



KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VIRUS VIÊM GAN C CỦA CÁC HỢP CHẤT CÔ LẬP TỪ LOÀI ĐỊA Y *Parmotrema tinctorum* (NYL.) HALE

Nguyễn Thị Thu Trâm^{1*}, Trương Hoài Phong¹, Tống Hồ Đạt¹, Vũ Thị Huyền², Lohézic-Le Dévéhat Françoise³ và Le Seyec Jacques³

¹Khoa Khoa Học Cơ Bản, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ, Việt Nam

²Khoa Môi Trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam

³Khoa Dược, Trường Đại học Rennes 1, Pháp

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thu Trâm (email: ntttram@ctump.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 10/12/2019

Ngày duyệt đăng: 28/02/2020

Title:

Study on anti-hepatitis C virus activity of the isolated compounds from lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale

Từ khóa:

Atranorin, địa y, *Parmotrema tinctorum*, viêm gan C

Keywords:

Atranorin, Hepatitis C, lichen, *Parmotrema tinctorum*

ABSTRACT

Hepatitis C is a major global health burden. This long-term disease often leads to chronicity and potentially to liver failure. There is no anti-HCV vaccine. It has recently been shown that natural compounds may be a source of anti-HCV drugs, but there are a few studies on lichens. In recent study, a phytochemical investigation was conducted on the lichen *Parmotrema tinctorum* collected in Lam Dong province; study on activity against Hepatitis C virus of isolated compounds. Column chromatography, thin layer chromatography and recrystallization were used to isolate compounds. Their structures were elucidated by ESI-HRMS and NMR spectral analysis. The anti-HCV activity of five isolated compounds was evaluated by Renilla Luciferase assay. Five compounds including (1) methyl β -orcinolcarboxylate, (2) orsellinic acid, (3) lecanorol, (4) atranorin and (5) salazinic acid were isolated from such lichen. Compound (4) showed the most effective inhibitor with IC_{50} 22.3 μ M. Our work first demonstrates a new antiviral approach of natural compounds from lichen in Vietnam.

TÓM TẮT

Viêm gan C là mối hiểm họa lớn cho loài người, có thể dẫn đến xơ gan và ung thư gan. Hiện nay, chưa có vắc xin ngừa viêm gan C. Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh các hợp chất cô lập từ cây có khả năng kháng virus viêm gan C (HCV), tuy nhiên có rất ít nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất này từ địa y. Mục tiêu của nghiên cứu này là cô lập và xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết từ địa y *Parmotrema tinctorum* mọc phổ biến ở Lâm Đồng; thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV trên các hợp chất cô lập được. Các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, kết tinh lại được sử dụng để cô lập hợp chất tinh khiết. Cấu trúc các hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ nghiệm như khối phổ độ phân giải cao ESI-HRMS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Hoạt tính ức chế HCV của các hợp chất cô lập được đánh giá bằng thử nghiệm Renilla Luciferase. Kết quả đã cô lập và xác định cấu trúc của 5 hợp chất gồm (1) methyl β -orcinolcarboxylate, (2) orsellinic acid, (3) lecanorol, (4) atranorin và (5) salazinic acid. Hợp chất (4) ức chế mạnh HCV với IC_{50} 22,3 μ M. Nghiên cứu này đánh dấu một phát hiện mới trong tìm kiếm hoạt chất kháng HCV từ địa y mọc tại Việt Nam.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thu Trâm, Trương Hoài Phong, Tống Hồ Đạt, Vũ Thị Huyền, Lohézic-Le Dévéhat Françoise và Le Seyec Jacques, 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): 69-74.

