

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI RÊU TẢN *PORELLA OBTUSATA* THU HÁI TẠI SA PA, VIỆT NAM

PHYTOCHEMICALS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE LIVERWORT *PORELLA OBTUSATA*
COLLECTED IN SA PA, VIET NAM

Phạm Thị Ninh¹, Nguyễn Minh Thu¹, Mai Văn Vinh²,
Trần Văn Chiến¹, Nguyễn Thị Dung¹, Lê Thị Hồng Nhung²,
Nguyễn Văn Sinh³, Trần Thị Phương Thảo^{1,4,*}

DOI: <https://doi.org/10.57001/huih5804.2023.265>

TÓM TẮT

Dịch chiết ethanol của loài rêu tản *Porella obtusata* thu hái tại Sa Pa, Việt Nam thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư gồm ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (A549) và ung thư vú (MCF7) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 14,04 ± 1,04; 3,51 ± 0,21; 8,85 ± 0,02; 13,30 ± 0,61 μg/ml. Năm hợp chất là pinguisol (1), ent-11β-hydroxykauren-15-one (2), ent-11β-hydroxy-16R-kauran-15-one (3), kauren-18-oic acid (4) và β-sitosterol (5) đã được phân lập từ dịch chiết này. Cấu trúc của các chất được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như MS và NMR (1D và 2D) và so sánh với các tài liệu đã công bố. Đây là lần đầu tiên thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài rêu tản *Porella obtusata* được nghiên cứu ở Việt Nam.

Từ khóa: *Porella obtusata*, rêu tản, pinguisol, ent-11β-hydroxykauren-15-one, ent-11β-hydroxy-16R-kauran-15-one, kauren-18-oic acid, gây độc tế bào.

ABSTRACT

The ethanol extract of *Porella obtusata* collected in Sa Pa, Vietnam exhibited cytotoxicity against four cancer cell lines KB (epidermoid carcinoma cell lines), Hep-G2 (liver cancer cell lines), A549 (lung cancer cell lines) and MCF7 (breast cancer cell lines) with the IC₅₀ values of 14.04 ± 1.04, 3.51 ± 0.21, 8.85 ± 0.02, 13.30 ± 0.61 μg/ml, respectively. Five compounds including pinguisol (1), ent-11β-hydroxykauren-15-one (2), ent-11β-hydroxy-16R-kauran-15-one (3), kauren-18-oic acid (4) and β-sitosterol (5) were isolated from this extract. Their structures were determined by modern spectroscopy methods such as MS and NMR (1D and 2D) as well as by comparison with the published data. This is the first time the chemical constituents and biological activity of *Porella obtusata* have been studied in Vietnam.

Keywords: *Porella obtusata*, liverwort, pinguisol, ent-11β-hydroxykauren-15-one, ent-11β-hydroxy-16R-kauran-15-one, kauren-18-oic acid, cytotoxicity.

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: ntuelam2010@gmail.com

Ngày nhận bài: 24/10/2023

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 23/11/2023

Ngày chấp nhận đăng: 25/12/2023

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành rêu tản, hay còn gọi là ngành địa tiền (danh pháp khoa học *Marchantiophyta*) là một đơn vị phân loại thực vật trên cạn thuộc nhóm rêu không mạch. Giống như các nhóm rêu khác, chúng có vòng đời chủ yếu là thể giao tử, trong đó các tế bào của chúng chỉ mang một bộ thông tin di truyền. Ước tính có khoảng 8.000 loài rêu tản, trong đó ít nhất 85% các loài thuộc nhóm rêu tản lá [1]. Chúng phân bố toàn cầu trong gần như mọi môi trường sống, nhưng phần lớn thường là những nơi ẩm ướt, mặc dù có những loài sinh sống ở hoang mạc và ven Bắc cực. Các nghiên cứu đã cho thấy thành phần hóa học của các loài rêu tản có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như các mono-, sesqui- và diterpenoid, triterpenoid, phenol và các hợp chất chứa nitơ có cấu trúc thú vị và hiếm gặp [2,3]. Một số tài liệu đã công bố cho thấy nhiều loài rêu tản thuộc chi *Porella* đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng nấm và chống oxi hóa tiềm năng [4,5]. Cho đến nay, ở Việt Nam có rất ít công trình công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài rêu tản. Tác giả Đặng Ngọc Quang và cộng sự đã nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất terpenoid phân lập từ loài rêu tản *Porella densifolia* thu hái tại Sapa Việt Nam [6].

