

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Hữu Quân**

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO  
UNG THƯ CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT ALKALOID TỪ CÀNH  
VÀ LÁ CÂY LÀI TRÂU ( *Tabernaemontana bovina*. Lour )**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ  
SINH HỌC**

**NGUYỄN HỮU QUÂN**

**SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**2023**

***Hà Nội - 2023***

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Hữu Quân**

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ  
CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT ALKALOID TỪ CÀNH VÀ LÁ CÂY LÀI  
TRÂU ( *Tabernaemontana bovina*. Lour )**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm  
Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ  
NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :  
1. TS. Trần Hồng Quang

*Hà Nội - 2023*

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam kết luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự chỉ dẫn và hoàn thiện bởi TS. Trần Hồng Quang. Các số liệu thống kê, kết quả nghiên cứu cuối cùng đều đảm bảo tính trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, các kết quả này chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

**Tác giả**

**Nguyễn Hữu Quân**

## LỜI CẢM ƠN

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ Đề tài trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KHCVN: “Nghiên cứu xác định sự có mặt của các hợp chất có hoạt tính diệt tế bào ung thư từ một số cây dược liệu tự nhiên và các vi nấm nội sinh trên cây dược liệu”. Mã số: TĐCNSH.06/20-22.

Luận văn này được hoàn thành tại phòng Dược liệu biển, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, gia đình và bạn bè.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn trân trọng nhất đến TS. Trần Hồng Quang – người thầy đã tận tâm chỉ dẫn, giảng dạy cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn cũng như quá trình tôi làm việc tại Viện Hóa sinh biển.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng Dược liệu biển đã tạo điều kiện giúp đỡ, hỗ trợ và truyền đạt kinh nghiệm, đưa ra những lời khuyên hữu ích và góp ý quý báu trong suốt thời gian tôi làm việc tại phòng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban lãnh đạo và các cán bộ đang công tác tại Viện Hóa sinh biển, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hóa học và Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi trong việc học tập và thực hiện luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới toàn thể gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

*Hà Nội, tháng năm 2023*  
**Học viên**

**Nguyễn Hữu Quân**

### III

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	I
LỜI CẢM ƠN.....	II
DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	V
DANH MỤC HÌNH.....	VI
DANH MỤC BẢNG.....	VII
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Giới thiệu về cây Lài trâu ( <i>Tabernaemontana bovina</i> . Lour ) .....	3
1.1.1. Thực vật học .....	3
1.1.2. Đặc điểm thực vật.....	3
1.1.3. Bộ phận dùng, tính vị, tác dụng, công dụng theo các bài thuốc y học cổ truyền [1-3] .....	4
1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học của cây <i>T. bovina</i> .....	5
1.2.1. Tình hình nghiên cứu trong nước .....	5
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	6
CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	12
2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu .....	12
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	14
2.2.1. Phương pháp tạo dịch chiết tổng .....	14
2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất .....	14
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất .....	15
2.2.4. Phương pháp tính toán phổ lưỡng sắc tròn điện tử (ECD) .....	15
2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	16
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	18
3.1. Kết quả phân lập các hợp chất .....	18
3.2. Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất.....	19
3.2.1. Hợp chất TBL1 (chất mới): Taberbovinine A .....	19

<b>3.2.2. Hợp chất TBL2 (chất mới): Taberbovine B</b> .....	26
<b>3.2.3. Hợp chất TBL 3: (-)-Mehranine</b> .....	33
<b>3.2.4. Hợp chất TBL 4: 14<math>\alpha</math>,15<math>\beta</math>-dihydroxy-N-methylaspidospermidine</b> ....	34
<b>3.2.5. Hợp chất TBL 5: (16S*)-15-<i>epi-E</i>-isositsirikine</b> .....	36
<b>3.2.6. Hợp chất TBL 6: (16R*)-15-<i>epi-E</i>-isositsirikine</b> .....	37
<b>3.2.7. Hợp chất TBL 7: 16R*-19,20-<i>E</i>-isositsirikine acetate</b> .....	39
<b>3.2.8. Hợp chất TBL8: Hecubine</b> .....	40
<b>3.2.9. Hợp chất TBL 9: Voafinidine</b> .....	42
<b>3.2.10. Hợp chất TBL 10: Voacangarine</b> .....	43
<b>3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất</b> .....	45
<b>CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	52
<b>4.1. KẾT LUẬN</b> .....	52
<b>4.2. KIẾN NGHỊ</b> .....	52
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ</b> .....	53
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	54

## DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<i>T.bovina</i>	<i>Tabernaemontana bovina</i>	Cây Lài trâu
<sup>13</sup> C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H - Chemical Shift Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác proton-proton
<sup>1</sup> H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HRESIMS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry	Phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao
CD	Circular dichroism Spectroscopy	Phổ lưỡng sắc tròn
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác di hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
CC	Column chromatography	Sắc ký cột
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dung môi hòa tan các hợp chất phân cực và không phân cực
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
Hep-G2	Human liver cancer cell line	Tế bào ung thư biểu mô gan
HL-60	Human leukemia cell line	Tế bào ung thư máu ở người
MCF-7	Human breast cancer cell line	Tế bào ung thư vú ở người
SK-Mel-2	Human melanoma cancer cell line	Tế bào ung thư da ở người
LNCaP	Human prostate adenocarcinoma cells	Tế bào ung thư tiền liệt tuyến
MEME	Minimum Essential Medium with Eagle salt	Môi trường nuôi cấy tế bào cơ bản
SRB	Sulforhodamine B	Thuốc nhuộm thử hoạt tính
t <sub>R</sub>	Retention time	Thời gian lưu

## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Cây Lài Trâu (T.bovina).....	3
<b>Hình 3.1.</b> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài cây Lài trâu (Tabernaemontana bovin. Lour).....	19
<b>Hình 3.2.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ), COSY ( $\leftarrow$ ) của <b>TBL 1</b>	20
<b>Hình 3.3.</b> Tương tác NOESY và phổ ECD của <b>TBL 1</b> .....	21
<b>Hình 3.4.</b> Phổ HRESITOF của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	23
<b>Hình 3.5.</b> Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	23
<b>Hình 3.6.</b> Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	24
<b>Hình 3.7.</b> Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	24
<b>Hình 3.8.</b> Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	25
<b>Hình 3.9.</b> Phổ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	25
<b>Hình 3.10.</b> Phổ NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	26
<b>Hình 3.11.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ), COSY ( $\leftarrow$ ) của <b>TBL 2</b> .....	26
<b>Hình 3.12.</b> Tương tác NOESY và phổ ECD của <b>TBL 2</b> .....	29
<b>Hình 3.13.</b> Phổ HRESITOF của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	29
<b>Hình 3.14.</b> Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	30
<b>Hình 3.15.</b> Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	30
<b>Hình 3.16.</b> Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	31
<b>Hình 3.17.</b> Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	31
<b>Hình 3.18.</b> Phổ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	32
<b>Hình 3.19.</b> Phổ NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	32
<b>Hình 3.20.</b> Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của <b>TBL 3</b> .....	33
<b>Hình 3.21.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của <b>TBL 4</b> .....	34
<b>Hình 3.22.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của <b>TBL 5</b> .....	36
<b>Hình 3.23.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>TBL 6</b> .....	37
<b>Hình 3.24.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>TBL 7</b> .....	39
<b>Hình 3.25.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>TBL 8</b> .....	40
<b>Hình 3.26.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>TBL 9</b> .....	42
<b>Hình 3.27.</b> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>TBL 10</b> ... 43	
<b>Hình 3.28.</b> Cấu trúc hóa học của các hợp chất <b>TBL 1 – TBL 10</b> phân lập được từ cây T. bovin.....	45



## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 3.1.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 1</b> .....	22
<b>Bảng 3.2.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 2</b> .....	28
<b>Bảng 3.3.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 3</b> .....	33
<b>Bảng 3.4.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 4</b> .....	35
<b>Bảng 3.5.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 5</b> .....	36
<b>Bảng 3.6.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 6</b> .....	37
<b>Bảng 3.7.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 7</b> .....	39
<b>Bảng 3.8.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 8</b> .....	41
<b>Bảng 3.9.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 9</b> .....	42
<b>Bảng 3.10.</b> Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>TBL 10</b> .....	43
<b>Bảng 3.11.</b> Tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất <b>TBL 1 – TBL 10</b> .....	46
<b>Bảng 3.12.</b> Hoạt tính sinh học của hợp chất (-)-Mehranine ( <b>TBL 3</b> ) được dự đoán bằng PASS [30] .....	47
<b>Bảng 3.13.</b> Hoạt tính sinh học của hợp chất voafinidine ( <b>TBL 9</b> ) được dự đoán bằng PASS [30].....	50
<b>Bảng 3.14.</b> Hoạt tính gây độc tế bào của alkaloid của <i>Ervatamia heyneana</i> được dự đoán bằng PASS.....	50

## MỞ ĐẦU

Vì nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, gió mùa, mưa thuận, gió hoà nên hệ thực vật của Việt Nam rất phong phú và đa dạng với nhiều loài thực vật là những loại dược liệu quý. Trước khi sự ra đời của thuốc tây từ xa xưa cha ông ta đã biết sử dụng nhiều loại cây cỏ trong tự nhiên làm thuốc chữa bệnh, rất nhiều loại bệnh tật đã được chữa khỏi nhờ các loại cây cỏ. Nó đóng vai trò hết sức quan trọng trong đời sống hàng ngày của con người. Những hợp chất thiên nhiên được phân lập từ cây cỏ đã được ứng dụng rộng rãi trong rất nhiều ngành như ngành công nghiệp, nông nghiệp... từ nhiều thế kỷ cho đến ngày nay, chúng được dùng để sản xuất thuốc chữa bệnh, thuốc bảo vệ thực vật, làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm ...

Hiện nay công nghệ tổng hợp hoá dược đã phát triển mạnh mẽ, tạo ra các dược phẩm khác nhau sử dụng trong công tác phòng, chữa bệnh khác nhau. Điều này đã góp phần làm tăng tuổi thọ con người, nhưng không phải vì thế mà việc sử dụng các loại cây cỏ trong chữa bệnh giảm đi, thay vào đó nhu cầu sử dụng chúng theo cách cổ truyền hay từ các hợp chất nguồn gốc tự nhiên có xu hướng ngày càng tăng đã chiếm một vị trí quan trọng trong nền y học hiện đại. Trong chúng có chứa những biệt dược rất khó tổng hợp, đã được khoa học hiện đại tìm ra. Mặt khác việc dùng các loại thuốc từ thiên nhiên trong chữa bệnh hầu như không gây ra tác dụng phụ ảnh hưởng đến sức khỏe cơ thể con người.

Việc sử dụng các thảo dược dù chỉ là một loại dược liệu nhưng lại là hỗn hợp của nhiều hợp chất khác nhau tuy nhiên hầu hết đều chưa xác định rõ hoạt chất của từng chất chứa trong đó. Bởi vậy, những bài thuốc sử dụng thảo dược là đối tượng để cho các nhà khoa học nghiên cứu một cách đầy đủ về bản chất các hoạt chất có trong cây cỏ thiên nhiên. Từ đó định hướng cho việc nghiên cứu, chiết xuất để tìm ra các loại thuốc mới hay bằng con đường tổng hợp để tạo ra những chất có hoạt chất trong việc chữa trị nhiều loại bệnh. Chính vì vậy việc nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học từ những cây cỏ thiên nhiên có một ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Lài trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour), thuộc họ Trúc đào (Apocynaceae). Cây Lài Trâu từ xa xưa trong dân gian đã được sử dụng cho mục đích chữa trị một số bệnh liên quan đến dạ dày, chữa sốt, bệnh vàng da, sâu răng,

viêm họng, hen xuyên thể nhẹ và trung bình, viêm thận...[1-3] Trên cơ sở đó, chúng tôi đã lựa chọn đề tài:

**“ Nghiên cứu đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số hợp chất alkaloid từ cành và lá cây Lài Trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour) ”.**

**Mục tiêu của luận văn:**

- Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất alkaloid từ cây *T.bovina*.
- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được.

**Nội dung luận văn bao gồm:**

1. Chiết xuất cao tổng của lá và cành cây Lài trâu
2. Phân lập các hợp chất từ cao chiết tổng của cây Lài trâu
3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được
4. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được

## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Giới thiệu về cây Lài trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour )

#### 1.1.1. Thực vật học

Tên khoa học: *Tabernaemontana bovina*. Lour (*T. bovina*).

Tên thường gọi: Lài trâu hay Ớt làn lá nhỏ.

Giới : Plantae

Bộ : Gentianales

Họ : Apocynaceae

Chi : *Tabernaemontana*

Loài : *T. bovina*

#### 1.1.2. Đặc điểm thực vật

*T. bovina* có tên thông dụng ở Việt Nam là Lài trâu hay Ớt làn lá nhỏ, thuộc họ Trúc đào (*Apocynaceae*). Cây nhỡ cao 1m, không lông, mủ trắng, cành mảnh, hơi dẹp. Lá có phiến bầu dục, thon; đầu có đuôi, dài 8-12cm; gân phụ 8-11 cặp; cuống 4-6 mm. Tụ tán có cọng, hoa trắng, đài cao 2mm, vành có ống cao 2 cm, tai 5 mm, tiểu nhụy gắn gần miệng. Manh nang nâu dài 3-3,5 cm; hạt 2-3 hoe, phôi nhũ nhiều. [4]



**Hình 1.1.** Cây Lài Trâu (*T.bovina*)

Lài Trâu (*T. bovina*) phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới châu Á, bao gồm Ấn Độ, Nam Trung Quốc, bán đảo Đông Dương các nước ở vùng Đông Nam Á

và Australia. Ở Việt Nam, Lài Trâu phân bố rải rác ở các tỉnh thuộc vùng trung du và núi thấp (dưới 1000m), từ Lạng Sơn, Cao Bằng, Bắc Cạn, Yên Bái, Hòa Bình đến tận phía nam của Lâm Đồng, Đà Nẵng, Thừa Thiên Huế. Cây ưa sáng, có thể hơi chịu bóng khi còn nhỏ, thường mọc lẫn với các loại cây bụi khác ở đồi, đất sau nương rẫy và rừng sinh.

### **1.1.3. Bộ phận dùng, tính vị, tác dụng, công dụng theo các bài thuốc y học cổ truyền [1-3]**

#### **1.1.3.1. Bộ phận dùng**

Dùng rễ, lá, hoa, quả hoặc nhựa của cây.

#### **1.1.3.2. Tính vị, tác dụng**

Rễ, vỏ và lá lài trâu có vị cay, tính mát, có độc, có tác dụng thanh nhiệt, tán kết, giải độc, hạ huyết áp tiêu thũng, chỉ thống. Nhựa mủ làm giảm sưng tấy.

#### **1.1.3.3. Công dụng**

- Nước sắc hoặc rượu ngâm với liều 6 – 9g rễ; vỏ thân lài trâu được dùng chữa cao huyết áp, sốt rét rừng, giun, tiêu chảy, đau bụng, ngộ độc, kiết lỵ, đau tại chỗ, đau mắt, đau răng.
- Lá và hoa chữa ho và cao huyết áp.
- Nhựa cây để tẩy giun và tẩm tên độc.

#### **1.1.3.4. Tác dụng dược lý**

##### **Dược tính**

- Lài trâu có nhiều nhựa và phần nhựa này có tác dụng làm giảm sưng tấy (và vì có độc nên cũng được dùng để tẩm tên độc).
- Lá cây có tác dụng làm mát, giải độc chó dại cắn và điều trị bệnh ngoài da (ghẻ lở, nhọt).
- Rễ, lá và gỗ cây lài tây có tính mát, có thể làm tan uất kết, giúp giảm đau, hạ huyết áp và tiêu thũng.
- Vỏ, rễ và nhựa của cây có tác dụng điều trị đau răng, đau mắt, tẩy giun.
- Rễ cây còn được dùng để bó gãy xương.
- Cao ethanol từ vỏ rễ và vỏ thân có tác dụng kháng khuẩn, diệt côn trùng.

##### **Độc tính**

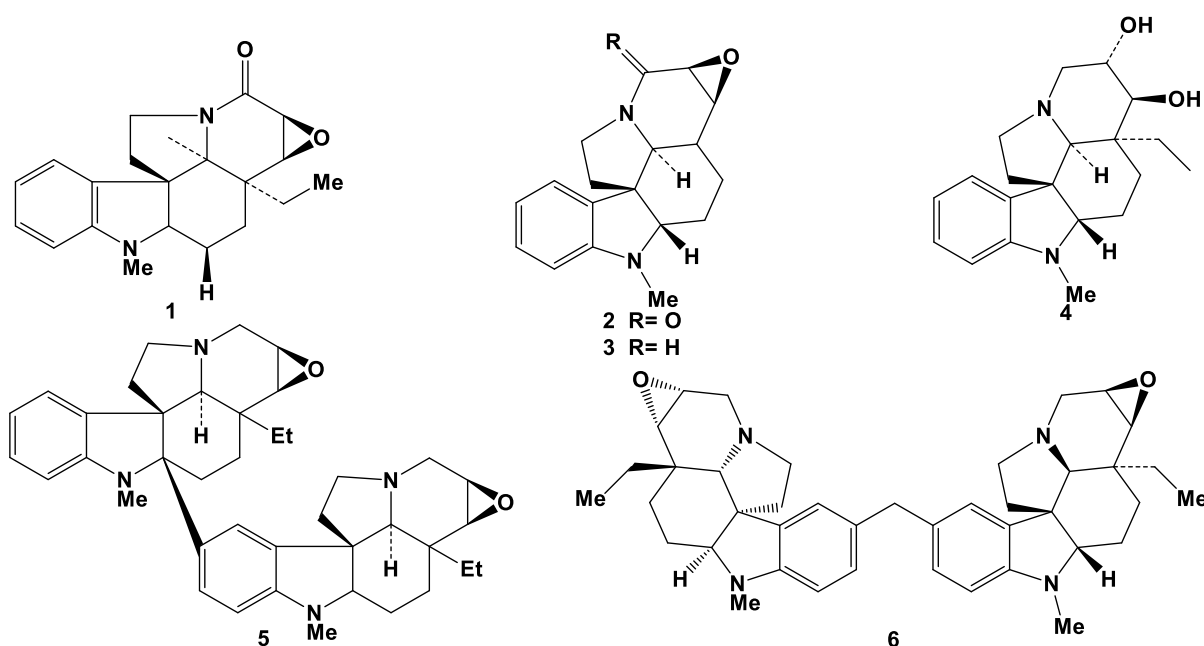
- Các bộ phận của cây lài trâu đều có độc. Qua các thí nghiệm, các nhà nghiên cứu đã phát hiện một số hoạt tính sau đây:
- Cao chiết khô từ rễ, hạt và vỏ cây lài trâu đều gây ức chế hoạt động của tủy xương và làm giảm bạch cầu (trên cơ thể động vật thí nghiệm).
- Cao ethanol chiết xuất từ hoa, lá, rễ và thân cây lài trâu đều có thể gây ức chế hô hấp, có tác dụng an thần nhưng nếu dùng quá liều thì có thể gây ảo giác.
- Các chiết xuất từ cây khi dùng bằng đường tiêm tĩnh mạch thì thấy có tác dụng làm chậm nhịp tim ở loài chuột lang.
- Dịch chiết của cây khi dùng quá liều có thể gây liệt hô hấp và gây chết ở động vật thí nghiệm.

## 1.2. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học của cây *T. bovina*

### 1.2.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

#### ❖ *Indole alkaloid – Bisindole alkaloid*

Năm 1988, Trịnh Phương Liên và cộng sự (Viện Hóa học, Trung tâm khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia Việt Nam) đã tách chiết và phân lập từ thân và lá của cây *T. bovina* thu được các hợp chất indole alkaloid mới (**1-4**). Cấu trúc của 3-oxomehranine (**1**) đã được xác định bằng các loại phổ NMR còn cấu trúc của 14 $\alpha$ , 15 $\beta$ -dihydroxy-N-methylaspidospermidine (**3**) bằng phân tích X-ray anal và cấu hình tuyệt đối của chúng được xác định bằng phổ CD. [5]

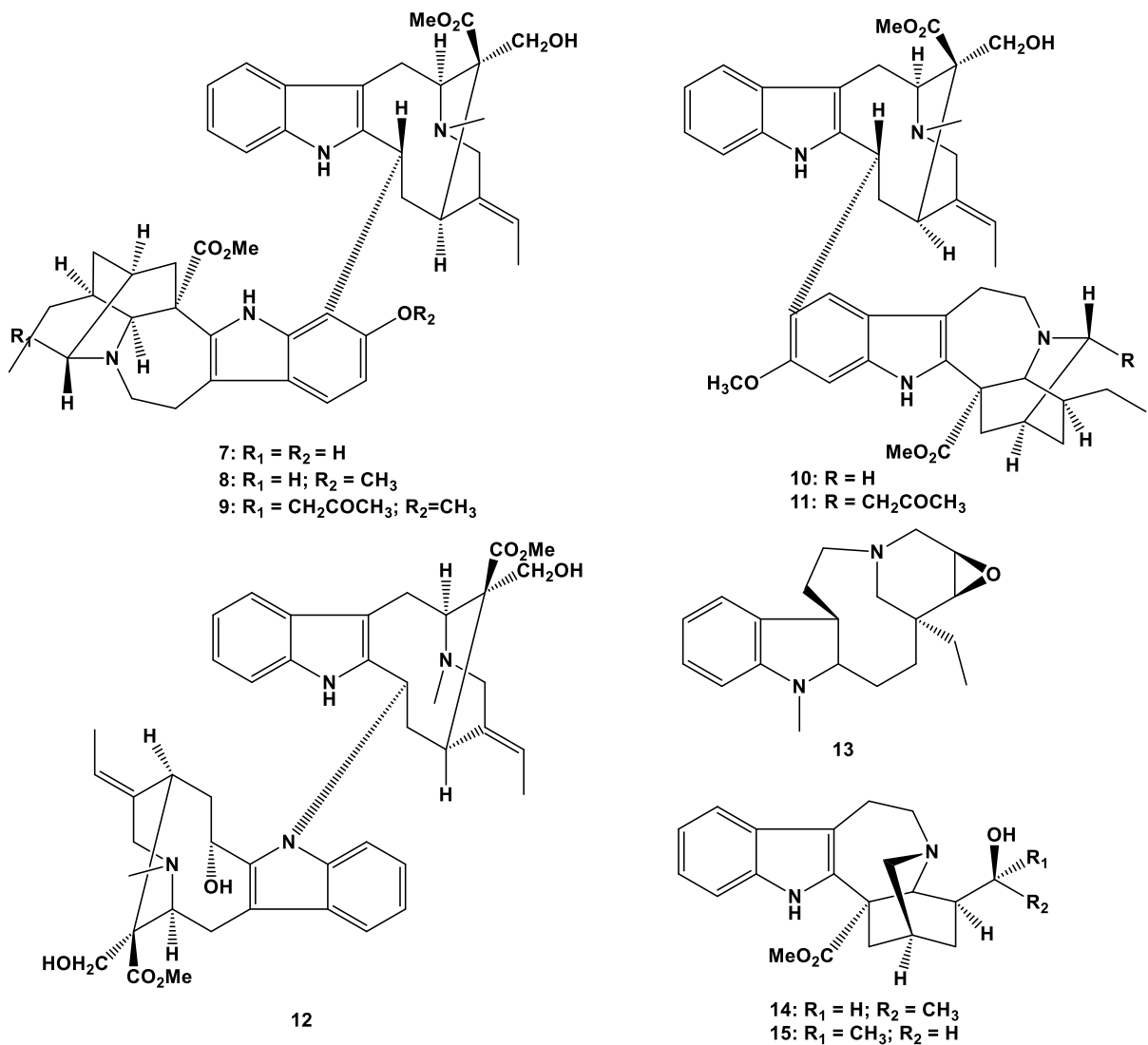


Thêm vào đó là 2 hợp chất bis-indole alkaloid mới chưa từng được công bố tên là tabernaevine (**5**) và methylenebismehranine (**6**), cả 2 đều được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ phân giải cao và phổ NMR. [6]