1 GIỚI THIỆU

Viêm gan C là bệnh truyền nhiễm do virus Hepatitis C (HCV) gây nên, đây là một căn bệnh thầm lặng nhưng là mối hiểm họa lớn cho loài người. Hàng năm trên thế giới có khoảng 3% dân số mắc bệnh viêm gan C và có khoảng 170 triệu người lành mang virus viêm gan C (Lavanchy, 2011). Viêm gan C mãn tính có thể dẫn đến biến chứng xơ gan hoặc nguy hiểm hơn là ung thư gan. Hiện nay, chưa có vắc xin ngừa viêm gan C. Phác đồ điều trị chuẩn là phối hợp giữa Pegylated interferon alpha (IFN- α) và Ribavirin (McHutchison *et al.*, 1998). Trong những năm gần đây, với sự phát hiện các thuốc kháng trực tiếp virus DAAs (direct-acting antivirals) kết hợp với phác đồ điều trị chuẩn đã mang lại hiệu quả chữa trị cho hầu hết các trường hợp viêm gan C và hạn chế các tác dụng phụ của IFN (DeLemos *et al.*, 2014). Tuy nhiên, do chi phí điều trị cao nên chỉ những bệnh nhân giàu mới có thể tiếp cận được. Vì thế, việc nghiên cứu các phương pháp thay thế và bổ sung để điều trị cho những bệnh nhân có nguồn thu nhập thấp là cần thiết.

Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh các hợp chất cô lập từ cây có thể kháng virus viêm gan C như silymarin từ *Silybum marianum*, quercetin từ *Embelia ribes*, honokiol từ *Magnolia officinalis*... (Calland *et al.*, 2012; Hattori *et al.*, 2013), tuy nhiên có rất ít nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính này từ địa y. Địa y là dạng cộng sinh giữa nấm và một (hoặc nhiều) sinh vật có khả năng quang hợp như tảo, vi khuẩn lam. Hơn 1035 hợp chất chuyên hóa thứ cấp được công bố trong địa y và còn rất nhiều hợp chất khác vẫn chưa được xác định cấu trúc. Hầu hết các hợp chất cô lập thuộc nhóm phenol đơn vòng thơm, dibenzofuran, depside, depsidone, quinone, và các dẫn xuất pulvinic acid (Boustie and Grube, 2005; Stocker-Wörgötter, 2008). Một trong số chúng đã được chứng minh có những hoạt tính sinh học hấp dẫn như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxi hóa, kháng ung thư... (Boustie and Grube, 2005). Hoạt tính kháng virus cũng được phát hiện với một số ít hợp chất chuyên hóa thứ cấp của địa y như (+)-usnic acid, sekikaic acid và anthraquinon (Zambare and Christopher, 2012; Lai *et al.*, 2013). Từ kết quả nghiên cứu về loài địa y *Stereocaulon evolutum* thu hái tại Pháp cho thấy các hợp chất cô lập được từ loài này có khả năng ức chế HCV với liều IC₅₀ trong khoảng từ 10 đến 70 μ M (Vu *et al.*, 2015). Tại Việt Nam, các nghiên cứu về địa y còn rất hạn chế, địa y thuộc chi *Parmotrema* mọc phổ biến trên các cánh rừng thông thuộc tỉnh Lâm Đồng tuy nhiên từ lâu ít được quan tâm nghiên cứu. Với mong muốn tìm kiếm các hoạt chất ức chế HCV từ địa y Việt Nam,

đề tài “Nghiên cứu khả năng ức chế virus viêm gan C của địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale” được thực hiện với hai mục tiêu. Thứ nhất là cô lập và xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết từ địa y *P. tinctorum*; thứ hai là thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV trên các hợp chất cô lập được.

2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Địa y *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale thu hái tại vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 12 năm 2017, được định danh bởi Gs. Joël Boustie, Đại học Rennes 1, Pháp. Mẫu khô lưu tại Phòng nghiên cứu – Khoa Khoa Học Cơ Bản – Trường Đại Học Y Dược Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Hóa chất, thiết bị

Các dung môi, hóa chất thuộc hãng Sigma, Chemsol độ tinh khiết $\geq 99,0\%$.

Sắc ký lớp mỏng (SKLM) được thực hiện trên bản silica gel trắng sẵn F254 của hãng Merck bề dày 0,25 mm, hiện vết bằng UV và dung dịch vanillin (0,5 g vanillin trong 80 mL sulfuric acid và 20 mL ethanol), hơi nóng. Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 0,040 – 0,063 mm của hãng Merck.

Khối phổ độ phân giải cao ESI-HRMS được đo trên máy khối phổ MICROMASS ZabspecTOF spectrometer. Phổ NMR được đo trên máy Bruker DMX 300 và 500 spectrometer.