Loài rêu tản *Porella obtusata* thường phân bố ở vùng núi cao nơi có khí hậu lạnh và độ ẩm cao. Ở Việt Nam, rêu tản *P. obtusata* được tìm thấy ở các khu vực miền núi phía Bắc và thường mọc ở độ cao trên 2000 mét so với mực nước biển [7]. Rêu *Porella obtusata* có xu hướng phát triển

thành những thảm khá dày. Cây dài 2 - 5cm, màu xanh ô liu đến nâu vàng. Chồi rộng 2 - 4mm, lá dài và rộng 2mm. Lá mọc dày đặc, hình trứng thuôn dài đến elip. Lá thường cuộn lại hướng lên ở mép trước. Lá có hai thùy, thùy lớn (lưng) có răng hoặc hoàn toàn có viền. Thùy nhỏ (ở bụng) hoàn toàn có viền hoặc có răng không đều, các lá ở bụng chạy dọc thân rõ ràng. Lá, thùy và các lá dưới đều rộng hơn so với các loài *Porella* khác [8].

Cho đến nay, trên thế giới có rất ít công trình công bố về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của loài rêu tản *P. obtusata*. Asakawa Y và cộng sự đã tiến hành khảo sát định tính thành phần hóa học của loài rêu *P. obtusata* thu hái tại Nhật Bản. Kết quả cho thấy loài này có chứa các hợp chất monoterpene và sesquiterpene [9,10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết EtOH của loài rêu tản *Porella obtusata* thu hái tại Sapa, Việt Nam. Kết quả cho thấy dịch chiết này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt trên bốn dòng tế bào ung thư gồm ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (A549) và ung thư vú (MCF7) với các giá trị IC_{50} lần lượt là $14,04 \pm 1,04$; $3,51 \pm 0,21$; $8,85 \pm 0,02$; $13,30 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$. Từ dịch chiết EtOH của loài này, một hợp chất sesquiterpen (pinguisenol, chất **1**), ba hợp chất diterpene [chất **2** (*ent*-11 β -hydroxykauren-15-one), chất **3** (*ent*-11 β -hydroxy-16*R*-kauran-15-one), chất **4** (kauren-18-oic acid)] và một sitosterol (β -sitosterol, chất **5**) đã được phân lập. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài rêu tản *Porella obtusata*.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng

Mẫu rêu tản được thu hái tại thị xã Sa Pa, tỉnh Lào Cai, Việt Nam vào tháng 4 năm 2022. Tên khoa học (*Porella obtusata* f. *Macrolob*) do tiến sĩ Vadim Bakalin - Viện Nghiên cứu vườn thực vật, thành phố Vladivostok, chi nhánh Viễn Đông, Viện Hàn lâm Khoa học Nga xác định. Tiêu bản số RSP1 được thu giữ tại Viện Sinh Thái và Tài nguyên Sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập, tinh chế các hợp chất

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi bằng máy Bruker Avance 600 và 500MHz. Phổ khối ESI-MS được đo trên máy Agilent LC-MSD-Trap SL tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Silica gel (40 - 63 μm , Merck) và Dianion HP20 được sử dụng trong sắc ký cột (CC). Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F_{254} (0,25mm, Merck). Hiện hình các vết chất trên TLC bằng ánh sáng UV ở bước sóng $\lambda = 254\text{nm}$ và thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 .

2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

Phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) được sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết ethanol của loài rêu tản *P. obtusata*. Đây là phương pháp được Viện Ung thư

Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phương pháp tiêu chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng gây độc tế bào ở điều kiện *in vitro* [11].

2.3. Thực nghiệm

Bột mẫu khô của loài rêu tản *Porella obtusata* f. *Macrolob* (480g) được chiết bằng máy siêu âm với dung môi EtOH/ H_2O (95/5) ở nhiệt độ 60°C (3x1,5Lx24h). Dịch chiết ethanol được gộp lại và được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 18,9g cao chiết. Cao chiết EtOH (18,9g) được đưa lên cột trao đổi Dianion HP 20 với hệ dung môi rửa giải $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ tương ứng 100/0; 50/50 và 0/100 thu được 7 phân đoạn (PD1- PD7). Phân lập phân đoạn PD7 (1,6g) bằng sắc ký cột silica gel và rửa giải với hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc (20/1) thu được 5 phân đoạn (PD7.1- PD7.5). Chất **1** được thu ở phân đoạn PD7.2 dưới dạng dầu màu vàng (2,8mg). Phân đoạn PD7.5 (63mg) được tiếp tục chạy sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone (90:10) thu được chất kết tinh hình kim màu trắng (chất **5**, 2,4mg). Phân đoạn PD6 (5,7g) được tinh chế bằng cột silica gel (*n*-hexane/acetone; 90:10) thu được phân đoạn PD6.1 (1,085g) và PD6.2 (438mg). Thực hiện sắc ký cột silica gel phân đoạn PD6.1 (1,085g) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexane/acetone (10/1) thu được chất rắn màu trắng (chất **2**, 2,6mg). Tinh chế phân đoạn PD6.2 (438mg) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc (5/1) thu được chất rắn màu trắng (chất **3**, 4,3mg). Phân đoạn PD2 (400mg) được đưa lên cột sắc ký silica gel (*n*-hexane/EtOAc 5/1) thu được chất rắn màu trắng (chất **4**, 2,8mg).