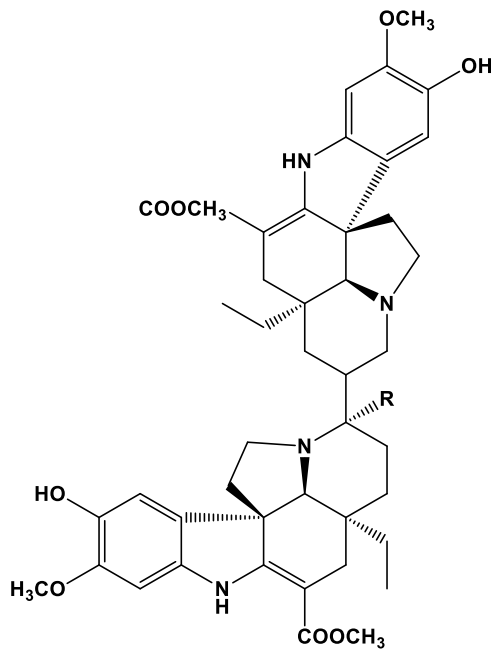
### 1.3.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

#### ❖ *Indole alkaloid – Bisindole alkaloid*

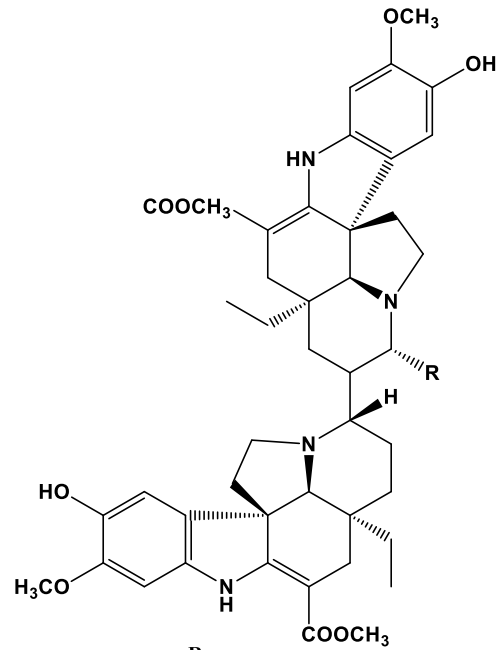
Năm 2018, Bo Liu và cộng sự (Đại học Nam Kinh, Trung Quốc) đã tách chiết và phân lập được 9 hợp chất indole alkaloid (**7-15**) từ lá và thân cây *T.bovina* và cấu trúc tất cả các chất đều được xác định bởi phổ NMR. [7]



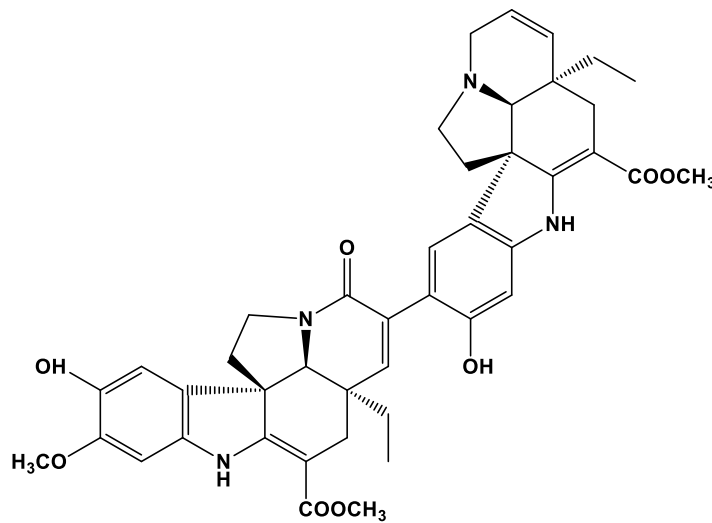
Năm 2020, Yang Yu và cộng sự (Viện Khoa học Trung Quốc, Bắc Kinh, Trung Quốc) đã tách chiết và phân lập được 12 hợp chất bis-indole alkaloid là tabernaemontines A – L (**16-27**) từ lá cây *T. bovina*. Tất cả 12 hợp chất đều được xác định cấu trúc dựa trên phổ NMR. [8]



- R
- 16 H  $\Delta^{14,15}\Delta^{14',15'}$
  - 17 H  $\Delta^{14,15}$  14',15'  $\alpha$ -epoxy
  - 18 H  $\Delta^{14',15'}$  14,15  $\alpha$ -epoxy
  - 19 NH-NH<sub>2</sub> 14,15  $\alpha$ -epoxy 14',15'  $\alpha$ -epoxy



- R
- 20 H  $\Delta^{14,15}\Delta^{14',15'}$
  - 21 CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>  $\Delta^{14,15}$   $\Delta^{14',15'}$
  - 22 =O  $\Delta^{14,15}$   $\Delta^{14',15'}$
  - 23 H  $\Delta^{14',15'}$  14,15  $\alpha$ -epoxy
  - 24 H  $\Delta^{14,15}$  14',15'  $\alpha$ -epoxy
  - 25 =O  $\Delta^{14,15}$  14',15'  $\alpha$ -epoxy
  - 26 H 14,15  $\alpha$ -epoxy 14',15'  $\alpha$ -epoxy

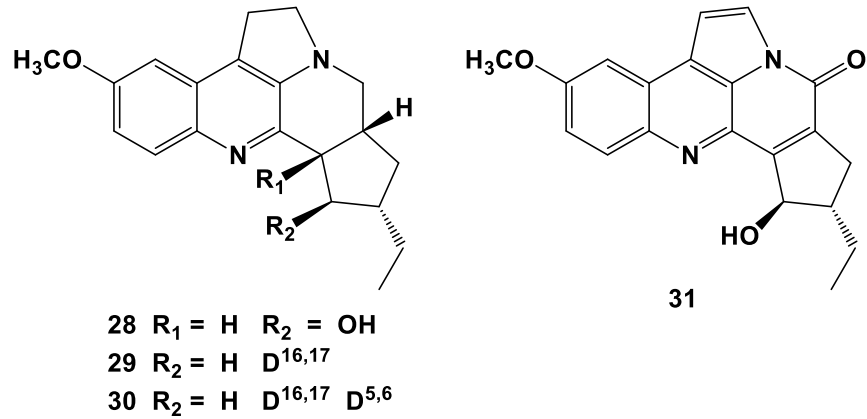


27

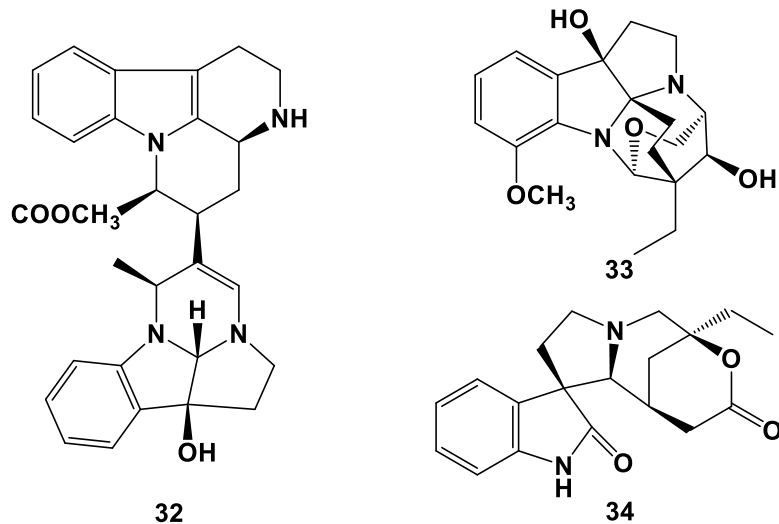
### ❖ *Monoterpenoid indole*

Năm 2019, Jing Wu và cộng sự (Viện khoa học Trung Quốc, Côn Minh, Trung Quốc) đã phân lập được bốn hợp chất alkaloid mới là taberbovine A–D (**28-31**) từ thân cây *T. bovina*. Các hợp chất (**28-31**) sở hữu hệ thống vòng 6/6/5/6/5 độc đáo và được phân loại là các quinolone monoterpenoid. Cấu trúc của chúng đã được làm sáng tỏ bằng dữ liệu phổ NMR, cùng với các tính toán hóa học và nhiễu xạ tinh thể tia X. [9]

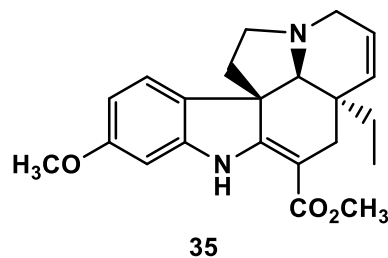




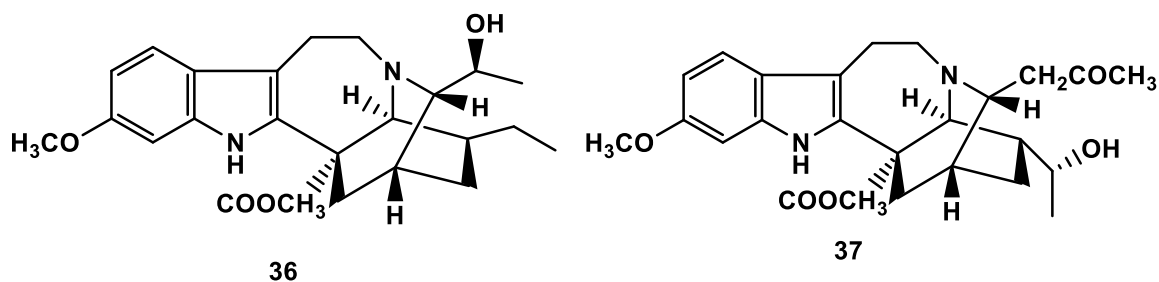
Năm 2019, Yang Yu và cộng sự (Viện Khoa học Trung Quốc, Bắc Kinh, Trung Quốc) đã phân lập được ba hợp chất monoterpene indole alkaloid (MIA) là tabernabovine A–C (**32-34**) từ cây *T. bovina*. Cấu trúc của chúng đã được làm sáng tỏ bằng dữ liệu quang phổ NMR và các phép tính toán hóa học. [10]



Năm 2020, Di Ge và cộng sự (Đại học Tế Nam, Trung Quốc) đã phân lập được hợp chất (**35**) Aspidosperma alkaloid từ *T. bovina*. Aspidosperma alkaloids, một phân lớp của monoterpene indole alkaloids giàu trong thực vật họ Trúc đào, có các hoạt tính kháng u đáng chú ý, nhưng các cơ chế cơ bản hiếm khi được báo cáo. [11]



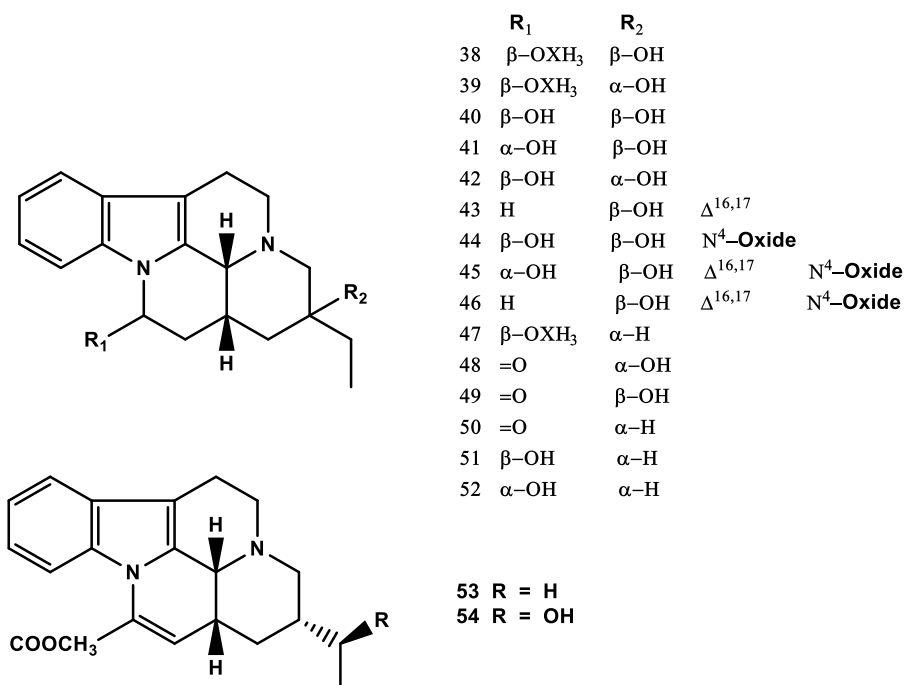
Năm 2021, Miao Zhang và cộng sự (Đại học Tế Nam, Quảng Châu, Trung Quốc) đã phân lập được 2 monoterpenoid indole alkaloid mới là taberibogine A và B (**36** - **37**), cùng với 4 hợp chất đã biết từ thân cây *T. bovina*. [12]



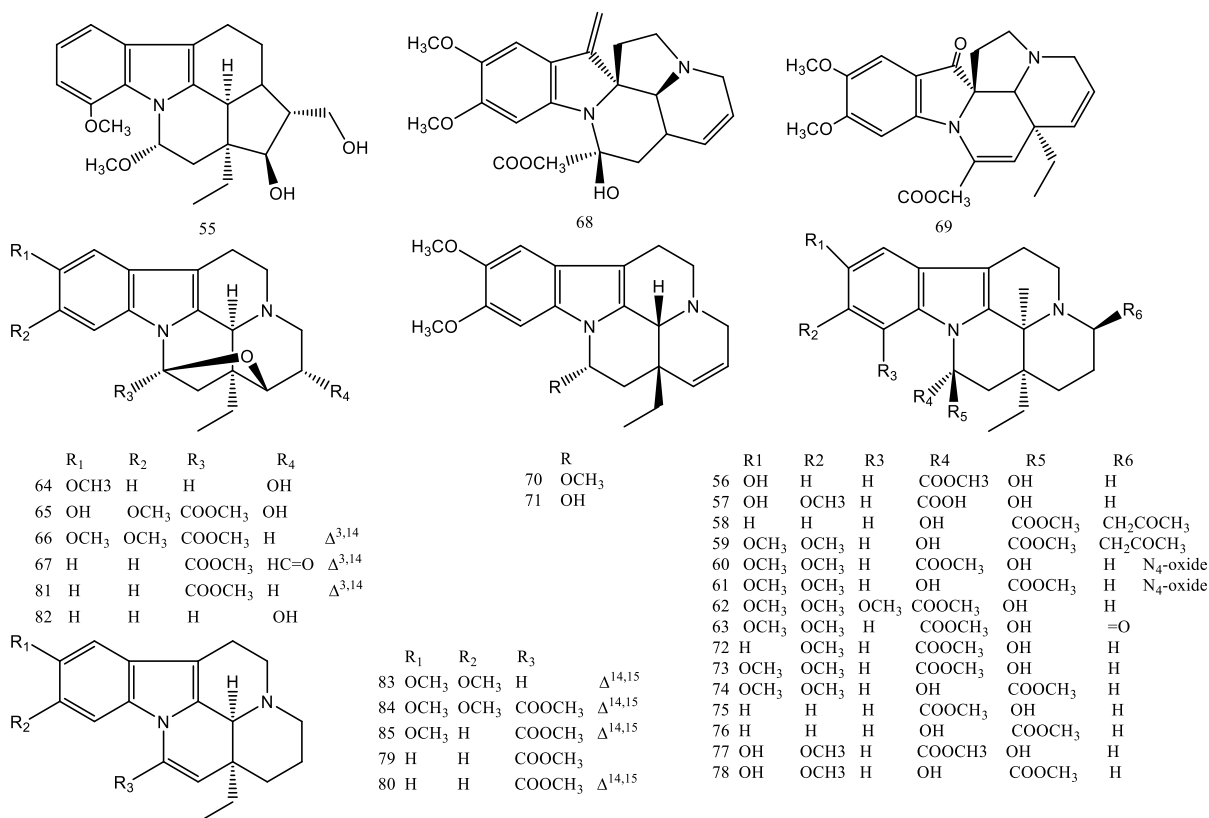
### ❖ *Tacamine alkaloid*

Năm 2019, Yang Yu và Cộng sự (Đại học Viện Khoa học Trung Quốc, Trung Quốc) đã tách chiết và phân lập được 11 hợp chất tacamine alkaloid mới là tabercamine A-K (**38-48**) từ lá cây *T. bovina*, cùng với 6 hợp chất alkaloids (**49-54**) đã biết. Cấu hình tuyệt đối của các hợp chất được xác định bởi tính toán phổ ECD và phân tích nhiễu xạ tia X.

Đây là lần đầu tiên loại chất tacamine được tìm thấy qua con đường tự nhiên chứ không phải sinh tổng hợp. [13]



## ❖ Eburnan alkaloid và Vincan alkaloid



Năm 2021, Yang Yu và cộng sự (Viện Thực vật học Côn Minh, Côn Minh, Trung Quốc) đã công bố kết quả phân lập được 31 hợp chất Vincan alkaloid (**55-72**; **75-85**), hai hợp chất Eburnan alkaloid (**73-74**) từ cây *T. bovina*, trong đó có 20 hợp chất mới. Tất cả các cấu trúc hóa học đã được làm sáng tỏ bằng phương pháp phổ NMR, MS, tính toán phổ lưỡng sắc tròn điện tử, và phương pháp nhiễu xạ tia X. [14]

### 1.4. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của cây *T. bovina*

#### 1.4.1. Hoạt tính sinh học của *Indole alkaloid* – *Bisindole alkaloid*

Năm 2018, Bo Liu và cộng sự (Đại học Nam Kinh, Trung Quốc) đã tách chiết và phân lập được 9 hợp chất indole alkaloid (**7-15**) từ lá và thân cây *T. bovina* trong đó:

- Hợp chất (**7**) được đánh giá về các hoạt động gây độc tế bào của nó chống lại 5 dòng tế bào ung thư ở người, bệnh bạch cầu dòng tủy ở người (HL-60), ung thư phổi (A-549), tế bào gan ung thư biểu mô (SMMC-7721), ung thư vú (MCF-7) và ung thư ruột kết (SW480), bằng phương pháp MTT. Hợp chất (**7**) cho thấy giá trị IC<sub>50</sub> là 14.43, 15.37, 16.36, 12.68 và 13.86 μM

đối với năm dòng tế bào ung thư ở người, trong khi cisplatin cho thấy giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 0.97, 3.56, 8.30, 16.50 và 5.88  $\mu\text{M}$ . [7]

Năm 2020, Yang Yu và cộng sự đã tách chiết và phân lập được 12 hợp chất bis-indole alkanoid là tabernaemontines A – L (**16-27**) từ lá cây *T. bovina*. Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Các alkaloid (**21**), (**26**) và (**27**) thể hiện hoạt tính ức chế tốt đối với sự hoạt hóa của tế bào tiểu thần kinh đệm. Hợp chất (**21**) có khả năng ức chế sự kích hoạt tế bào tiểu thần kinh đệm theo cơ chế ngăn chặn kích hoạt P38 MAPK, qua đó có tiềm năng trong điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh mãn tính. [8]

#### 1.4.2. Hoạt tính sinh học của của *Monoterpenoid indole*

Năm 2019, Jing Wu và cộng sự đã phân lập được bốn hợp chất alkaloid mới là taberbovine A–D (**28-31**) từ thân cây *T. bovina*. Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Hoạt tính kháng viêm của taberbovine A-D (**28-31**) thể hiện qua sự ức chế sản sinh NO trong các đại thực bào RAW264.7 kích hoạt bởi LPS. [9]

Năm 2019, Yang Yu và cộng sự đã phân lập được ba hợp chất monoterpenoid indole alkaloid (MIA) là tabernabovine A–C (**32-34**) từ cây *T. bovina*. Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Hoạt tính kháng viêm của tabernabovine A (**32**) thể hiện qua sự ức chế sản sinh NO do LPS gây ra ở các đại thực bào RAW 264.7, với  $IC_{50} = 44,1 \mu\text{M}$ . [10]

Năm 2020, Di Ge và cộng sự đã phân lập hợp chất (**35**) Aspidosperma alkaloid từ *T. bovina*. Aspidosperma alkaloids, một phân lớp của monoterpenoid indole alkaloids giàu trong thực vật họ Trúc đào. Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Hợp chất 11-methoxytabersonine (11-MT) (**35**), đã ức chế đáng kể khả năng sống sót của hai dòng tế bào ung thư phổi ở người A549 và H157.
- Nghiên cứu về cơ chế phân tử cho thấy (**35**) đã tiêu diệt các tế bào A549 thông qua cảm ứng quá trình hoại tử của tế bào. Ngoài ra, (**35**) gây ra hiện tượng apoptosis ở hai dòng tế bào A549 và H157 và (**35**) kích hoạt quá trình autophagy thông qua hoạt hóa AMP-activated protein kinase (AMPK)

/ mammalian target of rapamycin (mTOR) và con đường truyền tín hiệu c-Jun N-terminal kinase (JNK) trong cả hai tế bào A549 và H157.

- Kết hợp lại với nhau, (35) thể hiện một cơ chế chống khối u khác với cơ chế của các chất tương tự đã được báo cáo trước đây và có thể có tiềm năng đóng vai trò như một hợp chất dẫn đầu cho sự phát triển của phương pháp hóa trị mới cho bệnh ung thư phổi. [11]

Năm 2021, Miao Zhang và cộng sự đã phân lập được 2 monoterpene indole alkaloid mới là taberibogine A và B (36 - 37). Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất (36) và (37) đã được thể hiện qua sự ức chế sản sinh NO do LPS gây ra ở các đại thực bào RAW 264.7. [12]

### 1.4.3. Hoạt tính sinh học của *Eburnan alkaloid* và *Vincan alkaloid*

Năm 2021, Yang Yu và cộng sự đã công bố kết quả phân lập được 31 hợp chất Vincan alkaloid (55-72; 75-85), hai hợp chất Eburnan alkaloid (73-74) từ cây *T. bovina*. Trong quá trình thực nghiệm, nhóm các nhà khoa học đã khảo sát được hoạt tính sinh học của các hợp chất là:

- Hợp chất 10-hydroxy-14,15-didehydrovincanmine (56) và criocerine (70) thể hiện hoạt tính làm tăng mức tiêu thụ glucose trong mô hình myotube L6. [14]

## CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu

#### 2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất

##### 2.1.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Lá và cành của cây Lài trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour.) được thu thập tại Mê Linh, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt vào tháng 3 năm 2020 và được xác định tên khoa học bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm KHCNVN.

##### 2.1.1.2. Hóa chất

Hóa chất sử dụng cho sắc ký: bột silica gel (Kieselgel 60, 230–400 mesh, Merck), Bột pha đảo C<sub>18</sub> (ODS-A, 12 nm, S-150 μm, YMC Co.), bản mỏng silica

gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) và RP-18 F<sub>254S</sub> plates (Merck), các dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, EtOAc, n-hexane, acetone, acetonitrile, và các loại hóa chất, vật tư khác dùng để tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất.

