

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THỊ LIỄU

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH
HỌC VÀ ĐA DẠNG NGUỒN GEN DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ
LOÀI LÁ KIM Ở TÂY NGUYÊN, VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 62.44.01.14

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà nội-2018

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

Người hướng dẫn khoa học 1: GS.TSKH. Trần Văn Sung

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS. Đinh Thị Phòng

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 2018.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Khí hậu Việt Nam phân hóa đa dạng theo địa hình, với đặc điểm đa dạng về khí hậu đã tạo ra một thảm thực vật vô cùng phong phú. Loài cây lá kim là những loài cây quan trọng cả về sinh thái, kinh tế và văn hóa tại nhiều địa phương như Lâm Đồng, Kon Tum, Gia Lai... Theo số liệu thống kê của Nguyễn Tiến Hiệp và cộng sự (2005), trong số 34 loài lá kim ở Việt Nam có tới 15 loài ở Tây Nguyên (chiếm 44,11%). Vì thế mà Tây Nguyên được coi là “*cái nôi*” các loài lá kim có tính đa dạng vào hàng thứ hai ở Việt Nam, đặc biệt là tại Đắk Lắk, Kon Tum và Lâm Đồng.

Đỉnh tùng (*Cephalotaxus mannii*), Hoàng đàn giả (*Dacrydium elatum*) và Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana*) là những loài cây lá kim có giá trị kinh tế của khu vực Tây Nguyên, Việt Nam. Tuy nhiên, cho tới nay loài Kim giao núi đất vẫn chưa được nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học cả trong và ngoài nước, trong khi Đỉnh tùng mới chỉ được nghiên cứu hạn chế tại một số nước như Trung Quốc, Nhật Bản và chưa được nghiên cứu tại Việt Nam, Hoàng đàn giả mới chỉ có nghiên cứu thành phần hóa học qua tinh của dầu lá. Vì vậy việc nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của ba loài lá kim trên có nhiều triển vọng tìm ra chất có cấu trúc mới và có hoạt tính sinh học lý thú làm tiền đề cho việc nghiên cứu, phát triển thuốc chữa bệnh góp phần nâng cao giá trị nguồn tài nguyên sẵn có ở vùng Tây Nguyên. Kết hợp với kết quả nghiên cứu về đa dạng nguồn gen di truyền tạo cơ sở khoa học vững chắc cho việc bảo tồn và phát triển bền vững các loài cây lá kim tại khu vực Tây Nguyên, Việt Nam. Xuất phát từ các cơ sở khoa học nêu trên chúng tôi lựa chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học và đa dạng nguồn gen di truyền của một số loài lá kim ở Tây nguyên, Việt Nam**”

2. Mục tiêu của luận án.

Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của 3 loài lá kim nhằm tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học cao và có cấu trúc hóa học lý thú. Kết hợp với kết quả của nghiên cứu đa dạng nguồn gen di truyền giúp cho công tác bảo tồn các loài lá kim – một loài cây quan trọng của vùng Tây Nguyên, Việt Nam.

3. Những nghiên cứu chính của luận án.

- Phân lập các hợp chất từ các bộ phận của 3 loài lá kim nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký cột.
- Xác định cấu trúc hoá học các hợp chất phân lập được bằng phương pháp phổ IR, MS, 1D-NMR, 2D-NMR kết hợp với các phương pháp vật lý khác
- Thử hoạt tính chống oxi hóa và hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết và các chất sạch phân lập được.
- Đánh giá tính đa dạng nguồn gen di truyền của 3 loài lá kim nghiên cứu bằng 2 loại chỉ thị ISSR và SSR.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về 3 loài lá kim nghiên cứu

1.1.1. Đặc điểm thực vật và tình trạng bảo tồn.

1.1.1.1. Đinh tùng (Cephalotaxus mannii)

1.1.1.2. Hoàng đàn giả (Dacrydium elatum)

1.1.1.3. Kim giao núi đất (Nageia wallichiana)

1.1.2. Tình hình nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài trong chi Cephalotaxus, Dacrydium và Nageia.

1.1.2.1. Thành phần hóa học

1.1.2.2. Hoạt tính sinh học

1.2. Ứng dụng kỹ thuật phân tích ISSR và SSR trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở thực vật.

