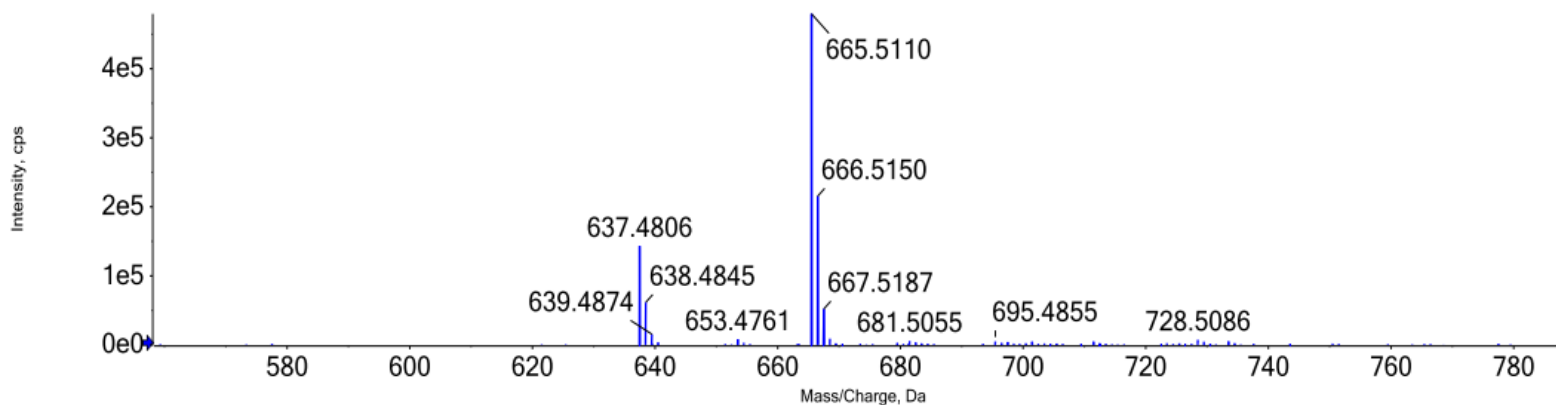
Full mass spectrum

Spectrum from DYq_(-)ESI.wiff2 (sample 1) - DYq_(-)ESI, -TOF MS (70 - 1500) from 0.134 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)