Hóa chất thử hoạt tính gây độc tế bào: DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium piruvat, NaHCO<sub>3</sub>, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%); và các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide), TCA (Trichloroacetic acid), Tris base, PBS (phosphate buffered saline), Ellipticine, SRB (Sulforhodamine B), acetic acid ...

### 2.1.1.3. Các dòng tế bào

Các dòng tế bào do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp, bao gồm:

- + HepG2: Tế bào ung thư gan ở người (human hepatocellular carcinoma)
- + SK-LU-1: Tế bào ung thư phổi ở người (human lung carcinoma)
- + MCF7: Tế bào ung thư gan ở người (human breast carcinoma)
- + SK-Mel-2: Tế bào ung thư da ở người (human melanoma cells)
- + LNCaP: Tế bào ung thư tiền liệt tuyến ở người (human prostate carcinoma)

Đây là các dòng ung thư phổ biến hiện nay trên thế giới cũng như tại Việt Nam, do đó nhóm nghiên cứu quyết định lựa chọn 5 dòng tế bào này để đưa vào khảo sát trong đề tài nghiên cứu.

### 2.1.2. Dụng cụ, thiết bị nghiên cứu

Các thiết bị đo quang phổ: máy JASCO P-2000 polarimeter (Tokyo, Japan); máy X500 QTOF mass spectrometer (Sciex, USA); máy Chirascan spectrometer (Applied Photophysics, UK); máy AVANCE III HD 500 FT-NMR spectrometer (Bruker, Germany).

Thiết bị sắc ký: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA).

Các dụng cụ, thiết bị cơ bản: các loại cột sắc ký, máy hứng phân đoạn DC1100; kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa Kỳ); máy quang phổ (BioTek); tủ ấm CO<sub>2</sub>, tủ lạnh sâu -80°C; bình nitơ lỏng; cân phân tích; máy đo pH; và các dụng cụ thí nghiệm thông thường

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Phương pháp tạo dịch chiết tổng**

Mẫu cành và lá cây Lài trâu được rửa sạch, cắt nhỏ và phơi khô trong bóng râm. Sau đó mẫu được nghiền nhỏ và ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết MeOH tổng.

### **2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất**

Các hợp chất được phân lập bằng các phương pháp sắc ký kết hợp, bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC), sắc ký cột (CC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufoalien 60 F<sub>254</sub> (Merck 1,05715), RP18 F<sub>245S</sub> (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel có kích thước hạt là 0.040 – 0.063 mm (240 – 430 mesh) và pha đảo RP-18 (150 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd.). Hỗn hợp chất được đưa lên cột, sử dụng các hệ dung môi để phân tách các chất và hứng các phân đoạn nhỏ.

Phương pháp HPLC: là một kỹ thuật dùng để phân tách, nhận biết, định lượng từng thành phần trong hỗn hợp các hợp chất. Kỹ thuật này dựa trên hệ thống bơm để đẩy dung môi lỏng dưới áp suất cao, trong dung môi có chứa hỗn hợp mẫu, qua một cột sắc ký. Cột sắc ký được nhồi bằng vật liệu hấp phụ rắn (phổ biến nhất là C18), với kích thước hạt hấp phụ nhỏ (trung bình kích thước hạt ~ 2-50 μm). Điều này mang lại HPLC hiệu quả phân giải cao khi phân tách hỗn hợp. Sơ đồ của một thiết bị HPLC đặc thù gồm có cổng lấy mẫu, bơm, và một đầu dò. Cổng lấy mẫu đưa hỗn hợp mẫu và dòng pha động để đi qua cột. Hệ thống bơm đảm bảo tốc độ dòng mong muốn và thành phần của pha động qua cột. Đầu dò

tạo ra tín hiệu tỷ lệ với lượng mẫu thành phần đi ra từ cột, do đó cho phép phân tích định lượng của những thành phần trong mẫu. Một bộ vi xử lý số và phần mềm điều khiển thiết bị HPLC và cung cấp dữ liệu phân tích. Các đầu dò như UV/Vis hay khối phổ MS được sử dụng phổ biến kết nối với hệ thống HPLC trong nhận dạng, phân tách, định lượng các hợp chất. Các dung môi sử dụng phổ biến cho HPLC như nước, acetonitrile, methanol...

### 2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

Các hợp chất được xác định cấu trúc hóa học bằng kết hợp xác định giữa các thông số vật lý và các phương pháp phổ hiện đại bao gồm:

➤ *Phổ khối lượng phân giải cao*

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

➤ *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*

Phổ NMR được đo trên máy Bruker AVANCE III HD 500 FT NMR (Bruker, Germany) của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là tetramethylsilane (TMS).

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, HMBC, COSY, NOESY

➤ *Phổ lưỡng sắc tròn (CD)*

Phổ CD được đo trên máy Chirascan<sup>TM</sup> CD spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

➤ *Xác định góc quay cực  $[\alpha]_D$*

Góc quay cực được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### 2.2.4. Phương pháp tính toán phổ lưỡng sắc tròn điện tử (ECD)

Tính toán phổ lưỡng sắc hình tròn điện tử (ECD) lý thuyết với hàm mật độ phụ thuộc thời gian (TDDFT) được thực hiện bằng chương trình Gaussian 16W.



Đầu tiên, các cấu dạng của hợp chất được phân tích bằng chương trình Spartan'18 với trường lực MMFF. Những cấu dạng có thông số Boltzmann trên 1% đã được lựa chọn để tính toán phổ ECD và được tối ưu hóa với hàm chức năng B3LYP/6-311G(d,p) trong methanol bằng mô hình CPCM. Phổ ECD lý thuyết được tính toán trong methanol bằng phương pháp TDDFT ở cùng hàm chức năng bằng chương trình Gaussian 16W. Cuối cùng, phổ ECD tính toán lý thuyết được mô hình hóa bằng chương trình SpecDis 1.71. Phổ ECD tính toán cho mỗi cấu dạng được tuân theo trọng số và tính tổng theo phân bố Boltzmann và so sánh với dữ liệu thực nghiệm.

## **2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư**

### **2.2.5.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào ung thư**

Tế bào ung thư được nuôi cấy *in vitro* theo phương pháp Mosmann và cs. Tế bào nuôi cấy ở 37°C trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100U/ml penicillin và 100mcg/ml streptomycin trong tủ nuôi cấy CO<sub>2</sub> 5% trong 48 giờ. [15]

### **2.2.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư**

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất được đánh giá bằng phương pháp sulforhodamine B (SRB) [16, 17].

- *Các dòng tế bào thử nghiệm:* bao gồm 5 dòng tế bào ung thư người là gan (HepG2), vú (MCF-7), da (SK-Mel-2), tiền liệt tuyến (LNCaP) và phổi (SK-LU-1).

- *Nguyên tắc của phương pháp:*

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*.

Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD - Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

- Các bước tiến hành:

Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường ẩm 5% CO<sub>2</sub> ở 37 °C trong 48 giờ. Khả năng sống của tế bào được kiểm tra bằng phương pháp SRB để xác định mật độ tế bào, dựa trên việc đo hàm lượng protein của tế bào.

Các tế bào được nuôi dưỡng trong môi trường nuôi cấy (180 µL) trên đĩa 96 giếng (4 × 10<sup>4</sup> tế bào mỗi giếng) trong 12 h. Các mẫu thử được thêm vào từng giếng và được ủ trong 72 giờ. Sau đó, môi trường được loại bỏ và các lớp tế bào còn lại được cố định với TCA 20% (w/v) lạnh trong 1 giờ ở 4°C và được nhuộm bằng dung dịch nhuộm SRB 1X ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thuốc nhuộm còn thừa sau đó được loại bỏ bằng cách rửa nhiều lần với dung dịch axit axetic 1% (v/v). Thuốc nhuộm gắn protein được hòa tan trong dung dịch Tris-base 10 mM để tiến hành đo độ hấp thụ OD ở 515 nm trên máy ELISA (Bio-Rad). DMSO 10% được sử dụng làm mẫu trắng, ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương. Thí nghiệm đã được chuẩn bị trong ba lần.

Giá trị ức chế sinh trưởng của tế bào (IR) được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD (chất thử)} - \text{OD(ngày 0)}] \times 100}{\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}}$$

Giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) được tính toán thông qua chương trình TableCurve 2Dv4.

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập các hợp chất

Lá và cành khô của cây *T. bovina* (3,5 kg) được ngâm chiết trong MeOH (10 L × 3 lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết MeOH được lọc qua giấy lọc và được cất loại dung môi dưới áp suất giảm và cuối cùng thu được phần cặn chiết (300 g).

Cặn chiết tổng sau đó được phân bố đều trong dung dịch HCl 5 %, sau đó được chiết phân lớp với dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> để loại bỏ các thành phần không phải là alkaloid. Sau đó, lớp dịch chiết HCl 5 % được kiềm hóa với dung dịch amoniac 15% cho đến khi dịch chiết có độ pH 9 và sau đó được chiết phân lớp với EtOAc.

Dịch chiết EtOAc được lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi thu được cặn chiết alkaloid tổng (30 g). Cặn chiết EtOAc được đưa lên cột sắc ký silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (30:1-1:1, v/v) thu được 8 phân đoạn (F1-F8).

Hợp chất **TBL 8** (10 mg) được phân lập từ phân đoạn F2 bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi n-Hexane-Acetone (40:1, v/v) và làm sạch bằng sắc ký cột pha đảo C18, rửa giải với hệ dung môi Acetone-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v).

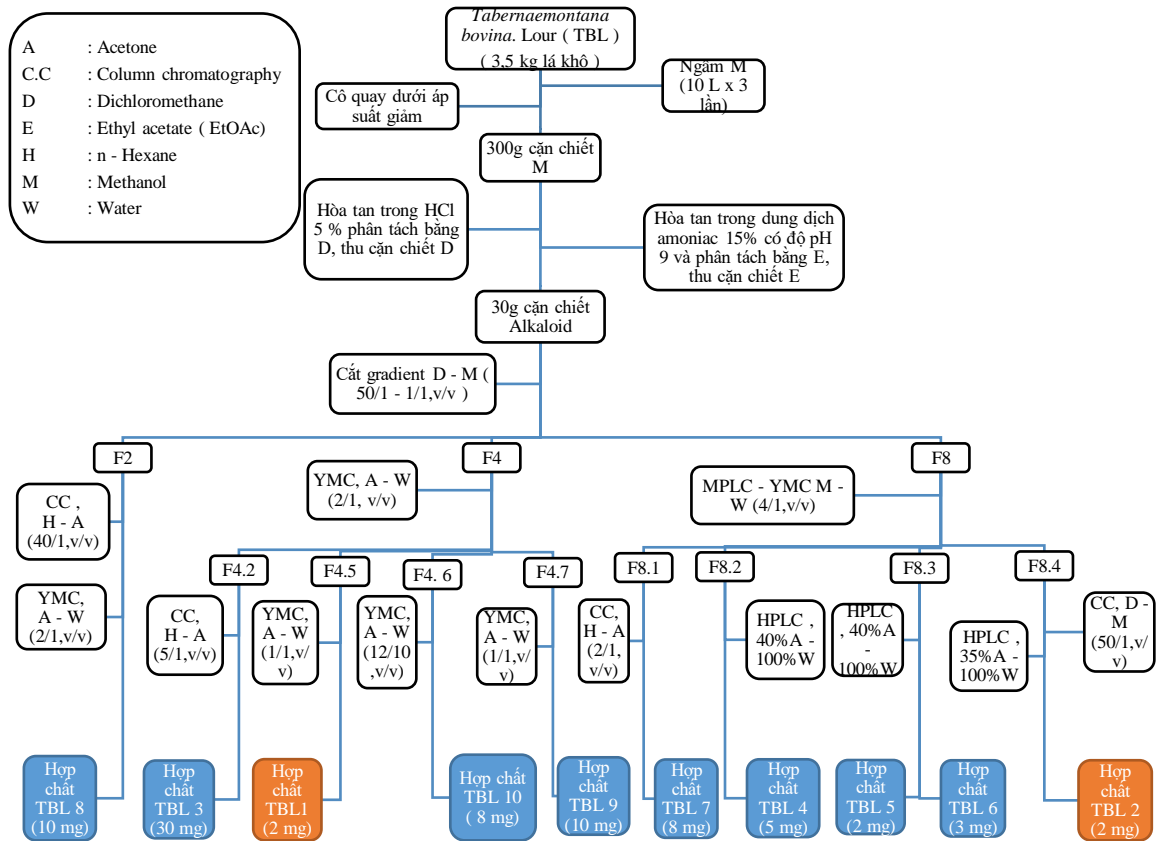
Phân đoạn F4 được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo C18, sử dụng hệ dung môi Acetone-H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) làm chất rửa giải để thu được 11 phân đoạn con (F4.1-F4.11).

Phân đoạn con F4.2 được đưa lên sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng n-Hexane-Acetone (5:1, v/v) thu được hợp chất **TBL 3** (30 mg).

Phân đoạn con F4.5 được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo C18, rửa giải bằng hệ dung môi Acetone-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) để thu được hợp chất **TBL 1** (2 mg).

Tương tự, phân đoạn con F4.6 được phân tách bằng RP C18 CC, sử dụng hệ dung môi Axeton - H<sub>2</sub>O (12:10, v/v) làm pha động để phân lập được hợp chất **TBL 10** (8 mg), trong khi hợp chất **TBL 9** (10 mg) được phân lập từ phân đoạn con F4.7 bằng cách sử dụng RP C18 CC và Axeton - H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) làm chất rửa giải. Phân đoạn F8 được đưa vào sắc ký lỏng áp suất trung bình (MPLC) RP C18, rửa giải bằng MeOH - H<sub>2</sub>O (4:1, v/v) để tạo ra 4 phân đoạn con (F8.1-F8.4). Phân

đoạn con F8.1 được tách bằng silica gel CC, rửa giải bằng n-Hexan-Axeton (2:1, v/v) để thu được hợp chất **TBL 7** (8 mg).



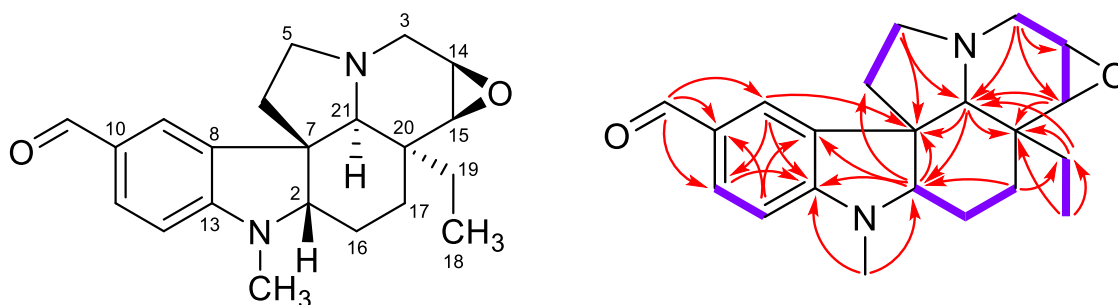
**Hình 3.1.** Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài cây Lài trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour)

Từ phân đoạn con F8.2, hợp chất **TBL 4** (5 mg) được tinh chế bằng HPLC điều chế RP C18, sử dụng 40% Axetonitril trong H<sub>2</sub>O làm pha động. Bằng cách áp dụng phương pháp tương tự, hợp chất **TBL 5** (2 mg) và **TBL 6** (3 mg) được phân lập từ 2 phân đoạn con F8.3.

Phân đoạn con F8.4 được phân tách bằng silica gel CC, rửa giải bằng CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:1, v/v) và được tinh chế thêm bằng HPLC điều chế RP C18, sử dụng Axetonitril 35 % trong H<sub>2</sub>O làm chất rửa giải để phân lập được hợp chất **TBL 2** (2 mg).

### 3.2. Kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

#### 3.2.1. Hợp chất TBL1 (chất mới): Taberbovine A



**Hình 3.2.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ), COSY ( $\blackrightarrow$ ) của **TBL 1**

Hợp chất **TBL 1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng và cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendorff chứng tỏ đây là một hợp chất alkaloid. Phổ khối lượng phân giải cao xuất hiện pic ion giả phân tử tại  $m/z$  339.2078 (tính toán cho CTPT  $C_{21}H_{27}N_2O_2^+$  là 339.2067). Như vậy **TBL 1** có công thức phân tử  $C_{21}H_{26}N_2O_2$  với độ bất bão hòa là 10.

Phổ  $^1H$  NMR xuất hiện tín hiệu của một proton tại độ chuyển dịch  $\delta_H$  9.67 (1H, s) gợi ý cho sự có mặt của một nhóm aldehyde, tín hiệu của một vòng thơm dạng ABX tại [ $\delta_H$  7.58 (d,  $J = 1.5$  Hz, H-9), 7.57 (dd,  $J = 1.5, 8.5$  Hz, H-11) và 6.39 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-12)], một nhóm methyl singlet tại  $\delta_H$  2.89 (s, N-CH<sub>3</sub>) và một nhóm methyl triplet tại  $\delta_H$  0.82 (3H,  $J = 7.5$  Hz, H<sub>3</sub>-18).

Phổ  $^{13}C$  NMR xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử cacbon, kết hợp với phổ HSQC cho phép nhận định trong phân tử bao gồm một nhóm aldehyde tại  $\delta_C$  190.0, 6 cacbon thơm thuộc hệ vòng ABX tại [ $\delta_C$  137.9 (C-8), 135.6 (C-9), 127.0 (C-10), 121.4 (C-11), 104.7 (C-12), 155.1 (C-13)].

Ngoài ra các phân tích phổ còn cho thấy trong phân tử gồm có 2 nhóm methyl, 6 nhóm methylene, 2 cacbon không mang hydro và 4 nhóm methin trong đó có hai nhóm oximethin tại  $\delta_C$  53.0 (C-14), 57.2 (C-15), độ chuyển dịch hóa học của hai nhóm oximethine này gợi ý cho sự xuất hiện của một vòng epoxy, điều này cũng được khẳng định thêm dựa trên tương tác giữa H-14 ( $\delta_H$  3.36) với H-15 ( $\delta_H$  2.99) trên phổ COSY cũng như độ bất bão hòa của phân tử là 10.

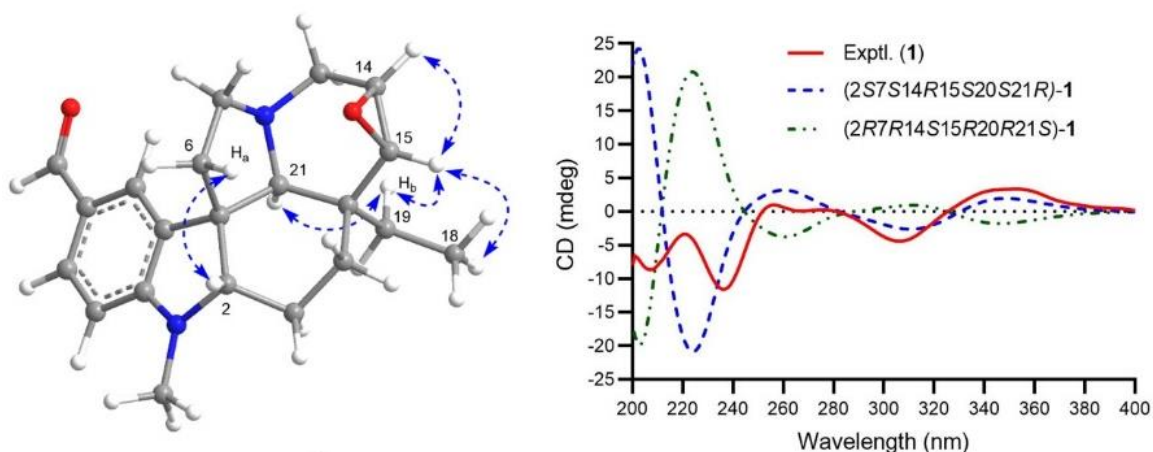
Bên cạnh đó, sự xuất hiện của hai nguyên tử nitơ trong phân tử cũng được nhận định dựa trên độ chuyển dịch hóa học của hai nhóm methine tại  $\delta_C$  74.1 (C-2), 68.3 (C-21), hai nhóm methylene tại  $\delta_C$  53.0 (C-3), 53.6 (C-5) và một nhóm methyl tại  $\delta_C$  31.0 (N-CH<sub>3</sub>). Tiếp tục phân tích phổ HSQC và COSY cho phép xác

định được các phân mảnh C-3/C-14/C-15, C-5/C-6, C-2/C-16/C-17 và C-18/C-19.

So sánh số liệu phổ của **TBL 1** với (-)-mehranine, một alkaloid đã được phân lập từ *Tabernaemontada divaricate* cho thấy hai hợp chất này có sự phù hợp về số liệu phổ tại các vị trí tương ứng, ngoại trừ việc **TBL 1** xuất hiện thêm một nhóm aldehyde tại C-10. Vị trí của nhóm aldehyde cũng được khẳng định dựa trên tương tác HMBC giữa  $\delta_H$  9.67 với C-9, C-10 và C-11 (Hình 3.3). [18]

Cấu hình tương đối của **TBL 1** được xác định dựa trên các tương tác NOESY. Phổ NOESY cho thấy tương tác giữa H-2 với H<sub>a</sub>-6 ( $\delta_H$  2.22) đồng thời H-2 không có tương tác NOE với H-21 ( $\delta_H$  2.32) chứng tỏ H-2 và H<sub>a</sub>-6 cùng thuộc một mặt phẳng và đối diện với mặt phẳng chứa H-21. Tương tác NOE giữa H-21 với H<sub>b</sub>-19, giữa H<sub>b</sub>-19 với H-15 chứng tỏ H-21 và H-15 nằm trên cùng một mặt phẳng. Trên cơ sở các gợi ý về cấu hình tương đối, chúng tôi đã tính toán phổ CD sử dụng phương pháp TD-DFT để chứng minh cấu hình tuyệt đối của **TBL 1**. [19-21]

Kết quả tính toán trên phổ ECD cho thấy cấu hình của **TBL 1** phù hợp với công thức tính toán cho hợp chất 2S7S14R15S20S21R (Hình 3.3). Như vậy hợp chất **TBL 1** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.2). Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là Taberbovine A.



**Hình 3.3.** Tương tác NOESY và phổ ECD của **TBL 1**

**Đặc điểm hóa lý:** Dạng bột màu trắng.  $[\alpha]_D^{25} = -21.3$  ( $c = 0.08$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) 350 (4.14), 248 (3.63) nm; IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu_{\text{max}}$  3331, 2917, 2850, 1672, 1600, 1502, 1452, 1383, 1273, 1179, 1099, 899, 813, 777. ECD (MeOH) mdeg ( $\lambda_{\text{max}}$ ): +3.34 (351), -4.41 (306), +0.98 (256), -11.58 (236) nm.