2.2.2 Cô lập và xác định cấu trúc các hợp chất tinh khiết

Cô lập các hợp chất tinh khiết

Địa y khô, cắt nhỏ (300 g) được chiết kiệt với acetone bằng hệ thống chiết soxhlet. Sự chiết kiệt được theo dõi bằng SKLM. Dịch chiết được cô quay, cho bay hơi dung môi ở nhiệt độ phòng đến khối lượng không đổi thu được 50 g cao acetone.

Trong quá trình cô quay dịch chiết acetone, xuất hiện kết tủa P (750 mg). Kết tủa được lọc và rửa nhiều lần với acetone lạnh sau đó được nạp lên cột sắc ký, giải ly với hệ dung môi petroleum ether - ethyl acetate (95:5) lần lượt thu được atranorin (**4**) 55,2 mg, methyl β -orcinoic acid (**1**) 10,5 mg và salazinic acid (**5**) 120 mg. Một phần cao acetone (2 g) được tiến hành sắc ký cột (SKC) với hệ dung môi giải ly *n*-hexane – acetone - methanol với độ phân cực tăng dần thu được 10 phân đoạn. Từ phân đoạn 6, tiến hành SKC với hệ dung môi chloroform - ethyl acetate với độ phân cực tăng thu được lecanorol (**3**) 26 mg. Từ phân đoạn 8, tiến hành SKC với hệ dung môi giải ly *n*-hexane - diethyl ether -

chloroform với độ phân cực tăng thu được chất rắn màu trắng, kết tinh lại trong diethyl ether thu được orsellinic acid (**2**) 45 mg.

Xác định cấu trúc các hợp chất cô lập được

Cấu trúc các chất tinh khiết được xác định bằng phương pháp phổ nghiệm hiện đại như khối phổ độ phân giải cao ESI-HRMS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.

2.2.3 Thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV

Mẫu thử: năm hợp chất tinh khiết cô lập được từ địa y *P.tinctorum* (**1**, methyl β -orcinolcarboxylate; **2**, orsellinic acid; **3**, lecanorol; **4**, atranorin và **5**, salazinic acid), chất chứng dương là Erlotinib (Abcam) và Telaprevir (Euromedex), chất chứng âm là dung môi DMSO.

Nuôi cấy tế bào

Tế bào Huh-7.5.1 được nuôi trong môi trường chứa 4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine (Life Technologies), bổ sung 100 đơn vị/mL penicillin (Life Technologies), 100 μ g/mL streptomycin (Life Technologies), các acid amin (Sigma-Aldrich), 1 mM Hepes (Life Technologies) và 10% huyết thanh (FCS, Hyclone). Các hợp chất đem thử nghiệm và chất chứng dương được hòa tan trong DMSO (nồng độ DMSO không được vượt quá 0,1%), với nồng độ này DMSO không ảnh hưởng đến vòng đời của HCVcc *in vitro* (dữ liệu này không được trình bày ở đây).

Tế bào được ủ với các liều khác nhau của các hợp chất thử nghiệm trong 1 giờ. Virus được cấy vào các tế bào, sau 48 giờ đánh giá số tế bào còn sống và số virus được nhân lên.

Phân tích số liệu

Số tế bào còn sống được xác định bằng phương pháp WST-1 (Roche), số virus nhân lên được xác định bằng thực hiện ít nhất ba lần độc lập thử nghiệm *Renilla Luciferase* (Vu *et al.*, 2015). Các giá trị IC₅₀ của mỗi hợp chất được xác định từ đây gồm 7 đến 12 nồng độ dựa trên phân tích hồi qui với phần mềm GraphPad Prism 5,00.

3 KẾT QUẢ

3.1 Cô lập và xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết

Từ 300 g địa y *P. tinctorum* thu hái tại vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng, năm hợp chất tinh khiết đã được cô lập.

Hợp chất **1**: tinh thể hình kim màu trắng, phổ 1D và 2D-NMR: xem Bảng 2.

Hợp chất **2**: tinh thể hình kim màu trắng, phổ ¹H và ¹³C-NMR: xem Bảng 2.

Hợp chất **3**: tinh thể hình kim màu đỏ, ESI-HRMS: *m/z* = 275,0923 [M+H]⁺ (tính toán phù hợp với công thức C₁₅H₁₅O₅ 275,0919), phổ 1D và 2D-NMR: xem Bảng 3.