1.2.1. Kỹ thuật ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

1.2.2. Kỹ thuật SSR (Simple Sequence Repeat)

1.2.3. Một số thành tựu về nghiên cứu đa dạng nguồn gen di truyền của một số loài thuộc chi Cephalotaxus, Dacrydium và Nageia.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu thực vật

2.1.1. *Nghiên cứu thành phần hóa học.*

2.1.1.1. *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học*

Mẫu lá, vỏ thân của loài Đinh tùng tiêu bản số CPC 4718; Mẫu lá, cành và vỏ thân của loài Kim giao núi đất mẫu tiêu bản Nr. CPC 4715; Mẫu gỗ thân, cành của loài Hoàng đàn giả tiêu bản số CPC 4708 được thu hái tại tỉnh Lâm Đồng vào tháng 8 / 2012 do Tiến sĩ Nguyễn Tiến Hiệp, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) xác định tên khoa học và giữ tại Bảo tàng thiên nhiên, VAST, Hà Nội, Việt Nam.

2.1.1.2. *Nghiên cứu đa dạng nguồn gen di truyền*

Những mảnh lá/vỏ gỗ/rễ của 3 loài. Mỗi loài nghiên cứu lựa chọn 70 cá thể (riêng loài Đinh tùng chỉ có 34 cá thể).

2.2. Hóa chất, thiết bị

2.2.1. *Nghiên cứu về hóa học*

2.2.2. *Nghiên cứu đa dạng nguồn gen di truyền*

2.3. Chiết tách các chất từ 3 loài lá kim

2.3.1. *Phương pháp nghiên cứu*

2.3.1.1. *Phương pháp chiết mẫu thực vật*

Mẫu thực vật của 3 loài nghiên cứu được chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần.

2.3.1.2. *Phương pháp xác định cấu trúc*

Việc xác định cấu trúc hóa học của các chất sạch được thực hiện việc kết hợp các phương pháp phổ (FT-IR), phổ khối (MS), (1D và 2D NMR).

2.3.2. *Chiết tách các chất từ 3 loài lá kim*

2.3.2.1. *Đinh tùng (C. mannii)*

Chiết alkaloid bộ phận lá cây Đinh tùng (1 kg) thu được 6 gam alkaloid tổng. Từ vỏ cây Đinh tùng (0,5 kg) thu được 7,9 gam alkaloid tổng và 30 g dịch chiết EtOAc không chứa alkaloid.

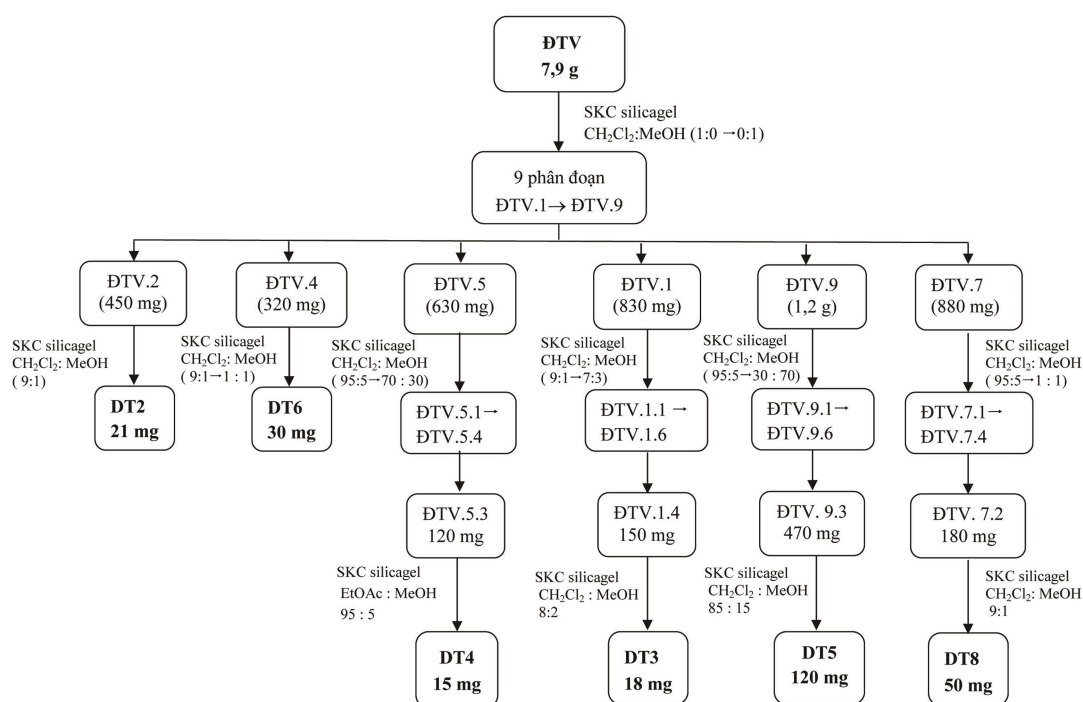
Từ 6 gam alkaloid tổng của lá và cành Đinh tùng (ĐTL), được chạy sắc ký cột silica gel hệ dung môi CH_2Cl_2 / MeOH (98 : 2), sau đó tăng dần đến tỉ lệ