Pinguisenol (1): Dạng dầu màu vàng; ESI-MS (m/z): 205,0 [$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_{H} 5,79 (1H, dd, $J = 17,4$; 10,8; H-10); 5,16 (1H, dd, $J = 17,4$; 1,2, H-11a); 5,00 (1H, dd, $J = 10,8$; 1,2; H-11b); 2,34 (1H, m, H-1); 1,79 (1H, m, H-2a); 1,72 (1H, dd, $J = 14,4$; 4,2, H-6a); 1,65 (1H, m, H-3a); 1,62 (1H, dd, $J = 13,8$; 4,2, H-7a); 1,54 (1H, q, $J = 7,2$, H-4), 1,29 (1H, m, H-6b); 1,26 (2H, m, H-3b, H-7b), 1,23 (1H, m, H-2b), 0,95 (3H, s, H-14); 0,82 (3H, d, $J = 7,2$, H-13); 0,81 (3H, d, $J = 7,2\text{Hz}$, H-15); 0,68 (3H, s, H-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ_{C} 146,6 (C-10); 109,6 (C-11); 74,6 (C-5); 46,3 (C-9); 44,1 (C-8); 39,3 (C-4); 35,1 (C-3); 33,9 (C-1); 32,8 (C-6); 28,1 (C-2); 24,9 (C-7); 18,1 (C-12); 16,8 (C-14); 13,5 (C-13); 9,0 (C-15).

ent-11 β -hydroxykauren-15-one (2): Chất rắn màu trắng; ESI-MS (m/z): 627,3 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ_{H} 5,86 (1H, s, H-17a); 5,26 (1H, s, H-17b); 4,05 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-11); 3,04 (1H, m, H-13); 2,39 (1H, d, $J = 12,0$, H-14a); 2,13 (1H, m, H-12a); 1,91 (2H, m, H-12b, H-7a); 1,87 (1H, m, H-1a); 1,64 (2H, m, H-2); 1,45 (2H, m, H-6a, H-14b); 1,42 (1H, m, H-3a); 1,34 (2H, m, H-7b, H-9); 1,28 (m, 1H, H-6b); 1,21 (1H, td, $J = 13,8$; 4,2 Hz, H-3b); 1,02 (3H, s, H-20); 1,00 (1H, m, H-1b); 0,99 (1H, m, H-5); 0,89 (3H, s, H-18); 0,82 (3H, s, H-19); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ_{C} 209,9 (C-15); 150,3 (C-16); 112,9 (C-17); 66,0 (C-11); 64,4 (C-9); 55,2 (C-5); 50,6 (C-8); 41,7 (C-3); 41,2 (C-12); 39,4 (C-1); 38,7 (C-10); 36,8 (C-13); 36,6 (C-14); 33,5 (C-7); 33,4 (C-18); 33,2 (C-4); 21,5 (C-19); 18,4 (C-6); 18,3 (C-2); 17,5 (C-20).

ent-11β-hydroxy-16R-kauran-15-one (3): Dạng dầu, không màu; ESI-MS (*m/z*): 327,1 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ_H 3,92 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-11); 2,42 (1H, m, H-13); 2,37 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-14); 2,26 (1H, m, H-16); 1,95 (1H, m, H-7b); 1,86 (2H, m, H-7a, H-12b); 1,64 (2H, m, H-2a, H-6b); 1,45 (1H, m, H-6a); 1,42 (2H, m, H-3a, H-12b); 1,34 (1H, m, H-14b); 1,26 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H-17); 1,24 (1H, m, H-2a); 1,21 (1H, td, *J* = 13,8; 4,2 Hz, H-3b); 1,10 (1H, brs, H-9); 0,98 (3H, s, H-20); 0,96 (1H, m; H-5); 0,88 (3H, s, H-18); 0,81 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ_C 222,9 (C-15); 65,1 (C-11); 64,0 (C-9); 55,3 (C-5); 51,1 (C-8); 49,4 (C-16); 41,7 (C-3); 39,2 (C-1); 38,4 (C-10); 37,3 (C-14); 34,7 (C-13); 34,3 (C-12); 33,3 (C-4); 33,2 (C-7 và C-18); 21,4 (C-19); 18,4 (C-6); 18,2 (C-2); 17,4 (C-20); 11,0 (C-17).