Hợp chất **4**: tinh thể hình kim màu trắng, ESI-HRMS *m/z* 397,0896 [M+Na]⁺ (tính toán phù hợp với công thức 397,0899 C₁₉H₁₈O₈Na), phổ ¹H và ¹³C-NMR: xem Bảng 3.

Hợp chất **5**: tinh thể hình kim màu trắng, ESI-HRMS: *m/z* = 389,0522 [M+H]⁺ (tính toán phù hợp với công thức C₁₈H₁₃O₁₀ 389,0508), phổ 1D và 2D-NMR: xem Bảng 3.

Cấu trúc của các hợp chất này được xác định lần lượt bằng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại.

3.2 Thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV

Thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV của năm hợp chất cô lập được từ địa y *P. tinctorum* bằng cách đánh giá sự phát triển của virus HCV trong tế bào nuôi cấy. Hai chất chứng dương được sử dụng là Erlotinib và Telaprevir. Kết quả cho thấy các hợp chất thử nghiệm không gây độc tế bào với phần trăm tế bào sống sau 48 giờ đạt trung bình trên 90% (Bảng 1). Trong các hợp chất khảo sát, hợp chất **4** ức chế tốt nhất virus với liều IC₅₀ 22,3 μ M, đối các hợp chất còn lại giá trị này dao động từ 45 đến 67 μ M.

Bảng 1: Kết quả thử nghiệm ức chế HCV

Hợp chất	Khả năng ức chế HCV - IC ₅₀ (μ M)	Phần trăm tế bào còn sống
1	50,6 \pm 5,0	97,3 \pm 6,2 ^a
2	67,3 \pm 3,7	91,5 \pm 3,0 ^a
3	45,4 \pm 2,3	93,4 \pm 5,7 ^a
4	22,3 \pm 4,0	91,8 \pm 5,9 ^a
5	56,8 \pm 1,5	90,6 \pm 4,8 ^a
Erlotinib	0,6 \pm 0,1	86,5 \pm 5,1 ^b
Telaprevir	0,2 \pm 0,02	94,1 \pm 4,0 ^b

^a: ở nồng độ 100 μ M, ^b: ở nồng độ 10 μ M

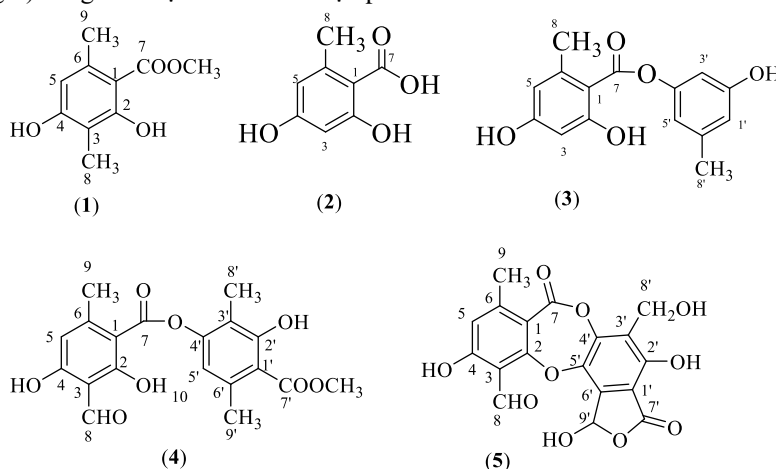
4 BÀN LUẬN

4.1 Cô lập và xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết

Phổ ¹H-NMR của hợp chất **1** xuất hiện hai tín hiệu của nhóm methyl tại δ_H 2,10 (3H, s) và 2,46 (3H, s), một nhóm methoxy tại δ_H 3,92 (3H, s), một proton methin của nhân thơm tại δ_H 6,21 (1H, s), hai -OH phenol tại δ_H 5,09 (1H, s) và 12,05 (1H, s). Phổ ¹³C-NMR cho thấy tín hiệu của nhóm carbonyl ester (δ_C 172,7), một nhóm methoxy (δ_C 52,0), hai nhóm methyl (δ_C 7,8 và 24,2), sáu carbon methine vòng

thom (δ_C 105,4, 108,6, 110,7, 140,3, 158,1 và 163,3). Từ sự tương quan trong phổ HSQC và HMBC (Bảng 2) cùng với việc so sánh dữ liệu phổ

đã có (Nguyen *et al.*, 2016), hợp chất **1** được xác định là methyl β -orcinolcarboxylate.