(1:1). Tiếp tục sắc ký cột trên silica gel nhiều lần các phân đoạn đã phân lập được 2 hợp chất sạch kí hiệu là **DT1** (30mg) và **DT7** (11 mg).

Từ 7,9 gam cặn vỏ alkaloid tổng (ĐTV) phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi CH_2Cl_2 : MeOH (1:0) tăng dần tỉ lệ phân cực và kết thúc cột (0:1) thu được 9 phân đoạn (ĐTV.1→ĐTV.9). Tiếp tục sắc ký cột trên silica gel nhiều lần các phân đoạn đã phân lập được 7 hợp chất sạch kí hiệu là **DT2** (21 mg), **DT3** (18 mg), **DT4** (15 mg), hỗn hợp **DT5** (120 mg) (**DT5.1** và **DT5.2**), **DT6** (30 mg), **DT8** (50 mg).

Từ dịch chiết EtOAc (30 gam) phần không chứa alkaloid, chạy sắc ký cột silica gel hệ dung môi (CH_2Cl_2 / MeOH; 95:5) đã phân lập được 2 hợp chất flavonoid là: Epicatechin **DT9** (20 mg) và Epigallocatechin **DT10** (25 mg).

❖ Phân lập, tinh chế các chất từ dịch chiết alkaloid tổng

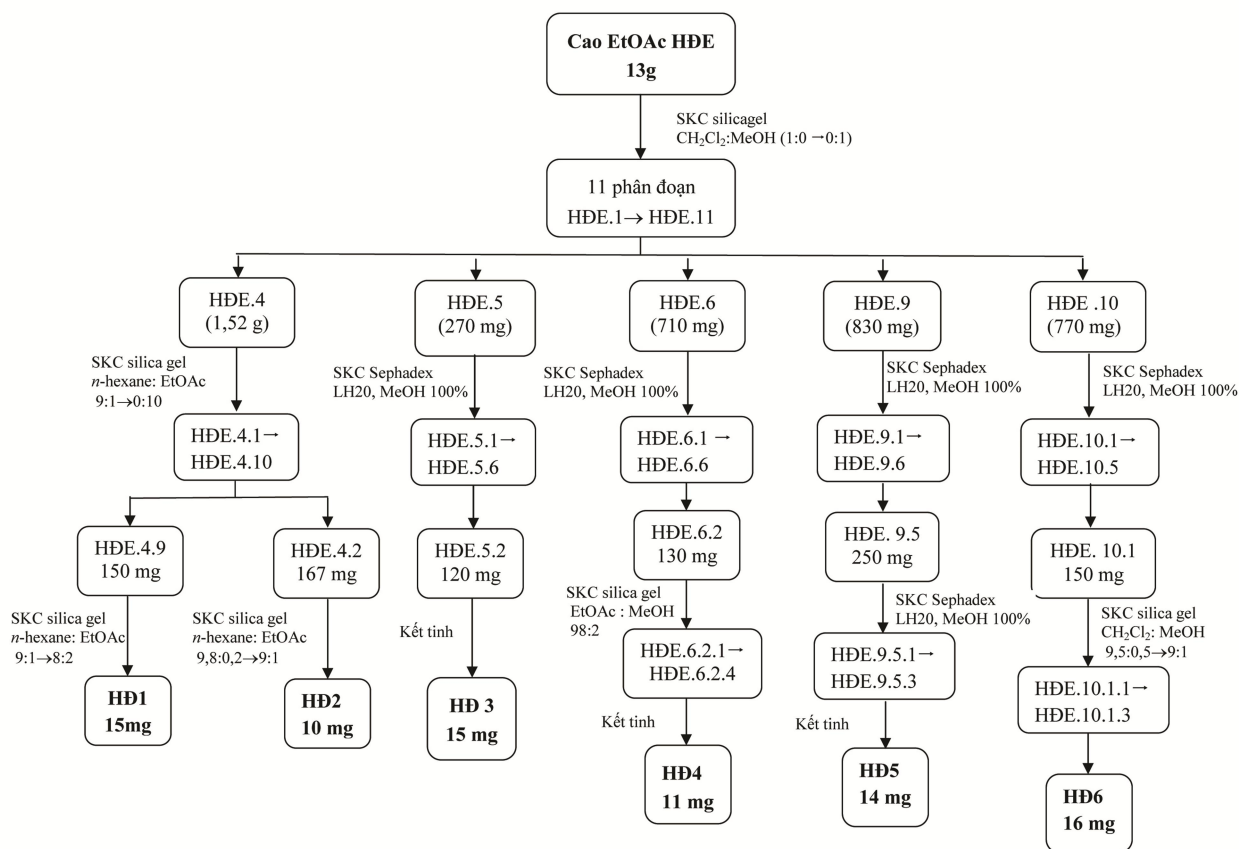


Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các chất từ vỏ Đinh tùng

2.3.2.2. Hoàng đàn giả (*D. elatum*)

13 gam cao chiết EtOAc (HĐE) được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột silica gel nhiều lần với các hệ dung môi thích hợp thu được 6 chất sạch kí

hiệu **HĐ1** (15 mg), **HĐ2** (10 mg), **HĐ3**(15 mg), **HĐ4** (11 mg), **HĐ5** (16 mg), **HĐ6** (14 mg).



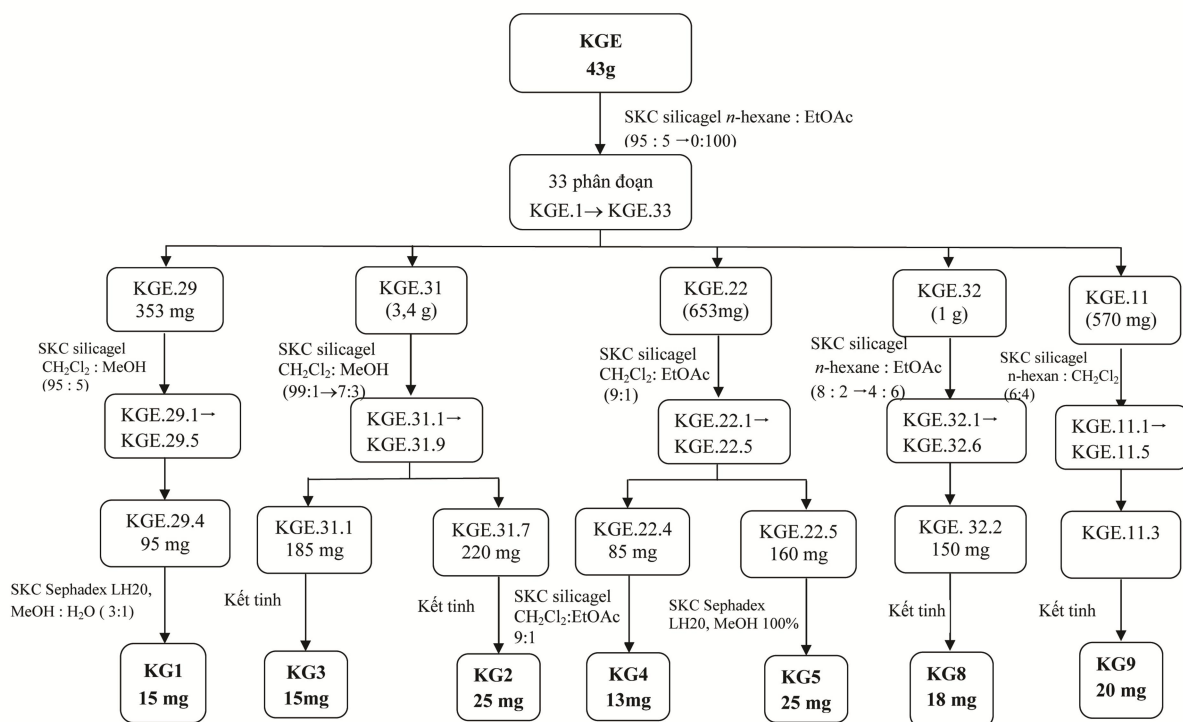
Hình 2.5. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch chiết EtOAc mẫu thân và cành Hoàng đàn giả