HRESITOFMS:  $m/z$  339.2078  $[M+H]^+$  (calcd. for  $C_{21}H_{27}N_2O_2^+$ , 339.2067).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz) và  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz): Xem tại Bảng 3.1

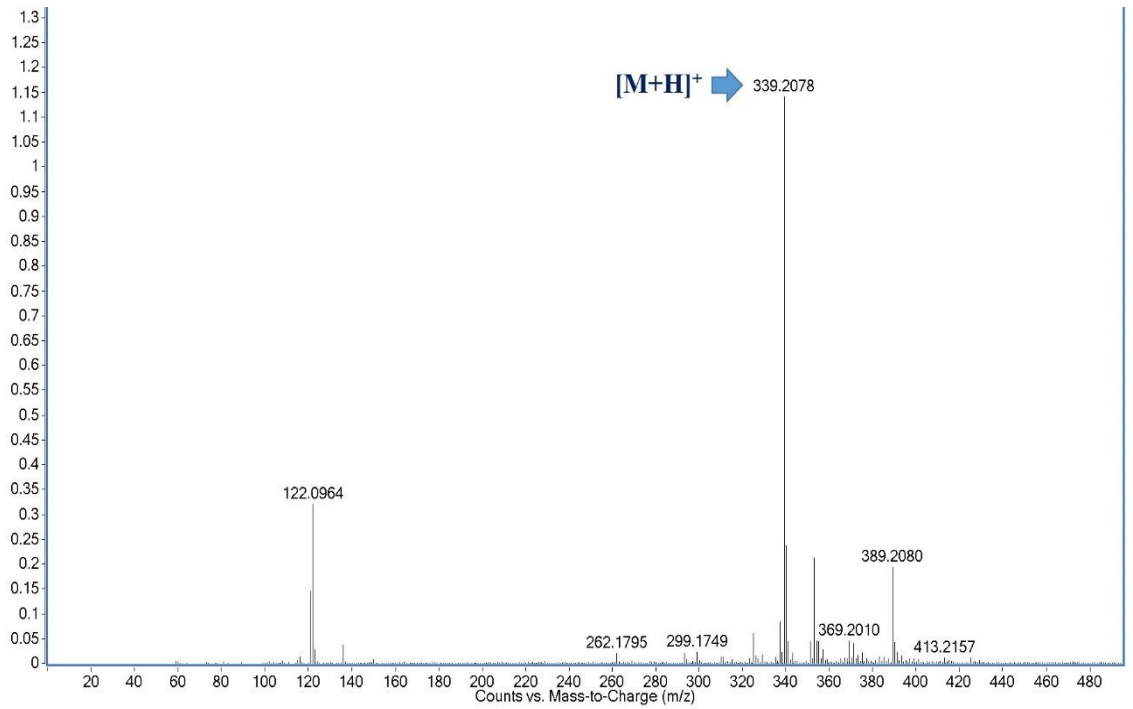
**Bảng 3.1.** Số liệu phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của hợp chất **TBL 1**

Vị trí	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng peak, $J = Hz$ )
2	73.3	74.1	3.49 (dd, 6.0, 10.5)
3	53.1	53.0	3.59 (dd, 1.5, 13.0) 2.40 (br d, 13.0)
5	3.7	53.6	3.18 (m) 2.23 (m)
6	41.1	42.8	2.22 (m) 1.68 (m)
7	51.3	50.6	-
8	136.7	137.9	-
9	121.3	135.6*	7.58 (d, 1.5)
10	117.1	127.0	-
11	127.6	121.4*	7.57 (dd, 1.5, 8.5)
12	106.5	104.7	6.39 (d, 8.5)
13	150.1	155.1	-
14	53.0	53.0	3.36 (br d, 3.5)
15	57.3	57.2	2.99 (d, 4.0)
16	19.9	21.8	1.95 (m) 1.15 (m)
17	23.4	23.2	1.79 (td, 3.0, 14.0) 1.49 (m)
18	7.5	7.4	0.82 (t, 7.5)
19	27.7	28.0	1.30 (dq, 7.5, 15.0) 1.24 (dq, 7.5, 15.0)
20	34.6	34.6	-
21	67.7	68.3	2.32 (br s)
N-CH <sub>3</sub>	31.5	31.0	2.89 (s)
10-CHO		190.0	9.67 (s)

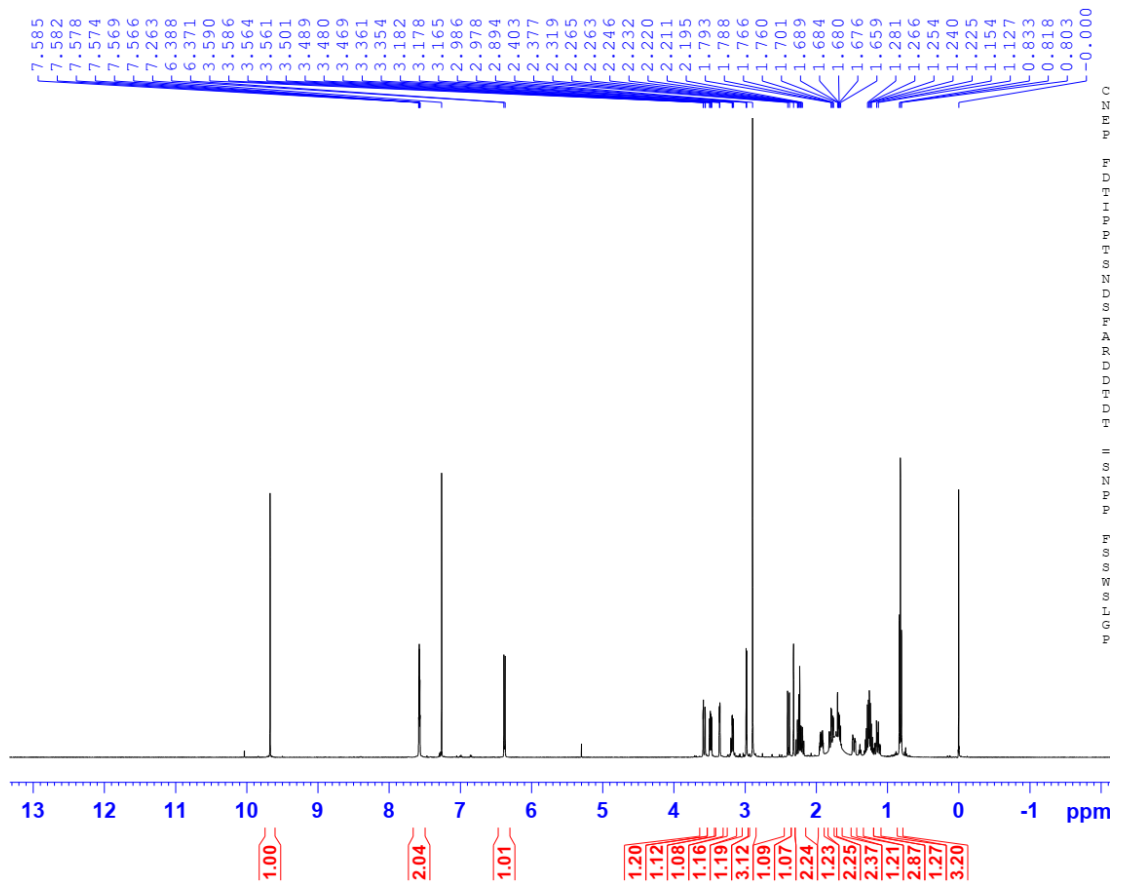
<sup>a</sup> Đo trong  $CDCl_3$ ; <sup>b</sup> 125 MHz; <sup>c</sup> 500 MHz;

\* tín hiệu được xác định bởi phổ 2D NMR

# Số liệu phổ  $^{13}C$  NMR của hợp chất tham khảo (-)-mehranine [22]

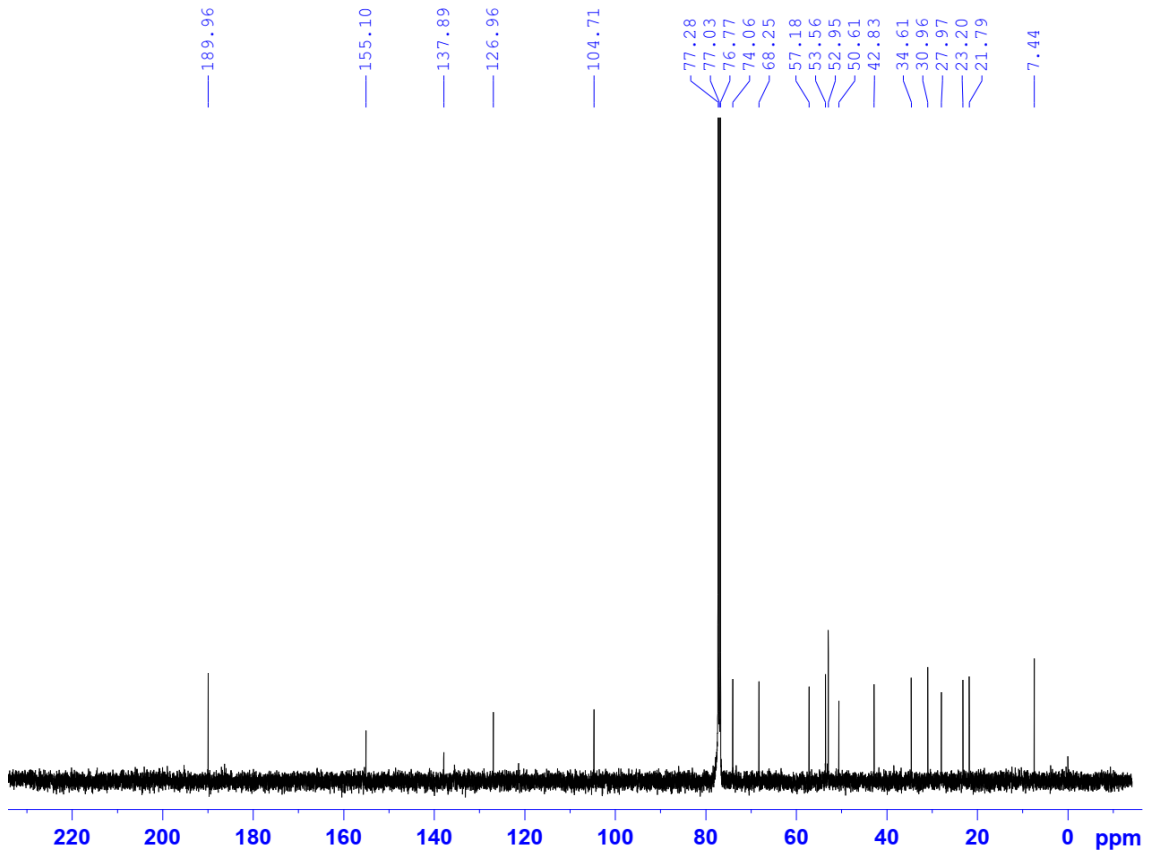


**Hình 3.4.** Phổ HRESITOF của hợp chất **TBL 1**

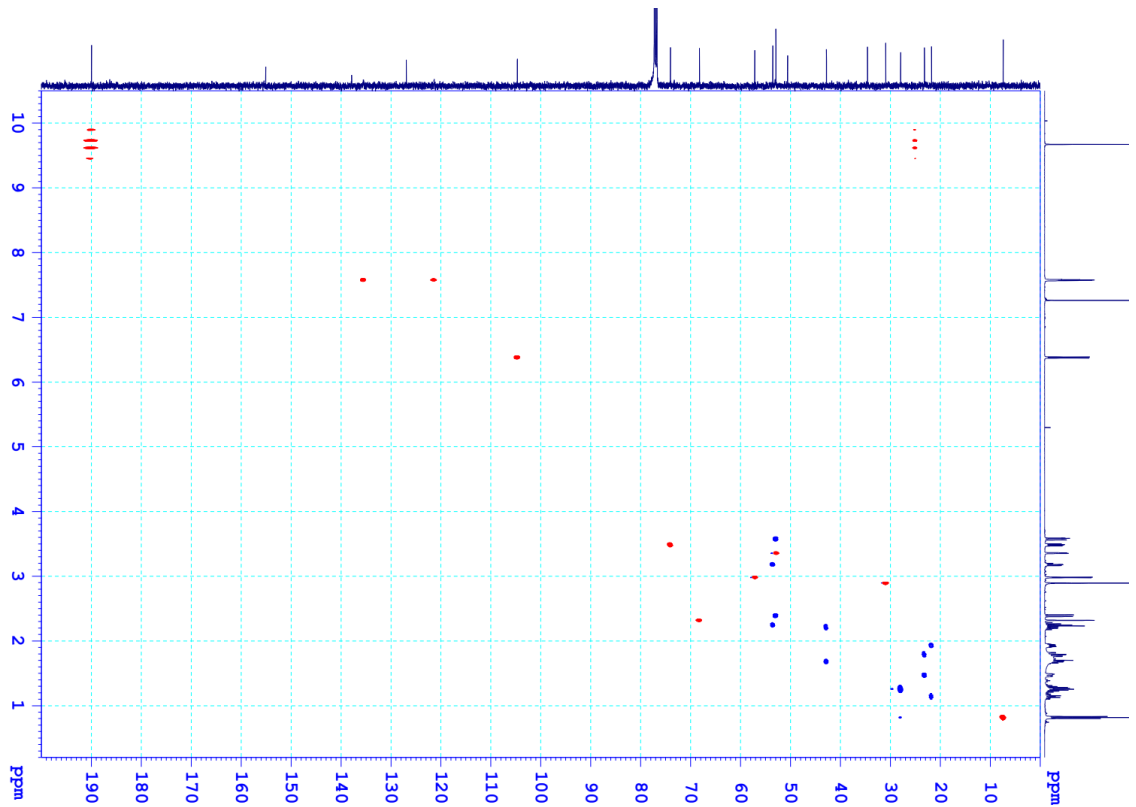


**Hình 3.5.** Phổ  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất **TBL 1**

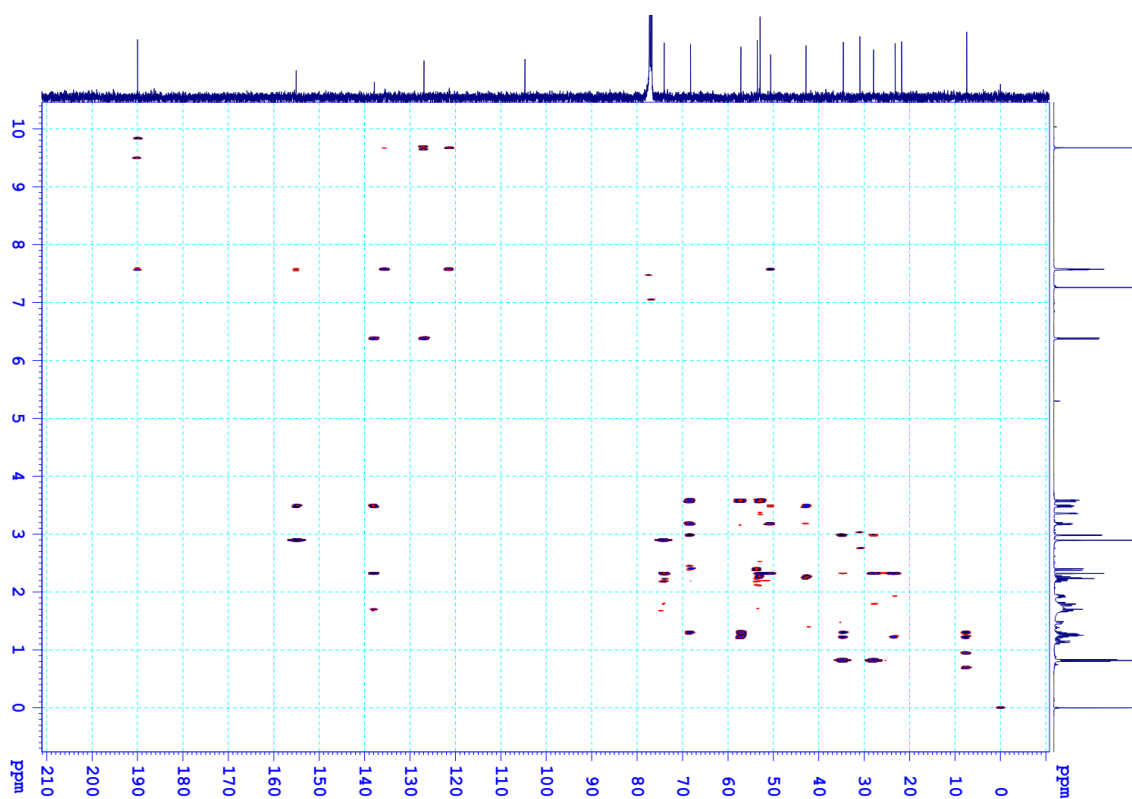




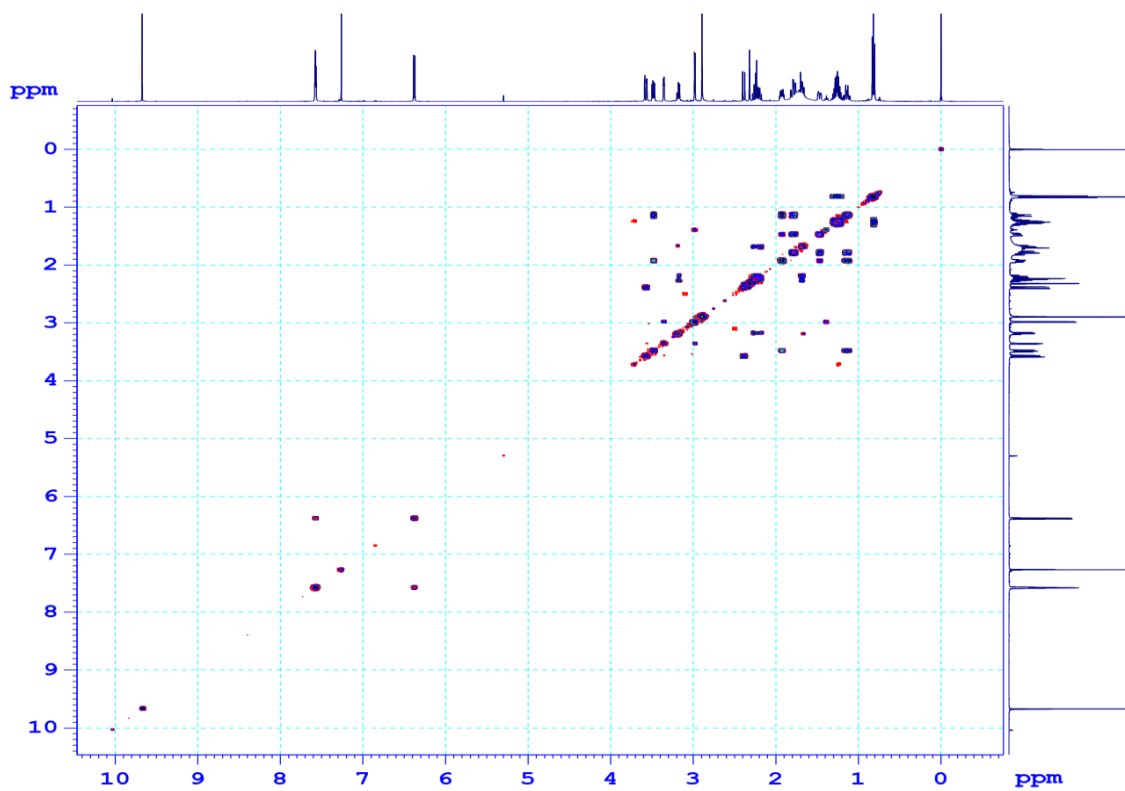
Hình 3.6. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) của hợp chất **TBL 1**



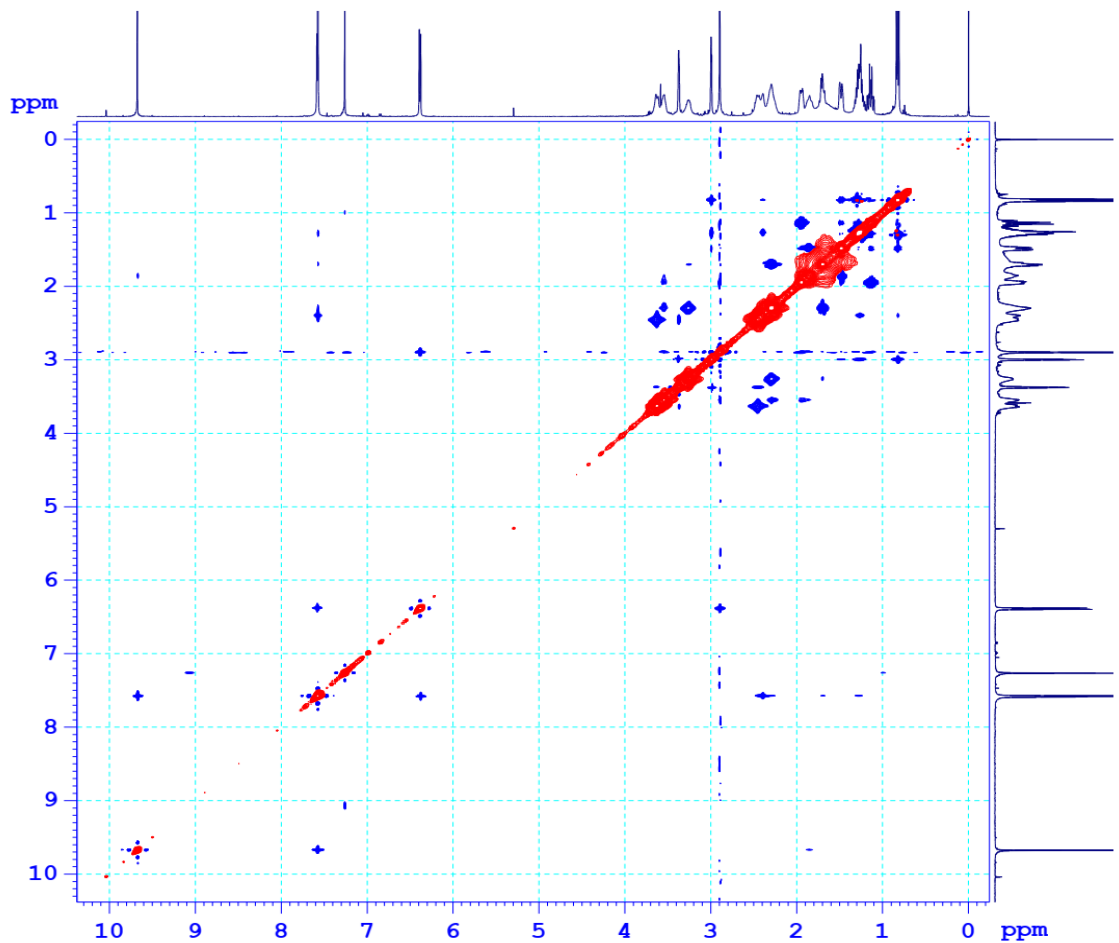
Hình 3.7. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất **TBL 1**



**Hình 3.8.** Phổ HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất **TBL 1**

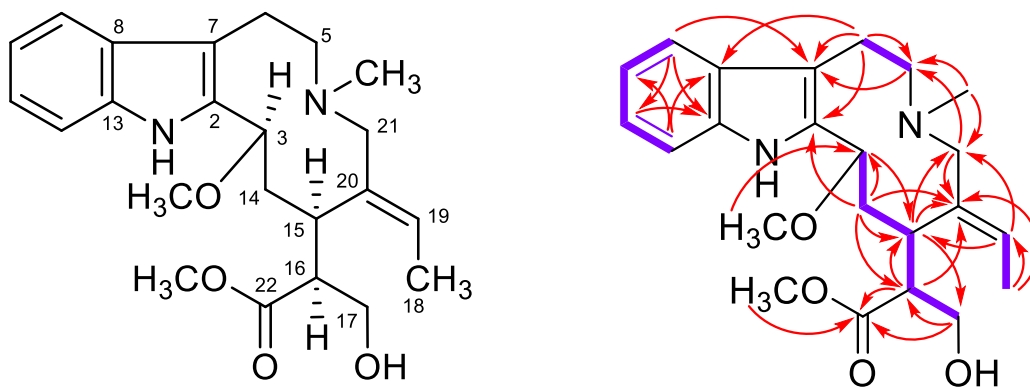


**Hình 3.9.** Phổ COSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất **TBL 1**



**Hình 3.10.** Phổ NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất **TBL 1**

### 3.2.2. Hợp chất **TBL2** (chất mới): Taberbovine B



**Hình 3.11.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ), COSY ( $\text{—}$ ) của **TBL 2**

Hợp chất **TBL 2** thu được dưới dạng chất bột màu trắng và cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendroff chứng tỏ đây là một hợp chất alkaloid.