Hình 1: Cấu trúc của các hợp chất cô lập được từ *P. tinctorum*

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **2** cho thấy tín hiệu của 2 proton nhân thom tại δ_H 6,09 (1H, *brs*) và 6,14 (1H, *brs*) ở vị trí *meta* so với nhau. Ở vùng từ trường cao xuất hiện tín hiệu một mũi đơn tại δ_H 2,43 (3H, *s*) tương ứng với 3 proton nhóm methyl gắn trên nhân thom. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy sự xuất hiện của

1 carbon nhóm methyl, 1 carbon carbonyl và 6 carbon nhân thom tương tự hợp chất **1**. Từ kết quả phổ nghiệm NMR và so sánh với tài liệu tham khảo (Thiago *et al.*, 2008) cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **2** là orsellinic acid.

Bảng 2: Dữ liệu phổ NMR của 1 và 2

Vị trí	Hợp chất 1 (300 MHz, CDCl ₃)		HMBC	Hợp chất 2 (300 MHz, CD ₃ OD)	
	δ_H	δ_C		δ_H	δ_C
1		105,4		-	105,5
2		158,1		-	163,7
3		108,6		6,14 (1H, <i>brs</i>)	101,6
4		163,3		-	166,9
5	6,21 (1H, <i>s</i>)	110,7	1, 3, 9	6,09 (1H, <i>brs</i>)	112,3
6		140,3		-	145,3
7		172,7		-	175,1
8	2,10 (3H, <i>s</i>)	7,8	2, 3, 4	2,43 (3H, <i>s</i>)	24,3
9	2,46 (3H, <i>s</i>)	24,2	1, 5, 6	-	-
7-OCH ₃	3,92 (3H, <i>s</i>)	52,0	7	-	-
2-OH	12,05 (1H, <i>s</i>)		1, 2, 3	-	-
4-OH	5,09 (1H, <i>s</i>)		3, 4	-	-

Ghi chú: HMBC ($H \rightarrow C$)

Hợp chất **3** thu được ở dạng tinh thể hình kim màu đỏ. Phổ ESI-HRMS xuất hiện mũi tại m/z 275,0923 của ion $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_5$. Đồng thời xuất hiện mảnh ion tại m/z 151,0386 (tương ứng với công thức phân tử $C_8H_7O_3$) đặc trưng cho việc cắt liên kết C-O của nhóm ester $-\text{COO}-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy sự hiện diện của 5 proton của 2 vòng thom trong đó có 2 proton thuộc vòng thom A tại δ_H 6,19 (1H, *brs*), 6,26 (1H, *brs*) ghép cặp *meta* với nhau và 3 proton còn lại thuộc vòng thom B tại δ_H 6,40 (1H, *brs*), 6,46 (1H, *brs*) và 6,53 (1H, *brs*) cũng ở vị trí *meta* với

nhau. Ở vùng từ trường cao xuất hiện 2 tín hiệu tại δ_H 2,27 (3H, *s*) và 2,54 (3H, *s*) tương ứng với 2 nhóm methyl gắn trên nhân thom. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy sự xuất hiện của 15 carbon trong đó có 2 carbon nhóm methyl gắn với vòng thom tại δ_C 21,4 (C-8') và 24,4 (C-8), 1 carbon của nhóm carbonyl tại 171,5 ppm (C-7), 12 carbon vòng thom trong đó có 4 carbon liên kết với oxy tại δ_C 166,8 (C-4), 164,4 (C-2), 159,4 (C-2') và 152,3 (C-4'). Kết hợp với dữ liệu phổ 2D-NMR (Bảng 3) và so sánh với tài liệu tham khảo (Iqbal and Meher, 2011), hợp chất **3** được xác định là lecanorol.