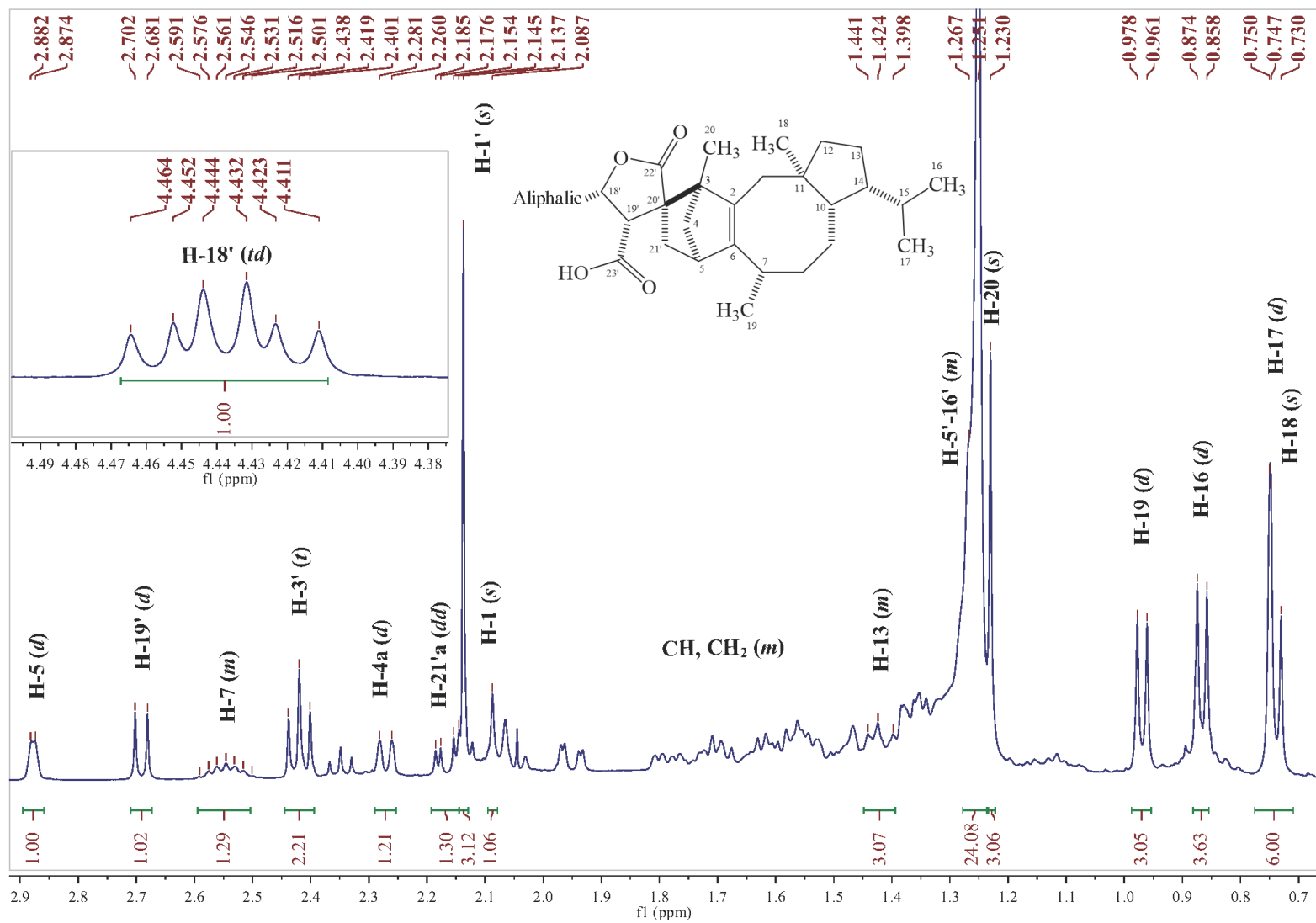
Expanded spectrum

Spectrum from DYq_(-)ESI.wiff2 (sample 1) - DYq_(-)ESI, -TOF MS (70 - 1500) from 0.134 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)