Công thức phân tử được xác định là  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$  dựa trên sự phân tích phổ khối lượng phân giải cao HRESIMS với sự xuất hiện pic ion giả phân tử tại  $m/z$

401.2438 (tính toán lý thuyết cho hợp chất công thức  $C_{23}H_{32}N_2O_4^+$  là 401.2435). Hợp chất **TBL 2** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.11)

Phổ  $^1H$  NMR xuất hiện tín hiệu của 4 proton thơm thuộc hệ vòng AA'BB' tại  $\delta_H$  7.47 và 7.31 (1H cho mỗi vị trí, d,  $J = 8.0$  Hz, H-9, H-12) và  $\delta_H$  7.07 và 7.13 (1H cho mỗi vị trí, td,  $J = 1.0, 8.0$  Hz, H-10, H-11) gợi ý cho sự xuất hiện của một vòng thơm thế tại vị trí 1,2. Tín hiệu của một proton olefin tại  $\delta_H$  5.62 (q,  $J = 6.5$  Hz, H-19) cho thấy sự có mặt của một nối đôi thế 3 vị trí. Ngoài ra phổ  $^1H$  NMR cũng xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methyl tại  $\delta_H$  1.72 (br d,  $J = 6.5$  Hz, H<sub>3</sub>-18) và 2.10 (s, N-CH<sub>3</sub>) và hai nhóm methoxy tại  $\delta_H$  3.25 và 3.62.

Phổ  $^{13}C$  NMR xuất hiện tín hiệu của 23 nguyên tử cacbon trong đó 10 cacbon được nhận định thuộc nhân indol (bao gồm 6 cacbon thuộc một vòng benzen thế 1,2 và hai cacbon olefin tại  $\delta_C$  136.5 và 108.4). Cùng với đó là một liên kết đôi thế 3 vị trí tại  $\delta_C$  129.5 (C-19) và 136.3 (C-20) : Xem tại Bảng 3.2.

Kết hợp với phân tích phổ HSQC cho thấy 13 cacbon còn lại bao gồm một nhóm methyl ester tại [ $\delta_C$  175.1 và 51.5 (16-COOCH<sub>3</sub>)], 3 nhóm methin, 5 nhóm methylene, hai nhóm methyl và một methoxy. Phổ COSY cho phép xác định các phân mảnh gồm C-3/C-14/C-15/C-16/C-17 và C-9/C-10/C-11/C-12.

So sánh số liệu phổ của **TBL 2** với **TBL 5**, **TBL 6** (hai alkaloid loại *Corynanthe*) cho thấy có sự tương đồng tại các vị trí tương ứng. Sự khác biệt của **TBL 2** là việc xuất hiện một nhóm methyl đính trực tiếp với nguyên tử nitơ tại [ $\delta_H$  2.10 (s)/  $\delta_C$  42.4] và một nhóm methoxy tại [ $\delta_H$  3.25 (s)/  $\delta_C$  57.9 (3-OCH<sub>3</sub>)]. Vị trí của nhóm methyl tại N-4 và nhóm methoxy tại C-3 được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa proton N-methyl ( $\delta_H$  2.10) với C-5, C-21 và proton của nhóm methoxy ( $\delta_H$  3.25) với C-3.

Đây là lần đầu tiên một hợp chất có vòng azecane (tạo thành bởi quá trình mở vòng C/D) của khung *Corythane* được phát hiện từ nguồn gốc tự nhiên. Trên cơ sở các phân tích phổ nêu trên, **TBL 2** là một hợp chất mới và được đặt tên là taberbovinine B. Việc không xuất hiện các tương tác HMBC giữa H<sub>2</sub>-5 và H<sub>2</sub>-21 với C-3, giữa H-3 với C-5, C-21 đã gợi ý rằng vòng C và D đã được sắp xếp lại để tạo thành vòng azecane trong **TBL 2**, điều này cũng phù hợp với công thức phân tử của **TBL 2** (độ bất bão hòa là 9) cũng như việc so sánh với các chất có vòng C/D loại *Corythane* đã được tổng hợp trước đó. [23]

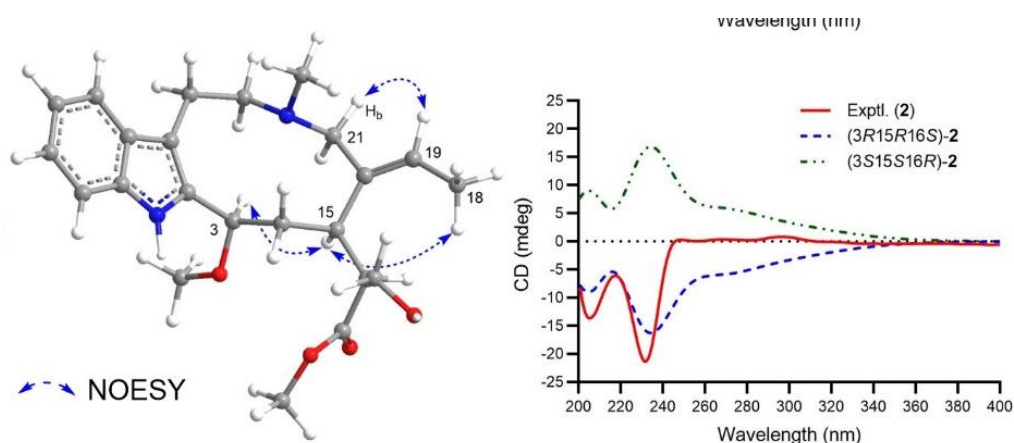
Trên phổ NOESY, tương tác giữa H-3 với H-15 đã chỉ ra rằng hai proton này nằm trên cùng một mặt phẳng. Hơn nữa, tương tác NOE giữa H-19 và H<sub>b</sub>-21, H<sub>3</sub>-18 và H-15 đã chứng minh cấu hình dạng *E* của liên kết đôi. Cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của **TBL 2** được xác định là 3R15R16S dựa trên sự tính toán phổ ECD sử dụng phương pháp TD-DFT. [19-21]

**Bảng 3.2.** Số liệu phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **TBL 2**

Vị trí	δ <sub>C</sub> <sup>#</sup>	δ <sub>C</sub> <sup>a,b</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>a,c</sup> (dạng peak, <i>J</i> = Hz)
2	133.5	136.5	-
3	53.1	76.6	4.50 (d, 7.5)
5	51.2	51.7	3.32 (m) 2.12 (dt, 4.0, 13.0)
6	18.5	23.2	3.17 (m) 2.83 (dt, 4.0, 16.5)
7	107.3	108.4	-
8	127.2	129.8	-
9	118.0	118.0	7.47 (d, 8.0)
10	119.2	118.9	7.07 (td, 1.0, 8.0)
11	121.4	121.3	7.13 (td, 1.0, 8.0)
12	111.0	110.5	7.31 (d, 8.0)
13	138.2	134.7	-
14	29.6	39.5	2.48 (t, 13.0) 1.92 (m)
15	32.9	37.1	3.40 (m)
16	49.1	51.2	2.72 (m)
17	61.6	61.8	3.87 (br s) 3.86 (br s)
18	13.0	13.3	1.72 (br d, 6.5)
19	122.5	129.5	5.62 (q, 6.5)
20	134.5	136.3	-
21	54.6	64.2	3.37 (d, 13.0) 2.63 (d, 13.0)
N-CH <sub>3</sub>		42.4	2.10 (s)
3-OCH <sub>3</sub>		57.9	3.25 (s)
16-COOCH <sub>3</sub>	174.9 51.5	175.1 51.5	3.62 (s)

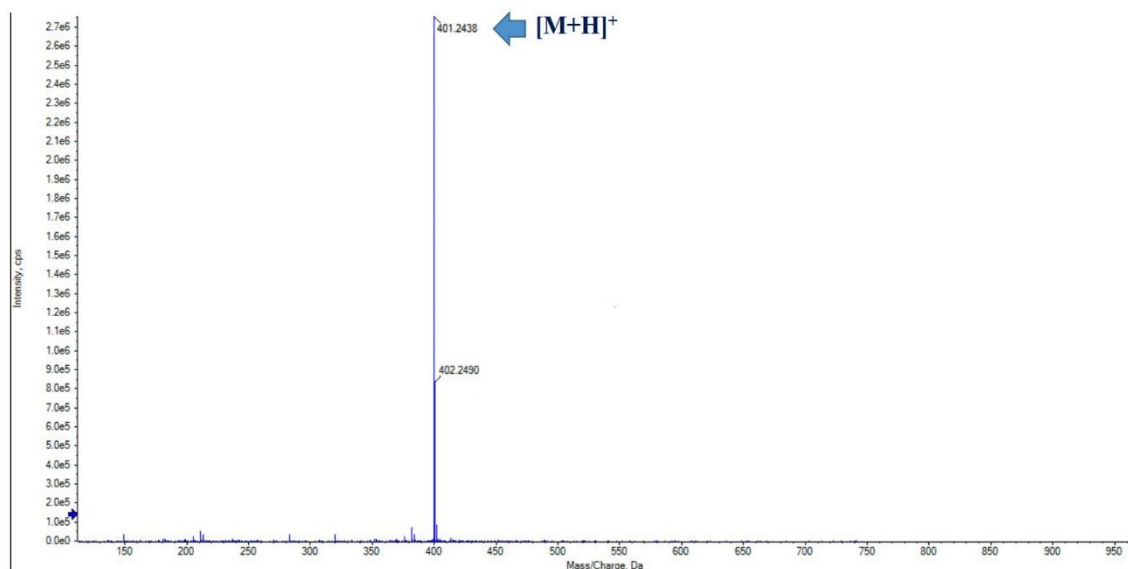
<sup>a</sup> Đo trong CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> 125 MHz; <sup>c</sup> 500 MHz.

<sup>#</sup> Số liệu phổ <sup>13</sup>C NMR của hợp chất tham khảo (16S\*)-*E*-isositsirikine[24]

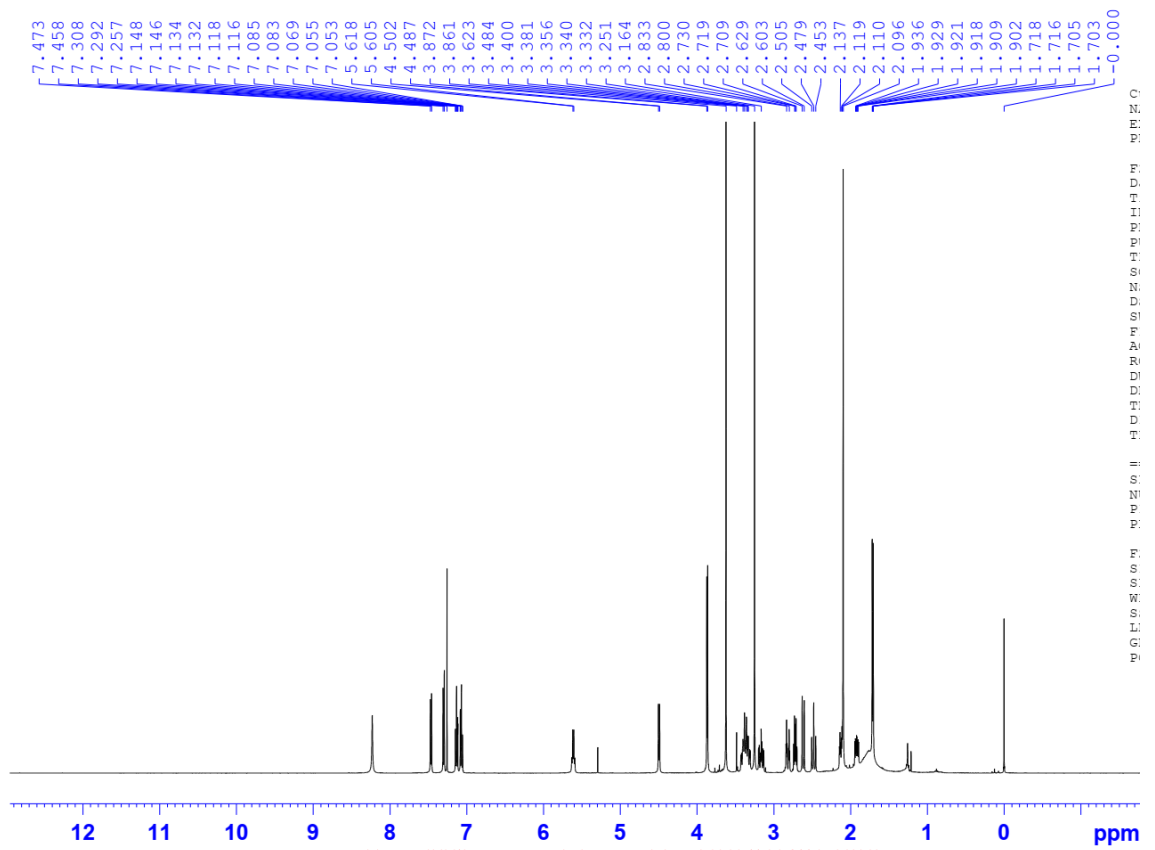


**Hình 3.12.** Tương tác NOESY và phổ ECD của TBL 2

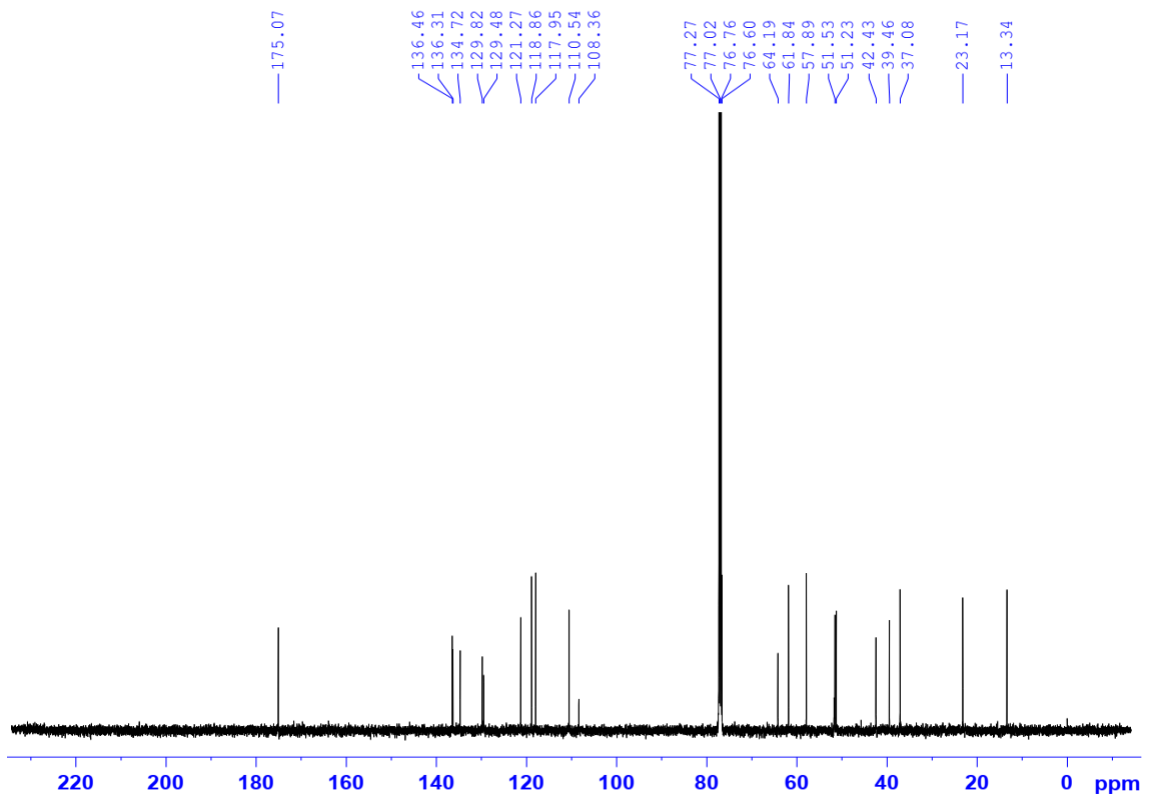
**Đặc điểm hóa lý:** Dạng bột màu trắng.  $[\alpha]_D^{25} = +6.3$  ( $c = 0.09$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) 284 (3.46), 226 (4.12) nm; IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu_{\text{max}}$  3370, 2918, 2850, 1730, 1652, 1459, 1380, 1197, 1095, 925, 835, 744; ECD (MeOH) mdeg ( $\lambda_{\text{max}}$ ):  $-21.37$  (232),  $-13.70$  (205) nm; HRESITOFMS:  $m/z$  401.2438  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4^+$ , 401.2435).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): Xem tại Bảng 3.2



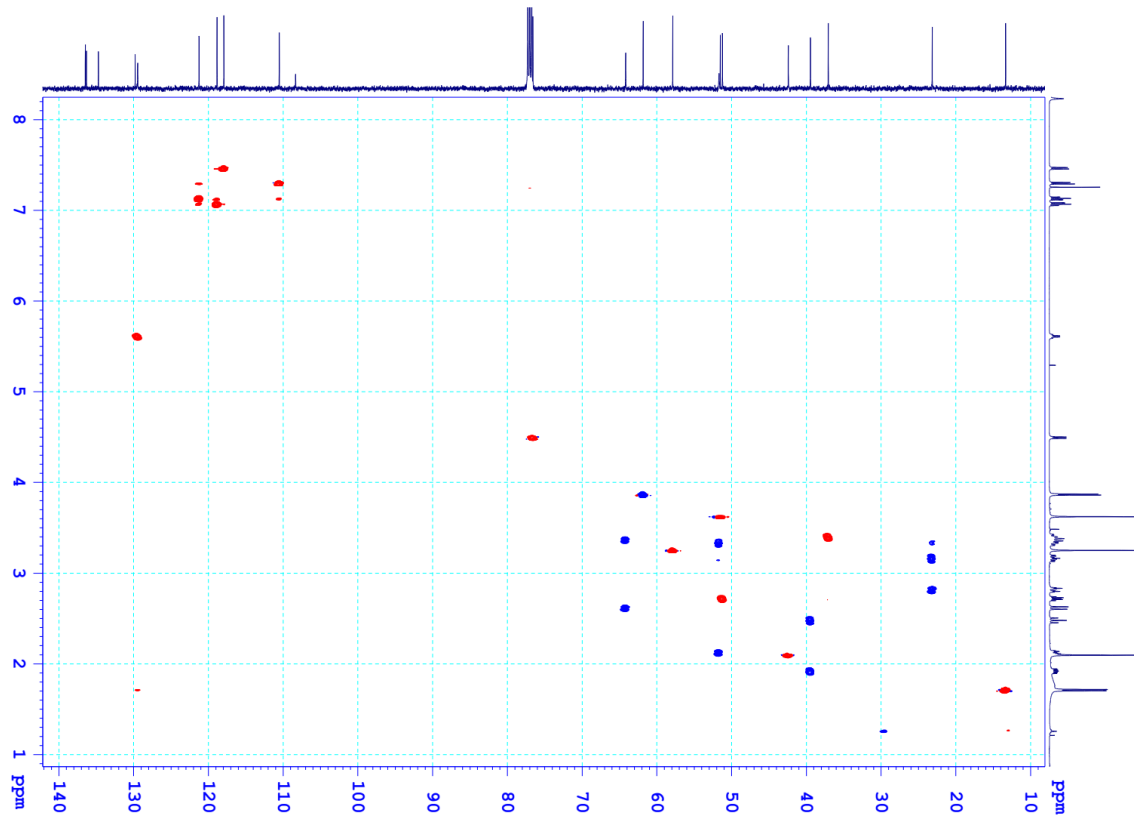
**Hình 3.13.** Phổ HRESITOF của hợp chất TBL 2



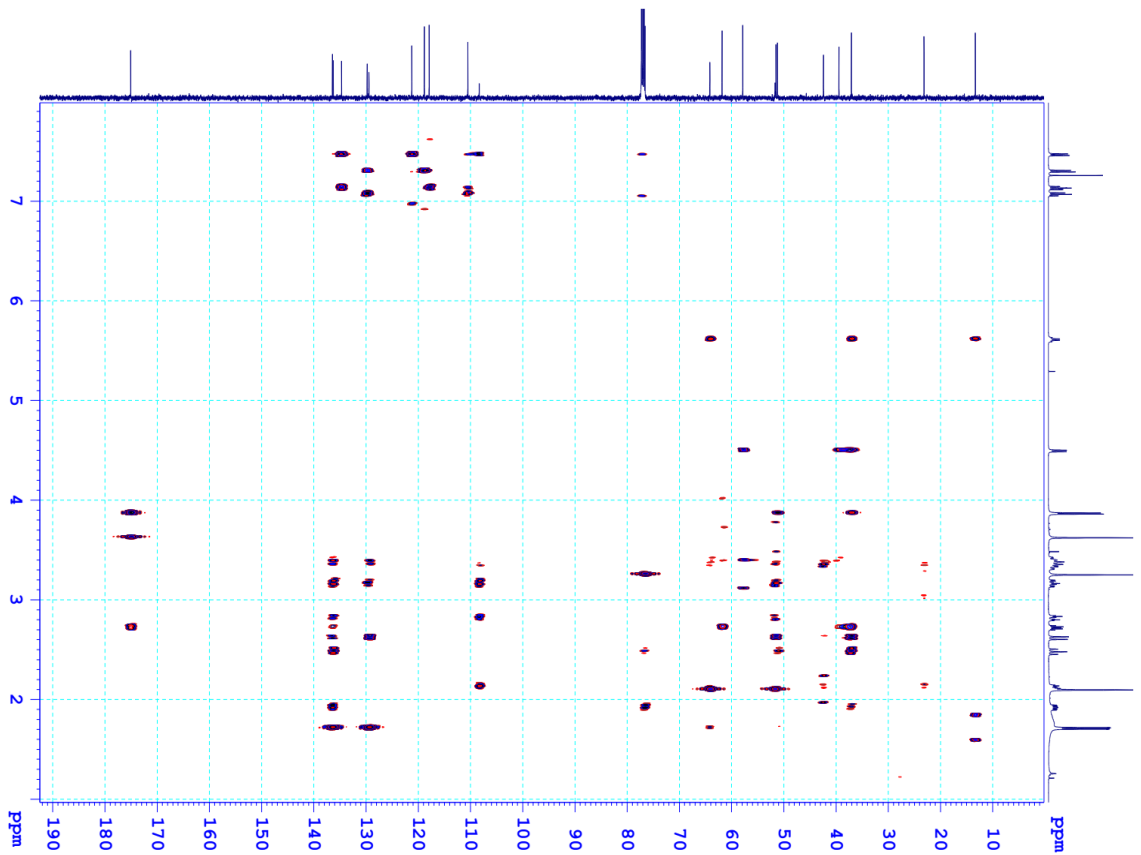
Hình 3.14. Phổ  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) của hợp chất **TBL 2**