Hợp chất **4** thu được ở dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy ba mũi đơn tại δ_{H} 12,54, 12,48 và 11,92 tương ứng với 3 proton của 3 nhóm $-\text{OH}$ phenol, một mũi đơn tại δ_{H} 10,36 tương ứng với proton nhóm $-\text{CHO}$, hai mũi đơn tại δ_{H} 6,51 và 6,40 tương ứng với 2 proton methin của nhân thơm, một mũi đơn tại δ_{H} 3,98 tương ứng với nhóm methoxy, ba mũi đơn tại δ_{H} 2,68; 2,54 và 2,09 tương ứng với 3 nhóm methyl gắn trên vòng thơm. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất **4** có khung depside tương tự hợp chất **3**, trong đó xuất hiện thêm tín hiệu của 1 nhóm aldehyde $-\text{CHO}$, 1 carbon carboxyl, 1 nhóm methoxy, 1 nhóm methyl gắn trên vòng thơm. Dựa trên các thông tin đã có, so sánh đối chiếu với tài liệu tham khảo (Vu *et al.*, 2015) hợp chất **4** được xác định là atranorin.

Hợp chất **5** thu được ở dạng tinh thể hình kim màu trắng có công thức phân tử là $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_{10}$ được xác định bằng ESI-HRMS. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (300

MHz, $\text{DMSO-}d_6$) cho thấy hai tín hiệu $-\text{OH}$ phenol tại δ_{H} 8,29 (1H, *brs*) và 12,06 (1H, *s*), một proton aldehyde $-\text{CHO}$ tại δ_{H} 10,48 (1H, *s*), một proton methin thơm tại δ_{H} 6,88 ppm (1H, *s*), một proton methin tại δ_{H} 6,79 (1H, *brs*), proton nhóm benzyloxy tại δ_{H} 4,64 (2H, *s*) và một nhóm methyl gắn trên vòng thơm tại δ_{H} 2,45 (3H, *s*). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy 18 tín hiệu cộng hưởng rất gần với salazinic acid. Kết hợp phổ HSQC và HMBC (Bảng 3) cùng với so sánh dữ liệu phổ đã có (Nguyen *et al.*, 2016) hợp chất **5** được xác định là salazinic acid.

4.2 Thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV

Trong thử nghiệm này, hai chất chứng dương là erlotinib và telaprevir được thử đồng thời trong mỗi thí nghiệm vì chúng lần lượt là hai chất ức chế giai đoạn xâm nhập và nhân lên của virus. Kết quả thu được từ các hợp chất chứng dương hoàn toàn phù hợp với giá trị đã công bố (Vu *et al.*, 2015) chứng tỏ tính chính xác của phương pháp.

Bảng 3: Dữ liệu phổ NMR của 3, 4 và 5

Vị trí	Hợp chất 3 (300 MHz, CD_3OD)			Hợp chất 4 (500 MHz, CDCl_3)		Hợp chất 5 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)		
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	-	105,1		-	102,8	-	111,9	
2	-	164,4		-	169,1	-	165,9	
3	6,19 (1H, <i>brs</i>)	101,8		-	108,7	-	110,7	
4	-	166,8		-	167,5	-	164,0	
5	6,26 (1H, <i>brs</i>)	112,9		6,40 (1H, <i>s</i>)	112,8	6,88 (1H, <i>s</i>)	117,4	1, 3, 9
6	-	144,7		-	152,4	-	152,8	
7	-	171,5		-	169,7	-	160,3	
8	2,54 (3H, <i>s</i>)	24,4	1, 5, 6	10,36 (1H, <i>s</i>)	193,8	10,48 (1H, <i>s</i>)	192,7	4
9	-	-		2,68 (3H, <i>s</i>)	25,5	2,45 (3H, <i>s</i>)	21,4	1, 5, 6
1'	6,53 (1H, <i>brs</i>)	114,8		-	-	-	109,6	
2'	-	159,4		-	-	-	152,2	
3'	6,40 (1H, <i>brs</i>)	107,4		-	-	-	123,5	
4'	-	152,3		-	-	-	148,2	
5'	6,46 (1H, <i>brs</i>)	114,5		6,51 (1H, <i>s</i>)	116,0	-	137,3	
6'	-	141,6		-	139,8	-	138,1	
7'	-	-		-	172,2	-	163,5	
8'	2,27 (3H, <i>s</i>)	21,4	1', 5', 6'	2,09 (3H, <i>s</i>)	23,9	4,64 (2H, <i>s</i>)	52,6	2', 3', 4'
9'	-	-		2,54 (3H, <i>s</i>)	9,3	6,79 (1H, <i>brs</i>)	94,8	
2-OH	-	-		12,48 (1H, <i>s</i>)	-	-	-	
4-OH	-	-		12,54 (1H, <i>s</i>)	-	8,29 (1H, <i>brs</i>)	-	
7'-OCH ₃	-	-		3,98 (3H, <i>s</i>)	52,3	-	-	
2'-OH	-	-		11,92 (1H, <i>s</i>)	-	12,06 (1H, <i>s</i>)	-	