Kauren-18-oic acid (4): Bột vô định hình màu trắng; ESI-MS (*m/z*): 301,2 [M-H]⁻; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ_H 4,79 (1H, s); 4,73 (1H, s); 2,64 (1H, brs); 2,16 (1H, m); 2,02 (1H, m), 1,95 (1H, m); 1,83 (1H, m); 1,75 (1H, m) 1,64 (6H, m); 1,53 (8H, m); 1,17 (3H, s); 1,15 (1H, m); 1,05 (3H, s); 0,87 (1H, m); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ_C 183,7 (C-18); 155,7 (C-16); 103,0 (C-17); 56,0 (C-9); 50,2 (C-5); 49,0 (C-15); 47,5 (C-4); 44,3 (C-8); 43,9 (C-13); 40,6 (C-7); 39,7 (C-1); 39,5 (C-14); 38,6 (C-10); 36,9 (C-3); 33,2 (C-12); 23,2 (C-6); 17,9 (C-2); 17,8 (C-19); 17,7 (C-11); 16,2 (C-20).

β-sitosterol (5): Kết tinh hình kim màu trắng; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 5,38-5,36 (1H, m); 3,56-3,52 (1H, m); 2,33-2,25 (2H, m); 2,05-1,97 (2H, m); 1,89-1,82 (3H, m); 1,70-1,65 (2H, m); 1,54-1,11 (24H, m); 1,07 (3H, s); 1,00 (3H, d, *J* = 6,7 Hz); 0,87 (3H, t, *J* = 7,1 Hz); 0,86 (6H, br s); 0,70 (3H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz), δ (ppm): 140,79; 121,72; 71,82; 56,80; 56,10; 50,17; 45,88; 42,35; 42,33; 39,81; 37,28; 36,53; 36,16; 33,98; 31,93; 31,69; 29,20; 28,26; 26,14; 24,32; 23,10; 21,11; 19,82; 19,41; 19,06; 18,80; 12,00; 11,87.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết ethanol của loài rêu tản *Porella obtusata*

Mẫu dịch chiết EtOH của rêu tản *Porella obtusata* được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư: KB (Ung thư biểu mô), Hep-G2 (Ung thư gan), A549 (Ung thư phổi) và MCF7 (Ung thư vú). Ellipticine được dùng làm chất đối chứng trong phép thử này.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết EtOH của loài rêu tản *P. obtusata*

Tên mẫu	IC ₅₀ (µg/ml)			
	KB	Hep-G2	A549	MCF7
Dịch chiết EtOH	14,04 ± 1,04	3,51 ± 0,21	8,85 ± 0,02	13,30 ± 0,61
Ellipticine	0,29 ± 0,01	0,35 ± 0,05	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,03

Kết quả cho thấy dịch chiết EtOH thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt trên cả bốn dòng tế bào ung thư KB (Ung thư biểu mô), Hep-G2 (Ung thư gan), A549 (Ung thư phổi) và MCF7 (Ung thư vú) với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 14,04 ± 1,04; 3,51 ± 0,21; 8,85 ± 0,02; 13,30 ± 0,61 µg/ml. Đặc biệt, dịch chiết này có hoạt tính tốt trên dòng tế bào ung thư gan Hep-

G2, với giá trị IC₅₀ là 3,51 ± 0,21 µg/ml. Dịch chiết EtOH được tiếp tục nghiên cứu phân lập, chiết tách và xác định cấu trúc các chất sạch.