Hình 3.15. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) của hợp chất **TBL 2**

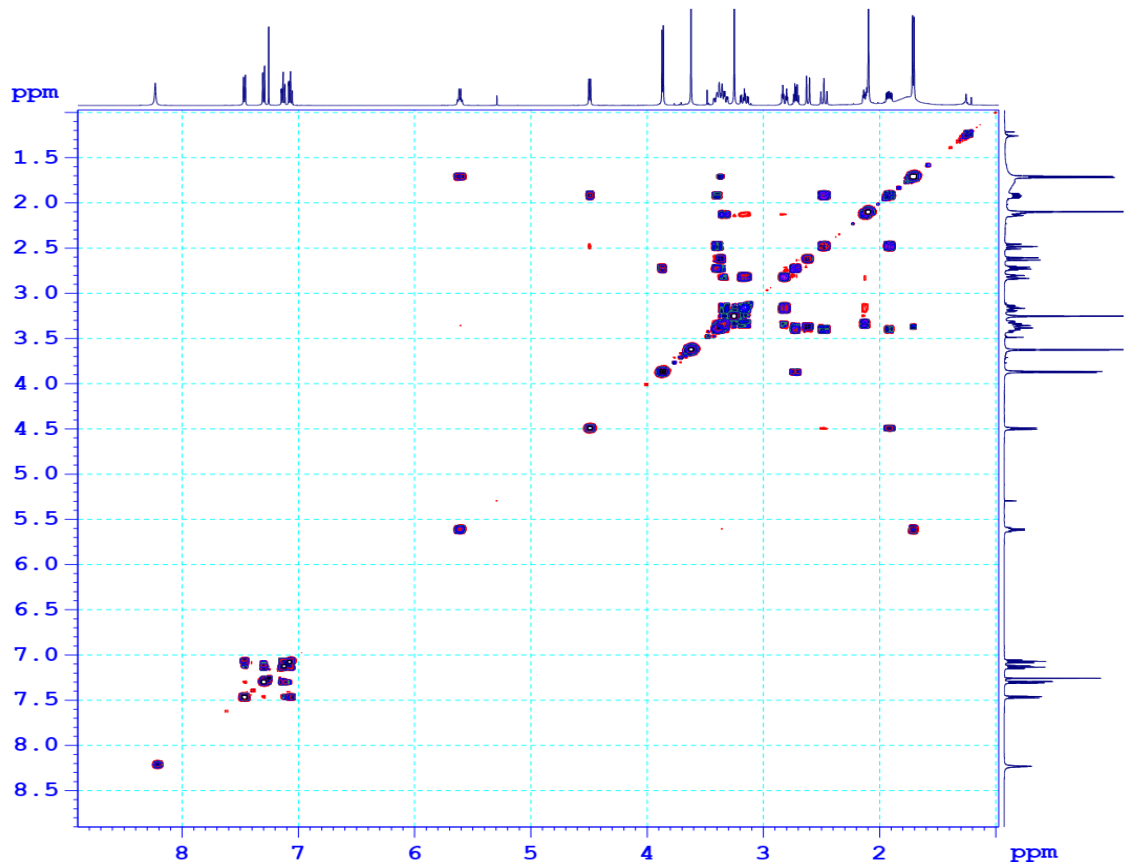


**Hình 3.16.** Phổ HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất **TBL 2**

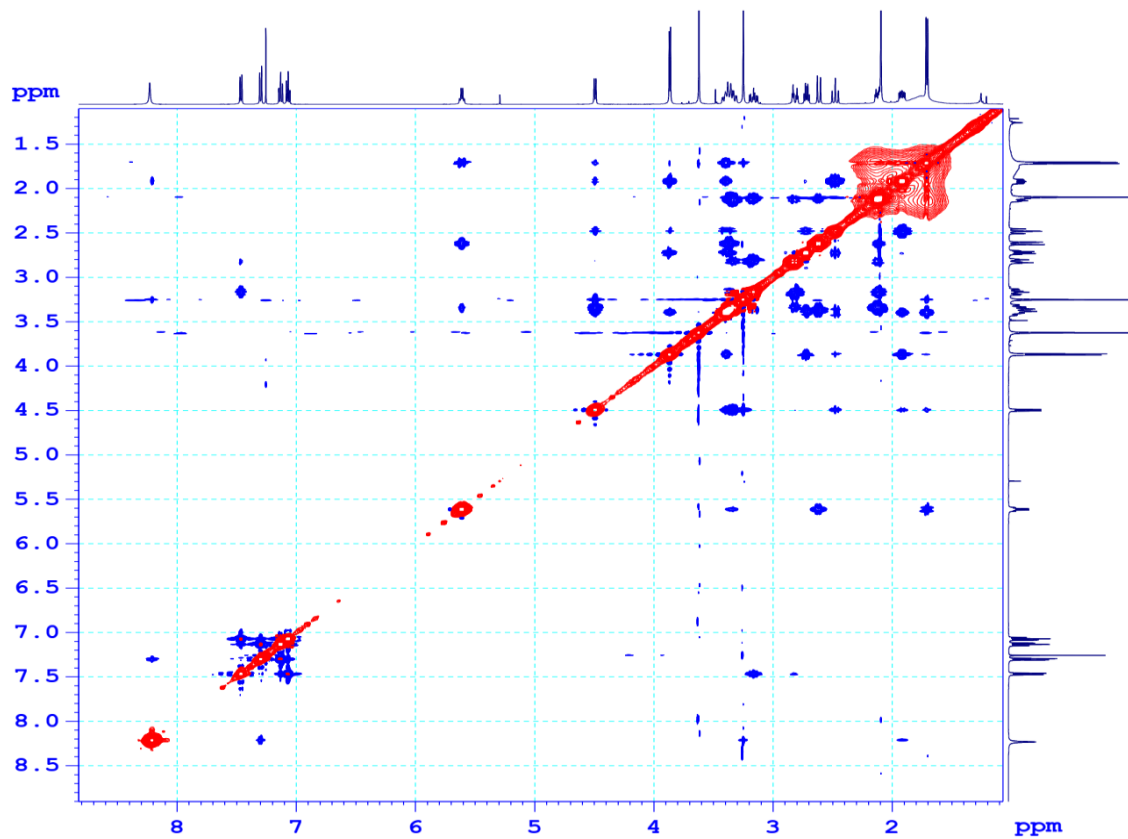


**Hình 3.17.** Phổ HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất **TBL 2**



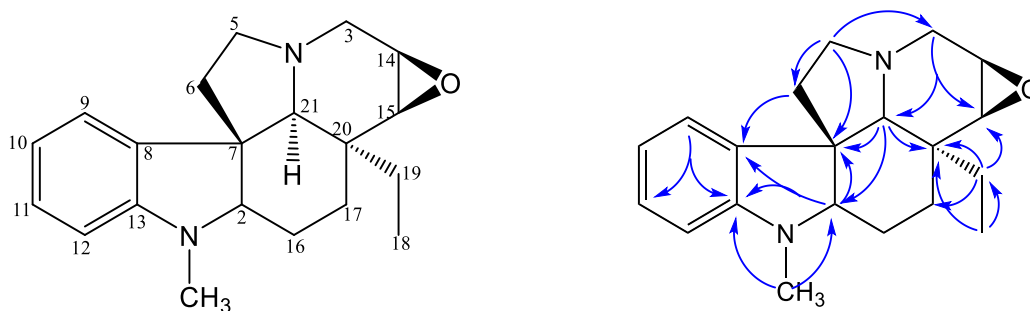


**Hình 3.18.** Phổ COSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất TBL 2



**Hình 3.19.** Phổ NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) của hợp chất TBL 2

### 3.2.3. Hợp chất TBL 3: (-)-Mehranine



**Hình 3.20.** Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của **TBL 3**

Hợp chất **TBL 3** thu được dưới dạng bột màu trắng và cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendroff chứng tỏ đây là một hợp chất alkaloid.

**Bảng 3.3.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL3**

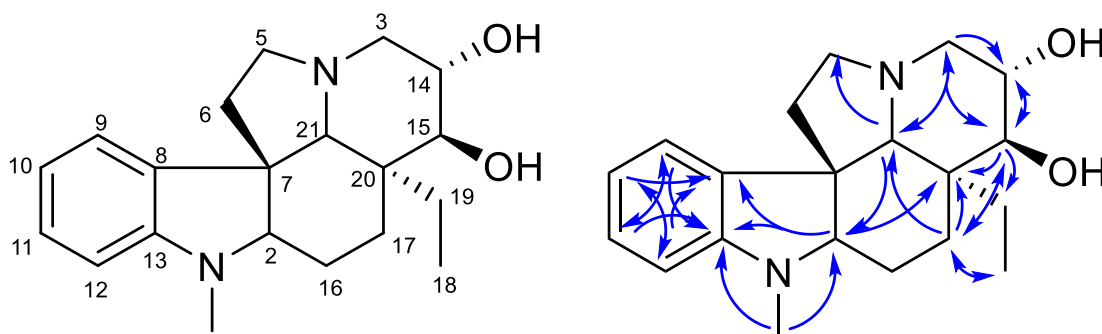
Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	73.3	73.3	3.37	7, 8, 13
3	53.1	53.2	2.37 (d, 13.0) 3.57 (dd, 2.0, 13.0)	5, 15, 21
5	53.7	53.7	2.20 (dd, 9.0, 17.5) 3.18 (dt, 2.0, 8.5)	3, 6, 7
6	41.1	41.2	1.62 (m)    2.28 (m)	8
7	51.3	51.4	-	
8	136.7	136.7	-	
9	121.3	121.4	7.00 (d, 7.0)	11, 13
10	117.1	117.1	6.63 (d t, 1.0, 7.5)	8, 12
11	127.6	127.7	7.07 (dd, 1.0, 7.5)	9, 13
12	106.5	106.5	6.38 (d, 8.0)	
13	150.1	150.2	-	
14	53.0	53.0	3.33	
15	57.3	57.3	2.95 (d, 4.0)	17, 20, 21
16	19.9	20.0	1.13 1.80	
17	23.4	23.5	1.47 1.80	
18	7.5	7.5	0.81 (t, 7.5)	19, 20
19	27.7	27.8	1.27 (m)	15, 17, 20, 21
20	34.6	34.7	-	
21	67.7	67.7	2.25 (s)	2, 5, 7, 15, 17, 19, 20
N-CH <sub>3</sub>	31.5	31.6	2.74 (s)	2, 13

<sup>b</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz,  $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [22]

Phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR của TBL3 là tương tự như **TBL 1**, sự khác biệt duy nhất là vòng benzene của **TBL 3** có dạng AA'BB' (thay vì ABX như **TBL 1**) tại [ $\delta_{\text{C}}$  136.74 (C-8), 121.38 (C-9), 117.10 (C-10), 127.67 (C-11), 106.52 (C-12), 150.15 (C-13)]/ $\delta_{\text{H}}$  7.00 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 6.63 (1H, td,  $J = 1.0, 7.5$  Hz, H-10), 7.07 (1H, dd,  $J = 1.0, 7.5$  Hz, H-11), 6.38 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12)] đồng thời **TBL 3** mất đi tín hiệu của nhóm aldehyde.

So sánh số liệu phổ của **TBL 3** với tài liệu đã công bố có thể khẳng định **TBL 3** chính là (-)-mehranine, một alkaloid đã được phân lập từ *Tabernaemontada divaricata* [22], hợp chất **TBL 3** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.20) và có công thức phân tử  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ : Xem tại Bảng 3.3

### 3.2.4. Hợp chất TBL 4: 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-N-methylaspidospermidine



**Hình 3.21.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của **TBL 4**

Hợp chất **TBL 4** thu được dưới dạng bột màu trắng. Hợp chất **TBL 4** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.21)

Phân tích phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR cho thấy **TBL 4** có cùng dạng khung chất như **TBL 3**, sự khác biệt là ở chỗ có sự mở vòng epoxy tại C-14, C-15: Xem tại Bảng 3.4

Điều này được khẳng định khi hai nhóm oximethin tại C-14, C-15 có độ chuyển dịch lần lượt là 69.84 và 78.55 (thay vì 53.01, 57.30 như ở **TBL 3**). Tương tác HMBC giữa H-3 với C-14, C-15, C-21, giữa H-15 với C-3, C-17, C-19, C-20 cũng khẳng định vị trí của hai nhóm hydroxy tại hai vị trí C-14, C-15. (Hình 3.21)

Ngoài ra các vị trí khác không có sự thay đổi. Như vậy **TBL 4** được xác định là 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-N-methylaspidospermidine và có công thức phân tử  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$

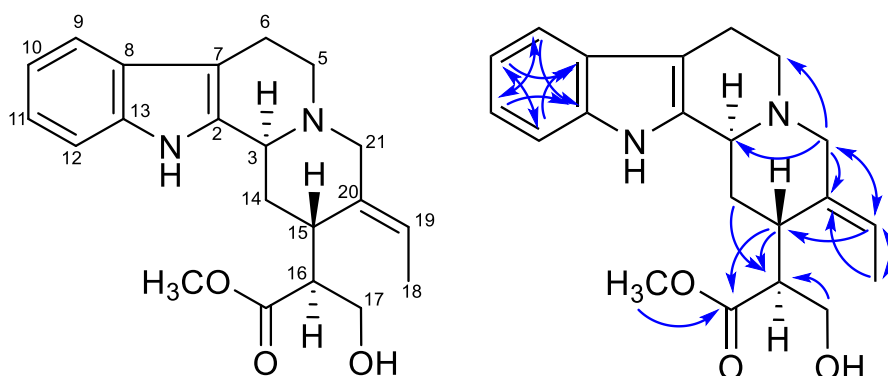
**Bảng 3.4.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 4**

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	71.4	72.74	3.40 (q)	8, 13, 20
3	56.8	58.53	3.14 (m) 2.00 (t,10.5)	14, 21, 15
5	51.8	52.98	3.10 (m) 2.31(m)	7, 21
6	39.5	41.15	2.34 (m) 1.57 (m)	2, 5, 21
7	52.4	53.67	-	
8	135.4	136.93	-	
9	121.6	122.73	7.07 (dd, 1.5, 8.0)	11, 13
10	117.2	118.48	6.63 (dt, 0.5, 7.5)	8, 12
11	127.6	128.69	7.02 (dd, 1.0, 7.5)	9, 13
12	106.6	107.91	6.40 (d, 8.0)	8, 10
13	150.6	151.93	-	
14	69.3	69.84	3.76 (m)	15
15	78.5	78.55	3.36 (d, 1.5)	14, 19, 17, 20,
16	21.1	22.14	1.83 (m) 1.24 (m)	7, 20
17	25.5	26.36	1.40 (m) 1.31 (m)	15, 21, 20, 18
18	8.1	8.42	0.83 (t, 7.5)	17, 20
19	23.1	24.37	1.74 (m) 1.44 (m)	15
20	39.8	40.99	-	
21	66.5	67.91	2.55 (s)	2, 3, 5
N-Me	31.5	31.76	2.75 (s)	2, 13

<sup>b</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz

$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [5]

### 3.2.5. Hợp chất TBL 5: (16*S*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine



**Hình 3.22.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của **TBL 5**

Hợp chất **TBL 5** thu được dưới dạng bột màu trắng. Hợp chất **TBL 5** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.22)

Phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR xuất hiện tín hiệu của một nhân indole bao gồm 6 cacbon thuộc một vòng benzen thế 1,2 tại [ $\delta_{\text{C}}$  127.2 (C-8), 118.1 (C-9), 119.1 (C-10), 121.3 (C-11), 111.2 (C-12), 136.7 (C-13)/ $\delta_{\text{H}}$  7.45 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-9), 7.06 (1H, td,  $J = 1.2, 7.8$  Hz, H-10), 7.11 (1H, td,  $J = 1.2, 7.8$  Hz, H-11), 7.33 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-12)] và hai cacbon olefin tại [ $\delta_{\text{C}}$  134.1 (C-2), 107.6 (C-7)], một nối đôi thế 3 vị trí tại [ $\delta_{\text{C}}$  123.8 (C-19), 132.6 (C-20)/  $\delta_{\text{H}}$  5.53 (1H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-19)], một nhóm methyl ester tại [ $\delta_{\text{C}}$  175.2, 51.8/  $\delta_{\text{H}}$  3.65 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ): Xem tại Bảng 3.5

So sánh số liệu phổ của **TBL5** với tài liệu đã công bố có thể khẳng định hợp chất **TBL5** là (16*S*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine, với công thức phân tử  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ . [24]

**Bảng 3.5.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 5**

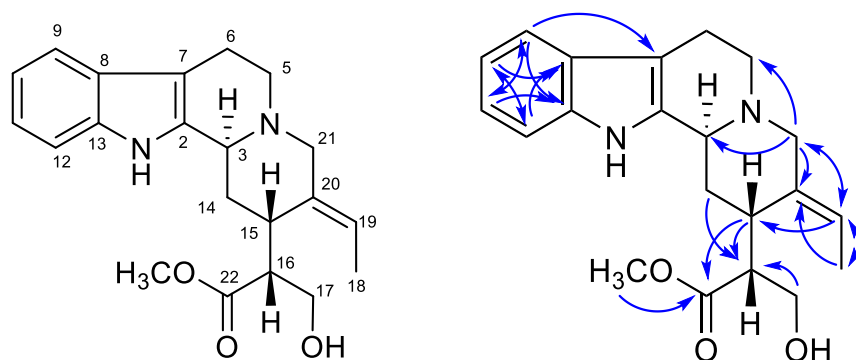
Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (dạng peak, $J =$ Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{d,e}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,f}}$ (dạng peak, $J =$ Hz)	HMBC
2	133.9	134.3	-	134.1	-	
3	54.9	56.7	3.97 (m)	55.4	3.96 (m)	16
5	52.5	53.5	3.23 (m) 2.85 (m)	52.4	3.13 (br d, 10.8) 2.72 (td, 4.8, 10.8)	3, 7
6	21.5	22.0	3.02 (m) 2.82 (m)	21.5	3.02 (m) 2.80 (m)	2
7	108.6	108.1	-	107.6	-	
8	127.3	128.2	-	127.2	-	
9	118.1	118.7	7.42 (d, 8.0)	118.1	7.45 (d, 7.8)	11, 13
10	119.4	119.9	7.00 (td, 1.0, 8.0)	119.1	7.06 (td, 1.2, 7.8)	8, 12
11	121.5	122.3	7.08 (td, 1.0, 8.0)	121.3	7.11 (td, 1.2, 7.8)	9, 13

12	110.8	112.0	7.32 (d, 8.0)	111.2	7.33 (d, 7.8)	8, 10
13	136.0	138.1		136.7		
14	33.2	32.0	2.54 (br d, 14.0) 1.74 (td, 4.5, 14.0)	31.3	2.40 (br d, 13.8) 1.75 (td, 5.4, 13.8)	16
15	33.4	35.2	3.19 (m)	34.2	3.35 (m)	16
16	48.3	50.3	3.22 (m)	48.5	3.10 (m)	C=O
17	62.4	63.1	4.06 (dd, 4.0, 10.5) 3.96 (m)	62.1	3.96 (m) 3.82 (br d, 12.0)	16
18	13.1	13.2	1.65 (dd, 1.5, 6.5)	12.9	1.60 (dd, 1.8, 7.2)	19, 20
19	124.5	125.2	5.59 (q, 7.0)	123.8	5.53 (q, 7.2)	15, 18, 21
20	133.2	135.0		132.6		
21	59.9	61.0	3.52 (br d, 12.0) 3.30 (br d, 12.0)	60.5	3.22 (br d, 12.0) 3.20 (br d, 12.0)	3, 15, 19, 20
16-COOCH <sub>3</sub>	175.1 52.1	175.8 52.0	- 3.66 (s)	175.2 51.8	- 3.65 (s)	C=O C=O

<sup>a</sup>đo trong CD<sub>3</sub>OD; <sup>b</sup> 125 MHz; <sup>c</sup>500 MHz; <sup>d</sup>đo trong CDCl<sub>3</sub>; <sup>e</sup>150 MHz; <sup>f</sup>600 MHz.

$\delta_C^d$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [24]

### 3.2.6. Hợp chất TBL 6: (16*R*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine



**Hình 3.23.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của hợp chất **TBL 6**

Hợp chất **TBL 6** thu được dưới dạng bột màu trắng. Hợp chất này cũng được nhận định là một alkaloid do có phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendroff. Hợp chất **TBL 6** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.23)

**Bảng 3.6.** Số liệu phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **TBL 6**

Vị trí	$\delta_C^a$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H→C)
2	134.0	135.1	-	
3	54.9	56.6	3.82 (br d, 12.0)	7, 15

5	52.0	53.6	3.12 (m) 2.73 (m)	7
6	21.4	22.3	2.99 (m) 2.77 (m)	2
7	108.2	108.3	-	
8	127.2	128.3	-	
9	118.0	118.6	7.40 (d, 8.0)	7, 11, 13
10	119.2	119.8	6.98 (td, 1.5, 8.0)	8, 12
11	121.3	122.0	7.06 (td, 1.5, 8.0)	9, 13
12	110.9	111.9	7.31 (d, 8.0)	8, 10
13	136.1	138.1	-	
14	31.4	32.2	2.49 (br d, 13.5) 1.71 (td, 4.5, 13.5)	16
15	33.4	35.4	3.16 (m)	3, 21
16	47.8	50.4	3.22 (m)	22
17	61.7	63.1	4.07 (dd, 4.5, 11.0) 3.95 (dd, 9.5, 11.0)	15, 22
18	12.8	13.1	1.63 (dd, 1.5, 7.0)	19, 20
19	123.1	124.2	5.55 (q, 7.0)	15, 18, 21
20	134.0	135.8	-	
21	60.2	61.3	3.41 (br d, 12.0) 3.20 (d, 12.0)	3, 15, 19, 20
16-COOCH <sub>3</sub>	175.0 51.6	175.9 51.9	- 3.65 (s)	C=O

<sup>a</sup> Đo trong CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> đo trong CD<sub>3</sub>OD; <sup>b</sup>125 MHz; <sup>c</sup>500 MHz

$\delta_C^a$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [24]

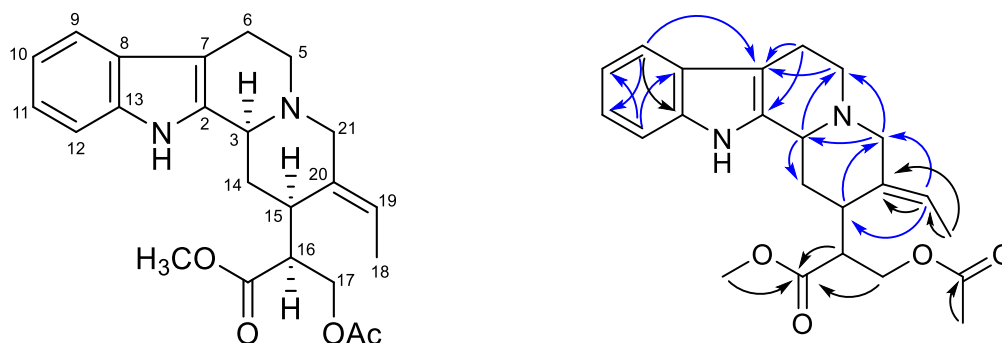
Tiến hành so sánh phổ <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **TBL 6** với các đồng phân indole cho thấy sự phù hợp với 16*R*\*-15-*epi-E*-isositsirikine và 16*S*\*-15-*epi-E*-isositsirikine (đặc biệt ở vị trí C-21 là  $\delta_C$  61.3 ppm, trong khi các cấu hình còn lại chỉ có độ dịch chuyển hóa học ở vị trí C-21 cao nhất là  $\delta_C$  55.6 ppm). [24]

Tiến hành so sánh phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C của hợp chất **TBL 6** với **TBL 5** và với 2 đồng phân 16*R*\* và 16*S*\* cho thấy sự phù hợp giữa các số liệu phổ của **TBL 6** với đồng phân 16*R*\*, đặc biệt là vị trí nối đôi C-19. Xem tại Bảng 3.6

Với các dữ kiện phổ thu được, hợp chất **TBL 6** được xác định là (16*R*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine, với công thức phân tử C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Đáng chú ý, là đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Tabernaemontana*.