Ghi chú: HMBC (H→C)

Liều tối đa của mỗi hợp chất thử nghiệm là 100 μM , do ở liều cao hơn hầu hết các hợp chất này sẽ không tan. Kết quả giá trị IC_{50} của các hợp chất cô lập từ địa y dao động trong khoảng từ 20 -70 μM , giá trị này tương tự đối với các hợp chất thiên nhiên cô lập từ nguồn khác (Vu *et al.*, 2015). Các depside thường ức chế HCV tốt hơn các phenol đơn vòng thơm, cụ thể trong nghiên cứu này, hợp chất **4**, một depside phổ biến trong các loài địa y thuộc chi *Parmotrema*, có hoạt tính cao hơn các hợp chất phenol đơn vòng thơm **1** và **2**. Điều này có thể được giải thích do các depside có tính thân dầu cao hơn, dễ dàng thấm qua màng tế bào của virus và do đó có hoạt tính ức chế cao hơn các phenol đơn vòng thơm, vốn mang tính thân nước hơn.

5 KẾT LUẬN

Từ 300 g địa y *P. tinctorum* thu hái tại vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng đã cô lập và xác định cấu trúc của năm hợp chất tinh khiết gồm methyl β -orcinolcarboxylate **1**, orsellinic acid **2**, lecanorol **3**, atranorin **4** và salazinic acid **5**. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế HCV cho thấy cả 5 hợp chất đều không độc tính với dòng tế bào Huh-7.5.1, hợp chất **4** có khả năng ức chế HCV mạnh nhất với IC_{50} 22,3 μM . Kết quả nghiên cứu bước đầu đã cho thấy các hợp chất cô lập từ địa y *P. tinctorum* mọc tại Việt Nam có khả năng kháng virus viêm gan C đáng quan tâm để phát triển các nghiên cứu tiếp theo nhằm ứng dụng vào thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lavanchy, D., 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*. 17(2): 107–115.

McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., *et al.*, 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*. 339(21): 1485–1492.

DeLemos, A.S., and Chung R.T., 2014. Hepatitis C treatment: an incipient therapeutic revolution. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6): 315–321.

Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., and Séron, K., 2012. Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses*. 4(10): 2197–2217.

Hattori, M., Ma, C-M., Wei, Y., Dine, R.S.E., and Sato, N., 2013. Survey of anti-HIV and anti-HCV compounds from natural sources. *Canadian Chemical Transactions*. 1(2): 116–140.

Stocker-Wörgötter, E., 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*. 25(1): 188–200.

Boustie, J., and Grube, M., 2005. Lichens: a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. 3(2): 273–287.

Zambare, V.P., and Christopher, L.P., 2012. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*. 50(6): 778–798.

Lai, D., Odimegwu, D.C., Esimone, C., Grunwald T., and Proksch, P., 2013. Phenolic compounds with *in vitro* activity against respiratory syncytial virus from the Nigerian lichen *Ramalina farinacea*. *Planta Medica*. 79(15): 1440–1446.

Vu, T.H., Anne-Cécile, L.L., Claudia, L., *et al.*, 2015. Depsides: lichen metabolites active against Hepatitis C virus. *Plos One*. 10(3): 1-14.

Nguyen, T.T.T., Nguyen, T.T., Nguyen, P.D., Nguyen, T.N.V., Nguyen, P.H.T., 2016. Study on chemical constituents of the lichen *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale (Parmeliaceae). *Vietnam Journal of Chemistry*. 54(4): 524-527.

Thiago, I.B.L., Roberta, G.C., Nídia, C.Y., and Neli, H., 2008. Radical-scavenging activity of orsellinates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 56(11): 1551-1554.