2.3.2.3. Kim giao núi đất (*N. wallichiana*)

Từ cao chiết *n*-hexane (8,0 g) sắc ký cột trên silica gel (*n*-hexane : CH₂Cl₂) nhiều lần các phân đoạn đã phân lập được 2 hợp chất sạch kí hiệu là **KG6** (15 mg) và **KG7** (11mg).

Từ cao chiết methanol (20 g) sắc ký cột trên silica gel và sephadex nhiều lần thu được 1 chất sạch kí hiệu **KG10** (12 mg).

Tiến hành sắc ký cột silica gel cao chiết dịch ethyl acetate (43 g) hệ dung môi (*n*-hexane : EtOAc ; 95 : 5 → 0:100) thu được 33 phân đoạn kí hiệu từ KGE.1 đến KGE.33. Chọn chạy sắc ký cột silica gel các phân đoạn KGE.11 (570 mg); KGE.22 (653 mg); KGE.29 (353 mg); KGE.31 (3,4 g) và KGE.32 (1g) với các hệ dung môi rửa giải có độ phân cực khác nhau thu được 7 chất sạch là **KG1**, **KG2**, **KG3**, **KG4**, **KG5**, **KG8**, **KG9**.



Hình 2.9. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch chiết EtOAc lá và cành Kim giao núi đất

❖ Số liệu phổ các hợp chất phân lập được từ 3 loài lá kim nghiên cứu.

• Hợp chất DT1: Cephalotaxine

(+) ESI-MS: m/z 316 $[M + H]^+$, CTPT là $C_{18}H_{21}NO_4$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 4,92 (*s*, H-1), 4,75 (*d*, $J = 9,0$, H-3), 3,67 (*d*, $J = 9,0$, H-4), 2,00 (*m*, H-6a), 1,86 (*m*, H-6b), 1,75 (*m*, H-7), 3,06 (*m*, H-8), 2,92 (*td*, $J = 11,0$; 7,0, H-10), 2,35 (*dd*, $J = 14,5$; 6,5, H-11a), 3,35 (*m*, H-11b), 6,64 (*s*, H-14), 6,67 (*s*, H-17), 5,90 (*s*, H-18), 3,72 (*s*, H-19). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm): 97,6 (C-1), 160,5 (C-2), 73,3 (C-3), 57,2 (C-4), 70,6 (C-5), 43,5 (C-6), 20,3 (C-7), 53,8 (C-8), 48,5 (C-10), 31,6 (C-11), 134,2 (C-12), 128,0 (C-13), 112,6 (C-14), 146,9 (C-15), 146,1 (C-16), 110,3 (C-17), 110,9 (C-18), 57,2 (C-19).

• Hợp chất DT2: Cephalotaxine- β -N-oxide

(+) HR-ESI-MS: m/z 354,1303 $[M + Na]^+$ và $[M + H]^+$. CTPT là $C_{18}H_{21}NO_5$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 4,79 (*s*, H-1), 4,15 (*d*, $J = 4,3$, H-3), 3,40 (*d*, $J = 4,3$, H-4), 2,01 (*m*, H-6a), 2,01 (*m*, H-6b), 2,18 (*m*, H-7a), 2,30 (*m*, H-7b), 3,35 (*m*, H-8a), 3,40 (*m*, H-8b), 3,42 (*m*, H-10a), 3,51 (*m*, H-10b), 2,26 (*m*, H-11a), 3,84 (*m*, H-11b), 6,58 (*s*, H-14), 6,58 (*s*, H-17), 5,90 (*s*, H-18a), 5,94 (*s*, H-18b), 3,76 (*s*, H-19). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm):