### 3.2.7. Hợp chất TBL 7: 16*R*\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate



**Hình 3.24.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của hợp chất **TBL 7**

Hợp chất **TBL 7** thu được dưới dạng bột màu trắng. Hợp chất này cũng là một alkaloid do có phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendroff. Hợp chất **TBL 7** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.24).

Tiến hành so sánh phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 7** với các dữ kiện phổ của hợp chất **TBL 5**, **TBL 6** cho thấy khá tương đồng, ngoại trừ sự khác biệt rõ ràng ở một số vị trí như C-6, C-14, C-15, C-17, C-20, C-21; điều này cho gợi ý hợp chất **TBL 7** là một đồng phân của **TBL 5** và **TBL 6**. Xem tại Bảng 3.7

Tiếp tục tiến hành so sánh số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của **TBL 7** với hợp chất 16*R*\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate đã biết cho thấy sự phù hợp hoàn toàn và cấu trúc của **TBL 7** được khẳng định bởi các phân tích phổ HSQC và HMBC. Như vậy, hợp chất **TBL 7** được xác định là 16*R*\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate, với công thức phân tử  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ . [24]

Đáng chú ý, là đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Tabernaemontana*.

**Bảng 3.7.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 7**

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC(H→C)
2	133.4	133.0	-	
3	52.7	52.9	4.34 (br s)	14, 5
5	52.1	53.8	3.89 (m) 3.20 (m)	7
6	17.7	18.1	2.99 (m) 2.72 (m)	2, 7
7	107.9	106.9	-	
8	127.7	127.1	-	
9	118.0	118.1	7.44 (d, 7.5)	7, 11, 13

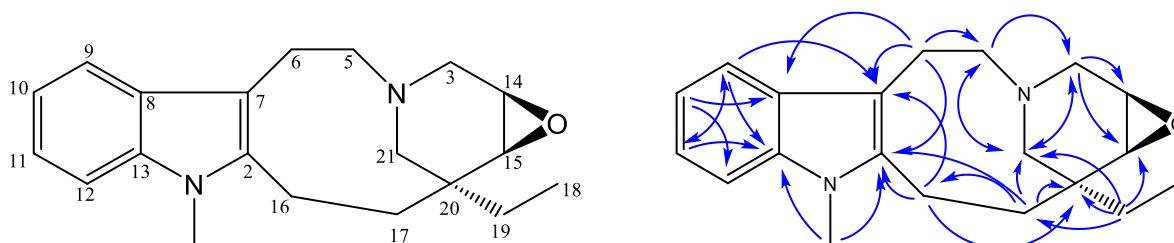


10	119.5	119.6	7.08 (m)	8, 12
11	121.6	121.7	7.13 (m)	9, 13
12	111.3	111.3	7.31 (d, 24)	8, 10
13	136.2	136.6	-	
14	30.1	29.2	2.49 (m) 2.30 (m)	16
15	32.4	32.8	3.22 (m)	21
16	46.2	49.1	2.50 (m)	C=O
17	63.6	61.8	3.90 (m)	15, Ac
18	13.3	13.1	1.60 (dd, 1.5, 7.0)	19, 20
19	123.9	124.3	5.57 (dd, 6.5, 13.5)	15, 20, 21
20	133.4	132.3	-	
21	51.4	50.6	3.22 (br s) 3.01 (br s)	3, 5
OCH <sub>3</sub>	52.3	51.5	3.50 (s)	C=O
16-C=O	174.4	174.6	-	
17-OAc	170.4	177.5	-	
	20.8	23.3	2.01 (s)	C=O

<sup>b</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz

$\delta_C^a$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [25]

### 3.2.8. Hợp chất TBL8: Hecubine



**Hình 3.25.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của hợp chất **TBL 8**

Hợp chất **TBL 8** có dạng bột màu trắng, cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendorff. Hợp chất **TBL 8** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.25).

Trên phổ <sup>13</sup>C NMR xuất hiện tín hiệu của một nhân indole bao gồm 6 carbon thuộc một vòng benzen thế 1,2 tại [ $\delta_C$  127.7 (C-8), 117.6 (C-9), 118.5 (C-10), 120.2 (C-11), 108.5 (C-12), 136.9 (C-13)] và hai carbon olefin tại [ $\delta_C$  140.8 (C-2) và 109.2 (C-7)]. Bên cạnh đó, 3 carbon methylene liên kết với nito tại 53.8 (C-3), 53.5 (C-5), và 58.0 (C-21), cùng với 2 carbon methine liên kết với oxy của 1 vòng epoxy [52.4 (C-14) và 59.4 (C-15)] cũng được ghi nhận.

Ngoài ra, phổ  $^{13}\text{C}$  NMR còn ghi nhận 4 nhóm  $\text{CH}_2$  và 2 nhóm  $\text{CH}_3$  tại 7.5 (C-18) và 30.0 (N- $\text{CH}_3$ ). So sánh số liệu phổ của **TBL 8** với hợp chất indole đã biết là hecubine cho kết quả hoàn toàn phù hợp : Xem tại Bảng 3.8 [26]

Điều này được khẳng định bởi chi tiết các tương tác trên phổ NMR 2 chiều, bao gồm HSQC và HMBC (Hình 3.25). Như vậy, hợp chất **TBL 8** được khẳng định là hecubine, với công thức phân tử:  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ .

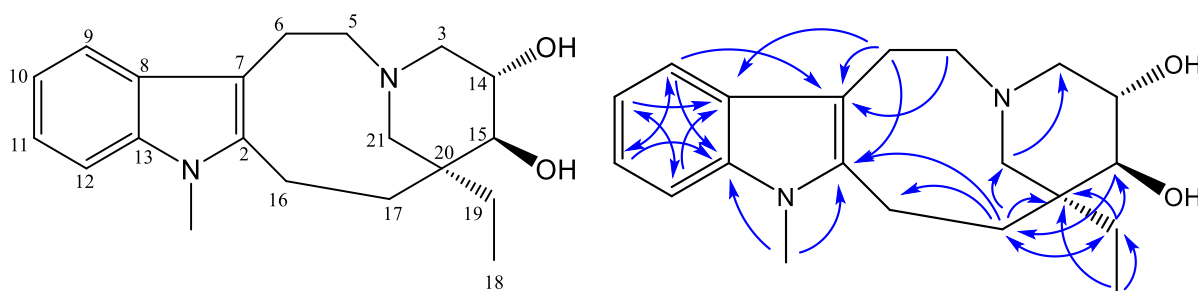
**Bảng 3.8.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 8**

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	140.8	140.8	-	
3	58.1	53.8	2.66 (d, 12.0) 3.26 (d, 12.0)	14, 15, 21
5	53.5	53.5	2.36 (m) 2.60 (m)	3, 21
6	26.3	26.3	2.85 (m)	2, 5, 7, 8
7	108.5	109.2	-	
8	127.7	127.7	-	
9	117.6	117.6	7.44 (d, 8.0)	7, 11, 13
10	118.5	118.5	7.05 (t, 8.5)	8, 12
11	120.2	120.2	7.13 (t, 8.5)	9, 13
12	109.2	108.5	7.24 (d, 8.5)	8, 10
13	136.8	136.9	-	
14	52.4	52.4	3.13 (d, 3.5)	20
15	59.4	59.4	2.92 (m)	3, 19
16	20.9	20.9	2.77 (dd, 7.5, 14.5) 4.20 m	2, 7, 20
17	32.4	35.2	1.67 (m) 2.20 (m)	2, 15, 16, 20, 21
18	7.4	7.5	0.77 (t, 7.5)	19, 20
19	35.2	32.4	1.13 (m)	15, 17, 20, 21
20	33.7	33.8	-	
21	53.8	58.0	1.74 (d, 12.0) 2.50 (d, 12.0)	3, 5, 15, 20
N- $\text{CH}_3$	30.0	30.0	3.69 (s)	2, 13

<sup>b</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz

$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [26]

### 3.2.9. Hợp chất TBL 9: Voafinidine



**Hình 3.26.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của hợp chất **TBL 9**

Hợp chất **TBL 9** có dạng bột màu trắng. So sánh số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của **TBL 9** với **TBL 8** thấy khá tương đồng, ngoại trừ sự dịch chuyển về trường thấp của 2 vị trí C-14 (70.9) và C-15 (81.0) cho thấy có sự mở vòng epoxy ở hợp chất **TBL 9** : Xem tại Bảng 3.9

**Bảng 3.9.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **TBL 9**

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H→C)
2	141.4	141.5	-	
3	60.0	60.1	2.21 (t, 10.0) 2.66 (m)	15, 21
5	53.0	53.1	2.31 (m) 2.55 (m)	7
6	22.7	22.8	2.89 (m)	2, 7, 8
7	107.8	107.9	-	
8	127.3	127.4	-	
9	117.2	117.3	7.46 (d, 7.5)	7, 11, 13
10	118.4	118.4	7.05 dt, 1.0, 8.0)	8, 12
11	120.0	120.1	7.13 (dt, 1.0, 8.5)	9, 13
12	108.6	108.6	7.25 (d, 9.0)	8, 10
13	136.2	136.3	-	
14	70.7	70.9	3.50 (m)	20
15	80.8	81.0	3.19 (dd, 3.5, 8.5)	17
16	18.6	18.7	2.70 (m) 2.85 (m)	7, 20
17	31.6	31.7	1.77 (m)	2, 16, 19, 20, 21
18	8.4	8.5	0.93 (t, 7.5)	19, 20
19	29.4	29.5	1.40 (dd, 7.5, 14.0) 1.60 (dd, 7.5, 14.0)	15, 17, 20, 21
20	42.5	42.5	-	
21	53.0	53.2	1.67 (d, 12.5) 3.35 (dd, 2.0, 12.5)	3
N-CH <sub>3</sub>	29.5	29.5	3.65 (s)	2, 13

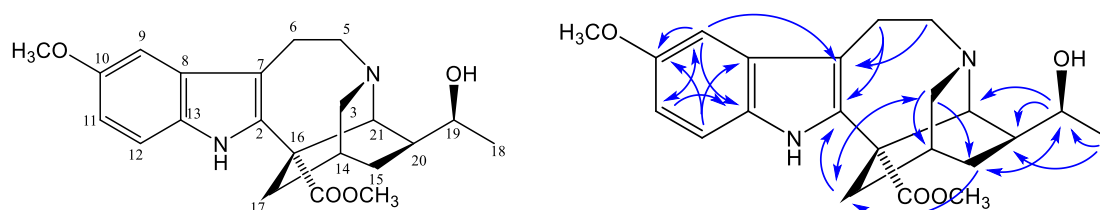
<sup>b</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz

$\delta_C^a$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [27]

Điều này được khẳng định bằng sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh số liệu phổ của **TBL 9** với hợp chất đã biết voafinidine và các phân tích phổ HSQC và HMBC (Hình 3.26) [27]

Như vậy, hợp chất **TBL 9** được xác định là voafinidine, với công thức phân tử C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.2.10. Hợp chất TBL10: Voacangarine



**Hình 3.27.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC(→) của hợp chất **TBL 10**

Hợp chất **TBL 10** có dạng bột màu trắng, cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendroff. Hợp chất **TBL 10** được thể hiện như hình vẽ (Hình 3.27)

**Bảng 3.10.** Số liệu phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **TBL 10**

Vị trí	$\delta_C^a$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ (dạng peak, $J = \text{Hz}$ )	HMBC (H→C)
2	138.0	136.6	-	
3	53.1	50.8	2.81 (m) 3.00 (m)	14, 15, 17
5	52.0	52.0	3.15 (m) 3.44 (m)	7
6	22.2	21.7	3.12 (m) 3.16 (m)	2, 7
7	110.7	109.6	-	
8	129.5	128.9	-	
9	102.1	100.8	6.91 (d, 2.0)	7, 10, 11, 13
10	155.5	154.1	-	
11	113.2	112.3	6.82 (dd, 2.5, 8.0)	9, 13
12	112.2	111.3	7.14 (d, 8.5)	8, 10
13	132.2	130.7	-	
14	27.5	27.0	2.00 (m)	
15	23.7	28.6	1.77 (m) 1.84 (m)	17, 19, 20
16	55.0	53.9		

17	37.7	36.7	1.95 (m) 2.58 (m)	2, 3
18	20.9	22.2	1.28 (d, 6.0)	19, 20
19	72.1	70.8	3.90 (dd, 2.0, 6.0)	15, 20, 21
20	40.6	40.0	1.41 (m)	15
21	60.5	54.2	4.09 (br s)	2, 3, 5, 15, 16, 17, 20
C=O	176.3	174.9	-	3
COO-CH <sub>3</sub>	53.3	52.8	3.72 (s)	C=O
10-OCH <sub>3</sub>	56.8	56.0	3.84 (s)	10

, <sup>b</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz

$\delta_c^a$  Số liệu phổ của hợp chất tham khảo [28]

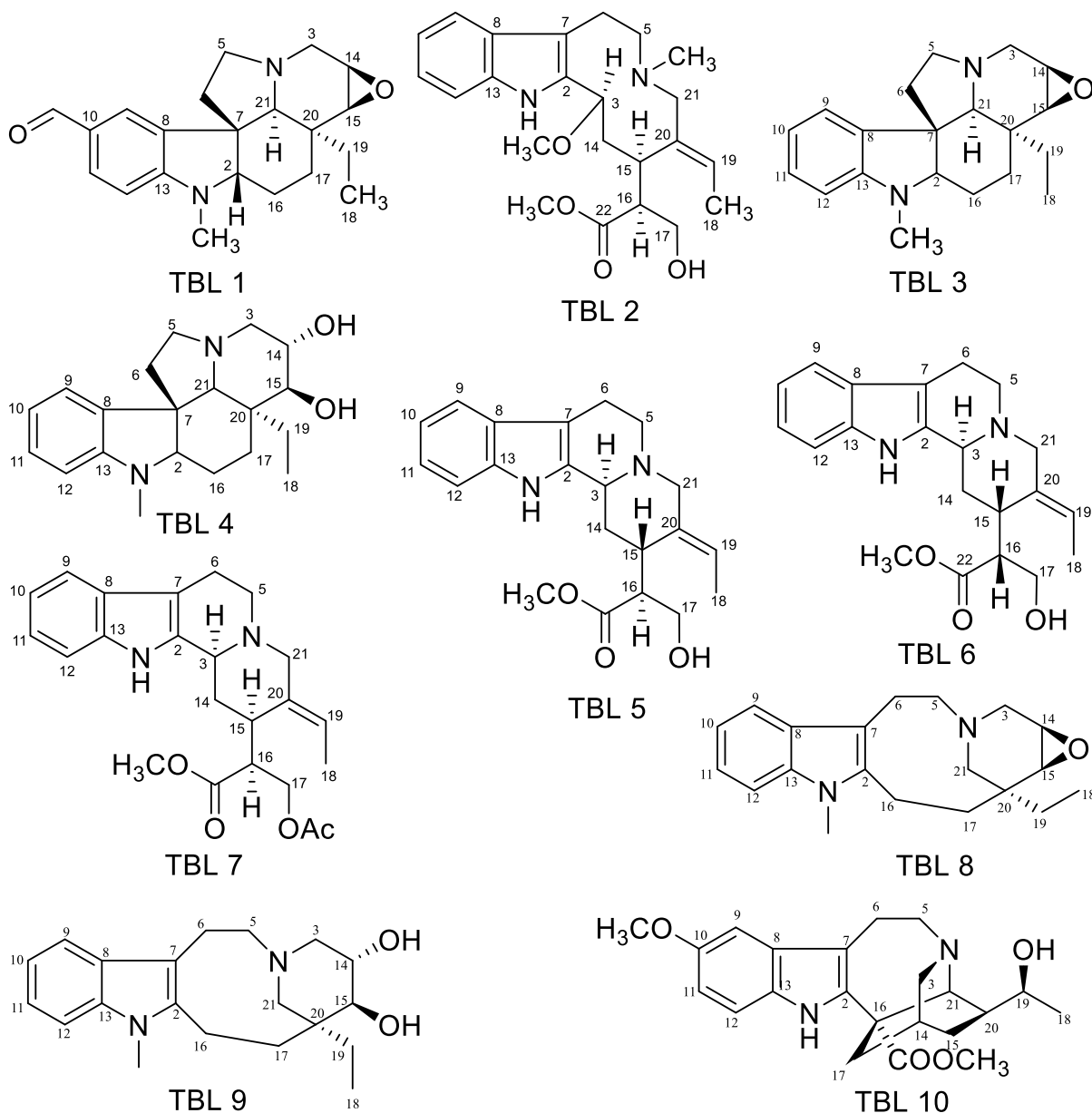
Trên phổ <sup>1</sup>H NMR xuất hiện tín hiệu của một vòng thơm hệ spin ABX, 2 nhóm methoxy tại 3.72 (s) và 3.84 (s), và một nhóm methyl bậc 2 tại 1.28 (d, 6.0).

Phân tích phổ <sup>13</sup>C NMR và HSQC cho thấy sự xuất hiện của 22 tín hiệu cacbon, bao gồm các tín hiệu đặc trưng của một nhân indole, tín hiệu của 4 cacbon methylene [trong đó có 2 cacbon liên kết với nito tại 50.8 (C-3) và 52.0 (C-5)], 4 cacbon methine [trong đó có một nhóm liên kết với oxy tại 70.8 (C-19) và một nhóm liên kết với nito tại 54.2 (C-21)], và một nhóm methyl ester tại 174.9 và 52.8. Tiến hành so sánh số liệu phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **TBL 10** với hợp chất indole đã biết voacangarine cho kết quả hoàn toàn tương đồng. Hơn nữa, phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC giúp khẳng định sự quy kết các vị trí của hợp chất này.

Cuối cùng, hợp chất **TBL 10** được xác định là voacangarine, với công thức phân tử C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: Xem tại Bảng 3.10

### 3.2.11. Tổng hợp kết quả xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

Bằng các phương pháp phân tích phổ NMR, phổ MS, phổ ECD và so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của các hợp chất được xác định như sau: taberbovine A (**TBL 1**), taberbovine B (**TBL 2**), (-)-mehranine (**TBL 3**), 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-*N*-methylaspidospermidine (**TBL 4**), (16*S*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 5**), (16*R*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 6**), 16*R*\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate (**TBL 7**), hecubine (**TBL 8**), voafinidine (**TBL 9**), và voacangarine (**TBL 10**) (Hình 3.29).



**Hình 3.28.** Cấu trúc hóa học của các hợp chất TBL 1 – TBL 10 phân lập được từ cây *T. bovinia*

### 3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất

Tất cả các hợp chất **TBL 1-TBL 10** được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào đối với năm dòng tế bào ung thư người, bao gồm: phổi (SK-LU-1), gan (Hep-G2), vú (MCF-7), da (SK-Mel-2) và tiền liệt tuyến (LNCaP) bằng phương pháp SRB.

Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào cho thấy 2 hợp chất taberbovine B (**TBL 2**) và hecubine (**TBL 8**) thể hiện khả năng gây độc tế bào đối với tất cả các dòng tế bào ung thư thử nghiệm, với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng  $42.9 \pm 3.8$  –  $66.3 \pm 3.4 \mu\text{M}$ : Xem bảng 3.11

Các hợp chất **TBL 4**, **TBL 5**, **TBL 6** và **TBL 9** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP, với các giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng  $51.6 \pm 3.5 - 93.3 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ; tuy nhiên các hợp chất này lại không có hoạt tính đối với 2 dòng tế bào HepG2 và SK-Mel-2, cho thấy có sự chọn lọc giữa các dòng tế bào.

Ngược lại, các hợp chất **TBL 1**, **TBL 3**, **TBL 7** và **TBL 10** đều không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên tất cả các dòng tế bào ung thư ở nồng độ thử nghiệm ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

**Bảng 3.11.** Tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất **TBL 1 – TBL 10**

Hợp chất	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>				
	Hep-G2	MCF-7	SK-LU-1	SK-Mel-2	LNCaP
<b>TBL 1</b>	>100 <sup>b</sup>	>100	>100	>100	>100
<b>TBL 2</b>	$60.8 \pm 6.4$	$52.4 \pm 5.7$	$66.3 \pm 3.4$	$50.8 \pm 4.5$	$42.9 \pm 3.8$
<b>TBL 3</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>TBL 4</b>	>100	$77.6 \pm 2.1$	$85.6 \pm 3.0$	>100	$93.3 \pm 3.0$
<b>TBL 5</b>	>100	$71.5 \pm 4.4$	$72.1 \pm 2.7$	>100	$89.7 \pm 5.6$
<b>TBL 6</b>	>100	$79.2 \pm 6.1$	$78.7 \pm 5.4$	>100	$82.5 \pm 6.7$
<b>TBL 7</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>TBL 8</b>	$62.3 \pm 3.0$	$65.2 \pm 2.0$	$60.8 \pm 2.5$	$59.1 \pm 2.0$	$62.1 \pm 5.0$
<b>TBL 9</b>	>100	$51.6 \pm 3.5$	$54.4 \pm 2.2$	>100	$76.0 \pm 2.9$
<b>TBL 10</b>	>100	>100	>100	>100	>100
Ellipticine <sup>c</sup>	$1.7 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.2$

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ );

<sup>b</sup>  $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$  được xem như không có hoạt tính;

<sup>c</sup> Đối chứng dương

Theo kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, hợp chất (-)-mehranine (**TBL 3**) không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên tất cả các dòng tế bào ung thư ở nồng độ thử nghiệm ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Tuy nhiên, nghiên cứu vào năm 2014 của nhóm các nhà khoa học Valli và cộng sự cho thấy hợp chất (-)-mehranine phân lập từ loài *T. divaricata* thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý như tăng cường hô hấp, hồi sức, chống ung thư, ức chế CYP2D2, điều trị ung thư

tuyến tiền liệt, ức chế enzym phosphatase, tăng cường biểu hiện TP53 (Bảng 3.12) [29]

**Bảng 3.12.** Hoạt tính sinh học của hợp chất (-)-Mehranine (**TBL 3**) được dự đoán bằng PASS [30]

Mehranine	Các thử nghiệm	Pa	Pi
	Antineoplastic (Chống ung thư)	0.814	0.010
	Respiratory analeptic (Tăng cường hô hấp)	0.704	0.014
	Analeptic (Hồi sức)	0.629	0.016
	CYP2D2 inhibitor (Ức chế CYP2D2)	0.497	0.020
	Prostate cancer treatment (Điều trị ung thư tuyến tiền liệt)	0.487	0.011
	Phosphatase inhibitor (Ức chế phosphatase)	0.548	0.076
	TP53 expression enhancer (Tăng cường biểu hiện TP53)	0.537	0.073

Ngoài ra hợp chất (-)-mehranine còn được phân lập và xác định cấu trúc hóa học từ loài *T. divaricata* vào năm 2016 của nhóm các nhà khoa học: Sridhar S. N. C., Seshank Mutya, Atish T. Paul [31] và loài *Ervatamia coronaria* vào năm 1983 của nhóm các nhà khoa học Atta-ur-Rahman; Muzaffar, Anjum; aulatabadi, Nader [32]. Tuy nhiên cả 2 nghiên cứu đều chưa đưa ra được kết quả về hoạt tính sinh học đáng chú ý của hợp chất (-)-mehranine.