3.2. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được

Chất **1** được phân lập dưới dạng dầu màu vàng. Phổ ¹³C NMR của hợp chất này xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, trong đó có 2 tín hiệu carbon olefin tại δ_C 109,6 (C-11) và 146,6 (C-10). Phổ ¹³C NMR còn cho thấy sự có mặt của carbon bậc bốn gắn với oxy tại δ_C 74,6 (C-5), 2 carbon methine tại δ_C 39,3 (C-4); 33,9 (C-1), 4 carbon methylene tại δ_C 28,1 (C-2); 35,1 (C-3); 32,8 (C-6); 24,9 (C-7), 4 carbon methyl tại δ_C 9,0 (C-15); 16,8 (C-14); 13,5 (C-13); 18,1 (C-12) và 2 carbon bậc 4 tại δ_C 46,3 (C-9); 44,1 (C-8). Tương ứng với phổ ¹³C NMR, phổ ¹H NMR của chất **1** cho các tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,79 (1H, dd, *J* = 17,4; 10,8; H-10); 5,16 (1H, dd, *J* = 17,4; 1,2; H-11a); 5,00 (1H, dd, *J* = 10,8; 1,2; H-11b). Hai tín hiệu methyl singlet tại δ_H 0,95 (3H, s, H-14) và 0,68 (3H, s, H-12) cùng với hai tín hiệu methyl doublet xuất hiện tại δ_H 0,82 (3H, d, *J* = 7,2; H-13) và 0,81 (d, *J* = 7,2 Hz; 3H, H-15). Các tín hiệu proton methine và methylene khác xuất hiện trong khoảng δ_H 1,79-1,23. Cấu trúc của hợp chất **1** còn được khẳng định rõ hơn bằng phổ 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Phổ COSY chỉ ra tương tác giữa H-10 (δ_H 5,79)/H-11a (δ_H 5,16) và H-11b (δ_H 5,00); H-15 (δ_H 0,81)/H-4 (δ_H 1,54); H-1 (δ_H 2,34)/H-13 (δ_H 0,82); H-2b (δ_H 1,23) và H-2a (δ_H 1,79); H-2a (δ_H 1,79)/H-3a (δ_H 1,65) và H-3b (δ_H 1,26); H-6a (δ_H 1,72)/H-7a (δ_H 1,62) và H-7b (δ_H 1,26) chứng tỏ vị trí của các proton trong và ngoài vòng. Phổ HMBC khẳng định sự gắn kết của mạch vinyl (C-11 và C-10) thông qua tương tác giữa H-6a (δ_H 1,72) và H-4 (δ_H 1,54)/C-10 (δ_C 146,6). Nhóm hydroxyl (-OH) được khẳng định gắn tại vị trí C-5 thông qua tương tác của H-10 (δ_H 5,79); H-7a (δ_H 1,62); H-7b (δ_H 1,26) và H-6a (δ_H 1,72)/C-5 (δ_C 74,6). Vị trí của các nhóm methyl được khẳng định thông qua tương tác của H-14 (δ_H 0,95)/C-9 (δ_C 46,3), C-8 (δ_C 44,1); H-12 (δ_H 0,68)/C-8 (δ_C 44,1) và C-9 (δ_C 46,3); H-13 (δ_H 0,82)/C-1 (δ_C 33,9), C-8 (δ_C 44,1); H-15 (δ_H 0,81)/C-4 (δ_C 39,3) và C-9 (δ_C 46,3). Phổ NOESY cho thấy tương tác giữa H-12 (δ_H 0,68)/H-13 (δ_H 0,82); H-14 (δ_H 0,95)/H-15 (δ_H 0,81); H-13 (δ_H 0,82)/H-15 (δ_H 0,81) chứng tỏ chúng định hướng cùng phía so với mặt phẳng phân tử. Ngược lại, tương tác giữa H-1 (δ_H 2,34) và H-4 (δ_H 1,54) cũng được quan sát thấy trên phổ NOESY. Phổ khối (+)-ESI-MS cho tín hiệu tại *m/z* 205,0 [M+H₂O]⁺. Kết hợp các dữ liệu phổ trên đã khẳng định công thức phân tử của chất **1** là C₁₅H₂₆O. Đối chiếu với các tài liệu đã công bố [12, 13] cho thấy số liệu phổ của chất này hoàn toàn trùng khớp với pinguisol [12, 13]. Do đó, hợp chất **1** được xác định là pinguisol, một sesquiterpene khung pinguisane lần đầu tiên được phân lập từ loài rêu tản *Porella vernicosa* [13]. Sesquiterpene khung pinguisane có thể được coi là lớp chất đánh dấu đặc trưng cho các loài rêu tản thuộc chi *Porella* [14].

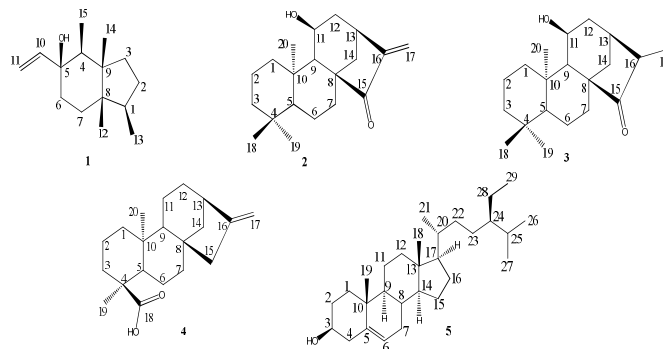
Chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Phổ khối phun mù điện tử (+)-ESI-MS cho tín hiệu pic ion giả phân tử tại *m/z* 627,3 [2M+Na]⁺. Dữ liệu phổ NMR cho thấy đây là một hợp chất diterpenoid. Phổ ¹³C NMR của hợp chất