97,94 (C-1), 169,83 (C-2), 77,63 (C-3), 58,30 (C-4), 89,39 (C-5), 30,05 (C-6), 17,52 (C-7), 69,05 (C-8), 63,20 (C-10), 29,85 (C-11), 134,07 (C-12), 126,99 (C-13), 112,88 (C-14), 146,43 (C-15), 146,99 (C-16), 110,18 (C-17), 101,16 (C-18), 57,14 (C-19).

• **Hợp chất DT3:** Deoxyharringtonine

(+) ESI-MS: m/z 516 $[M + H]^+$ và 298 $[100, M - C_{10}H_{17}O_5]^+$, CTPT $C_{28}H_{37}NO_8$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 5,04 (*d*, $J = 0,5$, H-1), 6,00 (*dd*, $J = 0,5, 10$, H-2), 3,77 (*d*, $J = 10$, H-4), 6,53 (*s*, H-14), 6,62 (*s*, H-17), 5,85 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-18a), 5,87 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-18b), 3,68 (*s*, H-19), 3,57 (*s*, H-5'), 0,97 (*m*, H-2'' α), 1,28 (*m*, H-2'' β), 1,41 (*m*, H-3''), 0,83 (3H, *d*, $J = 6,7$; H-4''a), 0,84 (3H, *d*, $J = 6,7$, H-5''a). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm): 100,08 (C-1), 157,83 (C-2), 74,61 (C-3), 55,91 (C-4), 70,63 (C-5), 43,40 (C-6), 20,32 (C-7), 53,94 (C-8), 48,63 (C-10), 31,37 (C-11), 133,33 (C-12), 128,48 (C-13), 112,67 (C-14), 146,67 (C-15), 145,83 (C-16), 109,71 (C-17), 100,80 (C-18), 57,12 (C-19), 174,07 (C-1'), 74,74 (C-2'), 42,77 (C-3'), 170,47 (C-4'), 51,49 (C-5'), 36,74 (C-1''), 31,60 (C-2''), 28,01 (C-3''), 22,26 (C-4''), 22,68 (C-5'').

• **Hợp chất DT4:** Nordeoxyharringtonine

(+) HR-ESI-MS: m/z 502,24405 $[M + H]^+$, CTPT $C_{27}H_{35}NO_8$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 5,03 (*s*, H-1), 5,95 (*d*, $J = 10$, H-3), 3,76 (*d*, $J = 10$, H-4), 6,52 (*s*, H-14), 6,61 (*s*, H-17), 5,86 (*d*, $J = 1,5$, H-18a), 5,83 (*d*, $J = 1,5$, H-18b), 3,65 (*s*, H-19), 3,55 (*s*, H-5'), 0,83 (*d*, $J = 6,5$, H-3''a), 0,89 (*d*, $J = 6,5$, H-4''a). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm): 100,0 (C-1), 157,7 (C-2), 75,1 (C-3), 55,8 (C-4), 70,5 (C-5), 43,3 (C-6), 20,2 (C-7), 53,8 (C-8), 48,5 (C-10), 31,2 (C-11), 133,2 (C-12), 128,3 (C-13), 112,6 (C-14), 146,6 (C-15), 145,7 (C-16), 109,6 (C-17), 100,7 (C-18), 57,0 (C-19), 174,3 (C-1'), 74,7 (C-2'), 43,3 (C-3'), 170,4 (C-4'), 51,3 (C-5'), 46,6 (C-1''), 24,0 (C-2''), 23,8 (C-3''), 23,9 (C-4'').

• **Hợp chất DT5.1:** Isoharringtonine

(+) HR-ESI-MS: m/z 532,25485 $[M + H]^+$, CTPT là $C_{28}H_{37}NO_9$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 5,08 (*s*, H-1), 6,03 (*d*, $J = 9,8$, H-3), 3,79 (*d*, $J = 9,8$, H-4), 6,54 (*s*, H-14), 6,65 (*s*, H-17), 5,80 *s*; 5,86 *brs* (H-18), 3,69 (*s*, H-19), 3,35 (*s*, H-3'), 3,61 (*s*, H-5'), 0,85 (*d*, $J = 6,7$, H-4''), 0,87 (*d*, $J = 6,7$, H-5'').