Hợp chất 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-*N*-methylaspidospermidine (**TBL 4**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP, với các giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 77.6  $\pm$  2.1, 85.6  $\pm$  3.0, 93.3  $\pm$  3.0  $\mu$ M (Bảng 3.11); tuy nhiên, hợp chất này lại không có hoạt tính đối với 2 dòng tế bào HepG2 và SK-Mel-2 IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$ M, cho thấy có sự chọn lọc giữa các dòng tế bào. Theo kết quả thu được có thể thấy hợp chất **TBL 4** ít có tiềm năng trong hoạt tính gây độc tế bào, tuy nhiên đây là lần đầu tiên hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này được biết đến. Theo tra cứu, cho đến nay, dữ liệu về hoạt tính sinh học của hợp chất này vẫn còn rất hạn chế.

Tương tự, hợp chất (16*S*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 5**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP, với các giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 71.5  $\pm$  4.4, 72.1  $\pm$  2.7, 89.7  $\pm$  5.6  $\mu$ M (Bảng 3.11); tuy nhiên



hợp chất này lại không có hoạt tính đối với 2 dòng tế bào HepG2 và SK-Mel-2  $IC_{50} > 100 \mu M$ , cho thấy có sự chọn lọc giữa các dòng tế bào. Mặc dù kết quả cho thấy **TBL 5** có ít có tiềm năng trong hoạt tính gây độc tế bào ung thư, tuy nhiên đây là lần đầu tiên đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này. Điều này gợi mở thêm các hướng nghiên cứu khác về hoạt tính sinh học như kháng viêm, kháng khuẩn, điều trị tiểu đường, ..v.v.. đối với hợp chất này. Hợp chất này trước đây được phân lập từ loài cây *Rhazya stricta* vào năm 1994 bởi nhóm các nhà khoa học: Mauri Lounasmaa, Reija Jokela, Pirjo Hanhinen, Jari Miettinen, and Jaana Salo [24]. Tuy nhiên nghiên cứu này vẫn chưa đưa ra được kết quả hoạt tính sinh học đáng chú ý của hợp chất này.

Cũng tương tự như **TBL 5**, hợp chất (16R\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 6**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP, với các giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $79.2 \pm 6.1$ ,  $78.7 \pm 5.4$ ,  $82.5 \pm 6.7 \mu M$  (Bảng 3.11); hợp chất này lại không có hoạt tính đối với 2 dòng tế bào HepG2 và SK-Mel-2  $IC_{50} > 100 \mu M$ , cho thấy có sự chọn lọc giữa các dòng tế bào. Đáng chú ý, đây là lần đầu tiên hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này được thử nghiệm. Theo tra cứu, cho đến nay, dữ liệu về hoạt tính sinh học của hợp chất này vẫn còn rất hạn chế.

Hợp chất 16R\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate (**TBL 7**) không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên tất cả các dòng tế bào ung thư ở nồng độ thử nghiệm ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) (Bảng 3.11). Theo kết quả thu được thì **TBL 7** rất ít có tiềm năng trong hoạt tính gây độc tế bào trên 5 dòng tế bào ung thư này, tuy nhiên đây là lần đầu tiên đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này. Bên cạnh đó, hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư khác cũng như các hoạt tính khác như kháng viêm, kháng khuẩn, điều trị tiểu đường, ..v.v.. của hợp chất này cũng chưa được biết đến. Ngoài ra hợp chất 16R\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate (**TBL 7**) còn được phân lập và xác định cấu trúc hóa học từ loài *Rhazya stricta* vào năm 1991 của nhóm các nhà khoa học: Atta-ur-Rahman; Zaman, Khurshid; Perveen, Shahnaz; Habib-ur-Rehman; Muzaffar, Anjum; Choudhary, M. Iqbal; Pervin, Azra [25] và loài cây *Vinca rosea* vào năm 1966 của nhóm các nhà khoa học: Kutney, J. P.; Brown, R. T. [33] Tuy nhiên, cả 2 nghiên cứu vẫn chưa cho thấy được kết quả tiềm năng về hoạt tính sinh học của hợp chất này.

Hợp chất hecubine (**TBL 8**) thể hiện khả năng gây độc tế bào đối với tất cả các dòng tế bào ung thư thử nghiệm Hep-G2, MCF-7, SK-LU-1, SK-Mel-2, LNCaP với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $62.3 \pm 3.0$ ,  $65.2 \pm 2.0$ ,  $60.8 \pm 2.5$ ,  $59.1 \pm 2.0$ ,  $62.1 \pm 5.0 \mu\text{M}$  (Bảng 3.11). Theo kết quả thu được có thể thấy hợp chất **TBL 8** có tiềm năng trung bình trong hoạt tính gây độc tế bào.

Ngoài ra hợp chất hecubine (**TBL 8**) còn được phân lập và xác định cấu trúc hóa học từ loài *Ervatamia chinensis* vào năm 2012 của nhóm các nhà khoa học: Guo, Ling-Li; He, Hong-Ping; Di, Ying-Tong; Li, Shi-Fei; Cheng, Yuan-Yuan; Yang, Wei; Li, Yan; Yu, Jian-Ping; Zhang, Yu; Hao, Xiao-Jiang [34]. Hợp chất này được đánh giá trên năm dòng tế bào ung thư ở người HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 và SW480 bằng cách sử dụng phương pháp MTT [35] và được phân lập từ loài *Ervatamia coronaria* vào năm 1976 - 1978 bởi nhóm các nhà khoa học: Gomez Gonzalez, Carlos; Corzo Rodriguez, Sergio [36]. Tuy nhiên hợp chất hecubine (**TBL 8**) lại không thể hiện hoạt tính sinh học nào đối với các thử nghiệm của các đề tài nghiên cứu trên 2 loài cây *Ervatamia chinensis* và *Ervatamia coronaria*.

Hợp chất voafinidine (**TBL 9**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP, với các giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $51.6 \pm 3.5$ ;  $54.4 \pm 2.2$ ;  $76.0 \pm 2.9$ : Xem thông số hiển thị tại Bảng 3.11. Theo kết quả thu được có thể thấy hợp chất **TBL 9** có tiềm năng trung bình trong hoạt tính gây độc tế bào. Đáng chú ý, đây là lần đầu tiên hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này được thử nghiệm.

Vào năm 2003 nhóm các nhà khoa học Kam, Toh-Seok; Pang, Huey-Shen; Lim, Tuck-Meng [27] và năm 2004, nhóm các nhà khoa học Toh-Seok Kama, Huey-Shen Panga, Yeun-Mun Chooa, and Kanki Komiyamab [37] cũng đã phân lập được hợp chất voafinidine (**TBL 9**) từ loài *T. divaricata*. 2 nghiên cứu này đã chỉ ra vai trò của hợp chất voafinidine (**TBL 9**) trong việc kích thích biểu hiện insulin trong quá trình điều trị tiểu đường.

Ngoài ra vào năm 2014 nhóm các nhà khoa học Valli, G., Perlina, R., & Anusuya, M. đã phân lập voafinidine (**TBL 9**) từ cây *T. divaricata* và xác định cấu trúc hóa học cũng như đánh giá hoạt tính sinh học của hợp chất này. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học in silico cho thấy hợp chất này thể hiện hoạt tính hiệu

quả trong điều trị bệnh Alzheimer và có tác dụng giảm đau cùng với một số các hoạt tính khác được thể hiện tại Bảng 3.13 [29]

**Bảng 3.13.** Hoạt tính sinh học của hợp chất voafinidine (**TBL 9**) được dự đoán bằng PASS [30]

Tên hợp chất	Các thử nghiệm	Pa	Pi
<b>TBL 9</b> (Voafinidine)	Alzheimer's disease treatment (Điều trị bệnh Alzheimer)	0.747	0.005
	Neurodegenerative disease treatment (Điều trị bệnh thoái hóa thần kinh)	0.747	0.005
	Analgesic (Thuốc giảm đau)	0.713	0.009
	Cognition disorder treatment (Điều trị rối loạn nhận thức)	0.677	0.005

Theo kết quả đánh hoạt tính sinh học, hợp chất voacangarine (**TBL 10**) không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên tất cả các dòng tế bào ung thư ở nồng độ thử nghiệm ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ): Xem thông số hiển thị tại Bảng 3.11

Vào năm 1980 nghiên cứu của nhóm các nhà khoa học: Gunasekera, S. P., Cordell, G., & Farnsworth, N. R. đã phân lập hợp chất voacangarine (**TBL 10**) từ loài cây *Ervatamia* và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất này trên dòng tế bào P-388 và trên mô hình in vivo. Kết quả hiển thị tại Bảng 3.14 cho thấy hợp chất này có tác dụng yếu đối với dòng tế bào P-388 trên mô hình in vitro, tuy nhiên hợp chất này lại bất hoạt trên mô hình thử nghiệm in vivo. [28]

**Bảng 3.14.** Hoạt tính gây độc tế bào của alkaloid của *Ervatamia heyneana*

Hợp chất	P-388 lymphocytic leukemia	
	in vitro, $ED_{50}$ , ( $\mu g/ml$ )	in vivo (T/C mg/kg)
<b>TBL 10</b> (Voacangarine)	50.0	0%

Ngoài ra Voacangarine (**TBL 10**) còn được tìm thấy trên nhiều loài cây khác nhau như:

- Trên loài cây *Voacanga africana* vào năm 1958 bởi các nhà khoa học Stauffacher, D.; Seebeck, E.[38] ;
- Năm 1984 trên loài *Stemmadenia grandiflora* bởi nhóm các nhà khoa học: Tessier, V.; Croquelois, G.; Poisson, J.; Moretti, C.[39]; Cùng năm này ở trên loài *Bonafousia macrocalyx* của nhóm các nhà khoa học: Garnier, J.; Croquelois, G.; Kaminski, P.; Lewin, G.; Miet, C.; Poisson, J.; Moretti, C.[40]
- Năm 1994 trên loài *Peschiera van heurckii* bởi nhóm các nhà khoa học: Tournon, J.; Gastiger, V.; Forgacs, P.; Kan, Christiane; Husson, H.-P.[41]
- Năm 2006 trên loài *Ervatamia yunnanensis* bởi nhóm các nhà khoa học: Liang, Shuang; Luo, Xin Gen; Chen, Hai Sheng; Zhang, Xiao Dong; Huang, Mao; Liu, Wen Yong. [42]

Tuy nhiên, tất cả các nghiên cứu trên đều chưa đưa ra được kết quả về hoạt tính sinh học đáng chú ý của hợp chất này.

➔ Trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên 5 dòng tế bào người, bao gồm phổi (SK-LU-1), gan (Hep-G2), vú (MCF-7), da (SK-Mel-2) và tiền liệt tuyến (LNCaP) đã được thử nghiệm. Trong đó, hợp chất **TBL 2** và **TBL 8** thể hiện hoạt tính đối với tất cả các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Hợp chất **TBL 4-TBL 6, TBL 9** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào chọn lọc trên các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP. Đáng chú ý, cho đến nay, đây mới là lần đầu tiên tiến hành thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất **TBL 3 – TBL 7** và **TBL 9**.

Nhìn chung, dữ liệu về hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất này chưa đáp ứng được yêu cầu tối thiểu về tiềm năng chống ung thư để có thể nghiên cứu chuyên sâu hơn, tuy nhiên các thử nghiệm hoạt tính sinh học trên loài cây *T.bovina* cũng như các hợp chất alkaloid này còn rất ít được biết đến cho đến thời điểm hiện tại, do đó, nghiên cứu này giúp gợi mở thêm các hướng nghiên cứu về các hoạt tính sinh học khác đối với loài cây *T.bovina* cũng như các hợp chất alkaloid.

## CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. KẾT LUẬN.

Đã phân lập và xác định cấu trúc của 10 hợp chất sạch từ cành và lá cây Lài trâu (*Tabernaemontana bovina*. Lour), bao gồm: hai hợp chất mới taberbovinine A (**TBL 1**) và taberbovinine B (**TBL 2**), và tám hợp chất đã biết: (-)-mehranine (**TBL 3**), 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-*N*-methylaspidospermidine (**TBL 4**), (16*S*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 5**), (16*R*\*)-15-*epi-E*-isositsirikine (**TBL 6**), 16*R*\*-19,20-*E*-isositsirikine acetate (**TBL 7**), hecubine (**TBL 8**), voafinidine (**TBL 9**), và voacangarine (**TBL 10**).

Đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất sạch đối với 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm, bao gồm SK-LU-1, HepG2, MCF-7, SK-Mel-2 và LNCaP. Hợp chất **TBL 2** và **TBL 8** gây độc tế bào đối với tất cả các dòng tế bào ( $IC_{50} = 42.9 \pm 3.8 - 66.3 \pm 3.4 \mu M$ ). Các hợp chất **TBL 4**, **TBL 5**, **TBL 6** và **TBL 9** gây độc tế bào đối với các dòng tế bào MCF-7, SK-LU-1 và LNCaP ( $IC_{50} = 51.6 \pm 3.5 - 93.3 \pm 3.0 \mu M$ ).

### 4.2. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn thành phần các hợp chất alkaloid từ cây Lài trâu *Tabernaemontana bovina*.
- Mở rộng thử nghiệm thêm các hoạt tính sinh học khác đối với các hợp chất sạch phân lập được.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ**

Ninh Thi Ngoc, Tran Hong Quang, Nguyen Huu Quan, Tran Thi Hong Hanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Van Thanh, Chu Hoang Ha, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh, 2022: Cytotoxic monoterpenoid indole alkaloids from the leaves and twigs of *Tabernaemontana bovina*, *Phytochemistry Letters*, 51, pp. 18-22.

DOI: 10.1016/j.phytol.2022.06.014

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1] Hien D., Xuyen D., 2011, Muong ethnic groups's medicinal plants for therapeutic kidney in Hang Kia-Pa Co Nature reserve, Hoabinh province, Vietnam. *Vietnam National Conference for Ecology and Biological Resources, Hanoi.*, vol 4, pp. 1122.
- [2] Sam H.V., 2012, Indigenous knowledge of medicinal plants among Dao and Muong ethnic minority groups in Ba Vi National Park, Hanoi, *Seed*, 1, pp. 36.
- [3] Trần Thị Ngọc Hằng, Đinh Thị Phượng, 2019, NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG CÂY THUỐC Ở XÃ CÚC ĐƯỜNG, HUYỆN VĨ NHAI, TỈNH THÁI NGUYÊN, *TNU Journal of Science and Technology*, 202, pp. 162.
- [4] Phạm Hoàng Hộ, 1999, Cây cỏ Việt Nam [An illustrated flora of Vietnam], *NXB Trẻ, Hồ Chí Minh, Việt Nam*, 2, pp. 702.
- [5] Lien T.P., Ripperger H., Porzel A., Merzweiler K., Sung T.V., Adam G., 1998, Indole alkaloids from *Tabernaemontana bovina*, *Phytochemistry*, 49, pp. 1457-1461.
- [6] Lien T.P., Kamperdick C., Van Sung T., Adam G., Ripperger H., 1998, Bisindole alkaloids from *Tabernaemontana bovina*, *Phytochemistry*, 49, pp. 1797-1799.
- [7] Liu B., Liu S.-j., Zhan R., Huang G.-l., Tian X.-j., Chen Y.-g., 2018, Cytotoxic Bisindole Alkaloids from *Tabernaemontana bovina*, *Chemistry of Natural Compounds* 54, pp. 814-817.
- [8] Yu Y., Zhao S.-M., Bao M.-F., Cai X.-H., 2020, An Aspidosperma-type alkaloid dimer from *Tabernaemontana bovina* as a candidate for the inhibition of microglial activation, *Organic Chemistry Frontiers* 7, pp. 1365-1373.
- [9] Wu J., Yu Y., Wang Y., Bao M.F., Shi B.B., Schinnerl J., Cai X.H., 2019, Four Yellow Monoterpenoid Quinoline Alkaloids from the Stem of *Tabernaemontana bovina*, *Organic Letters* 21, pp. 4554-4558.
- [10] Yu Y., Bao M.-F., Wu J., Chen J., Yang Y.-R., Schinnerl J., Cai X.-H., 2019, Tabernabovines A–C: Three Monoterpenoid Indole Alkaloids from the Leaves of *Tabernaemontana bovina*, *Organic Letters* 21, pp. 5938-5942.

- [11] Ge D., Tao H.-R., Fang L., Kong X.-Q., Han L.-N., Li N., Xu Y.-X., Li L.-Y., Yu M., Zhang H., 2020, 11-Methoxytabersonine Induces Necroptosis with Autophagy through AMPK/mTOR and JNK Pathways in Human Lung Cancer Cells, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 68, pp. 244-250.
- [12] Zhang M., Du S.-Y., Liu J., Zhao X., Liu J.-N., Jiang C.-S., Zhu K.-K., Fang L., 2021, New monoterpenoid indole alkaloids from *Tabernaemontana bovina*, *Phytochemistry Letters* 43, pp. 23-26.
- [13] Yu Y., Bao M.-F., Wang Y., Zeng Y., Cai X.-H., 2019, Tacamine-type alkaloids from *Tabernaemontana bovina* together with their configuration determination, *Tetrahedron* 75, pp. 130562.
- [14] Yu Y., Bao M.-F., Huang S.-Z., Wu J., Cai X.-H., 2021, Vincan-and eburnan-type alkaloids from *Tabernaemontana bovina* and their hypoglycemic activity, *Phytochemistry*, 190, pp. 112859.
- [15] Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65, pp. 55-63.
- [16] Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M., 1991, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 83, pp. 757-766.
- [17] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer research*, 48, pp. 4827-4833.
- [18] Kam T.-S., Anuradha S., 1995, Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*, *Phytochemistry*, 40, pp. 313-316.
- [19] O'Boyle N.M., Vandermeersch T., Flynn C.J., Maguire A.R., Hutchison G.R., 2011, Confab-Systematic generation of diverse low-energy conformers, *Journal of cheminformatics*, 3, pp. 1-9.



- [20] Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A.V., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams, Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V.G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery Jr. J.A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M.J., Heyd J.J., Brothers E.N., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T.A., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A.P., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Millam J.M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J.B., Fox D.J., 2016, Gaussian 16 Rev. C.01, *Gaussian, Inc., Wallingford, CT*, pp.
- [21] Bruhn T., Schaumlöffel A., Hemberger Y., Pescitelli G., 2017, SpecDis version 1.71, Berlin, Germany, <https://specdis-software.jimdo.com>, pp.
- [22] Kam T.-S., Anuradha S., 1995, Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*, *Phytochemistry*, 40, pp. 313-316.
- [23] Koike T., Takayama H., Sakai S., 1991, Synthetic Studies on the Picraline-Type Indole Alkaloids-I: Improved Synthesis of C-Mavacurine-Type Compounds and a New Skeletal Rearrangement in a Corynanthe-Type Derivative, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39, pp. 1677-1681.
- [24] Lousnasmaa M., Jokela R., Hanhinen P., Miettinen J., Salo J., 1994, Preparation and conformational study of Z-and E-isositsirikine epimers and model compounds. Determination of their C-16 configurations, *Tetrahedron*, 50, pp. 9207-9222.
- [25] Zaman K., Perveen S., Muzaffar A., Choudhary M.I., Pervin A., 1991, Alkaloids from *Rhazya stricta*, *Phytochemistry*, 30, pp. 1285-1293.
- [26] Rahman A.-u., Daulatabadi N., Smith D., 1983, C-13 NMR of Hecubine and Voaphylline, and a Study of Mass Spectral Fragmentation of Hecubine by Linked Scan Measurements, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 38, pp. 117-120.

- [27] Kam T.-S., Pang H.-S., Lim T.-M., 2003, Biologically active indole and bisindole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1, pp. 1292-1297.
- [28] Gunasekera S.P., Cordell G., Farnsworth N.R., 1980, Anticancer indole alkaloids of *Ervatamia heyneana*, *Phytochemistry*, 19, pp. 1213-1218.
- [29] Valli G., Perlina R., Anusuya M., 2014, In silico calculations of Binding energy, Dipole moment by DFT and Drug Activity Predictions for the bioactive constituent present in *Tabernaemontana divaricata* leaves, *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.*, 3, pp. 465-472.
- [30] Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V., 2000, PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances, *Bioinformatics*, 16, pp. 747-748.
- [31] SNC S., Mutya S., Paul A., 2017, Bis-indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata* as potent pancreatic lipase inhibitors: molecular modelling studies and experimental validation, *Medicinal Chemistry Research*, 26, pp. 1268-1278.
- [32] Rahman A.-u., Muzaffar A., 1983, The isolation and structure of mehranine, a new indoline alkaloid from *Ervatamia coronaria*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 38, pp. 1700-1702.
- [33] Kutney J.P., Brown R.T., 1966, The structural elucidation of sitsirikine, dihydrositsirikine and isositsirikine: Three new alkaloids from *vinca rosea linn*, *Tetrahedron*, 22, pp. 321-336.
- [34] Guo L.-L., He H.-P., Di Y.-T., Li S.-F., Cheng Y.-Y., Yang W., Li Y., Yu J.-P., Zhang Y., Hao X.-J., 2012, Indole alkaloids from *Ervatamia chinensis*, *Phytochemistry*, 74, pp. 140-145.
- [35] Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65, pp. 55-63.
- [36] Gomez Gonzalez C., Rodriguez C., Janetina S., 1978, hecubine: Two novel alkaloids, *Revista Cubana de Farmacia*, 12, pp. 177-183.

- [37] Kam T.S., Pang H.S., Choo Y.M., Komiyama K.J.C., biodiversity, 2004, Biologically active ibogan and vallesamine derivatives from *Tabernaemontana divaricata*, *Chemistry & biodiversity*, 1, pp. 646-656.
- [38] Rao K., 1958, Alkaloids of *Voacanga africana*, Stapf. I. voacafrine and voacafricine—two new alkaloids, *Journal of Organic Chemistry*, 23, pp. 1455-1456.
- [39] Torrenegra R., Pedrozo J.A., Achenbach H., Bauereiß P., 1988, Alkaloids of *Stemmadenia grandiflora*, *Phytochemistry*, 27, pp. 1843-1848.
- [40] Garnier J., Croquelois G., Kaminsky P., Lewin G., Miet C., Poisson J., Moretti C., 1984, [Alkaloids from *Bonafousia macrocalyx* [Apocynaceae, indole alkaloids; French Guiana]].[French], *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, pp.
- [41] Tournon J., Gastiger V., Forgacs P., Kan C., Husson H., 1994, Systematically significant indole alkaloids from *Peschiera van heurckii*, *Planta medica*, 60, pp. 496.
- [42] Luo X.G., Chen H.S., Liang S., Huang M., Xuan W.D., Jin L., 2007, Alkaloids from stems of *Ervatamia yunnanensis*, *Chinese Chemical Letters*, 18, pp. 697-699.