này xuất hiện tín hiệu của 20 nguyên tử carbon, trong đó có 2 tín hiệu carbon olefin tương ứng ở δ_c 112,9 (C-17) và 150,3 (C-16). Phổ ^{13}C NMR cũng khẳng định sự có mặt của nhóm carbonyl ketone tại δ_c 209,9 (C-15). Ngoài ra, trên phổ ^{13}C NMR còn quan sát thấy sự có mặt của 7 carbon methylene tại δ_c 39,4 (C-1); 18,3 (C-2); 41,7 (C-3); 18,4 (C-6); 33,5 (C-7); 41,2 (C-12); 36,6 (C-14), 3 carbon methyl tại δ_c 33,4 (C-18); 21,5 (C-19); 17,5 (C-20); 3 carbon bậc bốn tại δ_c 33,2 (C-4); 50,6 (C-8); 38,7 (C-10) và 4 carbon methine tại δ_c 55,2 (C-5); 64,4 (C-9); 66,0 (C-11); 36,8 (C-13); trong đó có 1 carbon methine mang oxi tại δ_c 66,0 (C-11). Tương ứng với phổ ^{13}C NMR, trên phổ ^1H NMR xuất hiện các tín hiệu của proton methylene olefin tại δ_H 5,86 (1H, s, H-17a); 5,26 (1H, s, H-17b), tín hiệu của ba nhóm methyl singlet tại δ_H 1,02 (3H, s, H-20); 0,89 (3H, s, H-18); 0,82 (3H, s, H-19). Bên cạnh đó còn có tín hiệu của một proton gắn với carbon methine mang oxi tại δ_H 4,05 (1H, d, $J = 4,8\text{Hz}$, H-11). Từ các dữ liệu phân tích trên, hợp chất **2** được xác định là một diterpenoid có công thức phân tử là $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$. Cấu trúc của hợp chất này được khẳng định rõ hơn bằng phân tích dữ liệu phổ 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Phổ COSY cho thấy tín hiệu của H-12 (δ_H 2,13) tương tác với H-11 (δ_H 4,05) và H-13 (δ_H 3,04); H-13 (δ_H 3,04) với H-14 (δ_H 2,39). Phổ HMBC cho thấy tín hiệu H-17 (δ_H 5,86; 5,26) tương tác với carbon carbonyl C-15 (δ_c 209,9); C-13 (δ_c 36,8); C-14 (δ_c 36,6) và C-12 (δ_c 41,2). Tín hiệu proton H-11 (δ_H 4,05) có tương tác với C-9 (δ_c 64,4); C-10 (δ_c 38,7) và C-8 (δ_c 50,6). Cũng trên phổ HMBC cho thấy tương tác của H-5 (δ_H 0,99) với C-18 (δ_c 33,4); C-19 (δ_c 21,5); C-4 (δ_c 33,2); C-10 (δ_c 38,7); C-20 (δ_c 17,5); C-9 (δ_c 64,4) và C-8 (δ_c 50,6). Phổ NOESY cho thấy tương tác của proton H-11 (δ_H 4,05) với nhóm methyl C-20 (δ_c 17,5), chứng tỏ chúng cùng phía với nhau trong mặt phẳng phân tử. Do đó, nhóm hydroxyl gắn tại vị trí C-11 được xác định là có định hướng β . Khi so sánh dữ liệu phân tích của chất **2** với các tài liệu đã được công bố, hợp chất **2** được xác định là *ent*-11 β -hydroxykauren-15-one [15, 16]. Hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài rêu tản thu hái ở Nhật Bản *Jamesoniella autumnalis* [15].

Chất **3** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối (+)-ESI-MS của hợp chất này cho tín hiệu ion giả phân tử tại m/z 327.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ ^1H và ^{13}C NMR của **3** cho thấy các tín hiệu tương tự chất **2**. Tuy nhiên, trên phổ ^1H và ^{13}C NMR của **3** không còn tín hiệu của nối đôi olefin mà thay vào đó là sự xuất hiện của tín hiệu carbon methine tại δ_c 49,5 (C-16)/ δ_H 2,26 (1H, q, $J = 6,6\text{Hz}$, H-16) và tín hiệu của một nhóm methyl tại δ_c 11,0 (C-17)/ δ_H 1,26 (3H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-17). Tín hiệu của carbon carbonyl ketone (C-15) dịch chuyển về trường thấp hơn (δ_c 222,9) so với chất **2**. Cấu trúc của hợp chất **3** được khẳng định rõ hơn bằng phân tích phổ 2 chiều 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Qua đó, các proton và carbon tại các vị trí trong cấu trúc của hợp chất này đã được gán phổ. Phổ COSY xuất hiện các tương tác của H-16 (δ_H 2,26)/H-13 (δ_H 2,42) và H-17 (δ_H 1,26). Đồng thời, trên phổ HMBC cũng cho thấy các tương tác dị hạt nhân giữa H-16 (δ_H 2,26)/C-17 (δ_c 11,0), C-13 (δ_c 34,7) và C-15 (δ_c 222,9). Kết hợp các dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã cho

phép xác định chất **3** có công thức phân tử $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ và được khẳng định là *ent*-11 β -hydroxy-16R-kauren-15-one [15]. Hợp chất này trước đó cũng được phân lập từ loài rêu tản *Jamesoniella autumnalis* [15].