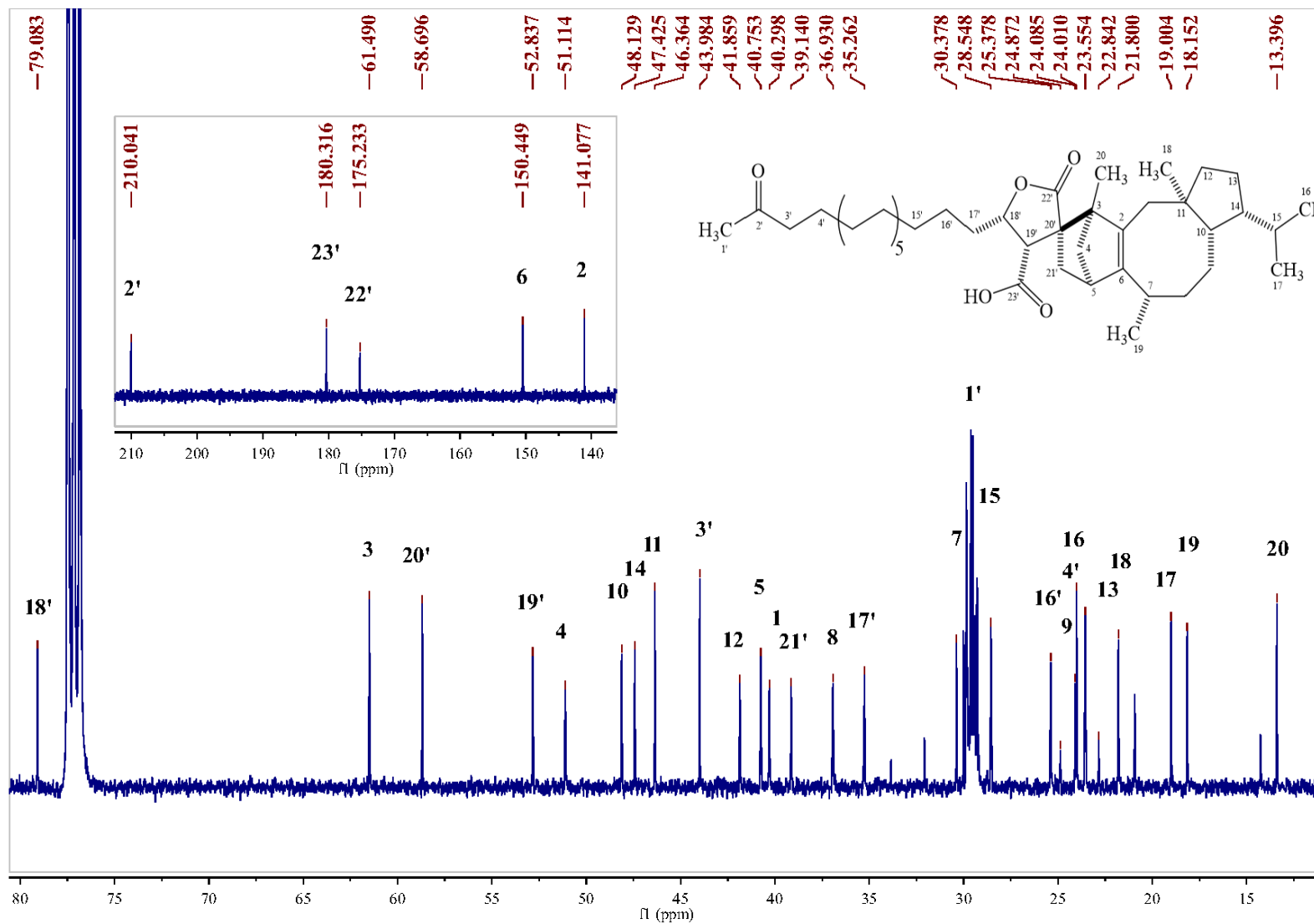


Molecular formula prediction

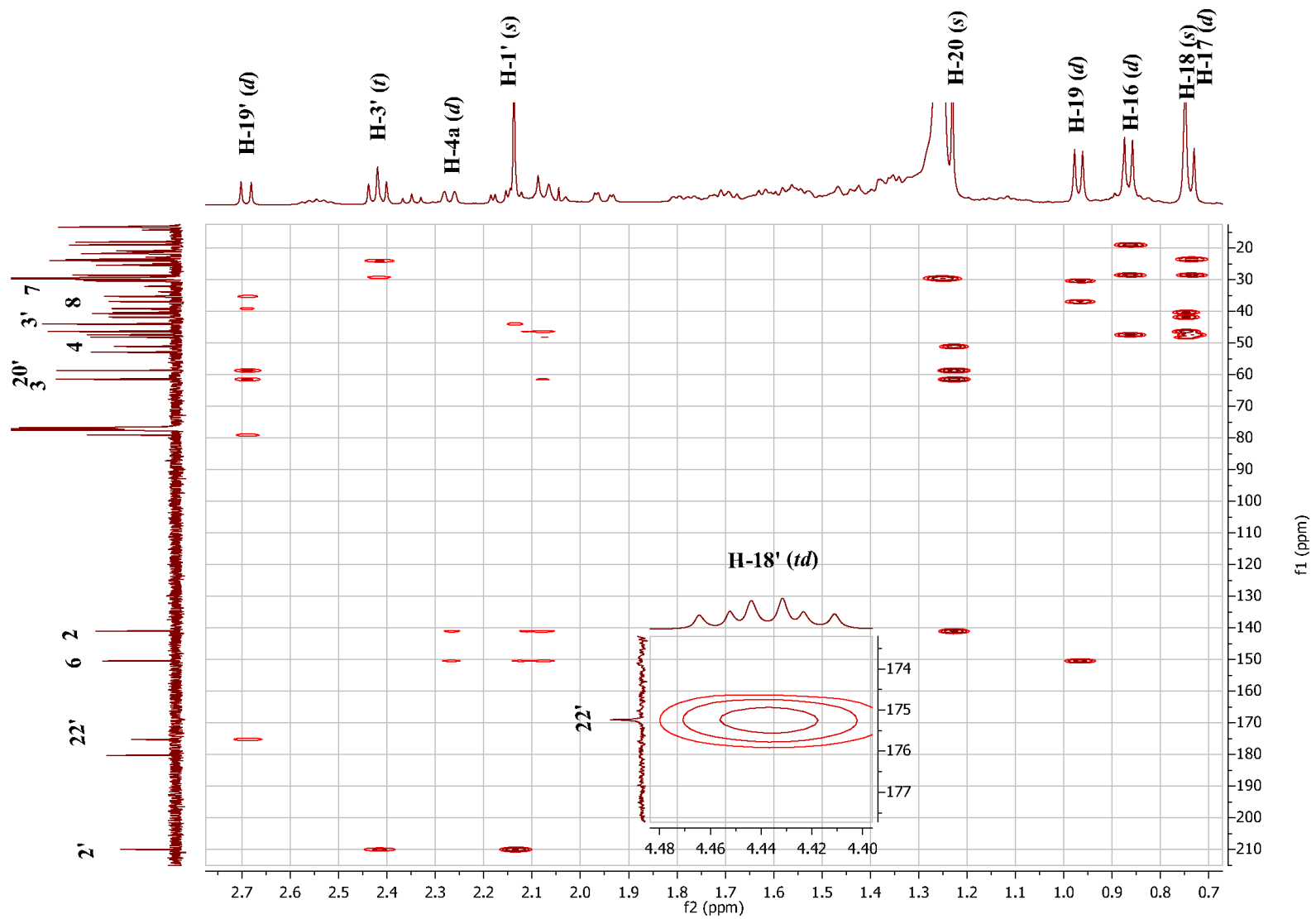
Phụ lục 22. Phổ MS hợp chất A5



Phụ lục 23. Phổ ¹H-NMR hợp chất A5



Phụ lục 24. Phổ ^{13}C -NMR hợp chất A5



Phụ lục 25. Phổ HMBC hợp chất A5