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 100,44 (C-1), 157,52 (C-2), 74,67 (C-3), 55,81 (C-4), 70,66 (C-5), 43,34 (C-6), 20,25 (C-7), 53,84 (C-8), 48,44 (C-10), 31,37 (C-11), 128,28 (C-12), 133,35 (C-13), 112,61 (C-14), 146,69 (C-15), 145,65 (C-16), 109,88 (C-17), 100,81 (C-18), 57,10 (C-19), 173,00 (C-1'), 79,13 (C-2'), 75,43 (C-3'), 171,65 (C-4'), 52,28 (C-5'), 32,99 (C-1''), 31,72 (C-2''), 28,06 (C-3''), 22,71 (C-4''), 22,22 (C-5'').

• **Hợp chất DT5.2:** Norisoharringtonine

(+) HR-ESI-MS: 518,23903 $[\text{M} + \text{H}]^+$, CTPT là $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_9$. ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 5,08 (s, H-1), 6,00 (*d*, $J = 9,8$, H-3), 3,79 (*d*, $J = 9,8$, H-4), 6,54 (*s*, H-14), 6,65 (*s*, H-17), 5,80 *s*; 5,86 *br s* (H-18), 3,68 (*s*, H-19), 3,28 (*s*, H-3'), 3,63 (*s*, H-5'), 0,96 (*d*, $J = 6,7$, H-3''), 0,97 (*d*, $J = 6,7$, H-4''), 5,08 (*s*, H-5''). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 100,44 (C-1), 157,52 (C-2), 75,03 (C-3), 55,81 (C-4), 70,66 (C-5), 43,34 (C-6), 20,25 (C-7), 53,84 (C-8), 48,44 (C-10), 31,37 (C-11), 128,28 (C-12), 133,35 (C-13), 112,65 (C-14), 146,65 (C-15), 145,65 (C-16), 109,88 (C-17), 100,81 (C-18), 57,10 (C-19), 173,20 (C-1'), 79,79 (C-2'), 75,34 (C-3'), 171,55 (C-4'), 52,33 (C-5'), 32,14 (C-1''), 24,27 (C-2''), 24,29 (C-3''), 23,71 (C-4'').

• **Hợp chất DT6:** 3-epischellhammericine

(+) ESI-MS: 314 $[\text{M} + \text{H}]^+$ và 282 $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$, CTPT $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$. ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 5,54 (*br s*, H-1), 3,23 (*m*), 1,56 (*t*, $J = 11,0$; H-4ax), 6,72 (*s*, H-15), 6,60 (*s*, H-18), 5,90 (*d*, $J = 1,0$, H-19a), 5,88 (*d*, $J = 1,0$, H-19b), 3,29 (*s*, H-20). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 127,92 (C-1), 46,34 (C-2), 76,00 (C-3), 36,03 (C-4), 68,84 (C-5), 131,61 (C-6), 28,79 (C-7), 51,14 (C-8), 54,60 (C-10), 28,65 (C-11), 37,36 (C-12), 134,59 (C-13), 136,40 (C-14), 108,79 (C-15), 145,65 (C-16), 145,37 (C-17), 111,34 (C-18), 100,83 (C-19), 55,83 (C-20).

• **Hợp chất DT7:** Manniicine

(+) ESI-MS: m/z 314,1745 $[\text{M} + \text{H}]^+$, CTPT là $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$. ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ_{H} (ppm): 6,02 (*ddd*, $J = 1,9; 4,5; 10,2$ Hz, H-1), 5,08 (*br d*, $J = 10,2$ Hz, H-2); 1,85 (1H, *t*, $J = 13,0$ Hz, H-4ax); 3,24 (3H, *s*, H-20); 5,92 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-19a), 5,91 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-19b). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz), δ_{C} (ppm): 116,18 (C-1), 130,87 (C-2), 74,29 (C-3), 32,07 (C-4), 68,18 (C-5), 38,56 (C-6), 27,56