Chất **4** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion phân tử tại m/z 301,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất này gợi ý sự có mặt của khung krauen diterpenoid tương tự hợp chất **2** và **3**. Tuy nhiên, trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất **4** không thấy có mặt một nhóm carbonyl ketone như hợp chất **2** và **3**, thay vào đó là sự xuất hiện của một nhóm carboxylic acid tại δ_c 183,7. Ngoài ra, trên phổ ^{13}C NMR còn xuất hiện một nối đôi olefin tương tự hợp chất **2** tại δ_c 155,7 (C-16) và 103,0 (C-17) cùng với 9 tín hiệu của carbon methylene tại δ_c 39,7 (C-1); 17,9 (C-2); 36,9 (C-3); 23,2 (C-6); 36,9 (C-7); 17,7 (C-11); 33,2 (C-12); 39,5 (C-14); 49,0 (C-15), 2 carbon methyl tại δ_c 17,9 (C-19); 16,2 (C-20), 3 nhóm methine tại δ_c 56,0 (C-9); 50,2 (C-5); 43,9 (C-13) và 3 carbon bậc 4 tại δ_c 44,3 (C-8); 47,5 (C-4); 38,6 (C-10). Tương ứng với phổ ^{13}C NMR, phổ ^1H NMR của hợp chất này xuất hiện tín hiệu của proton olefin tại δ_H 4,79 (1H, s); 4,73 (1H, s), tín hiệu của hai methyl singlet tại 1,17 (3H, s) và 1,05 (3H, s) cùng với các tín hiệu của các nhóm methylene và methine trong khoảng δ_H từ 2,64 - 0,87. Kết hợp các dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo [17] đã khẳng định chất **4** có công thức phân tử là $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ và được xác định là kauren-18-oic acid. Đây là một hợp chất diterpenoid có nhiều hoạt tính sinh học thú vị như hoạt tính hạ đường huyết, hoạt tính chống dị ứng và hoạt tính gây độc tế bào [18].



Hình 1. Cấu trúc của các hợp chất **1** - **5** phân lập từ loài rêu tản (*Porella obtusata* f. *Macrolob*)

Cấu trúc của **5** được xác định bằng các dữ liệu phổ NMR. Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methyl singlet tại δ_H 1,07 (3H, s) và 0,70 (3H, s), một nhóm methyl triplet tại δ_H 0,87 (3H, t, $J = 7,1\text{Hz}$) cùng với ba nhóm methyl khác tại δ_H 1,00 (3H, d, $J = 6,7\text{Hz}$) và 0,86 (6H, br s). Ngoài ra, trên phổ ^1H -NMR còn cho thấy các tín hiệu của một proton olefin tại δ_H 5,38 - 5,36 (1H, m) và tín hiệu một methine mang oxi tại δ_H 3,56 - 3,52 (1H, m). Các tín hiệu của các proton còn lại bị trùng lấp lên nhau trong khoảng δ_H 2,33-1,11. Phổ ^{13}C -NMR chỉ ra tín hiệu của hai carbon olefin (δ_c 140,79; 121,72) và một nhóm oxymethine tại δ_c 71,82. Tín hiệu của sáu nhóm methyl xuất hiện tại δ_c 19,82; 19,41; 19,06; 18,80; 12,00; 11,87. Tín hiệu còn lại của sáu nhóm methine và chín nhóm

methylene nằm trong khoảng δ_c 56,80-21,11. So sánh số liệu phổ NMR với tài liệu tham khảo [19] và đối chiếu với chất chuẩn có sẵn trong phòng thí nghiệm đã xác định chất **5** là β -sitosterol. Đây là một sterol tồn tại khá phổ biến trong các loài thực vật. Hợp chất này có thể hiện các hoạt tính như kháng viêm, bảo vệ tim, chống viêm khớp [20].

4. KẾT LUẬN

Đây là lần đầu tiên thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài rêu tản *P. obtusata* ở Việt Nam được công bố. Cấu trúc của các hợp chất phân lập đã được xác định là pinguisenol (**1**), *ent*-11 β -hydroxykauren-15-one (**2**), *ent*-11 β -hydroxy-16 R -kauran-15-one (**3**), kauren-18-oic acid (**4**) và β -sitosterol (**5**). Nghiên cứu của chúng tôi góp phần đóng góp vào kho tàng các hợp chất thiên nhiên từ loài rêu tản *P. obtusata* nói riêng và ngành rêu tản nói chung, một trong những ngành thực vật hiện còn ít được nghiên cứu ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hóa học (đề tài mã số VHH.2023.08) và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (đề tài mã số KHCBD.02/21-23) đã tài trợ kinh phí cho công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Schofield WB, 1985. *Introduction of Bryology*. New York: Macmillan Publishing Company.
- [2]. Celik G, Sahin H, Baltas N, Karaoglu S.A., Yayli N, 2023. *Chemical analysis and biological activity of the essential oils and extracts of two liverwort species growing in Turkey*. *Botanica Serbica*, 47 (1), 31-40.
- [3]. Nagashima F, Ohi Y, Nagai T, Tori M, Asakawa Y, Huneck S, 1993. *Terpenoids from some German and Russian liverworts*. *Phytochemistry*, 33, 1445-8.
- [4]. Métoyer B, Lebouvier N, Hnawia E, Thouvenot L, Wang F, Rakotondraibe L. H, Raharivelomanana P, Asakawa Y, Nour M, 2021. *Chemotaxonomy and cytotoxicity of the liverwort Porella Viridissima*. *Natural Product Research*, 35(12), 2099-2102.
- [5]. Danka Bukvicki, Davide Gottardi, Milan Veljic, Petar D. Marin, Lucia Vannini, Maria Elisabetta Guerzoni, 2012. *Identification of volatile components of liverwort (Porella cordaana) extracts using GC/MS-SPME and their antimicrobial activity*. *Molecules*, 17, 6982-6995.
- [6]. Dang Ngọc Q, Asakawa Y, 2010. *Chemical constituents of the Vietnamese liverwort Porella densifolia*. *Fitoterapia*, 81, 659-661.
- [7]. Vadim A. B, Klimova G.K, Nguyen Van S, Nguyen Manh H, Bakalin D.A, Choi S. S, 2023. *Liverwort and Hornwort Flora of Hoang Lien National Park and the Adjacent Areas (North Vietnam, Indochina)*. 2023. *Plants*, 12, 1841.
- [8]. Hassel, Kristian, Johnsen, John Inge, Jordal, John Bjarne, Knutsen, Asbjørn, 2015. *Dutch Bryological and Lichenological Society and Nordic Bryological Society*. *Lindbergia*, 38(1), 30-38.
- [9]. Asakawa Y, Tokunaga N, Toyota M, Takemoto T, Suire S, 1979. *Chemosystematics of Bryophytes I. The distribution of terpenoids of Bryophytes*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 45, 395-407.

[10]. Asakawa Y, Toyota M, Takemoto T, 1978. *Sesquiterpenes of Porella species*. *Phytochemistry*, 17, 457-460.

[11]. Mosmann T, 1983. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.

[12]. S. S. a. S. D. Jhillu Singh Yadav, 2018. *Stereoselective Total Syntheses of Acutifolone A, Bisacutifolone A and B, Pinguisenol, and Isonaviculol*. *ACS Omega*, 3, 636-647.

[13]. Asakawa Y, Toyota M, Aratani T, 1976. *A new sesquiterpene alcohol from Porella vernicosa and P. densifolia (Hepaticae)*. *Tetrahedron Letters*, 40, 3619-3622.

[14]. Sonja I. F, Ana B.B, Andrija I. B, Niko S. R, 2022. *Pinguisane-type sesquiterpenoids, unique secondary metabolites of liverworts: A review*. *Facta Universitatis*, 20, 1-40.

[15]. M. T. a. Y. A. Fumihiko Nagashima, 1990. *Terpenoids from some Japanese liverworts*. *Phytochemistry*, 29, 2169-2174.

[16]. Matsuo Akihiko, Uto Seiryu, Nakayama Mitsuru, Hayashi Shuichi, 1977. *Isolation of two new ent-kaurane class diterpenoids from Porella densifolia (Liverwort)*. *Chemistry Letters*, 6 (4), 4, 327-330.

[17]. Francisco J. Q. M, Enda M. G. D, Raimudon B. F, 1988. *New diterpenoids from Croton argyrophyloides*. *Phytochemistry*. 27 (10), 3209-3212.

[18]. Nemesio V. R, Edmundo L. G, Yesenia P. H, 2016. *Kaurenoic Acid: A Diterpene with a Wide Range of Biological Activities*. *International Center for Chemical and Biological Sciences, Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi, Pakistan, Chapter 3, Volume 51, 151-174*.

[19]. V. S. P. Charturvedula, I. Prakash, 2012. *Isolation of stigmaterol and β -sitosterol the dichloromethane extract of Rubus shuavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1 (9), 239-242.

[20]. S. Saiedina, A. Manayi, A. R. Gohari, M. Abdollahi, 2014. *The Story of β -sitosterol-A review*. *European Journal of Medicinal Plants*, 4 (5), 590-609.

AUTHORS INFORMATION

**Pham Thi Ninh¹, Nguyen Minh Thu¹, Mai Van Vinh²,
Tran Van Chien¹, Nguyen Thi Dzung¹, Le Thi Hong Nhung²,
Nguyen Van Sinh³, Tran Thi Phuong Thao^{1,4}**

¹Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

²Hanoi University of Industry, Vietnam

³Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

⁴Graduate University of Sciences and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam