

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hoàng Thị Minh Nguyệt

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC MỘT SỐ DÒNG TẾ
BÀO UNG THƯ CỦA CÁC HỢP CHẤT PRENYL XANTHONE
TỪ RỄ CÂY TAI CHUA (*GARCINIA COWA* ROXB.)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC HỮU CƠ

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



Hoàng Thị Minh Nguyệt

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC MỘT SỐ DÒNG TẾ
BÀO UNG THƯ CỦA CÁC HỢP CHẤT PRENYL XANTHONE
TỪ RỄ CÂY TAI CHUA (*GARCINIA COWA* ROXB.)**

Chuyên ngành : Hóa học hữu cơ

Mã số : 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC HỮU CƠ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. TS. Nguyễn Thị Kim An
2. PGS. TS. Trần Thị Thu Thủy

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

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

Tác giả



Hoàng Thị Minh Nguyệt

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc và kính trọng nhất tới TS. Nguyễn Thị Kim An và PGS.TS. Trần Thị Thu Thủy đã tận tâm hướng dẫn chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng Hóa sinh hữu cơ - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên về sự ủng hộ to lớn, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | ii |
| MỤC LỤC | iii |
| DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT | vi |
| DANH MỤC BẢNG | viii |
| DANH MỤC HÌNH..... | ix |
| MỞ ĐẦU | 1 |
| CHƯƠNG 1.TỔNG QUAN VỀ CÂY TAI CHUA <i>GARCINIA COWA</i> | 3 |
| 1.1. Đặc điểm thực vật, phân bố và công dụng..... | 3 |
| 1.2. Các nghiên cứu trên thế giới về cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.)..... | 4 |
| <i>1.2.1. Thành phần hóa học cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.).....</i> | <i>4</i> |
| 1.2.1.1. Xanthone..... | 4 |
| 1.2.1.2. Flavonoid | 10 |
| 1.2.1.3. Phloroglucinol | 12 |
| 1.2.1.4. Terpene và steroid | 15 |
| 1.2.1.5. Depsidone | 15 |
| 1.2.1.6. Các hợp chất khác..... | 16 |
| <i>1.2.2. Hoạt tính sinh học của cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.)</i> | <i>17</i> |
| 1.2.2.1. Hoạt tính chống ung thư | 17 |
| 1.2.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn..... | 18 |
| 1.2.2.3. Hoạt tính chống tiểu đường | 18 |
| 1.2.2.4. Hoạt tính chống oxy hóa..... | 19 |
| 1.2.2.5. Hoạt tính kháng viêm | 19 |
| 1.2.2.6. Hoạt tính chống sốt rét..... | 19 |
| 1.3. Các nghiên cứu tại Việt Nam về cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.)..... | 19 |
| <i>1.3.1. Các nghiên cứu về nhựa cây Tai chua</i> | <i>19</i> |
| <i>1.3.2. Các nghiên cứu về rễ cây Tai chua</i> | <i>21</i> |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 22 |
| 2.1. Đối tượng nghiên cứu..... | 22 |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu..... | 22 |
| 2.2.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập các hợp chất | 22 |
| 2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất | 23 |
| 2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào..... | 23 |
| CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM | 24 |
| 3.1. Chiết và phân lập các hợp chất từ rễ cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.)..... | 24 |
| 3.2. Dữ liệu vật lý và phổ của các hợp chất phân lập được | 26 |
| 3.2.1. Cowanin (G1)..... | 26 |
| 3.2.2. Norcowanin (G2) | 26 |
| 3.2.3. Cowanol (G3)..... | 26 |
| 3.2.4. Garcicowanone I (G4) | 26 |
| 3.2.5. Norcowanol A (G5)..... | 26 |
| 3.2.6. Garcinone F (G6)..... | 26 |
| 3.2.7. Garcicowanone E (G7)..... | 26 |
| 3.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được..... | 26 |
| CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 28 |
| 4.1. Phân lập các hợp chất prenyl xanthone từ rễ Tai chua (<i>G. cowa</i>). 28 | 28 |
| 4.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất G1-G7..... | 28 |
| 4.2.1. Cowanin (G1)..... | 28 |
| 4.2.2. Norcowanin (G2) | 30 |
| 4.2.3. Cowanol (G3)..... | 31 |
| 4.2.4. Garcicowanone I (G4, hợp chất mới)..... | 33 |
| 4.2.5. Norcowanol A (G5)..... | 35 |
| 4.2.6. Garcinone F (G6)..... | 37 |
| 4.2.7. Garcicowanone E (G7) | 38 |
| 4.3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất G4-G7 | 39 |
| KẾT LUẬN | 43 |

| | |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| KIẾN NGHỊ..... | 44 |
| CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN..... | 45 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 46 |
| PHỤ LỤC | 51 |

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

| Kí hiệu | Tiếng Anh | Diễn giải |
|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| A2780 | Human ovarian cancer cell line | Dòng tế bào ung thư buồng trứng ở người |
| A2780cis | Human ovarian cancer cell line cis-platin resistant | Dòng tế bào ung thư buồng trứng ở người kháng cis-platin |
| ^{13}C NMR | Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13 |
| CC | Column Chromatography | Sắc ký cột |
| COSY | Correlation Spectroscopy | Phổ COSY |
| DCM | Dichloromethane | Dichloromethane |
| δ (ppm) | Chemical shift (part per million) | Độ dịch chuyển hóa học (phần triệu) |
| ESI-MS | Electrospray Ionization Mass Spectrometry | Phương pháp khối phổ ion hóa phun điện tử |
| EtOAc | Ethyl acetate | Ethyl acetate |
| <i>G.</i> | <i>Garcinia</i> | <i>Garcinia</i> |
| ^1H NMR | Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton |
| HCT116 | Human colorectal carcinoma cancer cell line | Dòng tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng ở người |
| Hela | Human cervical cancer cell line | Dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy | Phổ tương quan đa liên kết dị hạt nhân |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | Sắc ký lỏng hiệu năng cao |

| Kí hiệu | Tiếng Anh | Diễn giải |
|------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| HR-ESI-MS | High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry | Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử |
| HSQC | Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy | Phổ tương quan đơn lượng tử dị hạt nhân |
| HT-29 | Human colorectal adenocarcinoma cancer cell line | Dòng tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng ở người |
| IC ₅₀ | Half maximal inhibitory | Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm |
| <i>J</i> (Hz) | Coupling constant | Hằng số tương tác |
| MCF-7 | Human breast cancer cell line | Dòng tế bào ung thư vú ở người |
| MeOH | Methanol | Methanol |
| Mp | Melting point | Điểm nóng chảy |
| MS | Mass Spectroscopic | Phổ khối lượng |
| NCIH187 | Human lung cancer cell line | Dòng tế bào ung thư phổi ở người |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân |
| TLC | Thin-layer Chromatography | Sắc ký lớp mỏng |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bảng 4. 1. Dữ liệu phổ NMR của G1 và cowanin..... | 29 |
| Bảng 4.2. Dữ liệu phổ NMR của G2 và norcowanin..... | 30 |
| Bảng 4.4. Dữ liệu phổ NMR của G4 và garcicowanone D | 34 |
| Bảng 4.5. Dữ liệu phổ NMR của G5 | 36 |
| Bảng 4.6. Dữ liệu phổ NMR của G6 | 37 |
| Bảng 4.8. Giá trị IC ₅₀ của G4-G7 đối với dòng tế bào HT-29, HCT116, A2780 và A2780cis..... | 40 |

DANH MỤC HÌNH

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hình 1.1. Thân, lá và quả cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.) | 3 |
| Hình 2. 1. Rễ cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.) | 22 |
| Hình 3. 1. Sơ đồ phân lập các chất từ rễ cây Tai chua (<i>Garcinia cowa</i> Roxb.) . | 25 |
| Hình 4. 1. Cấu trúc hóa học của hợp chất G1 | 28 |
| Hình 4. 2. Cấu trúc hóa học của hợp chất G2 | 30 |
| Hình 4. 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất G3 | 31 |
| Hình 4. 4. Cấu trúc hóa học của và tương tác HMBC của hợp chất G4 | 33 |
| Hình 4.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất G5 | 35 |
| Hình 4.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất G6 | 37 |
| Hình 4.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất G7 | 38 |
| Hình 4. 8. Hợp chất G4 (mẫu 1), G5 (mẫu 2) và G6 (mẫu 3) thể hiện độc tính đối với tế bào ung thư..... | 41 |

MỞ ĐẦU

Cây Tai chua *Garcinia cowa* Roxb. (*G. cowa*) là một loài cây nhiệt đới, thường được sử dụng làm thực phẩm và có tác dụng điều trị một số bệnh theo y học dân tộc ở một số nước Đông Nam Á. Các nghiên cứu hóa học và dược lý hiện đại đã chứng minh trong số các cây thuộc chi *Garcinia*, cây Tai chua (*G. cowa*) cùng với cây măng cụt (*G. mangostana*) là hai cây chứa nhiều các hợp chất xanthone nhất cả về số lượng và hàm lượng. Hơn nữa, lớp chất xanthone của chi *Garcinia* có phổ hoạt tính sinh học tương đối rộng bao gồm hoạt tính gây độc tế bào, kháng khuẩn, chống sốt rét, chống oxy hóa và kháng viêm. Đặc biệt, nhiều xanthone thể hiện hoạt tính chống ung thư, cụ thể là hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* tương đối mạnh trên nhiều dòng tế bào ung thư ở người như ung thư gan, phổi, đại tràng, buồng trứng, tiền liệt tuyến...

Gần đây, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. cowa* mọc ở Việt Nam do nhóm nghiên cứu tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã phát hiện 9 hợp chất prenyl xanthone mới và 12 xanthone đã biết từ nhựa và rễ cây với hoạt tính bảo vệ thần kinh và chống tiểu đường. Tuy nhiên việc nghiên cứu về rễ cây và hoạt tính chống ung thư của các chất phân lập được còn chưa đầy đủ.

Vì vậy, trong khuôn khổ luận văn thạc sỹ này tôi lựa chọn việc nghiên cứu hóa học và hoạt tính gây độc tế bào trên đối tượng rễ cây *G. cowa* nhằm mục đích phát hiện các hợp chất prenyl xanthone có hoạt tính gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư ở người. Do đó, tôi lựa chọn đề tài: “**Phân lập và đánh giá tác dụng gây độc một số dòng tế bào ung thư của các hợp chất prenyl xanthone từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)**”

Mục tiêu của luận văn:

- Phân lập các hợp chất prenyl xanthone từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.).

- Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của một số chất phân lập được trên một số dòng tế bào ung thư ở người.

Nội dung luận văn bao gồm:

1. Thu thập mẫu rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)
2. Xử lý mẫu, ngâm chiết, tạo cao chiết tổng và các cao chiết phân đoạn.
3. Phân lập các hợp chất prenyl xanthone bằng các phương pháp sắc ký.
4. Xác định cấu trúc hóa học của các prenyl xanthone phân lập được.

5. Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của một số prenyl xanthone phân lập được.

Những đóng góp của luận văn:

Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của bảy hợp chất prenyl xanthone từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) bao gồm cowanin (**G1**), norcowanin (**G2**), cowanol (**G3**), garcicowanone I (**G4**), norcowanol A (**G5**), garcinol F (**G6**) và garcicowanone E (**G7**). Trong số đó, hợp chất garcicowanone I (**G4**) là hợp chất mới. Các hợp chất norcowanol A (**G5**), và garcinol F (**G6**) cũng được phân lập lần đầu từ rễ cây Tai chua.

Bốn hợp chất **G4-G7** đã được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư đại tràng (HT-29 và HCT116), ung thư buồng trứng (A2780) và ung thư buồng trứng kháng cisplatin (A2780cis). Hợp chất **G4** và **G6** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đáng kể trên 3 dòng tế bào HCT116, A2780 và A2780cis với IC_{50} trong khoảng 10,3-19,3 μM .

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ CÂY TAI CHUA *GARCINIA COWA*

1.1. Đặc điểm thực vật, phân bố và công dụng

Cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) là một loại cây nhiệt đới thuộc Bộ Sori (Malpighiales), Họ Măng cụt (Clusiaceae), và Chi Bứa (*Garcinia*). Cây Tai chua có quả ăn được và phân bố chủ yếu ở miền Bắc Việt Nam, các nước Đông Nam Á, Ấn Độ, và Châu Phi. Tại Việt Nam, cây Tai chua thường mọc tại vùng rừng núi trung du thuộc các tỉnh Lào Cai, Hà Giang, Vĩnh Phú, Hòa Bình, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Lạng Sơn, Thanh Hóa, Nghệ An [1].

Tai chua là một cây thường xanh có kích thước vừa đến lớn, có thể cao từ 10-25 mét. Cây có lá dạng bầu dục, mọc đối, màu xanh bóng, dài 7-17 cm, rộng 2,5-7 cm cùng với các mầm lá có màu đỏ đẹp mắt. Hoa Tai chua thuộc loại lưỡng tính, có bốn hoặc năm cánh màu trắng. Cây ra hoa vào tháng 4-5, đến khoảng tháng 8-9 thì quả Tai chua bắt đầu chín [1].



Hình 1.1. Thân, lá và quả cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

Cây Tai chua có nhiều công dụng và được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm và trong y học dân gian ở khu vực Đông Nam Á. Dưới đây là một số công dụng phổ biến của cây Tai chua:

- Thực phẩm: Trái cây Tai chua được sử dụng làm thực phẩm. Trái chín có màu vàng hoặc cam, có hương vị chua ngọt.

- Y học dân gian: Vỏ cây, lá non và quả cây Tai chua được sử dụng để hạ sốt, sát trùng, chữa bệnh tiêu chảy, và các vấn đề về đường tiêu hóa [2].

- Sử dụng trong công nghiệp: Một số phần của cây Tai chua có thể được sử dụng trong công nghiệp, chẳng hạn như làm gỗ dán hoặc dùng làm gỗ chế biến.

1.2. Các nghiên cứu trên thế giới về cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

1.2.1. Thành phần hóa học cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

Các nghiên cứu hóa thực vật trên thế giới về các bộ phận khác nhau của cây *G. cowa* như nhựa, thân, rễ, lá, quả, và hoa đã chỉ ra rằng các thành phần hóa học chính bao gồm các lớp chất: xanthone [3-8], phloroglucinol [9-11], flavonoids [12,13], depsidone [14], và một số axit hữu cơ [15,16]. Cho đến nay, hơn 100 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học trong đó hơn một nửa là các hợp chất xanthone (khoảng 70 hợp chất).

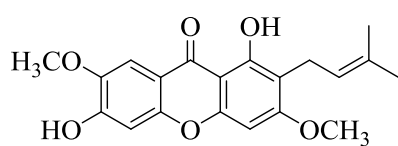
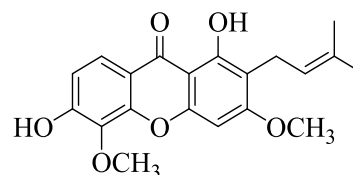
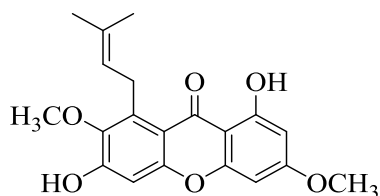
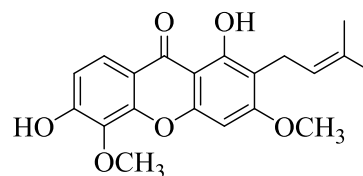
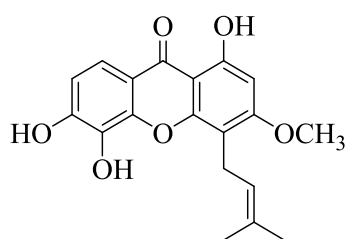
1.2.1.1. Xanthone

Trong cây Tai chua, xanthone thường được tập trung nhiều trong các phần của cây như vỏ cây và rễ. Các xanthone polyoxygen đơn giản chỉ chiếm hàm lượng nhỏ trong khi đó các hợp chất prenyl xanthone chiếm khoảng 80% trên tổng số các xanthone phân lập được.

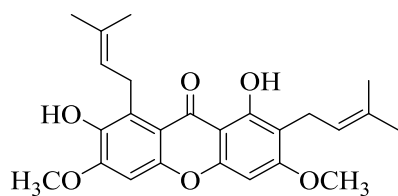
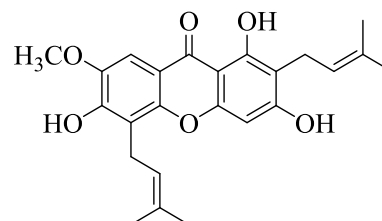
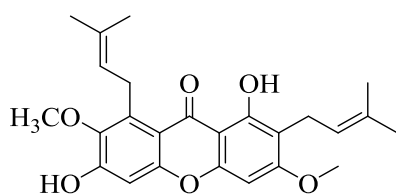
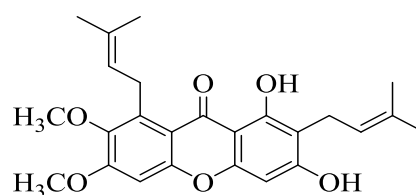
a. Prenyl xanthone

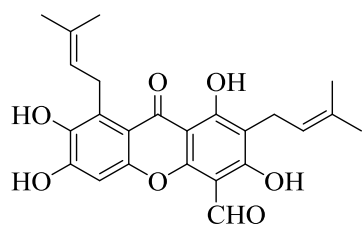
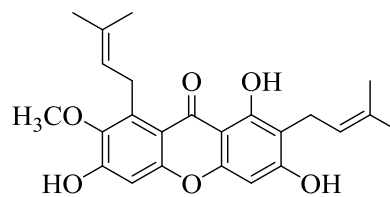
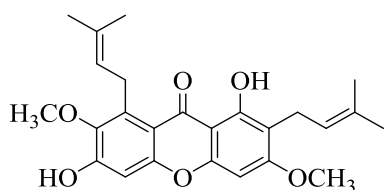
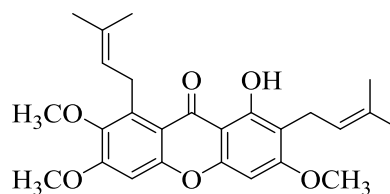
Các hợp chất prenyl xanthone trong cây Tai chua thường ở dạng tri- hoặc tetra-oxygen và có thể gắn với các nhóm thế chứa một, hai hay ba đơn vị năm carbon (5C), mười carbon (10C) hoặc mười lăm carbon (15C). Đơn vị 5C hay gặp nhất là nhóm 3-methylbut-2-enyl (còn gọi là prenyl hay isoprenyl), ngoài ra cũng có thể là nhóm 1,1-dimethylallyl. Các hợp chất prenyl xanthone thường chứa 1-3 nhóm thế prenyl, geranyl hoặc/và chứa một vòng dimethylpyran. Các nhóm prenyl và geranyl có thể tồn tại ở dạng không no, dạng hydrate hóa nối đôi hoặc có nhóm methyl bị oxy hóa.

Prenyl xanthone chứa một nhóm prenyl phân lập từ cây *G. cowa* bao gồm các hợp chất 1,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy-2-(3-methyl-2 butenyl) xanthone (1), cowaxanthone A (2), garcicowanone A (3) phân lập từ quả [4,7]; cowagarcinone B (4) phân lập từ nhựa cây [17]; dulxanthone A (5) phân lập từ vỏ cây [18].

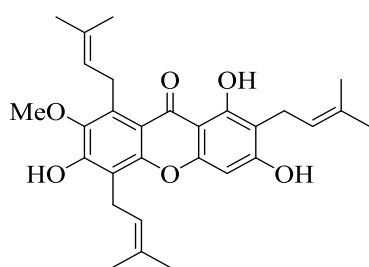
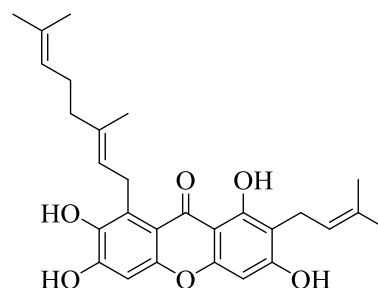
**1****2****3****4****5**

Có tám hợp chất prenyl xanthone chứa 2 nhóm prenyl ở các vị trí thể khác nhau được phân lập từ các bộ phận khác nhau của cây *G. cowa*: 3,6-dimethoxy- γ -mangostin (**6**) từ cành cây [14]; 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,5-bis (3-methyl-2-butenyl)xanthone (**7**) [6,17] và garcinone D (**8**) [19] từ nhựa cây; cowaxanthone B và E (**9-10**), α,β -mangostin (**11, 12**), fuscaxanthone C (**13**) từ quả [4].

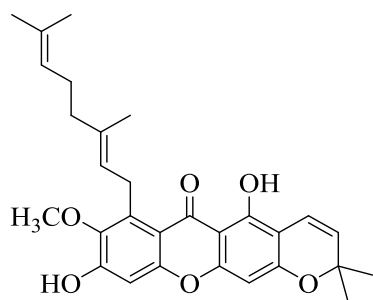
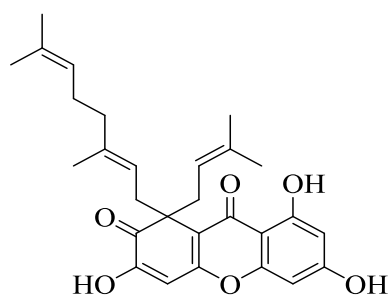
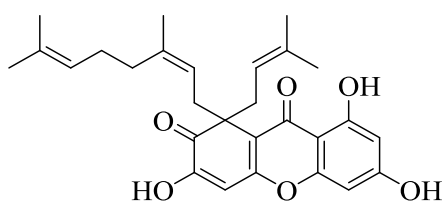
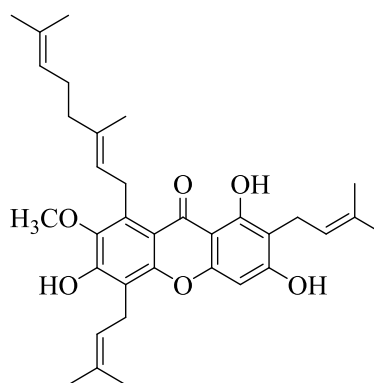
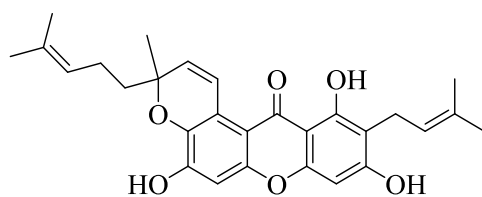
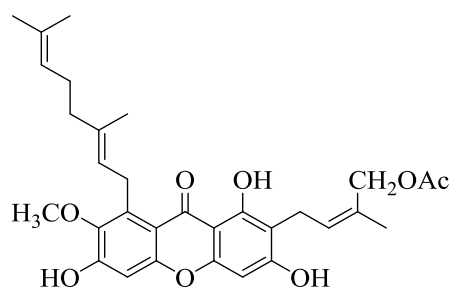
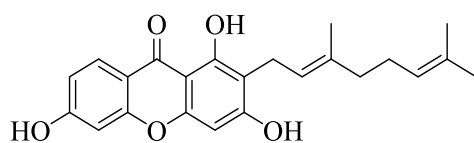
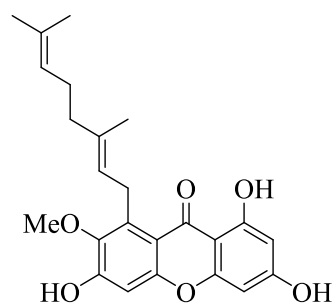
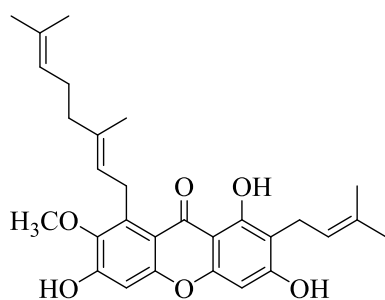
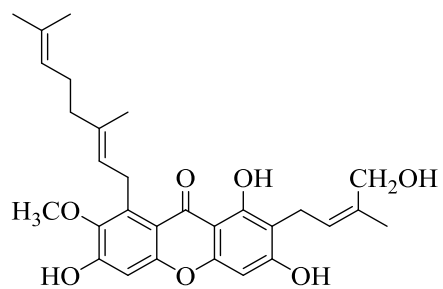
**6****7****8****9**

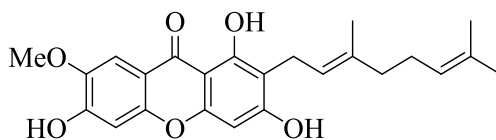
**10****11****12****13**

Một số hợp chất triprenylxanthone được phát hiện có mặt trong cây *G. cowa* ví dụ như: 7-*O*-methylgarcinone E (**14**) trong thân cành [20], vỏ cây [21] và quả [4].

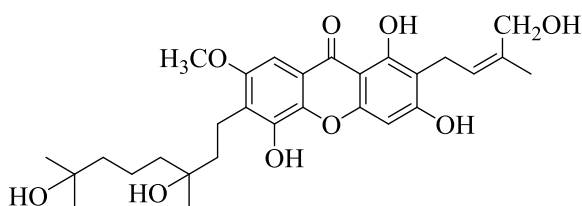
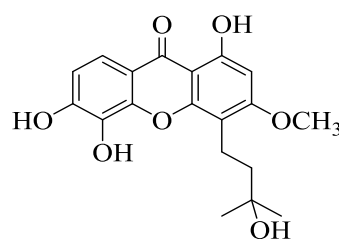
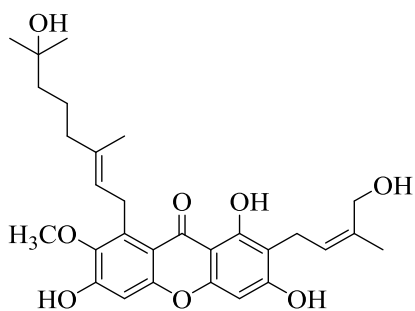
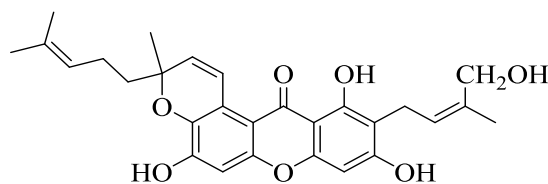
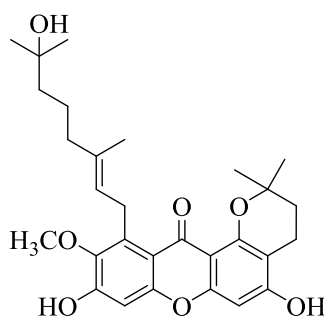
**14****15**

Ngoài ra, cây *G. cowa* còn chứa một phân nhóm xanthone với nhóm thế là geranyl (2 nhóm prenyl gắn liên tiếp). Một số chất điển hình phải kể đến như norcowanin (**15**) trong nhựa cây [6] và rễ cây [14], fuscaxanthone A (**16**) từ nhựa cây [17], garcinianone A, B (**17,18**) từ quả non, cụm hoa [12,23], cowagarcinone A, D, E (**19-20-21**), mangostinone (**22**) từ nhựa cây [17], quả non [18] và cành cây [4,16], và rubraxanthone (**23**) từ cành cây [150, 155]. Đặc biệt có ba hợp chất với hàm lượng lớn được tìm thấy ở hầu hết các bộ phận của cây như quả [4], nhựa cây [6,17], và vỏ thân cây [14,21] là cowanin (**24**), cowanol (**25**) và cowaxanthone (**26**).

**16****17****18****19****20****21****22****23****24****25**

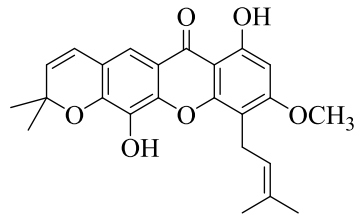
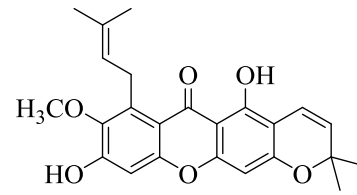
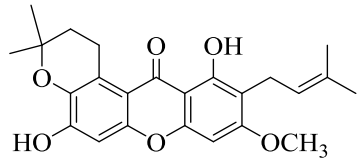
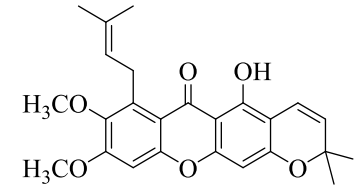
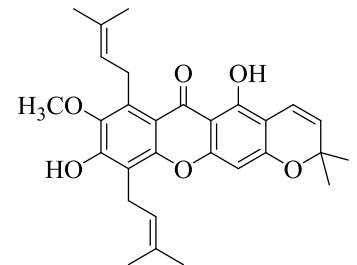
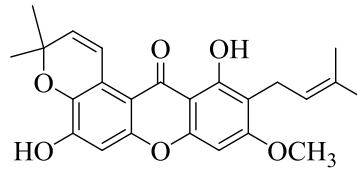
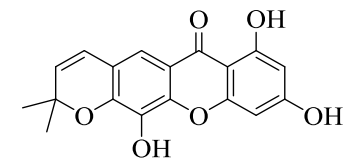
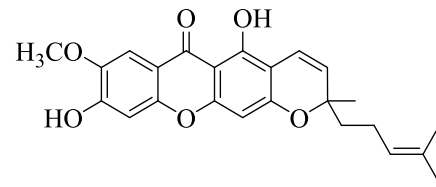
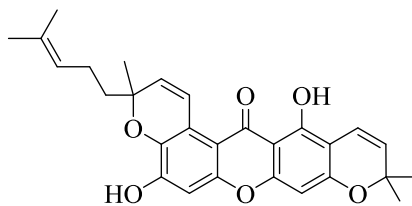
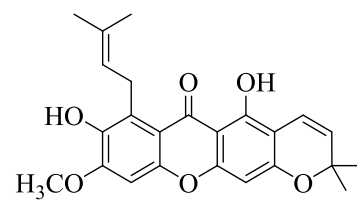
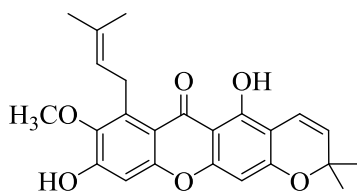
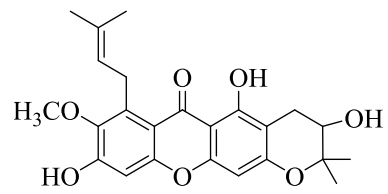
**26**

Một số xanthone phân lập được từ cây Tai chua có các nhóm prenyl hoặc geranyl đã bị hydrat hóa ở nối đôi hoặc oxi hóa nhóm methyl như: cowaxanthone F (**27**) [5], 1,5,6-trihydroxy-3-methoxy-4-(3-hydroxyl-3-methylbutyl)xanthone (**28**) [13,18], kaennacowanol A-C (**29-31**) [3].

**27****28****29****30****31**

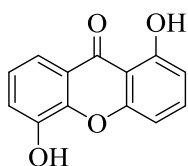
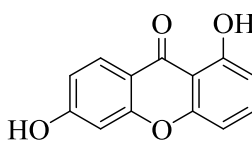
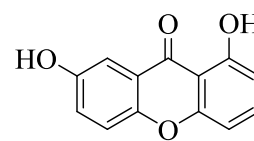
Nhiều hợp chất prenyl xanthone được tìm thấy với một nhóm prenyl đóng vòng nội phân tử tạo thành 1 vòng dimethyl pyran: 1,5-dihydroxy-3-methoxy-4-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethyl-2*H*-pyrano(2',3':6,7)xanthone (**32**) từ vỏ cây [13,18]; 6-hydroxycalabaxanthone (**33**) từ cụm hoa [25] và vỏ cây [26]; 3-*O*-methylmangostenone D (**34**) từ quả non và hoa [12]; 6-*O*-methylmangostanin (**35**), cowaxanthone C, D (**36, 37**) từ quả [4]; 1,3,5-trihydroxy-6',6'-dimethyl-2*H*-pyrano(2',3':6,7) xanthone (**38**) từ vỏ cây

[13,18]; garciniacowone C- E (**39-41**) từ quả non, hoa [12]; mangostanin (**42**) và mangostanol (**43**) từ hoa [27].

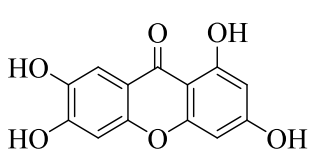
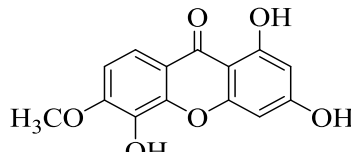
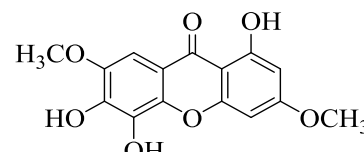
**32****33****34****35****36****37****38****39****40****41****42****43**

b. Các hợp chất polyoxygen xanthone đơn giản

Các polyoxygen xanthone đơn giản có thể mang từ hai đến năm nhóm thế hydroxy hoặc methoxy với các vị trí mang oxygen thường gặp là (1,3), (1,5), (1,3,5), (1,3,7), (1,3,5,7), (1,3,6,7) và (1,3,5,8). Ba hợp chất dioxygen xanthone đơn giản là 1,5-dihydroxyxanthone (**44**) [26], 1,6-dihydroxyxanthone (**45**) [5] được phân lập từ cành cây và 1,7-dihydroxyxanthone (**46**) được phân lập từ vỏ [18] của cây *G. cowa*.

**44****45****46**

Hai hợp chất là 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (norathyriol) (**47**) và 1,3,5-trihydroxy-6-methoxyxanthone (**48**) [18] đều được phân lập từ thân cành cây Tai chua là những ví dụ về tetraoxygen xanthone đơn giản.

**47****48****49**

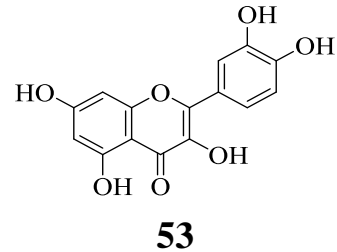
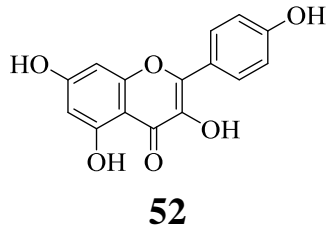
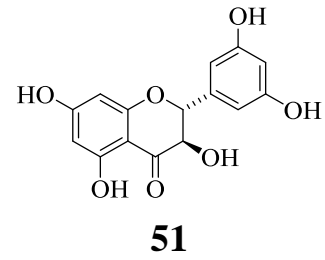
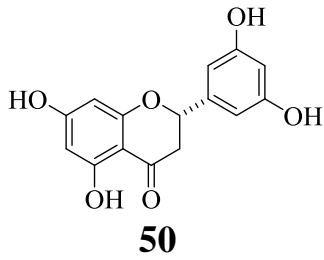
Các hợp chất pentaxygen xanthone ít phổ biến hơn, chỉ có một hợp chất được phân lập được từ thân cành là 1,5,6-trihydroxy-3,7-dimethoxyxanthone (**49**) [18].

1.2.1.2. Flavonoid

Flavonoid có mặt trong hầu hết các loài thực vật dưới dạng phân tử có 1-4 đơn vị cấu trúc hoặc ở dạng glycoside. Đã có khoảng 12 hợp chất flavonoid được phân lập từ cây *G. cowa*.

a. Flavonoid đơn giản

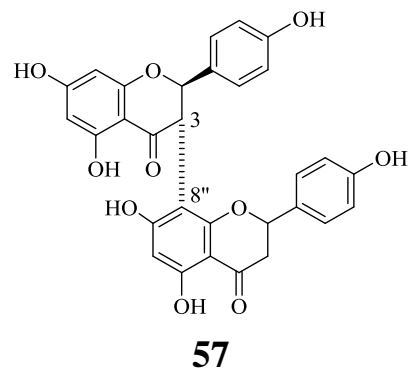
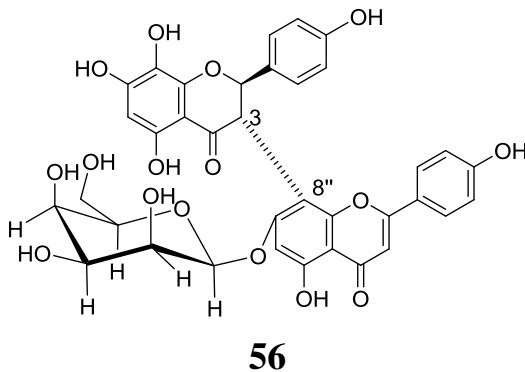
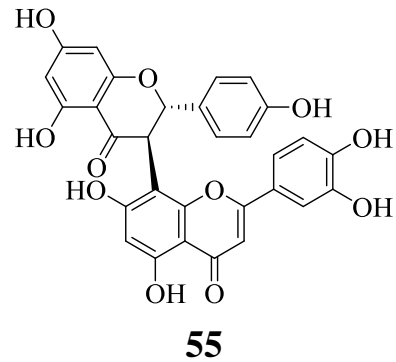
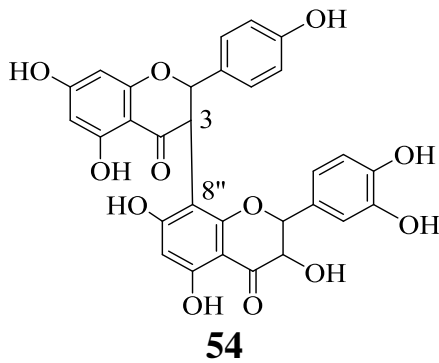
Mới chỉ có bốn hợp chất flavonoid đơn giản (1 đơn vị cấu trúc flavonoid) được phân lập từ cành cây *G. cowa*: 3',5,5',7-tetrahydroxyflavanone (**50**) [13], (2*R*,3*R*)-3,3',5,5',7-pentahydroxyflavanone (**51**) [13], kaempferol (**52**) [12] và quercetin (**53**) [13]



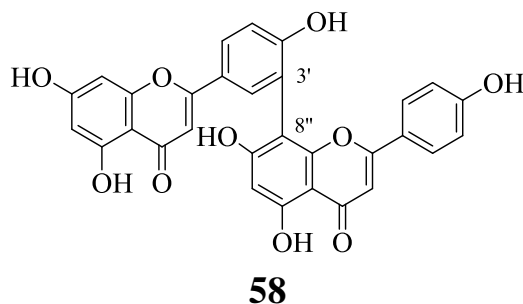
b. Biflavonoid

Biflavonoid là đime của flavonoid, thường được tạo thành do liên kết giữa C-3 với C-8'' hoặc giữa C-3' và C-8'' của các flavone, flavanone hay flavanonol.

Bốn biflavonoid tạo thành do liên kết giữa C-3 với C-8'' là GB-2 (**54**) được phân lập từ cành cây [12], morelloflavone (**55**) phân lập từ quả [28] và cành cây [5], morelloflavone-7''-*O*- β -D-glucoside hoặc fukugiside (**56**) và volkensiflavone (**57**) được tìm thấy ở cành cây [5].

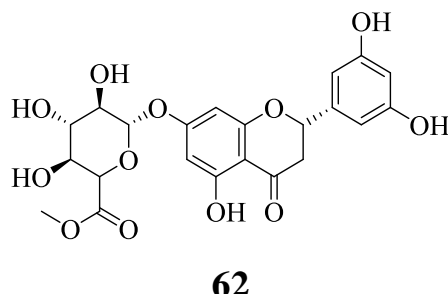
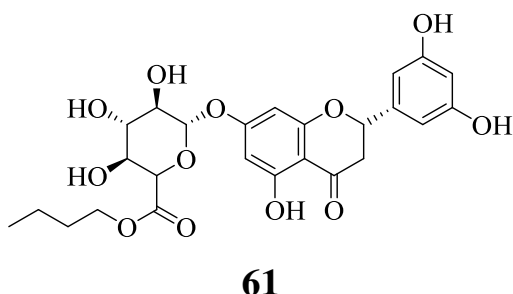
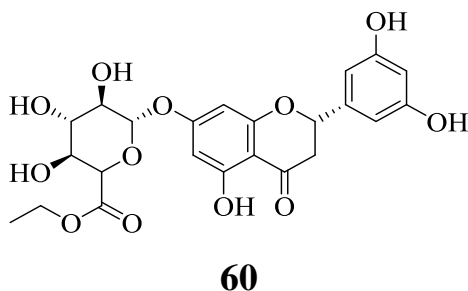


Chỉ có một biflavonoid tạo thành do liên kết giữa C-3' và C-8'' là amentoflavone (**58**) tìm thấy trong quả [28]



c. Flavonoid glycoside

Các hợp chất flavonoid còn có thể liên kết với các phân tử đường để tạo ra các hợp chất glycoside, ví dụ như hợp chất fukugiside (**59**) và garccowaside A-C (**60-62**) được phân lập từ vỏ cây Tai chua [13].

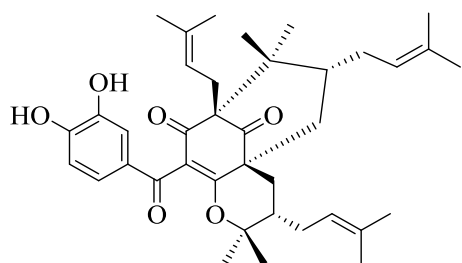
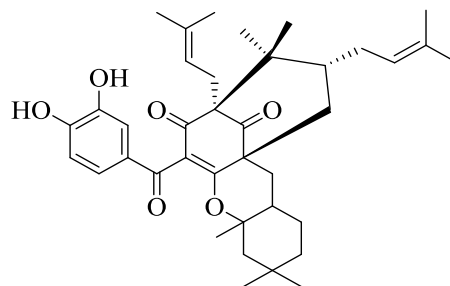
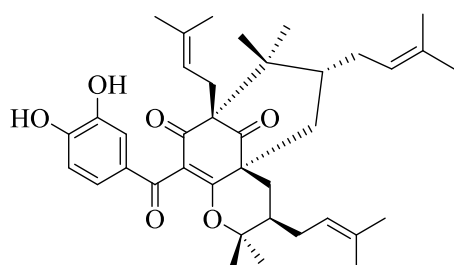
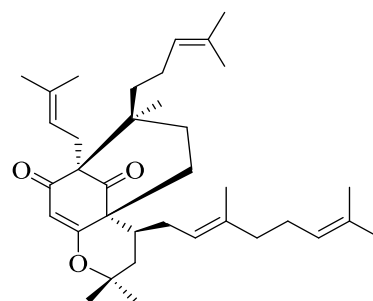
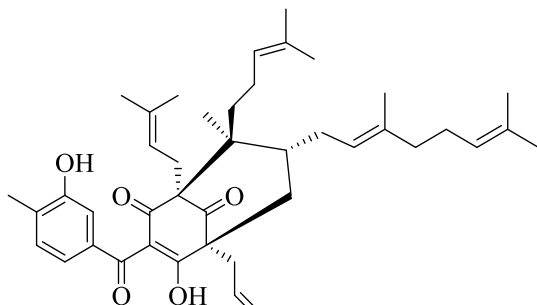
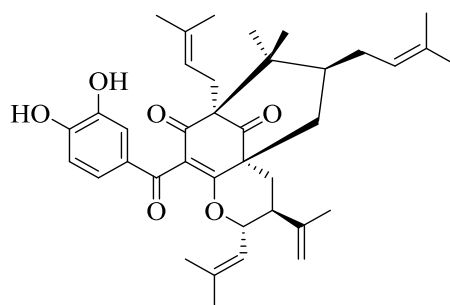
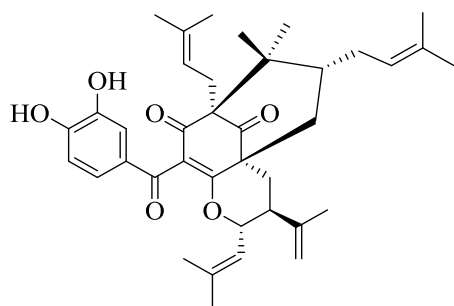
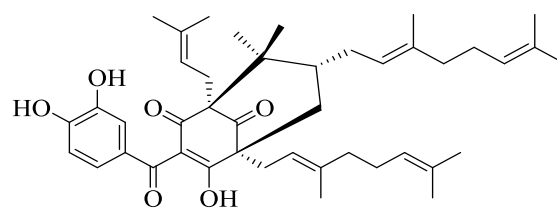


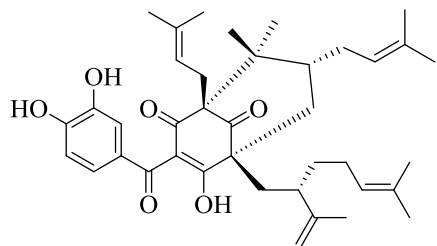
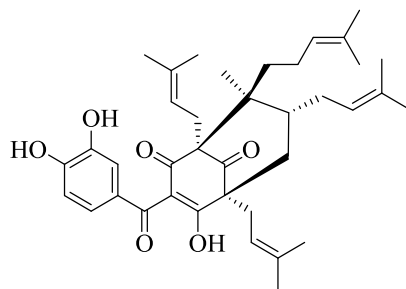
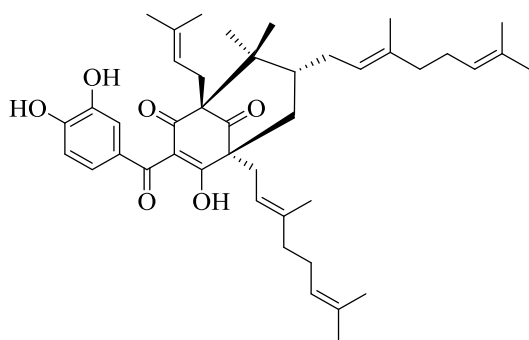
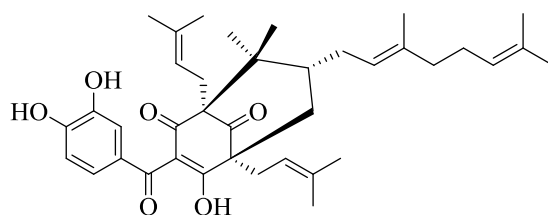
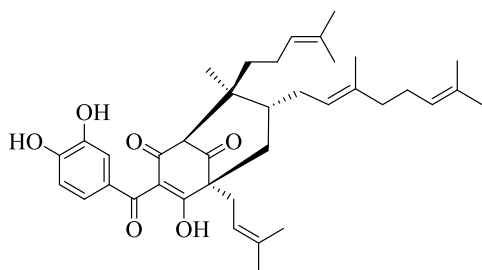
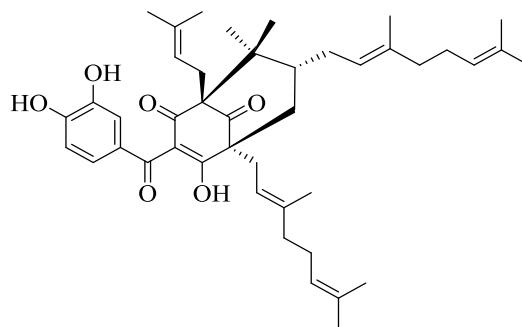
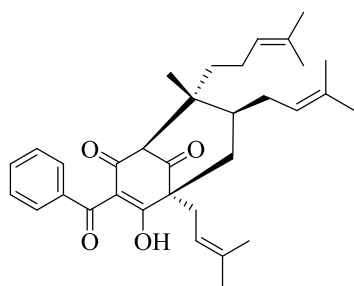
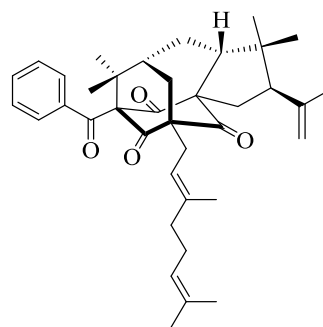
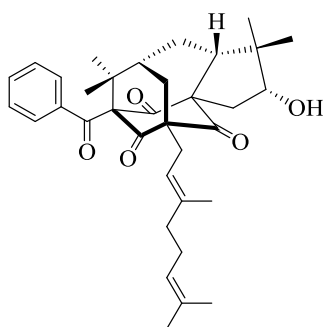
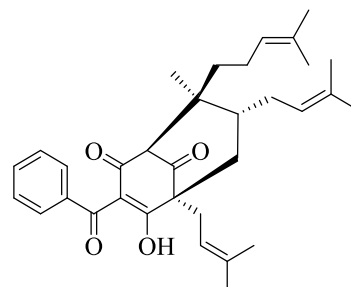
1.2.1.3. Phloroglucinol

Phloroglucinol được tìm thấy trong *G. cowa* có chứa một nhóm benzoyl và hệ vòng bicyclic[3.3.1]nonane-2,4,9-trione với các nhóm thế prenyl và geranyl. Cho đến nay, 18 hợp chất phloroglucinol đã được phân lập từ các bộ phận của cây *G. cowa*.

Hai hợp chất phloroglucinol phổ biến ở các cây thuộc chi *Garcinia* là cambogin (**63**) tìm thấy ở quả [29, 30], cành cây [9] và vỏ cây [30], và guttiferone K (**64**) có ở cả quả và vỏ cây *G. cowa* [30].

11 hợp chất phloroglucinol đã được phân lập từ cành cây là: 30-epicambogin (**65**), garcicowin A-D (**66-69**), guttiferone B, F, K(b) (**70-72**), oblongifolin A-D (**73-76**) [9].

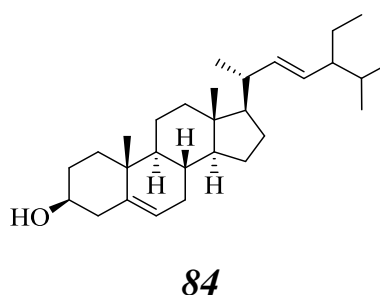
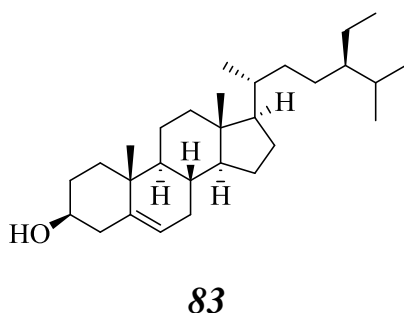
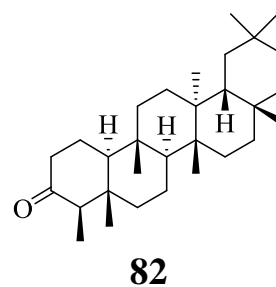
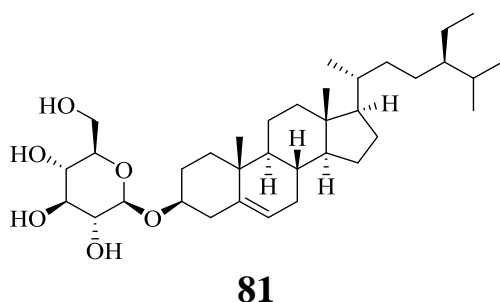
**63****64****65****66****67****68****69****70**

**71****72****73****74****75****76****77****78****79****80**

Ngoài ra, từ lá, quả và cụm hoa cũng đã phân lập được các chất là chamuangone (**77**) [31], cowabenzophenone A, B (**78**, **79**) [11], cowanone (**80**) [23].

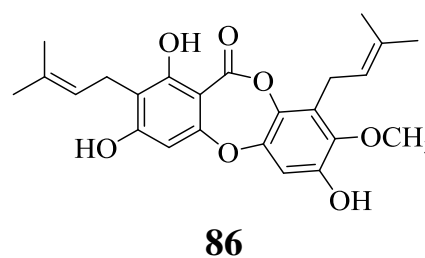
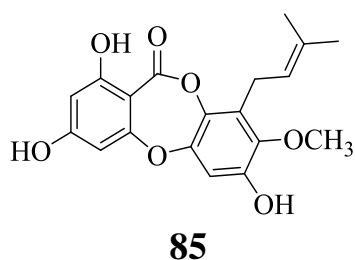
1.2.1.4. Terpene và steroid

Các hợp chất terpene và steroid là hai lớp chất chiếm số lượng và hàm lượng nhỏ trong cây *G. cowa*. Chỉ có bốn hợp chất (4 % tổng số hợp chất được phân lập) đã được Ritthiwigrom và cộng sự phân lập là daucosterol (**81**), friedelin (**82**), β -sitosterol (**83**), và stigmasterol (**84**) từ cành cây vào năm 2013 [12].



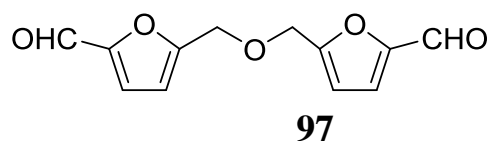
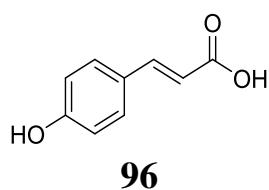
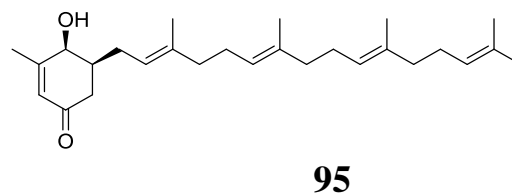
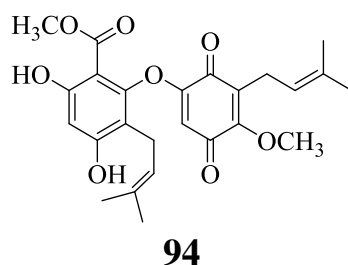
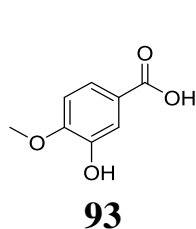
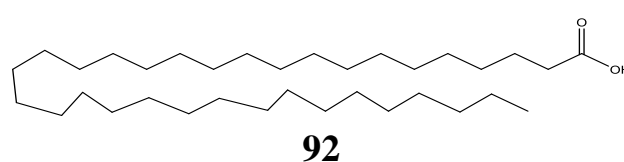
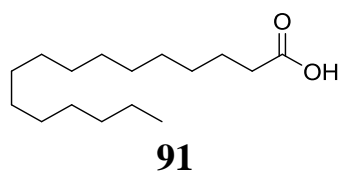
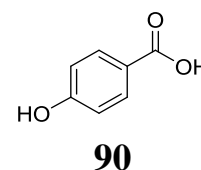
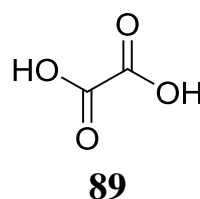
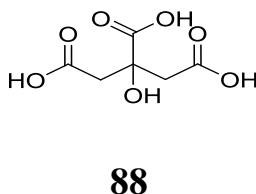
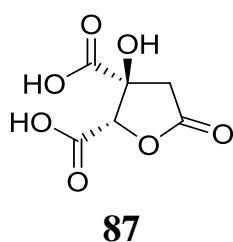
1.2.1.5. Depsidone

Depsidone là một nhóm chất polyphenol chứa khung 11H-dibenzo[*b,e*][1,4]-dioxepin-11-one, trước đây chỉ tìm thấy trong nấm mốc và địa y. Cho đến nay, chỉ có hai hợp chất deosidone là cowadepsidone (**85**) được tìm thấy trong cành cây [14] và garcinisidone A (**86**) trong lá cây *G. cowa* [32].



1.2.1.6. Các hợp chất khác

Các hợp chất benzoquinone, các acid và dẫn xuất của chúng cũng được tìm thấy từ các bộ phận khác nhau của cây *G. cowa*. Ba acid hữu cơ hàm lượng lớn có trong quả, lá và vỏ cây là acid (-)-hydroxycitric lactone (**87**), acid citric (**88**), và acid oxalic (**89**) [15]. Bốn acid tìm thấy trong cành cây là: acid palmitic (**90**), acid tetratriacontanoic (**91**), acid 4-hydroxybenzoic (**92**), và acid sovanillic (**93**) [12]. Từ lá cây phân lập được một hợp chất benzoquinone là 3-(1-methoxycarbonyl-4,6-dihydroxyphenoxy)-6-methoxy-3,5-di(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzoquinone (**94**) [32]. Một hợp chất được phân lập từ vỏ cây (*2E,6E,10E*)-(+)-4 β -hydroxy-3-methyl-5 β -(3,7,11,15-tetramethyl-2,6,10,14-hexadecatetraenyl)-2-cyclohexen-1-one (**95**) [33]. Từ quả phân lập được các hợp chất acid *p*-coumaric (**96**) và cirsiumaldehyde (**97**) [28].



1.2.2. Hoạt tính sinh học của cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

Các nghiên cứu dược lý hiện đại trên thế giới đã chỉ ra các căn chiết và các hợp chất phân lập từ cây *G. cowa* đặc biệt là các hợp chất prenyl xanthone thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý như chống ung thư, kháng khuẩn, chống tiểu đường, chống oxy hóa, kháng viêm, chống sốt rét, và bảo vệ thần kinh.

1.2.2.1. Hoạt tính chống ung thư

Nhiều hợp chất từ cây *G. cowa* đã được công bố có hoạt tính chống ung thư tương đối tốt. Nhiều công trình nghiên cứu về dược lý đã chỉ ra các hợp chất chính có hoạt tính chống ung thư đáng kể là cowanin (**24**), dulxanthone A (**5**), 3,6-di-*O*-methyl- γ -mangostin (**6**), norcowanin (**15**), cowaxanthone (**26**), guttiferone K(a),(b) (**64,72**), 30-epicambogin (**65**), garcicowin A (**66**), cowadepsidone (**85**).

Lớp chất depsidone là một trong những lớp chất điển hình của chi *Garcinia* với hoạt tính gây độc tế bào và chống tăng sinh khá mạnh. Cowadepsidone (**85**) được phân lập từ cành cây *G. cowa*, thể hiện khả năng gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư NCI-H187 và MFC-7 [14].

Guttiferone K(a), (b) (**64,72**); 30-epicambogin (**65**) đã được chứng minh có khả năng gây độc tế bào đáng kể đối với các tế bào HT-29 [34]. Chamuangone (**77**) có khả năng ức chế mạnh các tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ là 3,59 μ m [31]. Guttiferone K, một dẫn xuất polyprenyl acylphloroglucinol được phân lập từ các cành cây *G. cowa*, thể hiện hoạt tính chống tăng sinh tế bào ung thư đại trực tràng ở người HT-29 mà không ảnh hưởng đến các tế bào ruột kết bình thường CCD 841 CoN [9].

Trong số các xanthone, cowaxanthone (**26**), 3,6-di-*O*-methyl- γ -mangostin (**6**) thể hiện khả năng gây độc tế bào đáng kể đối với dòng tế bào NCI-H187 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 3,87 μ g/mL và 8,58 μ g/mL [14]. Khả năng gây độc tế bào trung bình đã được ghi nhận trên dòng tế bào KB ở hợp chất 3,6-di-*O*-methyl- γ -mangostin (**6**) với IC₅₀ = 6,64 μ g/mL [35] và MCF-7 ở các hợp chất cowanin (**24**), α -mangostin (**11**) với IC₅₀ lần lượt là 4,1 \pm 1,0 μ M; 4,1 \pm 1,0 μ M [6]. Dulxanthone A (**5**) thể hiện hoạt tính chống tăng sinh tế bào ung thư gan HepG2 [36].

Cowanin (**24**), một xanthone có hàm lượng cao từ cây *G. cowa*, thể hiện khả năng ức chế tăng sinh dòng tế bào ung thư đại trực tràng LoVo ở người. Hợp chất này cũng được chứng minh có tác dụng gây chết tế bào thông qua con đường apoptosis. Cowanin (**24**) làm giảm Bcl2-liên kết X (Bax) và sự biểu hiện của protein Bcl 2. Hợp chất này cũng có khả năng kích hoạt caspase 9, 7 và sự biểu hiện poly-ADP-ribosepolymerase. Hơn nữa, điều trị bằng cowanin (**24**) làm giảm p-ERK, p-Akt, p-3-phosphoinositide phụ thuộc protein kinase-1 trong khi lại làm tăng biểu hiện p-p38. Kết quả là, cowanin (**24**) đã gây ra quá trình apoptosis xảy ra trong tín hiệu dẫn truyền MAPK và Akt [37]. Cowanin (**24**) cũng thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU-145 với $IC_{50} = 11,3 \pm 10,0 \mu\text{M}$ [26].

1.2.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn

Garcinianone A (**17**), garcinianone B (**18**), rubraxanthone (**23**), β -mangostin (**12**), mangostanin (**42**), cowanol (**25**), và cowaxanthone (**26**) là những hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh từ cây *G. cowa*. Garcinianone A (**17**), garcinianone B (**18**) và rubraxanthone (**23**) được ghi nhận có hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với *Bacillus subtilis* TISTR 088 với giá trị MIC là $2 \mu\text{g/mL}$ [38]. Bên cạnh đó garcicowanone A (**3**) và β -mangostin (**12**) lại thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với chủng *Bacillus cereus* TISTR 688 với MIC là $0,25 \mu\text{g/mL}$ [38]. Mangostanin (**42**) và α -mangostin (**11**) được chứng minh có khả năng kháng khuẩn đáng kể đối với chủng *S. aureus* và *S. aureus* kháng methicillin với giá trị MIC tương ứng là $4 \mu\text{g/mL}$ và $8 \mu\text{g/mL}$ [5]. Hoạt động kháng khuẩn trung bình chống lại *S. aureus* đã được ghi nhận với cowanol (**25**) và cowaxanthone (**26**) với giá trị MIC là $500 \mu\text{g/mL}$ [6].

1.2.2.3. Hoạt tính chống tiểu đường

Một số hợp chất phân lập được từ cây *G. cowa* thể hiện các tác dụng chống bệnh tiểu đường tốt như: garciniacowone K, α -mangostin (**11**), và β -mangostin (**12**). Garciniacowone K đã được chứng minh ức chế hiệu quả enzyme α -glucosidase và thúc đẩy tiêu thụ glucose trong các tế bào 3T3-L1. α -Mangostin (**11**) và β -mangostin (**12**) có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase mạnh với các giá trị IC_{50} lần lượt là $7,8 \pm 0,5$ và $8,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Kết quả này phản ánh tiềm năng chống bệnh tiểu đường của hoa và quả non *G. cowa* [39].

1.2.2.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Morelloflavone (**55**) và morelloflavone-7''-O- β -D glucoside (**56**) là hai hợp chất flavonoid chống oxy hóa điển hình của cây *G. cowa* với khả năng thu dọn gốc tự do DPPH (diphenylpicrylhydrazyl), hydroxyl, và khả năng lấy gốc superoxygen tương đối mạnh [5].

Cặn chiết *n*-hexane và chloroform của quả Tai chua được đánh giá khả năng lấy gốc tự do DPPH ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$, đã thể hiện tác dụng là 83,3 và 86,3 % (chất đối chứng hydroxyanisole butylated: 88,5%) [40,41]. Trong khi đó cặn chiết methanol của quả cũng thể hiện hoạt tính thu dọn gốc tự do với $\text{IC}_{50} = 52,358 \mu\text{g/mL}$ [42]. Chiết xuất *n*-hexane của vỏ cây *G. cowa* cho thấy hiệu quả cao chống oxy hóa được đánh giá thông qua mô hình linoleate-carotene với sự ức chế 66,94 % ở 25 ppm [43].

1.2.2.5. Hoạt tính kháng viêm

Tám prenyl xanthone là cowaxanthone A (**2**), B (**9**), C (**36**) và D (**37**), α -mangostin (**11**), cowanin (**24**), cowanol (**25**) và mangostanin (**42**) đã được thử nghiệm về khả năng chống viêm bằng cách sử dụng xét nghiệm phù tai do ethyl phenylpropiolate gây ra. Tất cả xanthone đều có hoạt tính mạnh hơn chứng dương là thuốc phenylbutazone [5].

1.2.2.6. Hoạt tính chống sốt rét

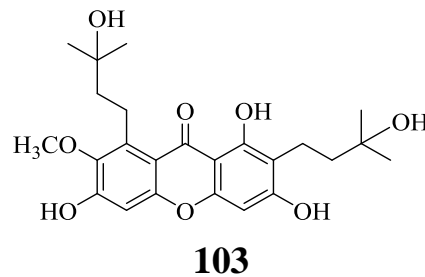
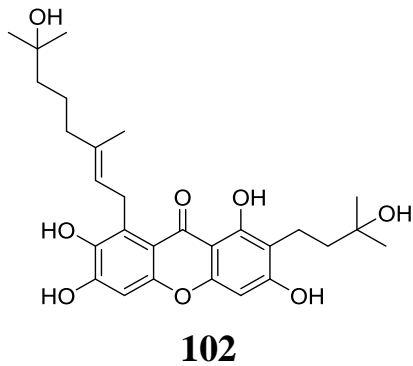
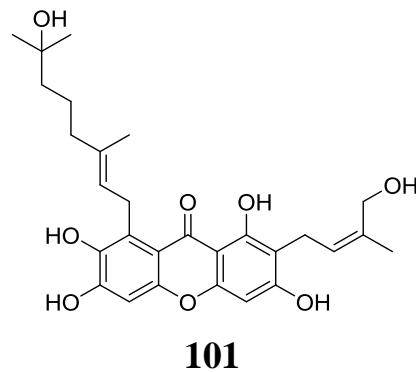
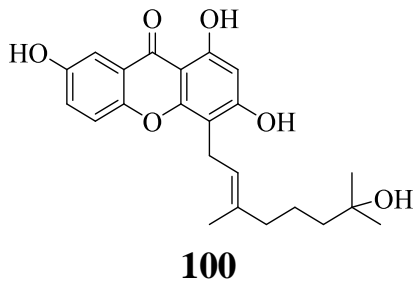
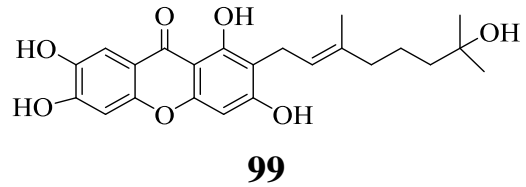
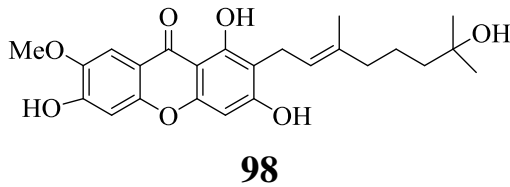
Năm xanthone được phân lập từ vỏ thân là α -Mangostin (**11**), 7-*O*-methylgarcinone E (**14**), cowanin (**24**), cowanol (**25**) và cowaxanthone (**26**) thể hiện hoạt tính chống ký sinh trùng sốt rét *in vitro* đáng kể đối với chủng ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 1,5-3,0 $\mu\text{g/mL}$ [21].

1.3. Các nghiên cứu tại Việt Nam về cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

1.3.1. Các nghiên cứu về nhựa cây Tai chua

Nhựa cây Tai chua *G. cowa* ở Việt Nam đã được nghiên cứu kỹ trong khuôn khổ luận án Tiến sĩ của TS. Nguyễn Thị Kim An – Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội thực hiện tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 6 hợp chất xanthone mới là garcicowanone F-G-H (**98-100**), norcowanol A-B (**101-102**), garcinol F (**103**) và 12 xanthone đã biết. Ba hợp chất cowanin (**24**), norcowanin (**15**) và kaennacowanol A (**29**) thể hiện hoạt

tính chống oxy hóa mạnh, hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng HT-29 với giá trị IC_{50} 1,6-3,9 μM . 2 hợp chất cowanin (**24**) và garcinone D (**8**) thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase rất mạnh với giá trị IC_{50} 17,23-33,53 μM [24].

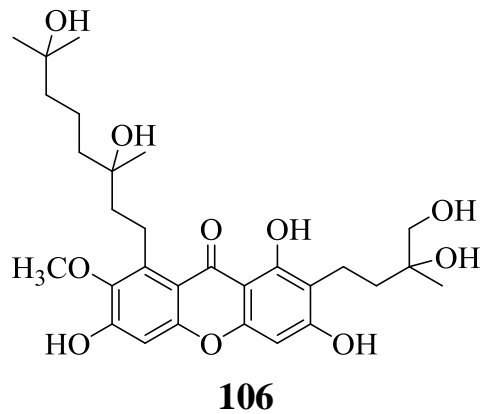
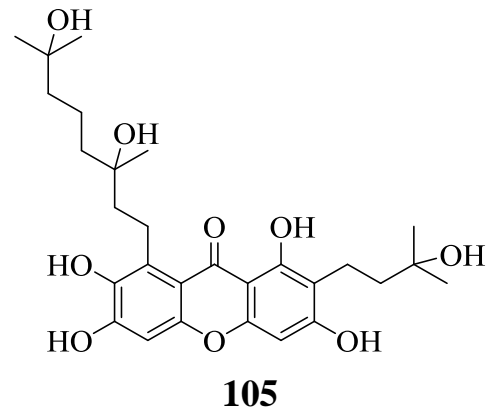
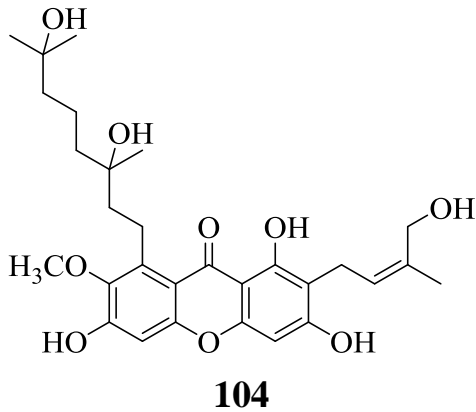


Kết quả nghiên cứu hoạt tính bảo vệ thần kinh trên tế bào HT22 của các hợp chất phân lập từ nhựa cây Tai chua mọc tại Việt Nam của nhóm nghiên cứu đã cho thấy các hợp chất garcicowanone F (**98**), 7-*O*-methylgarcinone E (**14**) và fuscaxanthone A (**16**) thể hiện tác dụng bảo vệ thần kinh đáng kể với >80% khả năng sống của tế bào trong khoảng nồng độ 2,6– 260,0 μM . Đặc biệt, hợp chất mới garcicowanone F (**98**) thể hiện khả năng bảo vệ thần kinh mạnh nhất trong khoảng nồng độ 2,9 - 115 μM và không có độc tính đối với tế bào trong khoảng nồng độ này. Các nghiên cứu về cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào HT22 đã chỉ ra garcicowanone F (**98**) có tác dụng làm giảm nồng độ Ca^{2+} trong tế bào bị nhiễm độc bởi glutamate, ngăn chặn sự sản sinh ROS

(reactive oxygen species) nội bào, giảm phosphoryl hóa MAPK, giảm mức độ biểu hiện của Bax, tăng Bcl-2, ức chế apoptosis phụ thuộc AIF gây ra do glutamate HT22 [24].

1.3.2. Các nghiên cứu về rễ cây Tai chua

Rễ cây Tai chua mới chỉ bước đầu được nghiên cứu bởi nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Thị Kim An - Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội kết hợp với nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Thị Thu Thủy - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 3 hợp chất mới garcicowanone C-E (**104-105**) và 6 xanthone đã biết. Cowanol (**25**) và norcowanin (**15**) thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh, với giá trị IC_{50} tương ứng là $33,5 \pm 0,8$ và $17,2 \pm 0,3 \mu M$ [22].



CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) được thu ở Ba Vì, Hà Nội vào tháng 7 năm 2020. Tên khoa học của mẫu được định danh bởi TS. Nguyễn Quốc Bình - Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu tiêu bản (GC072020) được lưu giữ tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KHCNVN.



Hình 2.1. Rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập các hợp chất

Phương pháp chiết xuất: Sử dụng phương pháp chiết rắn-lỏng

Phương pháp phân lập:

- **Sắc ký lớp mỏng (TLC):** được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC - Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715), RP - 18 F254S (Merck). Chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại tại hai bước sóng 254 nm và 365 nm và hiện màu bằng thuốc thử là dung dịch vanillin hoặc H₂SO₄ 10% bằng cách nhúng đều lên bản mỏng và đốt bản mỏng cho đến khi hiện màu.

- *Sắc ký cột (CC)*: sử dụng silica gel 60 (Merck, 15-40 μm), silica gel 60 (Merck, 40-63 μm), silica gel 100 (Merck, 63-200 μm), Sephadex LH -20 (GE Healthcare) và silica gel pha đảo C18 (RP-18, Merck, 15-25 μm) làm chất hấp phụ.

- *Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*: được thực hiện với cột sắc ký HPLC pha ngược (RP-HPLC), pha tĩnh không phân cực, trong khi pha động là chất lỏng phân cực. Cột điều chế được làm bằng thép không rỉ độ dài 250 mm với đường kính 20 mm. Đầu dò UV (detector) nằm ở cuối cột có tác dụng phát hiện chất điều chế. Tín hiệu đầu dò được ghi lại qua phần mềm lưu trữ và xử lý dữ liệu, sau đó hứng phân đoạn thu được chất điều chế.

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

Cấu trúc của các hợp chất phân lập được xác định bằng các phương pháp quang phổ hiện đại và bằng cách so sánh với dữ liệu được báo cáo.

- *Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS*: được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển.

- *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*: Các phép đo được thực hiện trên máy NMR Bruker AM600 và Bruker AV500 tại Viện Hóa học, sử dụng chất nội chuẩn là TMS. Các kỹ thuật phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã được áp dụng, bao gồm:

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: sử dụng các kỹ thuật như HSQC, HMBC, COSY và NOESY.

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

Thử nghiệm đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư sử dụng phương pháp nhuộm màu Sulforhodamine B (SRB) [44] do Tiến sĩ Lê Hoàng Thanh, Northern Ontario School of Medicine University, Canada hợp tác thực hiện.

Các dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780 và A2780cis (kháng cisplatin) được cung cấp bởi Tiến sĩ Barbara Vanderhyden tại Viện Nghiên cứu Bệnh viện Ottawa (OHRI, Ottawa ON). Các dòng tế bào HT-29 và HCT 116 được cung cấp bởi Tiến sĩ Hoyun Lee tại Viện Nghiên cứu Khoa học Y tế phía Bắc (HSNRI, Sudbury ON).

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM

3.1. Chiết và phân lập các hợp chất từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

Rễ cây Tai chua (*G. cowa*) tươi (5,0 kg) được cắt nhỏ và sấy khô ở 45°C trong 3 ngày thu được rễ khô (854 g). Sau đó rễ khô được nghiền thành bột và ngâm chiết bằng methanol (3 × 3 L) kết hợp siêu âm ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ mỗi lần. Cô quay dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn tổng MeOH (206,0 g). Ngâm chiết cặn tổng lần lượt bằng *n*-hexane (3 × 500 mL) và acetone (3 × 500 mL). Dịch chiết acetone được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được cặn chiết acetone có khối lượng 97 g. Cặn chiết acetone sau đó được đưa lên cột sắc ký CC với chất hấp phụ silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane (DCM)/methanol (MeOH) (100/0 đến 2/1, v/v) thu được 9 phân đoạn F1–F9.

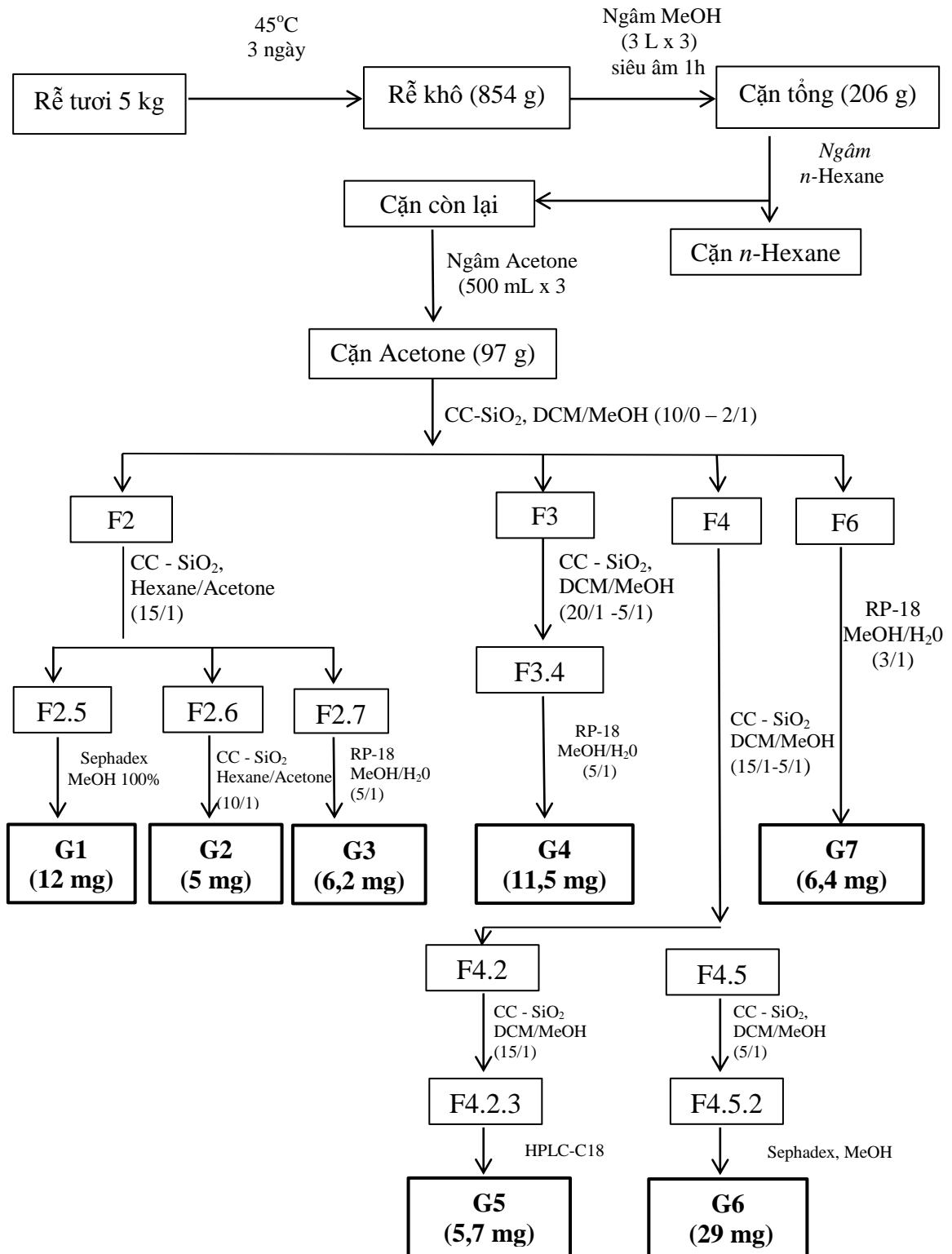
Phân đoạn F2 (15,4 g) được tách trên cột silica gel (rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexane/acetone, 15/1) thu được 8 phân đoạn nhỏ F2.1-F2.8. Phân đoạn F2.5 được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 (rửa giải bằng MeOH) thu được hợp chất **G1** (12 mg). F2.6 được tách trên cột silica gel (*n*-hexane/acetone, 10/1) thu được hợp chất **G2** (5,0 mg). Phân đoạn F2.7 được tách trên cột silica gel pha đảo (RP-18), sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (5/1, v/v) thu được hợp chất **G3** (6,2 mg)

Phân đoạn F3 (4,2 g) được tách trên cột silica gel và rửa giải với hệ dung môi DCM/MeOH (20/1 đến 5/1, v/v) thu được 7 phân đoạn, F3.1-F3.7. Phân đoạn F3.4 được tách trên cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (5/1, v/v) thu được hợp chất **G4** (11,5 mg).

Phân đoạn F4 (16,3 g) được tách trên cột silica gel và rửa giải với hệ dung môi DCM/MeOH (15/1 đến 5/1, v/v) cho 10 phân đoạn nhỏ, F4.1-F4.10. Hợp chất **G5** (5,7 mg) thu được từ phân đoạn F4.2 bằng cách sử dụng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi DCM/MeOH (15/1), và sau đó tinh chế bằng HPLC (C18) sử dụng hệ dung môi MeOH/H₂O/0.1% acid formic (63/37). Phân đoạn F4.5 được tách lại trên cột silica gel sử dụng hệ dung môi DCM/MeOH (15/1 đến 5/1, v/v), và sau đó tinh chế trên cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH, thu được hợp chất **G6** (29,0 mg).

Phân đoạn F6 (6,3 g) được tiến hành tách trên cột silicagel pha đảo (RP-18), sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (3:1, v/v) thu được hợp chất **G7 (6,4 mg)**.

Sơ đồ phân lập các chất được trình bày trong hình 3.1 dưới đây:



Hình 3. 1. Sơ đồ phân lập các chất từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)

3.2. Dữ liệu vật lý và phổ của các hợp chất phân lập được

3.2.1. Cowanin (G1)

Tinh thể hình kim màu vàng. Nhiệt độ nóng chảy: 137-139 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): xem bảng 4.1.

3.2.2. Norcowanin (G2)

Tinh thể hình kim màu vàng. Nhiệt độ nóng chảy: 161-162 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): xem bảng 4.2.

3.2.3. Cowanol (G3)

Tinh thể hình kim màu vàng. Nhiệt độ nóng chảy: 124-125 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): xem bảng 4.3.

3.2.4. Garcicowanone I (G4)

Chất rắn màu vàng. $[\alpha]_D^{25} + 3,9$ (c 0,1; MeOH); HR-ESI-MS 555,2548 [M+Na]⁺ (tính toán cho [C₂₉H₄₀O₉+Na]⁺ 555,2564). IR (KBr) ν_{\max} : 3436, 1634, 1469, 1384, 1293, 1078, 899. ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): xem bảng 4.4.

3.2.5. Norcowanol A (G5)

Chất rắn màu vàng. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): xem bảng 4.5.

3.2.6. Garcinone F (G6)

Chất rắn màu vàng. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): xem bảng 4.6.

3.2.7. Garcicowanone E (G7)

Chất rắn màu vàng. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): xem bảng 4.7.

3.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được

Các tế bào được duy trì ở 37°C và 5% CO₂ trong RPMI-1640 (HyClone, Logan UT) được bổ sung 10% FBS bất hoạt bằng nhiệt (HI) (Gibco, Grand Island NY) và 100 đơn vị/mL penicillin và streptomycin (HyClone, Logan UT)), và được chuyển hóa ở mức hợp lưu phụ (70-80%) bằng cách sử dụng trypsin/EDTA 0,25% (Gibco, Grand Island NY).

Sự phát triển của tế bào được đánh giá bằng phương pháp so màu SRB. Các tế bào được nhân ba lần với mật độ 5000 tế bào/100 μL trong một đĩa có 96 giếng và để yên qua đêm (khoảng 16 giờ) trước khi xử lý bằng các xanthone tương ứng (bảo quản ở 20 mM trong DMSO), với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,5- 32 μM . Mẫu chứng không được xử lý (NT) được sử dụng là mẫu chứng tăng trưởng 100% và các tế bào được cố định tại thời điểm 0 (T_0) được sử dụng là mẫu chứng tăng trưởng 0%. Sau 48 giờ, các tế bào được cố định trong axit trichloroacetic 10% (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ) trước khi nhuộm bằng thuốc nhuộm SRB 0,4% (Alfa Aesar, Heysham England). Sau khi rửa và làm khô các tấm, 200 μL dung dịch Tris 10 mM (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ) đã được thêm vào các tấm để hòa tan lại thuốc nhuộm và độ hấp thụ (abs) được đọc ở bước sóng 510 nm. % tăng trưởng tế bào được tính theo công thức:

$$\% \text{ tăng trưởng tế bào} = \frac{(\text{Abs mẫu} - \text{Avg Abs } T_0)}{(\text{Avg Abs NT} - \text{Avg Abs } T_0)} \times 100$$

Trong đó: Avg là giá trị đo trung bình

Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm SEM và các phân tích thống kê được thực hiện dưới dạng ANOVA hai chiều với so sánh Bonferroni bằng cách sử dụng GraphPad Prism 5. Các giá trị IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng hàm log (chất ức chế) so với phản hồi (4 tham số độ dốc thay đổi) trong GraphPad Prism 5.

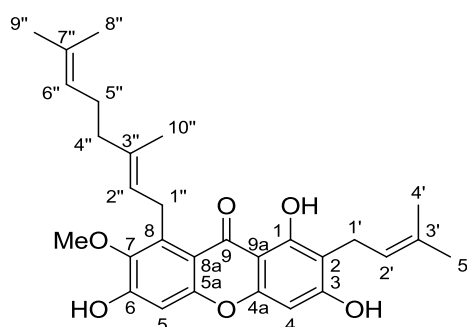
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Phân lập các hợp chất prenyl xanthone từ rễ Tai chua (*G. cowa*)

Rễ cây Tai chua được xử lý và ngâm chiết bằng methanol để tạo ra cặn tổng methanol. Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký cột sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường, pha đảo (RP-18), Sephadex LH-20 và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), bảy hợp chất prenyl xanthone (**G1-G7**) đã được phân lập theo sơ đồ hình 3.1.

4.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất G1-G7

4.2.1. Cowanin (**G1**)



Hình 4. 1. Cấu trúc hóa học của hợp chất **G1**

Hợp chất **G1** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 136-137 °C. Phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của **G1** có các tín hiệu đặc trưng của một khung tetraoxygen xanthone bao gồm một nhóm -OH có liên kết hydro với nhóm C=O tại δ_{H} 13,79 (1H, s, OH-1), một nhóm carbonyl (δ_{C} 182,0, C-9), hai nhóm methine thơm tại [δ_{H} 6,29 (1H, s, H-4); δ_{C} 93,3 (C-4)] và [δ_{H} 6,83 (1H, s, H-5); δ_{C} 101,5 (C-5)], một nhóm methoxy tại [δ_{H} 3,80 (3H, s, 7-OCH₃); δ_{C} 62,1 (OCH₃)] và tín hiệu của 10 carbon không liên kết trực tiếp với hydro trong đó có 6 carbon gắn với oxygen tại δ_{C} 161,6; 160,7; 155,8; 155,1; 154,5 và 142,6.

Ngoài ra, trên phổ ^1H NMR còn có các tín hiệu của ba proton olefin tại δ_{H} 5,29 (1H, m, H-2'), 5,26 (1H, m, H-2'') và 5,03 (1H, m, H-6''); bốn nhóm methylen tại δ_{H} 4,10 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, H-1''), 3,46 (2H, d, $J = 7,0$ Hz, H-1'), 2,06 (2H, m, H-4'') và 2,01 (2H, m, H-5''); và năm nhóm methyl dưới dạng singlet tại δ_{H} 1,84 (H-4'), 1,83 (H-10''), 1,77 (H-5'), 1,59 (H-9'') và 1,55 (H-8''). Các tín hiệu này gợi ý có một nhóm prenyl và một nhóm geranyl gắn với khung xanthone. Kết hợp các phổ COSY, HSQC và HMBC cho phép xác

định các tín hiệu proton và carbon tương ứng của hai nhóm thế này (Bảng 4.1).

Tương tác HMBC giữa proton của nhóm methylene tại δ_{H} 3,46 (H-1') với các carbon C-1 (δ_{C} 160,7), C-2 (δ_{C} 108,4) và C-3 (δ_{C} 161,6) cho phép dự đoán nhóm prenyl gắn với C-2 của khung xanthone. Tương tác HMBC giữa proton methylen δ_{H} 4,10 (H-1'') với các carbon C-7 (δ_{C} 142,6), C-8 (δ_{C} 137,2) và C-8a (δ_{C} 112,3) gợi ý nhóm geranyl gắn với khung xanthone tại C-8. Vị trí của hai proton thơm H-4 và H-5 được phân biệt nhờ tương tác HMBC giữa H-4 với C-3, C-4a (δ_{C} 154,5) và C-9a (δ_{C} 103,7), giữa H-5 với C-6 (δ_{C} 155,8), C-7 và C-8a. Các proton của nhóm methoxy có tương tác HMBC với carbon C-7 cho phép xác định vị trí của nhóm methoxy tại C-7 của khung xanthone.

Các dữ liệu phổ NMR của hợp chất **G1** (Bảng 4.1) cho phép dự đoán **G1** là hợp chất cowanin, một prenyl xanthone đã được phân lập trước đó từ thân cây Tai chua. Khi so sánh các dữ liệu NMR của **G1** và của cowanin [8] thì thấy hoàn toàn trùng khớp (Bảng 4.1). Do đó hợp chất **G1** được xác định là cowanin.

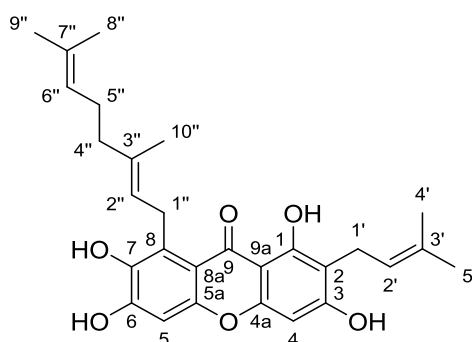
Bảng 4. 1. Dữ liệu phổ NMR của **G1** và cowanin

| Vị trí | G1 | | Cowanin |
|--------|-------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ |
| 1 | | 160,7 | 160,9 |
| 2 | | 108,4 | 108,7 |
| 3 | | 161,6 | 161,8 |
| 4 | 6,29 (s) | 93,3 | 93,5 |
| 4a | | 154,5 | 154,8 |
| 5 | 6,83 (s) | 101,5 | 101,8 |
| 5a | | 155,1 | 155,3 |
| 6 | | 155,8 | 156,0 |
| 7 | | 142,6 | 142,8 |
| 8 | | 137,2 | 137,6 |
| 8a | | 112,3 | 112,4 |
| 9 | | 182,0 | 182,2 |
| 9a | | 103,7 | 103,8 |
| 1' | 3,46 (d; 7,0) | 21,5 | 21,7 |
| 2' | 5,29 (m) | 121,5 | 121,7 |
| 3' | | 135,8 | 135,9 |
| 4' | 1,84 (s) | 17,9 | 18,1 |
| 5' | 1,77 (s) | 25,8 | 26,1 |
| 1'' | 4,10 (d; 6,5) | 26,5 | 26,7 |

| | | | |
|-------|---------------|-------|-------|
| 2'' | 5,26 (m) | 123,2 | 123,5 |
| 3'' | | 135,6 | 135,8 |
| 4'' | 2,06 (m) | 26,6 | 26,8 |
| 5'' | 2,01 (m) | 39,7 | 39,9 |
| 6'' | 5,03 (t; 7,0) | 124,3 | 124,5 |
| 7'' | | 131,3 | 131,5 |
| 8'' | 1,55 (s) | 17,7 | 17,9 |
| 9'' | 1,59 (s) | 25,6 | 25,9 |
| 10'' | 1,83 (s) | 16,5 | 16,7 |
| 7-OMe | 3,80 (s) | 62,1 | 62,3 |
| 1-OH | 13,79 (s) | | |

^a Đo trong CDCl₃, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

4.2.2. Norcowanin (G2)



Hình 4. 2. Cấu trúc hóa học của hợp chất **G2**

Hợp chất **G2** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 161-162 °C. Phổ ¹H NMR và ¹³C NMR của **G2** có các tín hiệu tương tự như của hợp chất **G1** (cowanin) ngoại trừ sự biến mất của tín hiệu tương ứng với nhóm methoxy tại C-7. Khi so sánh các dữ liệu phổ của **G2** với dữ liệu của norcowanin [6] (Bảng 4.2) và cowanin (Bảng 4.1) chúng tôi xác định **G2** là norcowanin.

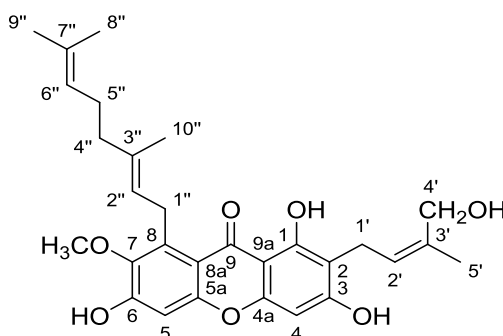
Bảng 4.2. Dữ liệu phổ NMR của **G2** và norcowanin [6]

| Vị trí | G2 | | Norcowanin [6] |
|--------|-------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ (mult; J) |
| 1 | | 160,6 | 160,9 |
| 2 | | 108,4 | 108,7 |
| 3 | | 161,6 | 161,8 |
| 4 | 6,29 (s) | 93,2 | 93,5 |
| 4a | | 153,7 | 154,8 |
| 5 | 6,82 (s) | 101,3 | 101,8 |
| 5a | | 155,1 | 155,3 |
| 6 | | - | 156,0 |

| | | | |
|------|---------------|-------|-------|
| 7 | | 144,2 | 142,8 |
| 8 | | 139,7 | 137,6 |
| 8a | | 111,4 | 112,4 |
| 9 | | 182,7 | 182,2 |
| 9a | | 103,7 | 103,8 |
| 1' | 3,45 (d; 6,5) | 21,5 | 21,7 |
| 2' | 5,31 (m) | 121,5 | 121,7 |
| 3' | | 135,7 | 135,9 |
| 4' | 1,87 (s) | 17,9 | 18,15 |
| 5' | 1,77 (s) | 25,8 | 26,1 |
| 1'' | 4,37 (d; 7,0) | 26,0 | 26,7 |
| 2'' | 5,30 (m) | 121,4 | 123,5 |
| 3'' | | 139,5 | 135,8 |
| 4'' | 2,13 (m) | 26,3 | 26,8 |
| 5'' | 2,13 (m) | 39,7 | 39,9 |
| 6'' | 5,04 (t, 7,0) | 123,7 | 124,5 |
| 7'' | | 132,3 | 131,5 |
| 8'' | 1,59 (s) | 17,7 | 17,9 |
| 9'' | 1,67 (s) | 25,7 | 25,9 |
| 10'' | 1,84 (s) | 16,3 | 16,7 |
| 1-OH | 13,77 (s) | - | |

^a Đo trong CDCl₃, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

4.2.3. Cowanol (G3)



Hình 4. 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất **G3**

Hợp chất **G3** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 124-125 °C. Phổ ¹H và ¹³C NMR của **G3** có các tín hiệu tương tự như của hợp chất **G1**, ngoại trừ sự biến mất của một nhóm methyl của mạch nhánh prenyl và xuất hiện thêm một nhóm oxymethylene tại δ_H 4,35 (2H, s, H-4')/ δ_C 62,7 (C-4'). Các dữ liệu này cho phép dự đoán **G3** là hợp chất cowanol (có cấu trúc như hình 4.4). Khi so sánh các dữ liệu phổ NMR

của **G3** với dữ liệu công bố của cowanol [6, 21] thì hoàn toàn trùng khớp (Bảng 4.3). Do đó có thể khẳng định **G3** là cowanol.

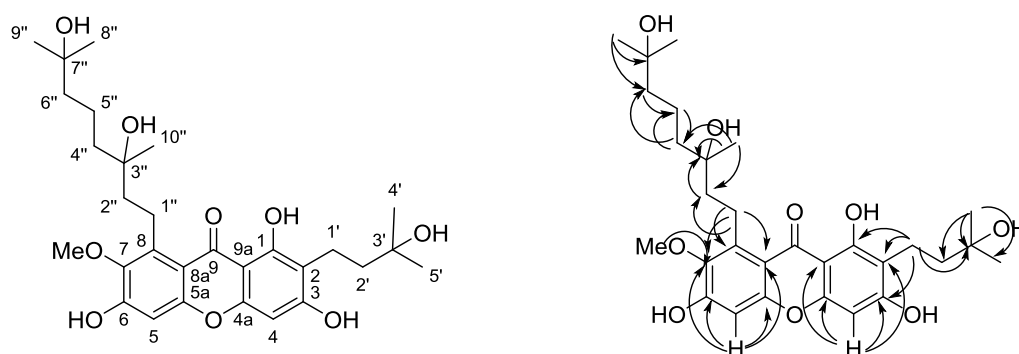
Bảng 4.3. Dữ liệu phổ NMR của **G3** và cowanol

| Vị trí | G3 | | Cowanol | |
|--------|---------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; <i>J</i>) | | $\delta_{\text{H}}^{\text{ad}}$ (mult; <i>J</i>) [6] | $\delta_{\text{C}}^{\text{ef}}$ [21] |
| 1 | | 160,8 | | 159,9 |
| 2 | | 108,4 | | 109,3 |
| 3 | | 161,6 | | 162,2 |
| 4 | 6,26 (s) | 93,6 | 6,28 (s) | 92,2 |
| 4a | | 155,2 | | 154,2 |
| 5 | 6,77 (s) | 101,7 | 6,80 (s) | 101,8 |
| 5a | | 155,8 | | 154,6 |
| 6 | | 154,7 | | 156,9 |
| 7 | | 142,8 | | 143,3 |
| 8 | | 137,3 | | 136,5 |
| 8a | | 112,3 | | 109,9 |
| 9 | | 181,9 | | 181,2 |
| 9a | | 103,5 | | 101,9 |
| 1' | 3,50 (d; 8,0) | 21,5 | 3,51 (d; 7,0) | 20,4 |
| 2' | 5,49 (dt; 8,0; 1,5) | 126,9 | 5,47 (t; 7,0) | 123,4 |
| 3' | | 133,5 | | 135,1 |
| 4' | 4,35 (s) | 62,7 | 4,35 (s) | 59,6 |
| 5' | 1,79 (d; 1,0) | 22,6 | 1,79 (br) | 21,1 |
| 1'' | 4,08 (d; 6,5) | 26,5 | 4,09 (d, 7,0) | 25,6 |
| 2'' | 5,25 (dt; 6,0; 1,0) | 123,4 | 5,24 (d, 7,0) | 123,7 |
| 3'' | | 135,5 | | 133,8 |
| 4'' | 1,99 (m) | 39,7 | 2,03 (m) | 39,3 |
| 5'' | 2,04 (m) | 26,7 | 2,03 (m) | 26,0 |
| 6'' | 5,03 (m) | 124,4 | 5,02 (t, 7,0) | 124,1 |
| 7'' | | 131,2 | | 130,5 |
| 8'' | 1,54 (s) | 17,6 | 1,54 (s) | 17,4 |
| 9'' | 1,60 (d, 1,0) | 25,5 | 1,59 (s) | 25,3 |
| 10'' | 1,82 (br s) | 16,5 | 1,82 (s) | 16,1 |
| 7-OMe | 3,80 (s) | 61,9 | 3,79 (s) | 60,1 |
| 1-OH | 13,83 (s) | | 13,96 (s) | |

^a Đo trong CDCl₃, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz, ^d 400 MHz,

^e đo trong d₆-DMSO, ^f 75 MHz.

4.2.4. Garcicowanone I (**G4**, hợp chất mới)



Hình 4. 4. Cấu trúc hóa học của và tương tác HMBC của hợp chất **G4**

Hợp chất **G4** (garcicowanone I) thu được ở dạng chất rắn màu vàng. Công thức phân tử của **G4** được xác định là $C_{29}H_{40}O_9$ dựa trên pic ion giả phân tử cộng natri tại m/z 555,2548 $[M+Na]^+$. Phổ 1H và ^{13}C NMR của **G4** có các tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của một khung xanthone tương tự như cowanin (**G1**).

Tín hiệu cộng hưởng của một nhóm carbonyl (δ_C 183,2, C-9), hai nhóm methin thơm [δ_H 6,27 (H-4)/ δ_C 93,2 và δ_H 6,71 (H-5)/ δ_C 102,8], một nhóm methoxy [δ_H 3,85 (7-OCH₃)/ δ_C 61,6] và 10 nguyên tử carbon thơm (δ_C 163,7–103,8) được gán cho một đơn vị tetraoxygen xanthone, tương tự như các chất **G1-G3**. Các tương tác trên phổ COSY và HMBC giữa các proton methoxy và C-7 (δ_C 144,8) cho phép xác định vị trí của nhóm methoxy này tại C-7 của khung xanthone.

Khi so sánh phổ NMR của cowanin và **G4** có thể nhận thấy các tín hiệu proton và carbon của hai mạch nhánh geranyl và prenyl ở cowanin được thay thế bởi các tín hiệu của 1 nhóm geranyl và 1 nhóm prenyl đã được hydrate hóa các nối đôi. Kết hợp các phổ NMR 1 và 2 chiều cho phép gán các tín hiệu proton và carbon cho mỗi mạch nhánh. Mạch nhánh thứ nhất là một nhóm 3-hydroxyisoprenyl bao gồm hai nhóm methylene [δ_H 2,70 (m, H-1')/ δ_C 18,4; δ_H 1,70 (m, H-2')/ δ_C 43,3], hai nhóm methyl [δ_H 1,29 (s, H-4', H-5')/ δ_C 29,2] và một carbon bậc ba oxygen hóa (δ_C 71,8, C-3'). Nhóm 3-hydroxyisoprenyl này được chứng minh là gắn vào C-2 của khung xanthone dựa trên tương tác HMBC giữa các proton methylen H-1' với hai carbon thơm gắn với oxygen là C-1 (δ_C 161,7) và C-3 (δ_C 163,7), và với C-2 (δ_C 112,3) của khung xanthone. Mạch nhánh thứ hai được xác định là một nhóm 3,7-dihydroxy-3,7-dimethyloctyl (nhóm 3,7-dihydroxygeranyl) bao gồm năm nhóm methylene

[δ_{H} 3,39 (m, H-1'')/ δ_{C} 23,2; δ_{H} 1,74–1,80 (m, H-2'')/ δ_{C} 43,3; δ_{H} 1,59 (m, H-4'')/ δ_{C} 43,0; δ_{H} 1,55 (m, H-5'')/ δ_{C} 19,8; và δ_{H} 1,53 (m, H-6'')/ δ_{C} 45,7], ba nhóm methyl [δ_{H} 1,24 (s, H-8'')/ δ_{C} 29,3; δ_{H} 1,24 (s, H-9'')/ δ_{C} 29,3; δ_{H} 1,34 (s, H-10'')/ δ_{C} 27,2] và hai carbon bậc ba gắn với oxygen [δ_{C} 73,9 (C-3''); 71,7 (C-7'')]. Vị trí gắn kết của nhóm 3,7-dihydroxygeranyl này với carbon ở vị trí C-8, đã được xác định bởi tương tác HMBC giữa proton methylen H-1'' và C-8 (δ_{C} 139,9)/C-7 (δ_{C} 144,8) /C-8a (δ_{C} 112,2). Do đó, cấu trúc của **G4** được xác định là 7-methoxy-1,3,6-trihydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl-8-(3,7-dihydroxy-3,7-dimethyl octyl)xanthone (garcicowanone I). Kết quả phân tích dữ liệu phổ NMR cho thấy **G4** chỉ khác so với garcicowanone D [22] là nhóm OH-7 đã bị methyl hóa.

Các dữ liệu phổ NMR của **G4** và garcicowanone D [22] được trình bày trong bảng 4.4.

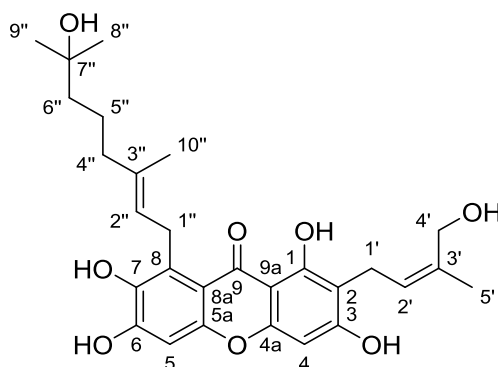
Bảng 4.4. Dữ liệu phổ NMR của **G4** và garcicowanone D

| Vị trí | G4 | | Garcicowanone D [22] | |
|--------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ |
| 1 | - | 161,7 | | 161,6 |
| 2 | - | 112,3 | | 112,0 |
| 3 | - | 163,7 | | 163,5 |
| 4 | 6,27 s | 93,2 | 6,28 s | 93,0 |
| 4a | - | 156,2 | | 156,3 |
| 5 | 6,71 s | 102,8 | 6,71 s | 101,1 |
| 5a | - | 156,8 | | 153,4 |
| 6 | - | 158,0 | | 154,2 |
| 7 | - | 144,8 | | 142,0 |
| 8 | - | 139,9 | | 131,0 |
| 8a | - | 112,2 | | 112,0 |
| 9 | - | 183,2 | | 183,6 |
| 9a | - | 103,8 | | 103,9 |
| 7-OMe | 3,85 s | 61,6 | | |
| 1' | 2,70 m | 18,4 | 2,71 m | 18,4 |
| 2' | 1,70 m | 43,3 | 1,70 m | 43,4 |
| 3' | - | 71,8 | | 71,8 |
| 4' | 1,29 s | 29,2 | 1,29 s | 29,2 |
| 5' | 1,29 s | 29,2 | 1,29 s | 29,2 |
| 1'' | 3,39 m | 23,2 | 3,44 m | 22,7 |
| 2'' | 1,80-1,74 m | 43,3 | 1,85-1,77 m | 42,1 |
| 3'' | - | 73,9 | | 74,1 |
| 4'' | 1,59 m | 43,0 | 1,56 m | 43,2 |

| | | | | |
|-----|--------|------|---------------|------|
| 5" | 1,55 m | 19,8 | 1,57 m-1,51 m | 19,9 |
| 6" | 1,53 m | 45,7 | 1,51 m | 45,6 |
| 7" | - | 71,7 | | 71,7 |
| 8" | 1,24 s | 29,3 | 1,23 s | 29,0 |
| 9" | 1,24 s | 29,3 | 1,23 s | 29,0 |
| 10" | 1,34 s | 27,2 | 1,32 s | 27,2 |

^a Đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

4.2.5. Norcowanol A (G5)



Hình 4.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất G5

Hợp chất **G5** được phân lập được dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Các tín hiệu cộng hưởng trên phổ ¹H và ¹³C NMR của **G5** có nhiều điểm tương đồng với phổ NMR của norcowanin (**G2**), ngoại trừ các tín hiệu NMR của hai mạch nhánh của **G5** tương ứng với nhóm geranyl và prenyl bị hydrate hóa.

Nhóm hydroxyprenyl được xác định là nhóm 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl do tương tác HMBC giữa các proton oxymethylen tại δ_{H} 4,33 (2H, s, H-4') với carbon methine tại δ_{C} 126,8 (C-2'), một carbon olefin không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_{C} 135,1 (C-3') và một carbon methyl tại δ_{C} 21,7 (C-5'). Vị trí nhóm prenyl gắn với khung xanthone ở C-2 được thể hiện rõ từ tương tác HMBC giữa proton ở δ_{H} 3,41 (2H, $J = 7,5$, H-1') với C-1 (δ_{C} 161,5), C-2 (δ_{C} 110,3) và C-3 (δ_{C} 163,2) của khung xanthone, tương tự như norcowanin (**G2**). Nhóm thế thứ hai được xác định là nhóm 7-hydroxy-3,7-trimethyloct-2-enyl, bao gồm các nhóm tín hiệu của một nhóm CH=C olefin, bốn nhóm methylen, ba nhóm methyl và một carbon bậc ba oxygen hóa [δ_{H} 4.15 (2H, d, $J = 6.5$, H-1'')/ δ_{C} 26.5, δ_{H} 5.29 (1H, t, $J = 7.0, 6.5$, H-2'')/ δ_{C} 125.0, δ_{C} 135.5

(C-3''), δ_{H} 1,98 (2H, d, $J = 7,0$, H-4'')/ δ_{C} 41,3, δ_{H} 1,46 (2H, m, H-5'')/ δ_{C} 23,5, δ_{H} 1,46 (2H, m, H-6'')/ δ_{C} 44,1, δ_{C} 71,5 (C-7''), δ_{H} 1,12 (3H, s, H-8'', H-9'')/ δ_{C} 29,1, δ_{H} 1,85 (3H, s, H-10'')/ δ_{C} 16,5]. Tín hiệu độ dịch chuyển hóa học giống nhau của hai nhóm methyl đặc trưng cho tín hiệu của carbon bậc 3 C-7'' có gắn với nhóm -OH. Tương tác HMBC giữa các proton H-1'' với các carbon ở C-7 (δ_{C} 142,5), C-8 (129,2) và C-8a (112,1) cho phép xác định vị trí liên kết của nhóm thế thứ 2 với C-8 của khung xanthone.

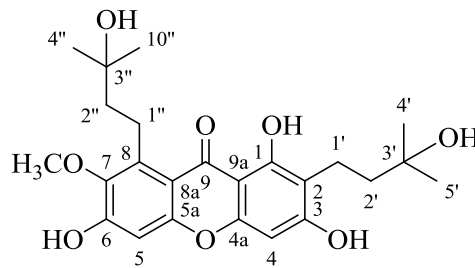
Các dữ liệu phổ NMR (Bảng 4.5) của **G5** cho phép dự đoán **G5** chính là 1,3,6,7-tetrahydroxy-2-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-8-(7-hydroxy-3,7-dimethyloct-2-enyl)xanthone (norcowanol A). Norcowanol A đã được phân lập gần đây từ nhựa cây Tai chua mọc tại Việt Nam và có các dữ liệu phổ hoàn toàn trùng khớp với **G5** [24].

Bảng 4.5. Dữ liệu phổ NMR của **G5**

| Vị trí | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | Vị trí | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ |
|--------|----------------------------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | | 161,5 | 1' | 3,40 (d; 7,5) | 21,8 |
| 2 | | 110,3 | 2' | 5,43 (t; 7,0; 7,5) | 126,8 |
| 3 | | 163,2 | 3' | | 135,1 |
| 4 | 6,27 (s) | 93,1 | 4' | 4,33 (s) | 61,8 |
| 4a | | 156,4 | 5' | 1,77 (s) | 21,7 |
| 5 | 6,69 (s) | 101,0 | 1'' | 4,15 (d; 6,5) | 26,5 |
| 5a | | 153,9 | 2'' | 5,29 (t; 7,0; 6,5) | 125,0 |
| 6 | | 154,2 | 3'' | | 135,5 |
| 7 | | 142,5 | 4'' | 1,98 (t; 7,0) | 41,3 |
| 8 | | 129,5 | 5'' | 1,45 (m) | 23,5 |
| 8a | | 112,1 | 6'' | 1,35 (m) | 44,1 |
| 9 | | 183,5 | 7'' | | 71,5 |
| 9a | | 103,9 | 8'' | 1,12 (s) | 29,1 |
| | | | 9'' | 1,12 (s) | 29,1 |
| | | | 10'' | 1,85 (s) | 16,5 |

^a Đo trong CD_3OD , ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

4.2.6. Garcinone F (G6)



Hình 4.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất **G6**

Hợp chất **G6** được phân lập dưới dạng kim màu vàng. Phổ ^1H và ^{13}C NMR của **G6** thể hiện các tín hiệu đặc trưng của khung tetraoxygen xanthone có hai nhóm thế 3-hydroxyprenyl, bao gồm tín hiệu của hai nhóm methine thơm tại δ_{H} 6,26 (1H, s, H-4)/ δ_{C} 93,2 và δ_{H} 6,70 (1H, s, H-5)/ δ_{C} 102,7, một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,85 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)/ δ_{C} 61,6, một nhóm 3-hydroxy-3-methylbutyl với các tín hiệu tại [δ_{H} 2,70 (2H, m, H-1')/ δ_{C} 18,4; δ_{H} 1,70 (2H, m, H-2')/ δ_{C} 43,3; δ_{C} 71,8 (C-3'); δ_{H} 1,29 (6H, s, H-4', H-5')/ δ_{C} 29,0] và một nhóm 3-hydroxy-3-methylbutyl thứ hai với các tín hiệu [δ_{H} 3,41 (2H, m, H-1'')/ δ_{C} 23,6; δ_{H} 1,76 (2H, m, H-2'')/ δ_{C} 45,6; δ_{C} 71,9 (C-3''); δ_{H} 1,35 (6H, s, H-4'', H-5'')/ δ_{C} 29,0]. Vị trí liên kết của hai nhóm thế 3-hydroxyprenyl được xác định tại C-2 và C-8 dựa trên các tương tác HMBC giữa H-1' với C-1 (δ_{C} 161,6)/C-2 (δ_{C} 112,2)/C-3 (δ_{C} 163,7), và giữa H-1'' với C-7 (δ_{C} 144,7)/C-8 (δ_{C} 139,8)/C-8a (δ_{C} 112,2). Dữ liệu ^1H và ^{13}C NMR của **G6** (Bảng 4.6) hoàn toàn trùng khớp với dữ liệu được công bố của hợp chất garcinone F [24] được phân lập trước đây từ nhựa cây Tai chua *G. cowa*. Do đó có thể khẳng định **G6** chính là garcinone F.

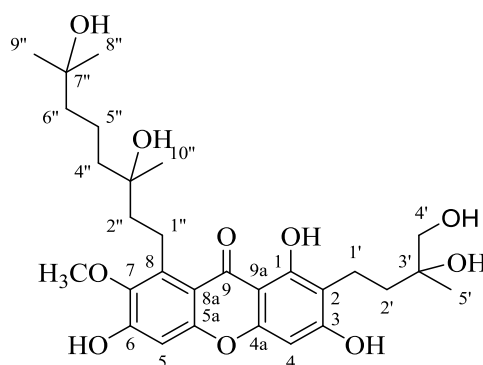
Bảng 4.6. Dữ liệu phổ NMR của **G6**

| Vị trí | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | Vị trí | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (mult; J) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ |
|--------|-------------------------------------------|---------------------------------|--------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | | 161,6 | 9a | | 103,8 |
| 2 | | 112,2 | 1' | 2,69 (m) | 18,4 |
| 3 | | 163,7 | 2' | 1,70 (m) | 43,3 |
| 4 | 6,26 (s) | 93,2 | 3' | | 71,8 |
| 4a | | 156,2 | 4' | 1,29 (s) | 29 |
| 5 | 6,70 (s) | 102,7 | 5' | 1,29 (s) | 29 |
| 5a | | 157,9 | 1'' | 3,41 (m) | 23,6 |
| 6 | | 156,8 | 2'' | 1,76 (m) | 45,6 |
| 7 | | 144,7 | 3'' | | 71,9 |
| 8 | | 139,8 | 4'' | 1,35 (s) | 29,0 |

| | | | | | |
|----|--|-------|-------|----------|------|
| 8a | | 112,2 | 5'' | 1,35 (s) | 29,0 |
| 9 | | 183,1 | 7-OMe | 3,85 (s) | 61,6 |

^a Đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

4.2.7. Garcicowanone E (G7)



Hình 4.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất G7

Hợp chất **G7** được phân lập dưới dạng bột màu vàng, mp. 226-228 °C. Phổ ¹H và ¹³C NMR của **G7** có các tín hiệu gần như tương tự của **G4**, ngoại trừ sự xuất hiện của một nhóm hydroxymethylen [δ_{H} 3,47 (2H, d, $J = 3,0$ Hz, H-4')/ δ_{C} 70,6] thay cho nhóm methyl (C-4') trên mạch nhánh prenyl. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa proton nhóm methylen H-4' với C-3' (δ_{C} 74,0), C-2' (δ_{C} 38,3), và C-5' (δ_{C} 23,3), và giữa H₂-1' (δ_{H} 2,73, m) với C-2', C-3' khẳng định sự có mặt của một nhóm 3',4'-dihydroxy-3'-methylbutyl. Vị trí của mạch nhánh prenyl được xác định ở C-2 bởi các tương tác HMBC giữa proton nhóm methylen H-1' và C-1 (δ_{C} 161,7)/ C-2 (δ_{C} 112,2)/ C-3 (δ_{C} 163,8). Vị trí của nhóm methoxy tại C-7 được khẳng định bởi tương tác HMBC giữa các proton methyl (δ_{H} 3,86) với C-7 (δ_{C} 144,9). Các dữ liệu NMR của mạch nhánh geranyl gần như trùng khớp với dữ liệu của nhóm geranyl thuộc **G4**. Trên cơ sở các dữ liệu phổ 1D và 2D NMR, cấu trúc của **G7** được xác định là 7-methoxy-1,3,6-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxy-3-methylbutyl)-8-(3,7-dihydroxy-3,7-dimethyl-octyl)xanthone hay garcicowanone E, một prenyl xanthone đã được phân lập trước đó từ rễ cây Tai chua [22].

Bảng 4.7. Dữ liệu phổ NMR của G7

| | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ | Vị trí | $\delta_{\text{H}}^{\text{ab}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}^{\text{ac}}$ |
|-------|-------------------------------------------|---------------------------------|--------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | | 161,7 | 1' | 2,73 m | 17,6 |
| 2 | | 112,2 | 2' | 1,72 t (8,4) | 38,3 |
| 3 | | 163,8 | 3' | | 74,0 |
| 4 | 6,29 s | 93,3 | 4' | 3,47 d (3,0) | 70,6 |
| 4a | | 156,3 | 5' | 1,26 s | 23,3 |
| 5 | 6,74 s | 102,8 | 1'' | 3,40 m | 23,2 |
| 5a | | 156,8 | 2'' | 1,75 m | 43,4 |
| 6 | | 158,0 | 3'' | | 73,9 |
| 7 | | 144,9 | 4'' | 1,59 m | 43,0 |
| 8 | | 139,9 | 5'' | 1,59 m 1,54 m | 19,8 |
| 8a | | 112,3 | 6'' | 1,53 m | 45,6 |
| 9 | | 183,2 | 7'' | | 71,7 |
| 9a | | 103,8 | 8'' | 1,24 s | 29,2 |
| 7-OMe | 3,86 s | 61,6 | 9'' | 1,24 s | 29,3 |
| | | | 10'' | 1,34 s | 27,1 |

^a Đo trong CD_3OD , ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

4.3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất G4-G7

Các hợp chất **G1-G3** (cowanin, norcowanin, cowanol) là các hợp chất có mặt trong nhiều bộ phận của cây Tai chua và đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất này. Do đó chúng tôi lựa chọn các hợp chất **G4-G7** là các prenyl xanthone mới được phân lập gần đây nhất để nghiên cứu hoạt tính chống ung thư. Hợp chất **G4-G7** được đánh giá về hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* đối với dòng tế bào ung thư đại tràng (HT-29 và HCT 116), ung thư buồng trứng (A2780) và ung thư buồng trứng kháng cisplatin (A2780cis) bằng cách sử dụng phương pháp Sulforhodamine B (SRB). Nồng độ ức chế IC_{50} của các chất được đưa ra trong Bảng 4.8.

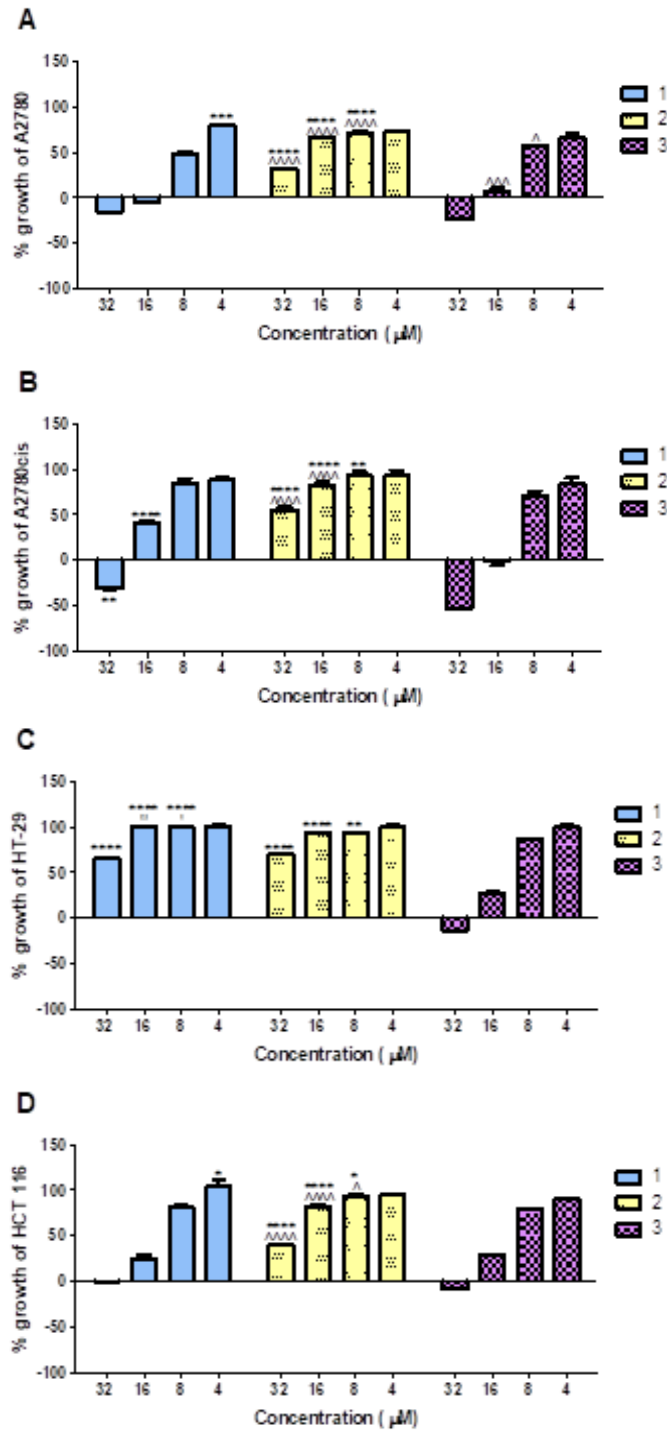
Bảng 4.8. Giá trị IC_{50} của **G4-G7** đối với dòng tế bào HT-29, HCT116, A2780 và A2780cis

| Hợp chất | IC_{50} (μM) | | | |
|--------------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | A2780 | A2780cis | HCT116 | HT-29 |
| G4 | 10,3 \pm 0,7 | 19,3 \pm 1,1 | 12,8 \pm 0,7 | ND* |
| G5 | ND* | ND* | ND* | ND* |
| G6 | 15,3 \pm 1,0 | 14,7 \pm 0,4 | 15,2 \pm 0,7 | 13,9 \pm 0,8 |
| G7 | ND* | ND* | ND* | ND* |
| Ellipticine | 1,30 | 2,46 | 1,41 | 1,99 |

ND*: không xác định, IC_{50} lớn hơn khoảng nồng độ thử nghiệm (0,5-32 μM)

Kết quả cho thấy **G4** và **G6** thể hiện hoạt tính gây độc từ trung bình đến tương đối mạnh trên các dòng tế bào thử nghiệm. Hợp chất **G5** và **G7** có hoạt tính yếu nhất với giá trị IC_{50} lớn hơn khoảng nồng độ thử nghiệm (0,5-32 μM) đối với cả 4 dòng tế bào. Đáng chú ý là **G4** và **G6** đều thể hiện hoạt tính gần như nhau trên hai dòng tế bào A2780 và A2780cis kháng cisplatin (IC_{50} của **G4** lần lượt là 10,3 μM và 19,3 μM , và của **G6** là 15,3 μM và 14,7 μM).

Tiếp đó chúng tôi đánh giá sự khác nhau về ảnh hưởng đối với sự tăng sinh tế bào ung thư (A2780, A2780 cis, HCT116 và HT-29) khi xử lý với ba xanthone **G4-G6**, so sánh với mẫu trắng (100% growth) và mẫu chứng T_0 (0% growth).



Hình 4. 2. Hợp chất **G4** (mẫu 1), **G5** (mẫu 2) và **G6** (mẫu 3) thể hiện độc tính đối với tế bào ung thư.

Tế bào **A**) A2780, **B**) A2780cis, **C**) HT-29, and **D**) HCT116 được xử lý với chất **G4-G6** trong 48h và được đánh giá bởi phương pháp SRB và tính toán tương đối với 100% mẫu trắng (không xử lý) và 0% mẫu chứng (T_0). Giá trị tăng sinh âm thể hiện sự chết của tế bào. Dữ liệu được trình bày ở dạng trung bình của 3 lần đo ($n=3$) (Sai số thống kê được tính bằng ANOVA hai chiều với nhiều test so sánh Bonferroni so sánh từng hợp chất ở nồng độ tương ứng trong đó % tăng sinh cao hơn đáng kể (giảm hoạt động gây độc tế bào: $^{****} p<0,0001$, $^{***} p<0,001$ và $^{**} p<0,01$ so với **G4**, $^{\prime} p<0,01$ và $^{\prime} p<0,05$ so với **G5**, và $^{****} p<0,0001$, $^{***} p<0,001$ $^{**} p<0,01$ và $^{*} p<0,05$ so với **G6**).

Kết quả nghiên cứu cho thấy hợp chất **G5** thể hiện hoạt tính kém hơn nhiều so với hợp chất **G4** và **G6** trên các dòng tế bào thử nghiệm, trừ trường hợp **G4** cũng thể hiện hoạt tính kém trên dòng tế bào HT-29. Với dòng tế bào A2780, hợp chất **G4** thể hiện tác dụng mạnh tại cả ba nồng độ 4 μM , 8 μM và 16 μM . Hai hợp chất **G4** và **G6** đều thể hiện hoạt tính tương tự nhau trên dòng tế bào HCT116 và dòng tế bào A2780 tại nồng độ cao (32 μM). Trên dòng tế bào kháng cisplatin A2780cis, hợp chất **G4** thể hiện khả năng ức chế tăng sinh thấp hơn hợp chất **G6** tại nồng độ 16 và 32 μM . Các kết quả nghiên cứu ức chế tăng sinh tế bào hoàn toàn phù hợp với các giá trị IC_{50} đưa ra trong bảng 4.8.

Đặc biệt, cả hai hợp chất **G4** và **G6** đều có độc tính và gây chết tế bào tại nồng độ cao (16-32 μM) trên các dòng tế bào thử nghiệm như chỉ ra trên hình vẽ với giá trị âm của tăng sinh tế bào, thể hiện các mẫu có chứa xanthone ít tế bào hơn so với mẫu đối chứng T_0 . Các kết quả này thống nhất với công bố trước đó chứng minh các xanthone không những có khả năng kìm hãm sự phát triển của tế bào (cytostatic), mà còn thể hiện hoạt tính gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) trong khoảng nồng độ tương tự như các chất được thử nghiệm ở nghiên cứu này [45, 46].

KẾT LUẬN

Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký cột thường, sắc ký cột Sephadex, sắc ký cột pha đảo và HPLC, bảy hợp chất prenyl xanthone đã được phân lập từ rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) mọc tại Việt Nam, bao gồm cowanin (**G1**), norcowanin (**G2**), cowanol (**G3**), garcicowanone I (**G4**), norcowanol A (**G5**), garcinol F (**G6**) và garcicowanone E (**G7**). Trong số đó hợp chất **garcicowanone I (G4)** là hợp chất mới lần đầu được phân lập từ tự nhiên. Các hợp chất norcowanol A (**G5**), và garcinol F (**G6**) cũng được phân lập lần đầu từ rễ cây Tai chua.

Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư đại tràng (HT-29 và HCT 116), ung thư buồng trứng (A2780) và ung thư buồng trứng kháng cisplatin (A2780cis) của các hợp chất **G4-G7** cho thấy hợp chất **G4** và **G6** thể hiện hoạt tính gây độc từ trung bình đến tương đối mạnh trên các dòng tế bào thử nghiệm. Đáng chú ý là **G4** và **G6** đều thể hiện hoạt tính gần như nhau trên hai dòng tế bào A2780 và A2780cis kháng cisplatin (IC_{50} : 10,3 μ M và 19,3 μ M, của **G4** và 15,3 μ M và 14,7 μ M, của **G6**). Thử nghiệm chống tăng sinh ở các nồng độ khác nhau cho thấy hai hợp chất **G4** và **G6** đều có độc tính và gây chết tế bào tại nồng độ cao (16-32 μ M) trên các dòng tế bào thử nghiệm.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học của rễ cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.)
- Tiếp tục nghiên cứu về hoạt tính chống ung thư của các hợp chất phân lập được và cơ chế tác dụng.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Thi Thu Thuy Tran, Phuong Mai Le, Thi Kim An Nguyen, **Thi Minh Nguyet Hoang**, Thi Quynh An Do, Alexandrine L. Martel, Jordan D. Lewicky, Alexandra Klem, Hoang Thanh Le, 2023, Novel human STING activation by hydrated-prenylated xanthones from *Garcinia cowa*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 75(8), 1058-1065. doi: 10.1093/jpp/rgad038.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ, 1999, *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ Tp. Hồ Chí Minh, quyển 1.
2. Nguyễn Hữu Toàn, 2005, *Tai chua*, Thaythuoccuaban.com, <https://www.thaythuoccuaban.com/vithuoc/taichua.htm>.
3. Kaennakam S., Siripong P., Tip-pyang S., 2015, Kaennacowanols A-C, three new xanthenes and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa*, *Fitoterapia*, 102, 171-176.
4. Panthong K., Pongcharoen W., Phongpaichit S., Taylor W.C., 2006, Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*, *Phytochemistry*, 67(10), 999-1004.
5. Panthong K., Hutadilok-Towatana N., Panthong A., 2009, Cowaxanthone F, A new tetraoxygenated xanthone, and other anti-inflammatory and antioxygendant compounds from *Garcinia cowa*, *Canadian Journal of Chemistry*, 87, 1636-1640.
6. Na Pattalung P., Thongtheeraparp W., Wiriyaichitra P., Taylor W.C., 1994, Xanthenes of *Garcinia cowa*, *Planta Medica*, 60(4), 365-8.
7. Auranwiwat C., Trisuwan K., Saiai A., Pyne S.G., Ritthiwigrom T., 2014, Antibacterial tetraoxygenated xanthenes from the immature fruits of *Garcinia cowa*, *Fitoterapia*, 98, 179-183.
8. Wahyuni F. S., Stanslas J., Lajis N., Hamidi D, 2015, Cytotoxic xanthenes from the stem bark of *Garcinia cowa* Roxb, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 227-236.
9. Xu G., Kan W.L.T., Zhou Y., Song J.-Z., Han Q.B., Qiao C.F., Cho C.H., Rudd J.A., Lin G., Xu H.X., 2010, Cytotoxic acylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia cowa*, *Journal of Natural Products*, 73(2), 104-108.
10. Sakunpak A., Panichayupakaranan P., 2012, Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry*, 130, 826–831.
11. Sriyatep T., Maneerat W., Sripisut T., Cheenpracha S., Machan T., Phakhodee W., Laphookhieo S., 2014, Cowabenzophenones A and B, two

- new tetracyclo[7.3.3.33,11.03,7]tetradecane-2,12,14-trione derivatives, from ripe fruits of *Garcinia cowa*, *Fitoterapia*, 92, 285-289.
12. Shen J., Yang J., 2007, Chemical constituents of branch of *Garcinia cowa* Roxb, *Zhongcaoyao*, 38, 993-994.
 13. Shen J., Tian Z., Yang J.S., 2007, The constituents from the stems of *Garcinia cowa* Roxb. and their cytotoxic activities, *Pharmazie*, 62(7), 549-51.
 14. Cheenpracha S., Phakhodee W., Ritthiwigrom T., Prawat U., Laphookhieno S., 2011, A new depsidone from the twigs of *Garcinia cowa*, *Heterocycles*, 83, 1139-1144.
 15. Jena B.S., Jayaprakasha G., Sakariah K., 2002, Organic acids from leaves, fruits, and rinds of *Garcinia cowa*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 3431-4.
 16. Shen J., Yang J.S., 2006, Chemical constituents from fruit of *Garcinia cowa*, *Chinese Pharmaceutical Journal*, 41, 660-661.
 17. Mahabusarakam W., Chairek P., Taylor W.C., 2005, Xanthones from *Garcinia cowa* Roxb. latex, *Phytochemistry*, 66(10), 1148-1153.
 18. Shen J., Yang J.S., 2006, Two new xanthones from the stems of *Garcinia cowa*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 126-128.
 19. Sen A.K., Sarkar K.K., Majumder P.C., Banerji N., 1986, Garcinone D, a new xanthone from *Garcinia mangostana*, *Linn. Indian J. Chem. B*, 25, 1157-1158.
 20. Lihitwitayawuid K., Phadungcharoen T., Mahidol C., Ruchirawat S., 1997, 7-O-Methylgarcinone E from *Garcinia cowa*, *Phytochemical Analysis*, 45, 1299-1301.
 21. Lihitwitayawuid K., Phadungcharoen T., Krungkrai J., 1998, Antimalarial xanthones from *Garcinia cowa*, *Planta Medica*, 64, 70-72.
 22. Nguyen Thi Kim An, Nguyen Van Hien, Nguyen Thi Thuy, Doan Lan Phuong, Ha Gia Bach, Nguyen Thanh Tra, Nguyen Quang Tung, Pham Thi Tham, Bui Huu Tai, Tran Thi Thu Thuy, 2022, Garcicowanones C-E, three new hydrated-geranylated xanthones from the roots of *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy, and their α -glucosidase inhibition activities, *Natural Product Research*, 1-9.

23. Trisuwan K., Ritthiwigrom T., 2012, Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*, *Archives of Pharmacal Research*, 35(10), 1733-1738.
24. Nguyen Thi Kim An, Nguyen Bao Ngoc, Hoang Thi Minh Nguyet, Doan Lan Phuong, Phan Minh Giang, Lee Heesu, Kim Dae Won, Lee Jae Wook, Tran Thi Thu Thuy, 2022, Six new polyoxygenated xanthenes from *Garcinia cowa* and their neuroprotective effects on glutamate-mediated hippocampal neuronal HT22 cell death, *Chemistry and Biodiversity*, 19(9):e202200376. doi: 10.1002/cbdv.202200376.
25. Trisuwan K., Ritthiwigrom T., 2012, Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*, *Archives of Pharmacal Research*, 35(10), 1733-8.
26. Wahyuni F.S., Stanslas J., Lajis N., Hamidi D., 2016, Cytotoxic properties and complete nuclear magnetic resonance assignment of isolated xanthenes from the root of *Garcinia cowa* Roxb, *Pharmacognosy Magazine*, 12 (1), S52-S56.
27. Pattamadilok C., 2016, Xanthenes from *Garcinia cowa* flowers and their cytotoxicity, *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 84-87.
28. Shen J., Yang J.S., 2006, Chemical constituents from fruit of *Garcinia cowa*, *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 41, 660-661.
29. Jayaprakasha G. K., Jena B. S., Rao L. J. M., Varadaraj M. C., A process for the isolation of cambogin from *Garcinia cowa*, *Indian Pattern*, No. 242799.
30. Shen J., Yang J.S., 2007, A novel benzophenone from *Garcinia cowa*, *Acta Chimica Sinica*, 65, 1675-1678.
31. Sakunpak A., Panichayupakaranant P., 2012, Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone, *Food Chemistry*, 130, 826-831.
32. Wahyuni F.S., Stanslas J., Lajis N., Hamidi D., 2015, Cytotoxic compounds from the leaves of *Garcinia cowa* Roxb, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5, 6-11.
33. Wahyuni F. S., Byrne L. T., Dachriyanus, Dianita R., Jubahar J., Lajis N. H., Sargent M. V., 2004, A new ring-reduced tetraprenyltoluquinone and

- a prenylated xanthone from *Garcinia cowa*, *Australian Journal of Chemistry*, 57, 223-226.
34. Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M., Nozawa Y., 2008, Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen, *International Journal of Molecular Sciences*, 9(3), 355-70.
 35. Chen G., Li Y., Wang W., Deng L., 2018, Bioactivity and pharmacological properties of *a*-mangostin from the mangosteen fruit, *Expert Opinioon on Therapeutic Patents*, 28(5),415- 427
 36. Tian Z., Shen J., Moseman A.P., Yang Q., Yang J., Xiao P., Wu E., Kohane I.S., 2008, Dulxanthone A induces cell cycle arrest and apoptosis via up-regulation of p53 through mitochondrial pathway in HepG2 cells, *International Journal of Cancer*, 122, 31–38.
 37. Laphookhieo C., Tanunyutthawongse R., Watanapokasin, 2018, P38 inhibitor inhibits the apoptosis of cowanin-treated human colorectal adenocarcinoma cells, *International Journal of Oncology*. 2018, 52, 2031–2040.
 38. Chouni A., Pal A., Gopal P.K., Paul S., 2021, GC-MS analysis and screening of antiproliferative potential of methanolic extract of *Garcinia cowa* on different cancer cell lines, *Pharmacognosy Journal*, 13, 347–361.
 39. Phukhatmuen P., Raksat A., Laphookhieo S., Charoensup R., Duangyod T., Maneerat W., 2020, Bioassay-guided isolation and identification of anti-diabetic compounds from *Garcinia cowa* leaf extract, *Heliyon*, 6, e03625.
 40. Joseph G.S., Jayaprakasha G.K., Selvi A.T., Jena B.S., Sakariah K.K., 2005, Antiaflatoxygenic and antioxygendant activities of *Garcinia* extracts, *International Journal of Food Microbiology*, 101, 153–160.
 41. Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jena B.S., 2010, Evaluation of antioxygendant and antimutagenic activities of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa*, *International Journal of Food Properties*, 13, 1256–1265.
 42. Zahan N., 2017, Antioxygendant, antimicrobial investigations of methanol extract of *Garcinia cowa* stem, thesis, East West University.
 43. Sharma A., Joseph G.S., Singh R.P., 2014, Antioxygendant and antiplatlet aggregation properties of bark extracts of *Garcinia pedunculata* and

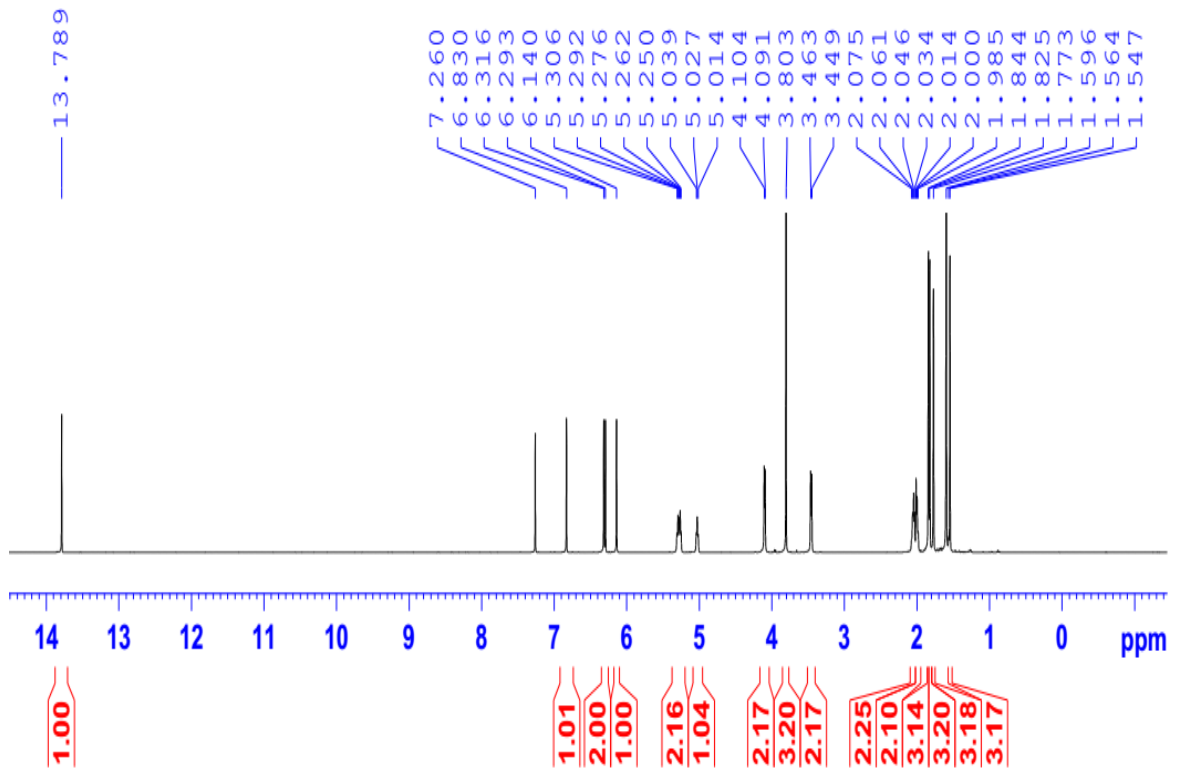
- Garcinia cowa*, *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1626-1631.
44. Orellana E., Kasinski A., 2016, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation , *Bio-Protocol*, 6(21).
45. Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, 2003, Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines, *Journal of Natural Products*, 66(8), 1124-1127.
46. Matsumoto K, Akao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y., 2005, Xanthones induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 13(21), 6064-6069.

PHỤ LỤC

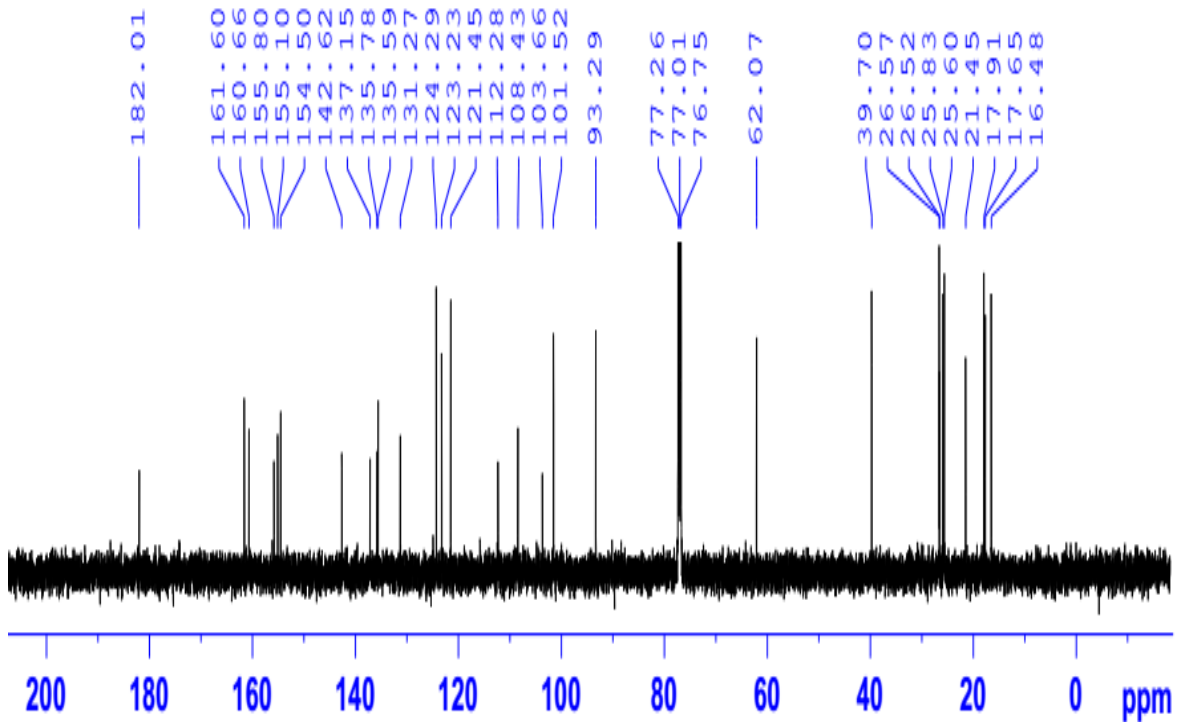
PHỤ LỤC

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Hình PL1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G1 | 54 |
| Hình PL2. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất G1 | 54 |
| Hình PL3. Phổ COSY của hợp chất G1 | 55 |
| Hình PL4. Phổ HSQC của hợp chất G1 | 55 |
| Hình PL5. Phổ HMBC của hợp chất G1 | 56 |
| Hình PL6. Phổ $^1\text{H NMR}$ của hợp chất G2 | 56 |
| Hình PL7. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất G2 | 57 |
| Hình PL8. Phổ $^1\text{H NMR}$ của hợp chất G3 | 57 |
| Hình PL9. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất G3 | 58 |
| Hình PL10. Phổ HSQC của hợp chất G3 | 58 |
| Hình PL11. Phổ HMBC của hợp chất G3 | 59 |
| Hình PL12. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất G4 | 59 |
| Hình PL13. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G4 | 60 |
| Hình PL14. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất G4 | 60 |
| Hình PL15. Phổ COSY của hợp chất G4 | 61 |
| Hình PL16. Phổ HSQC của hợp chất G4 | 61 |
| Hình PL17. Phổ HMBC của hợp chất G4 | 62 |
| Hình PL18. Phổ IR của hợp chất G4 | 62 |
| Hình PL19. Phổ $^1\text{H NMR}$ của hợp chất G5 | 63 |
| Hình PL20. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất G5 | 63 |
| Hình PL21. Phổ HSQC của hợp chất G5 | 64 |
| Hình PL22. Phổ HMBC của hợp chất G5 | 64 |
| Hình PL23. Phổ $^1\text{H NMR}$ của hợp chất G6 | 65 |
| Hình PL24. Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất G6 | 65 |
| Hình PL25. Phổ HSQC của hợp chất G6 | 66 |

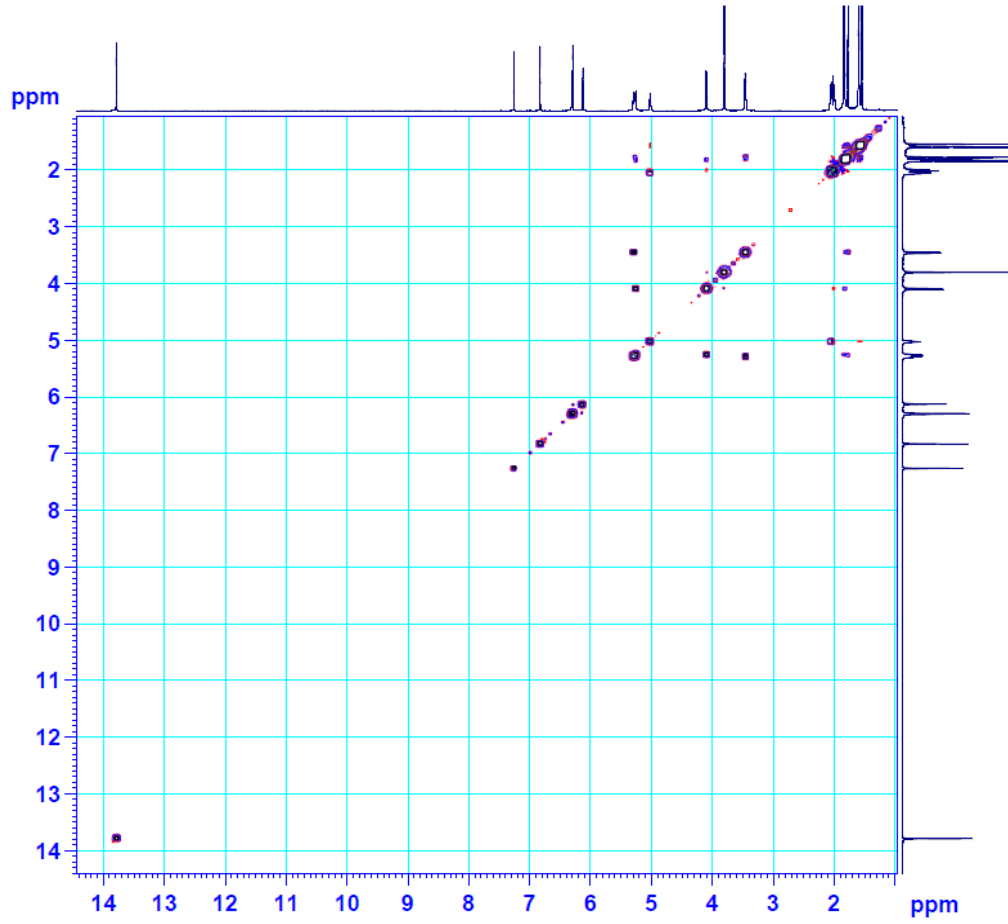
| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Hình PL26. Phổ HMBC của hợp chất G6 | 66 |
| Hình PL27. Phổ ^1H -NMR của hợp chất G7 | 67 |
| Hình PL28. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất G7 | 67 |
| Hình PL29. Phổ HSQC của hợp chất G7 | 68 |
| Hình PL30. Phổ HMBC của hợp chất G7 | 68 |
| Hình PL31. Phổ COSY của hợp chất G7 | 69 |



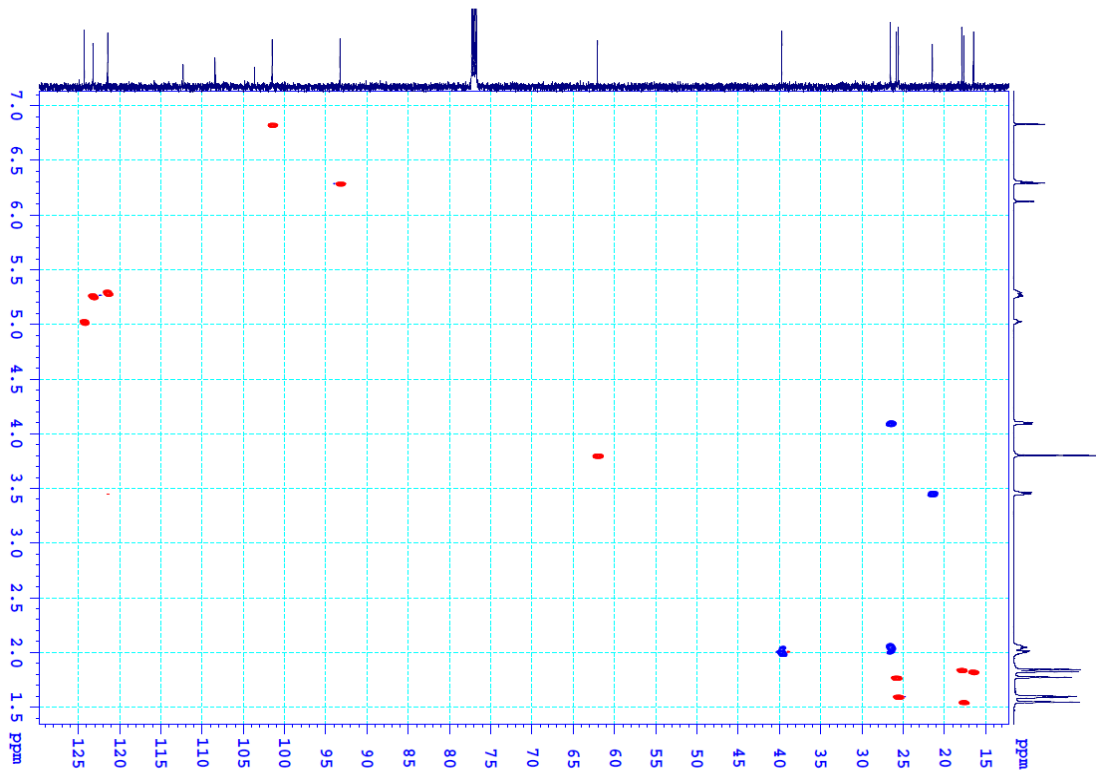
Hình PL1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G1**



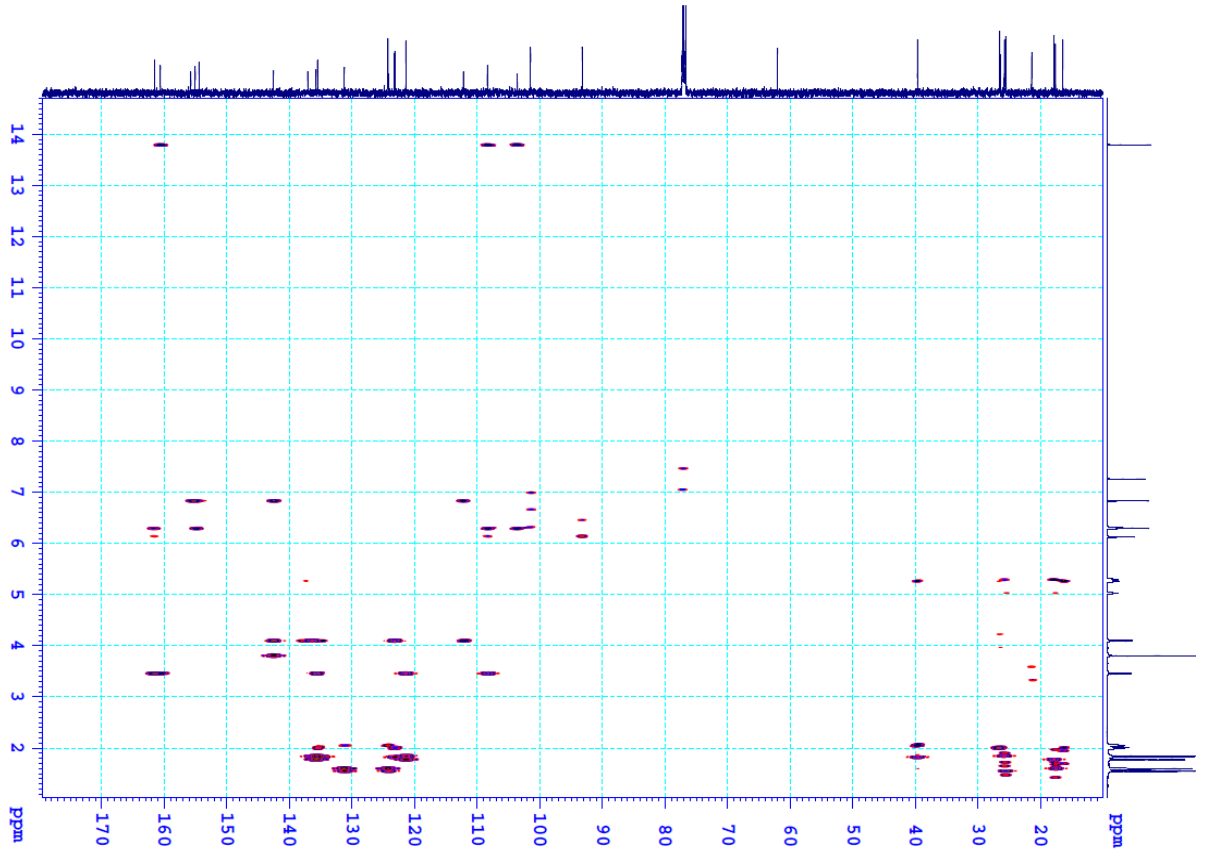
Hình PL2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G1**



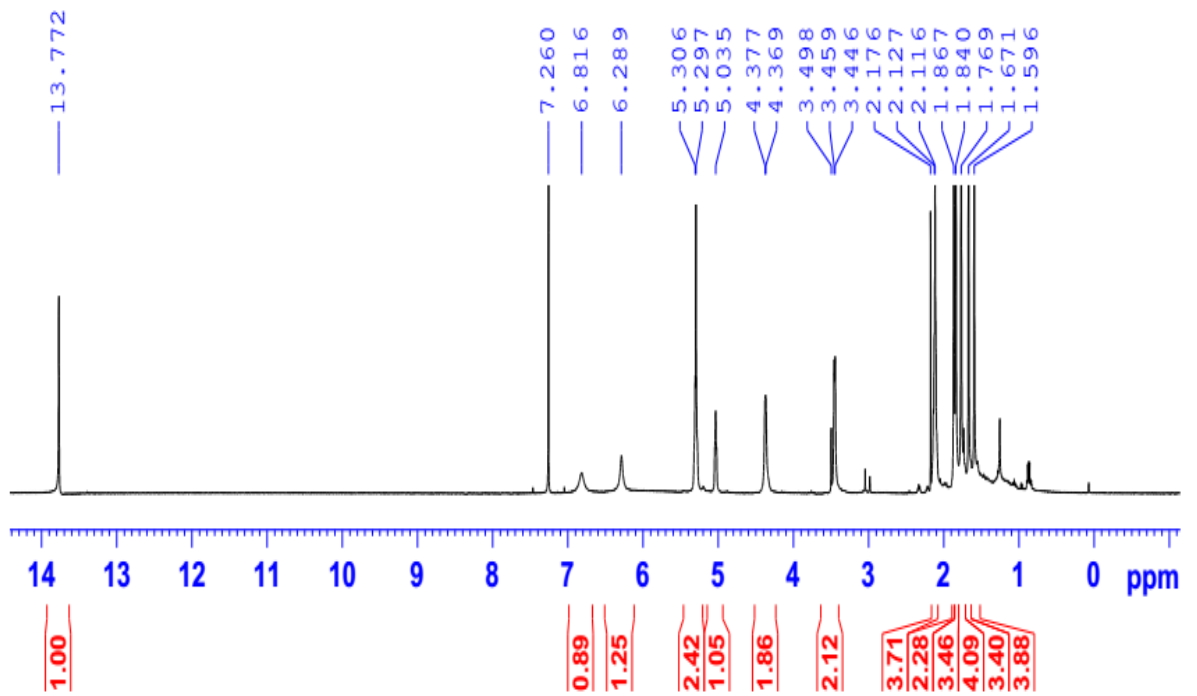
Hình PL3. Phổ COSY của hợp chất G1



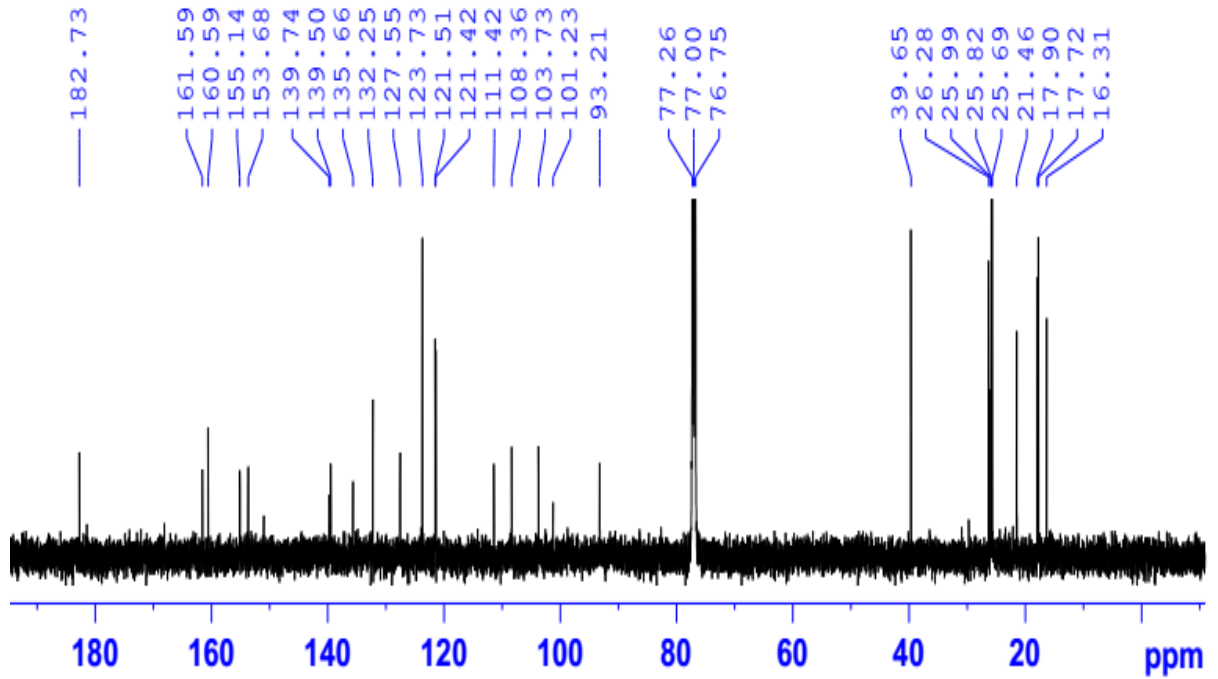
Hình PL4. Phổ HSQC của hợp chất G1



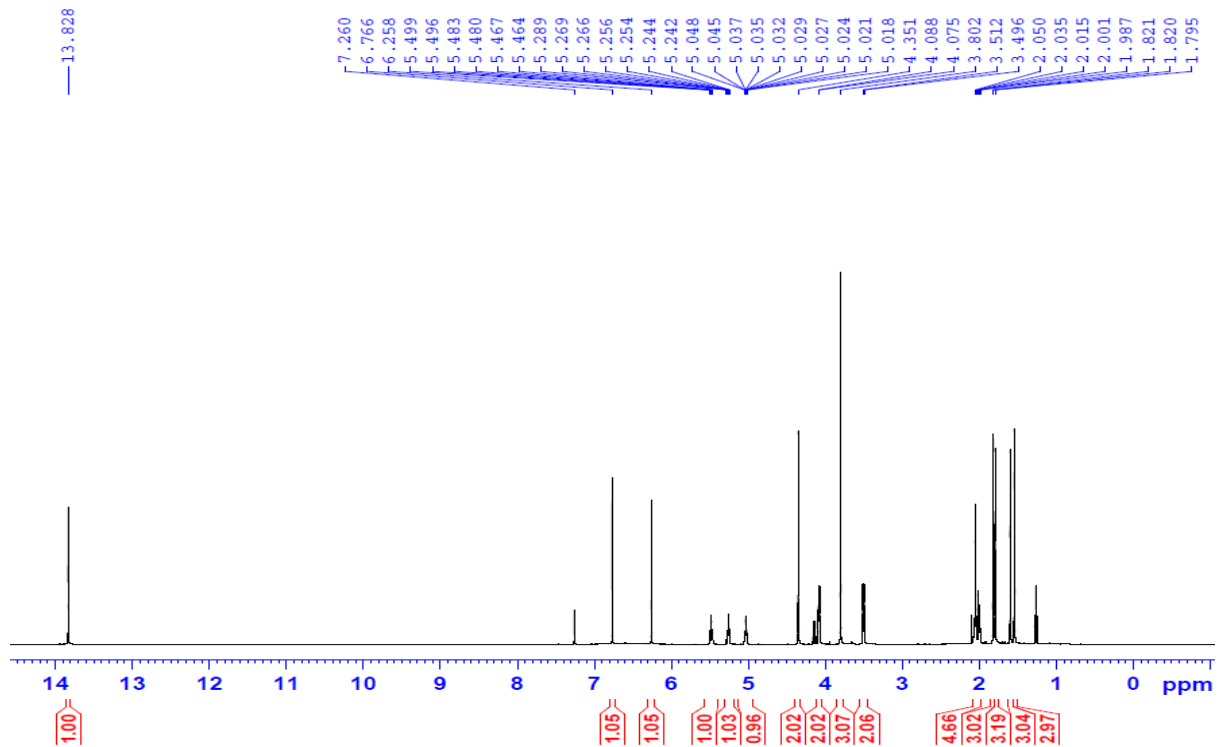
Hình PL5. Phổ HMBC của hợp chất **G1**



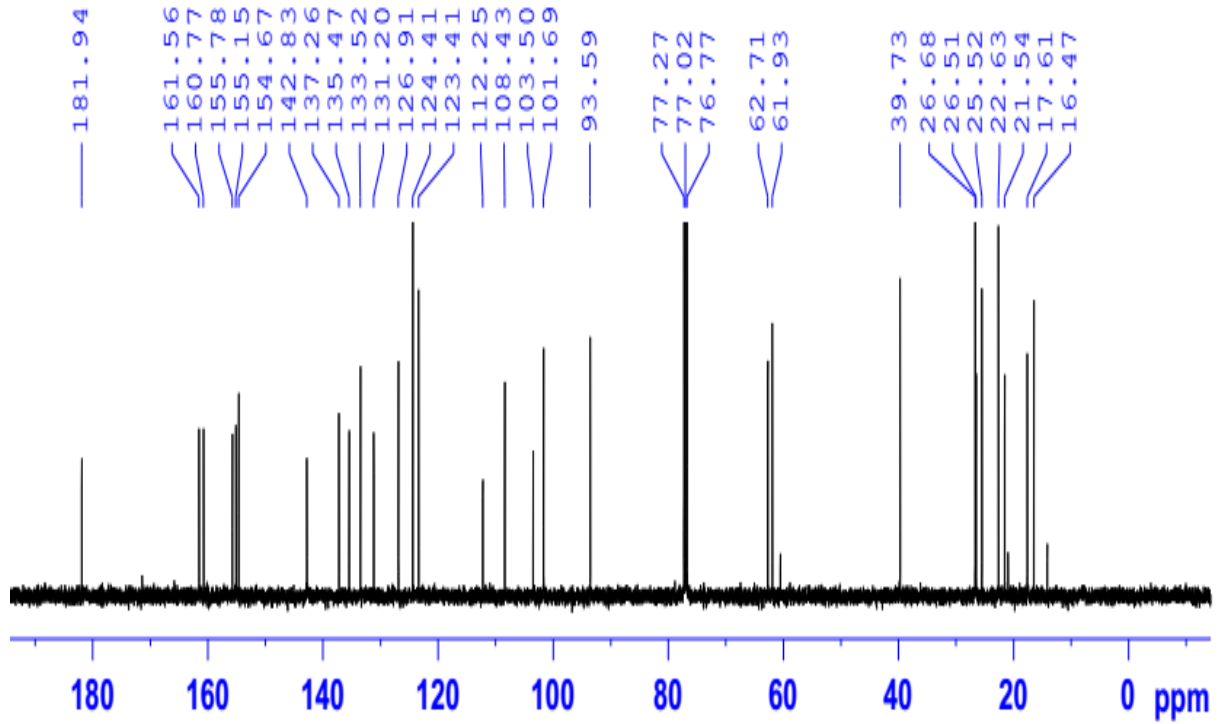
Hình PL6. Phổ ^1H NMR của hợp chất **G2**



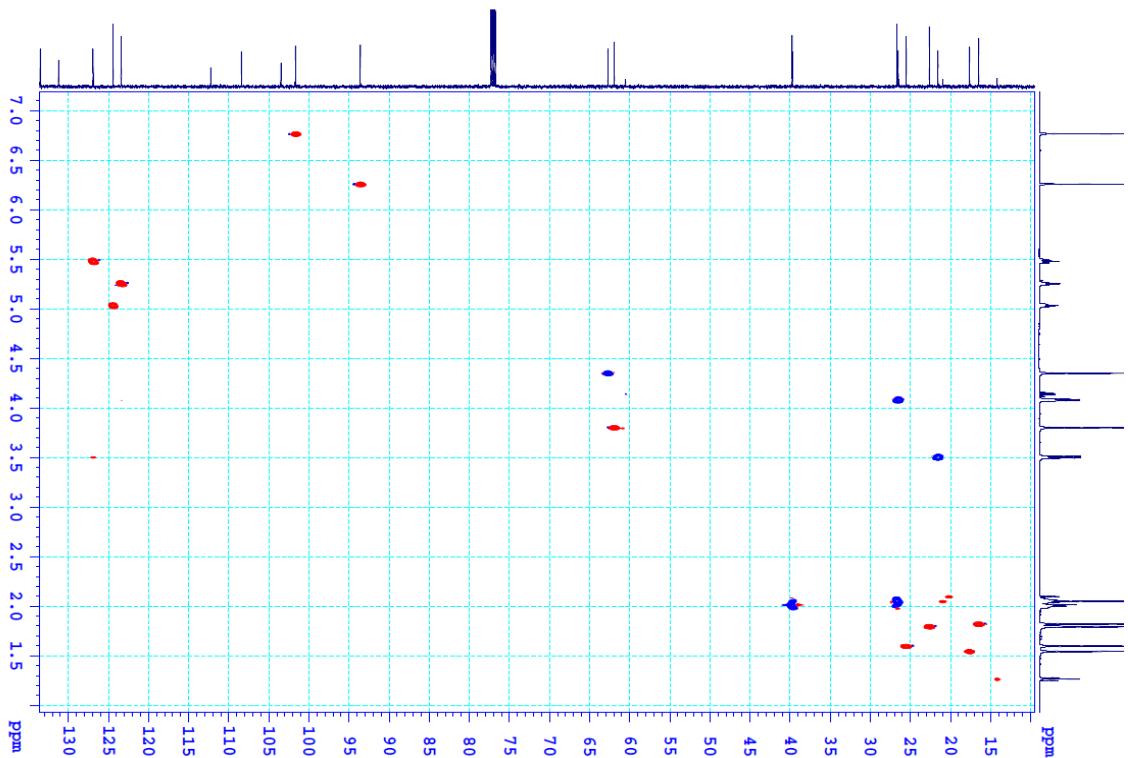
Hình PL7. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất G2



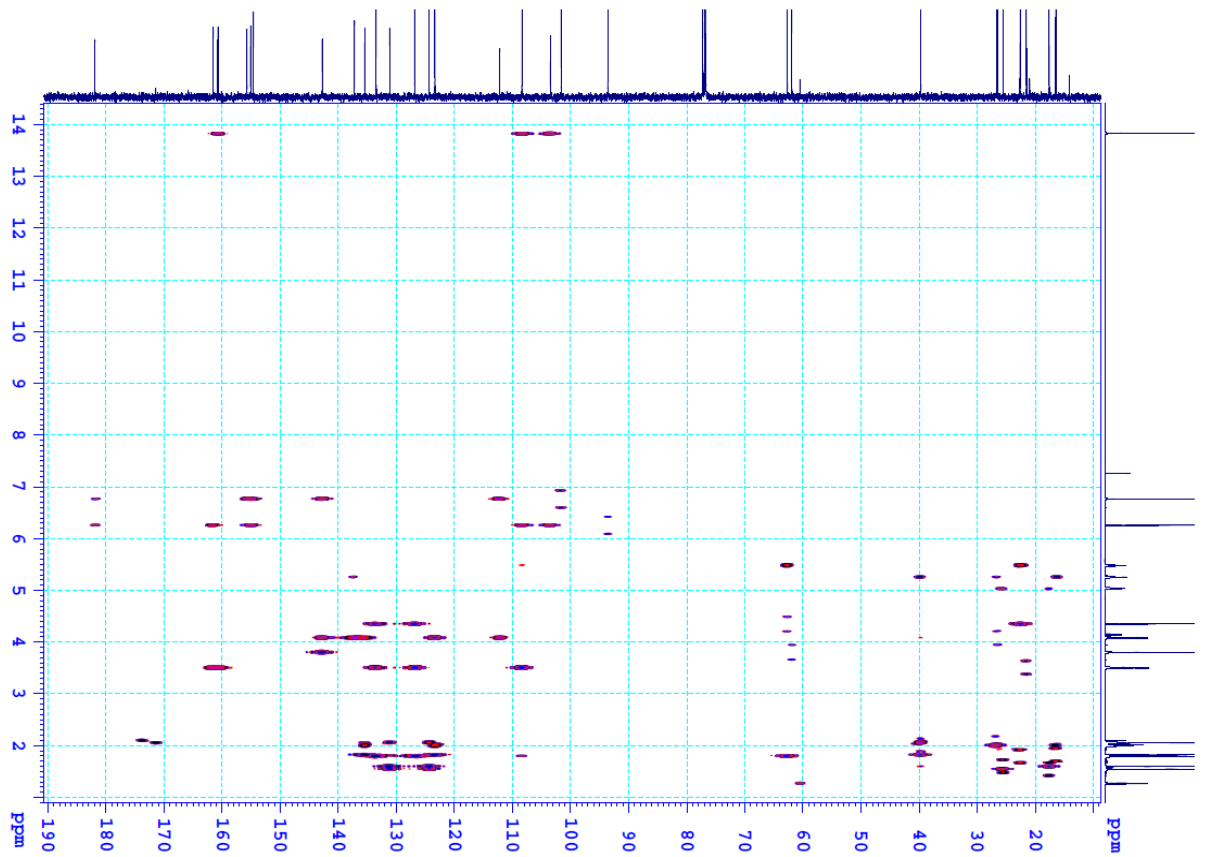
Hình PL8. Phổ ^1H NMR của hợp chất G3



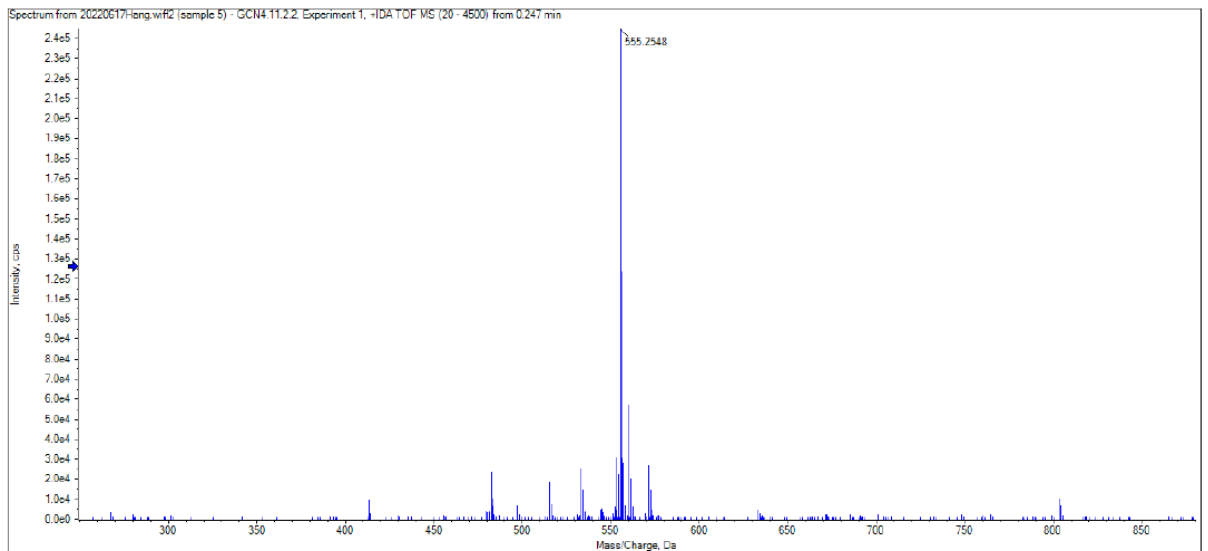
Hình PL9. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **G3**



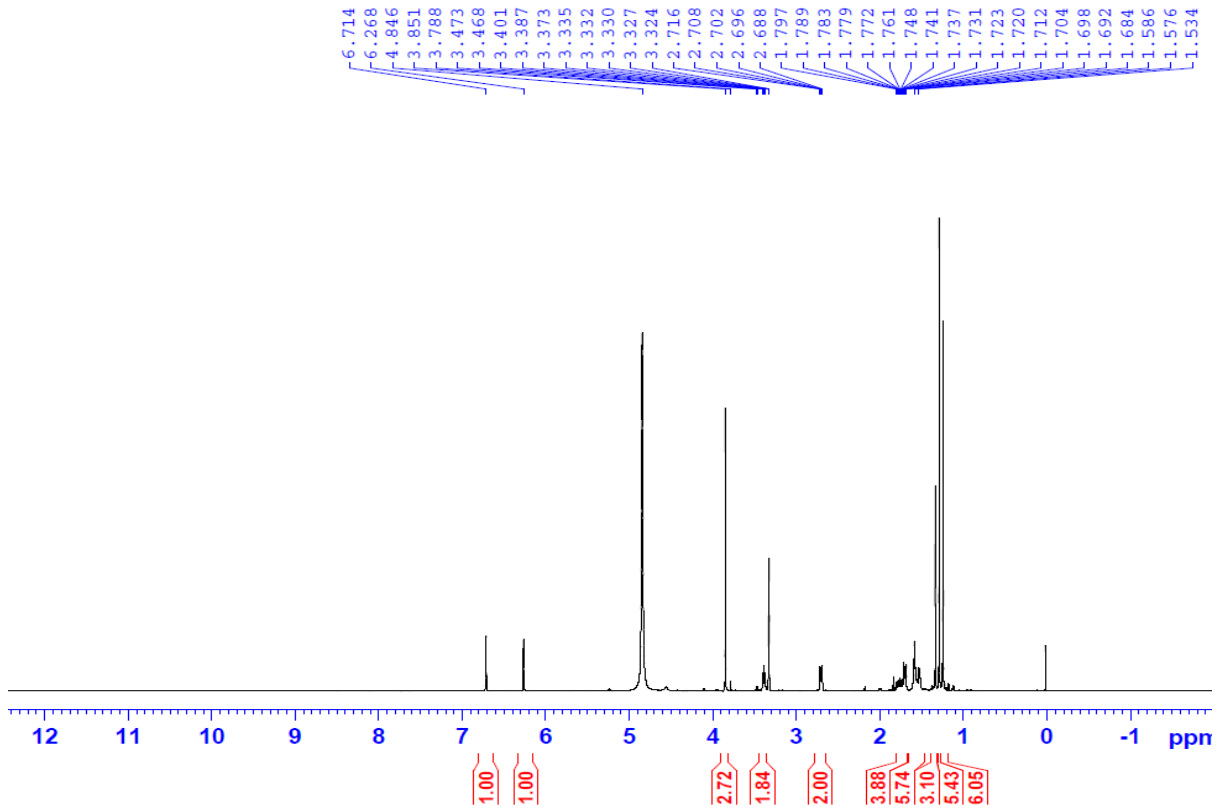
Hình PL10. Phổ HSQC của hợp chất **G3**



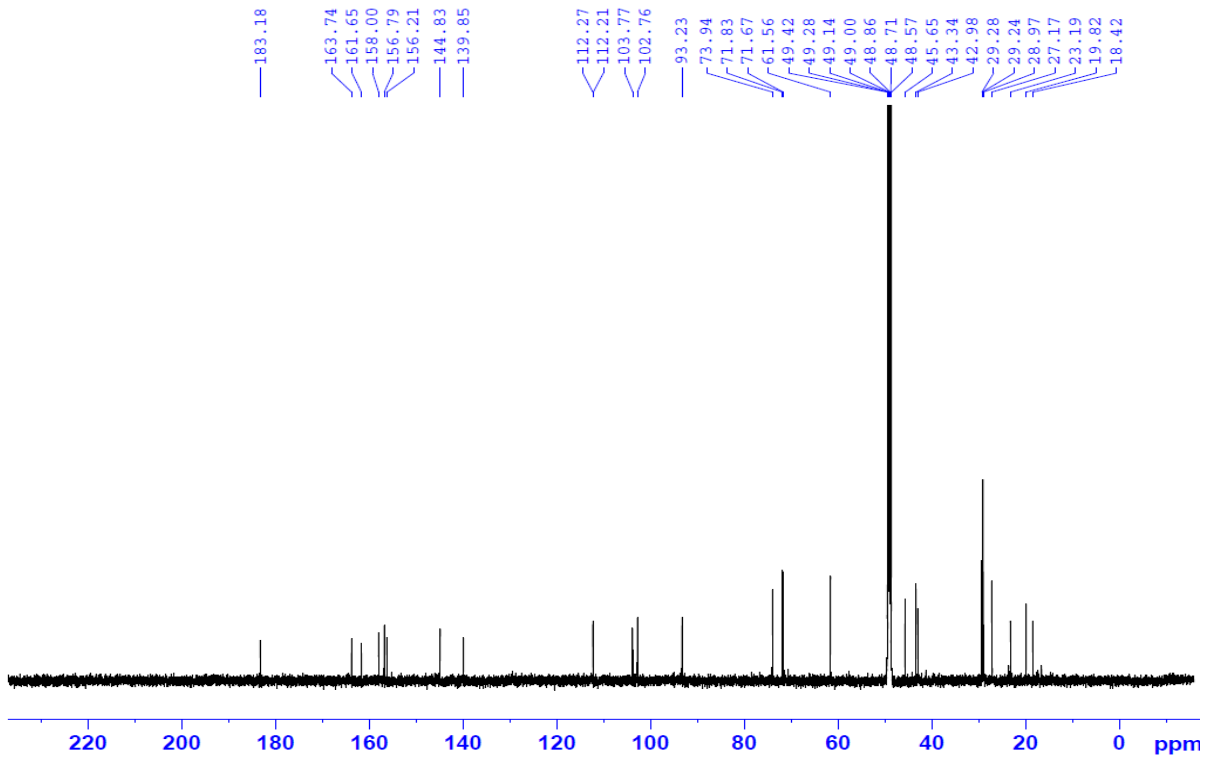
Hình PL11. Phổ HMBC của hợp chất **G3**



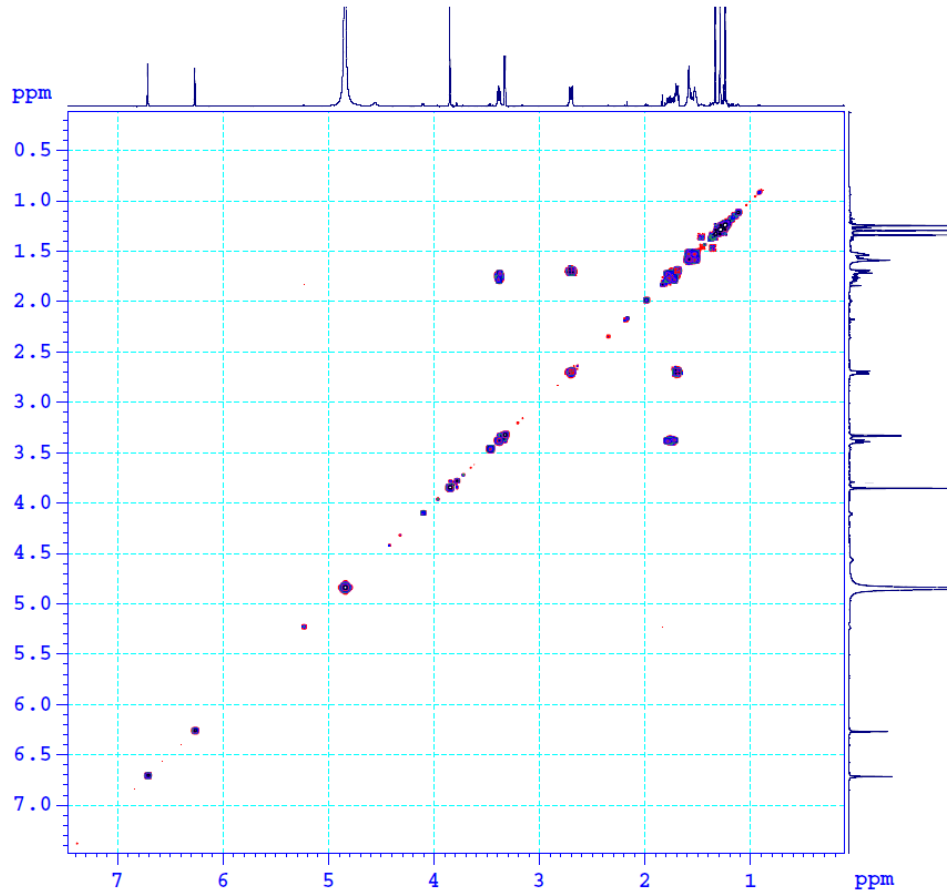
Hình PL12. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G4**



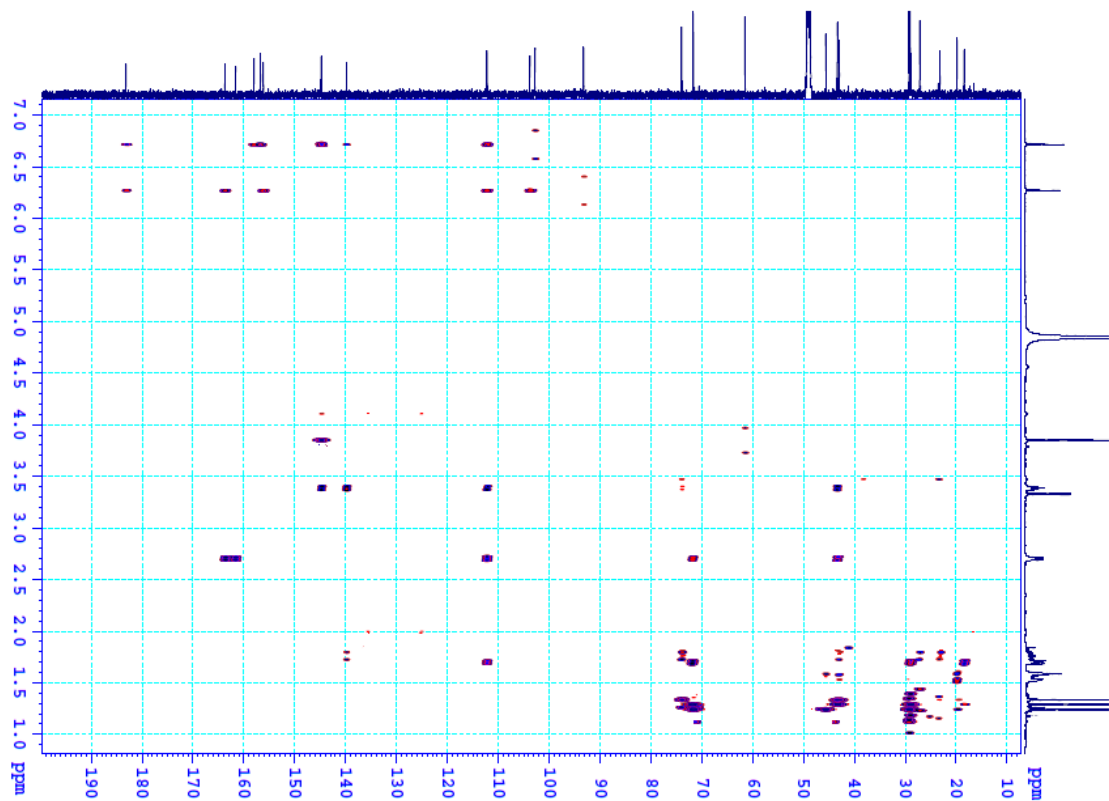
Hình PL13. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G4**



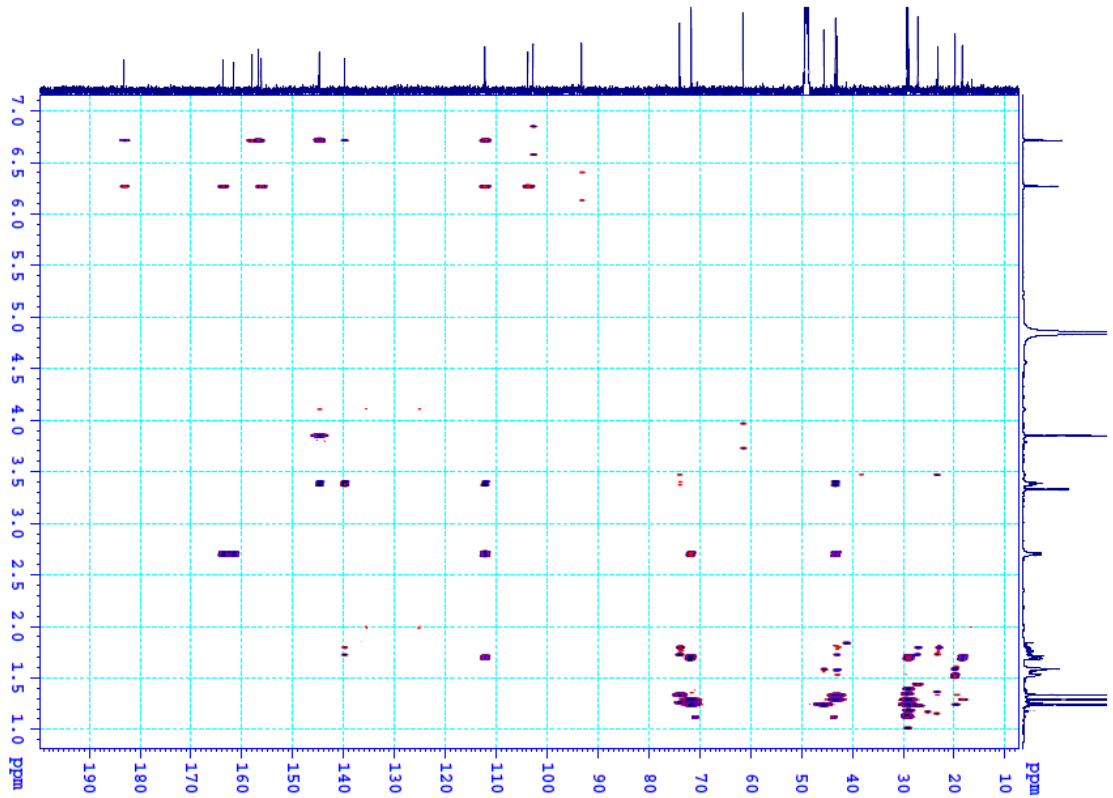
Hình PL14. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G4**



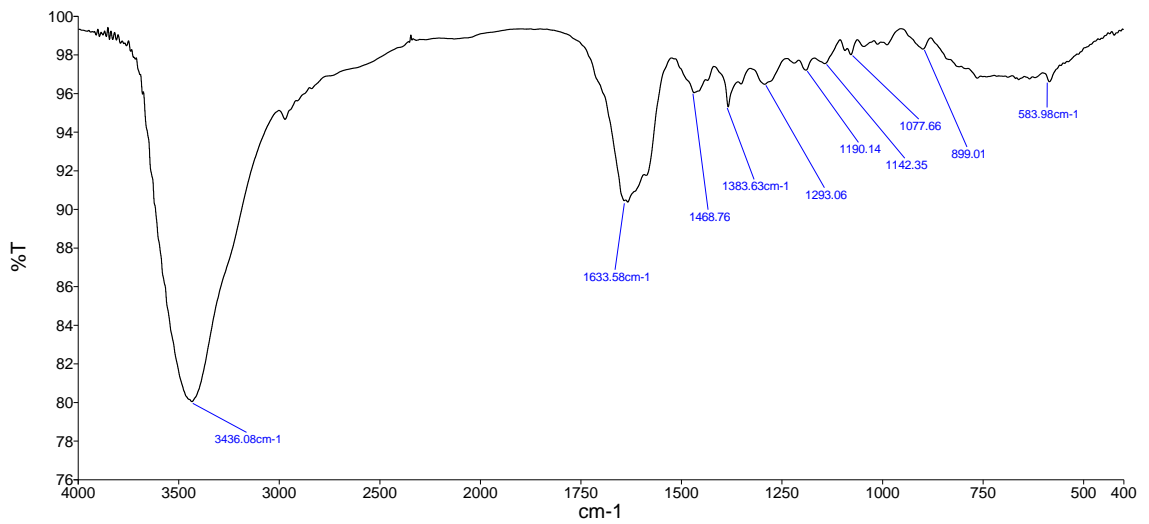
Hình PL15. Phổ COSY của hợp chất G4



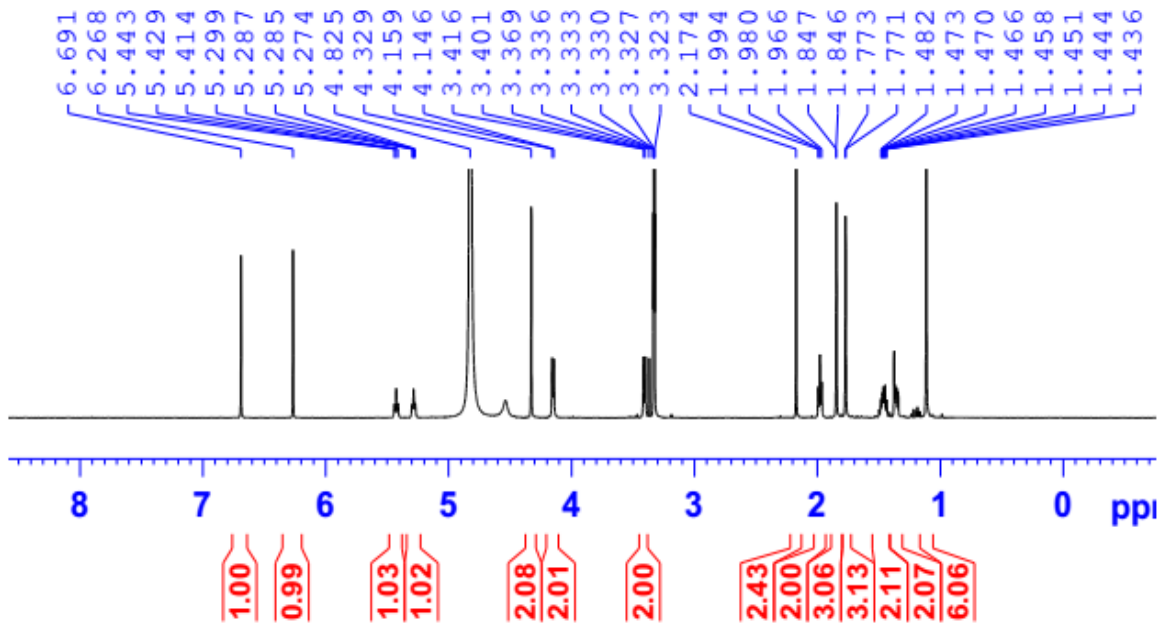
Hình PL16. Phổ HSQC của hợp chất G4



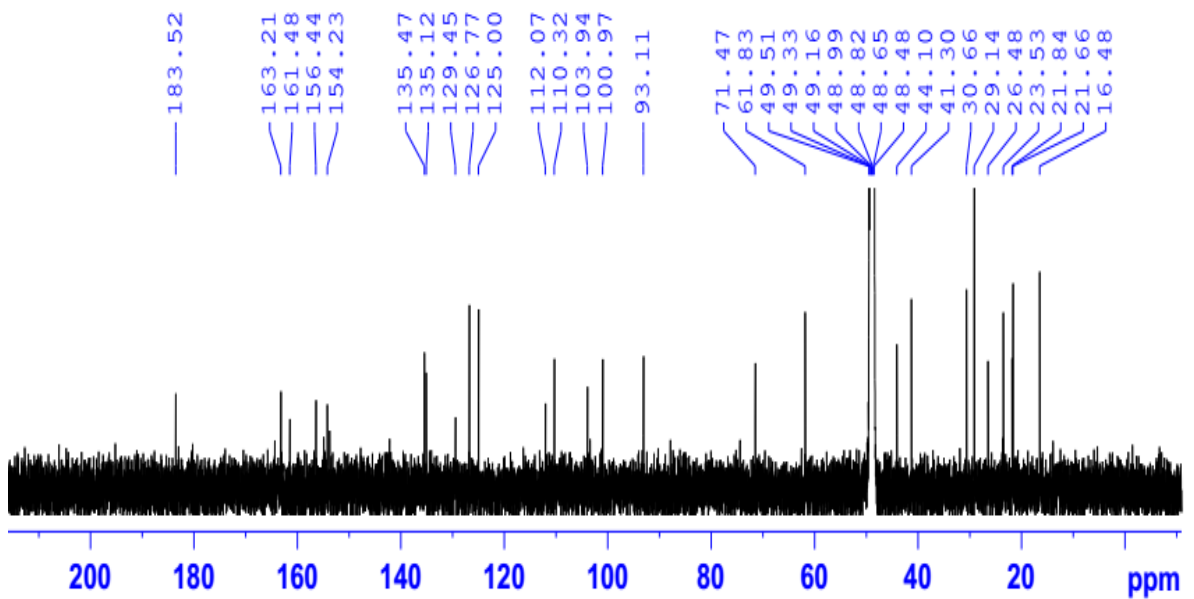
Hình PL17. Phổ HMBC của hợp chất G4



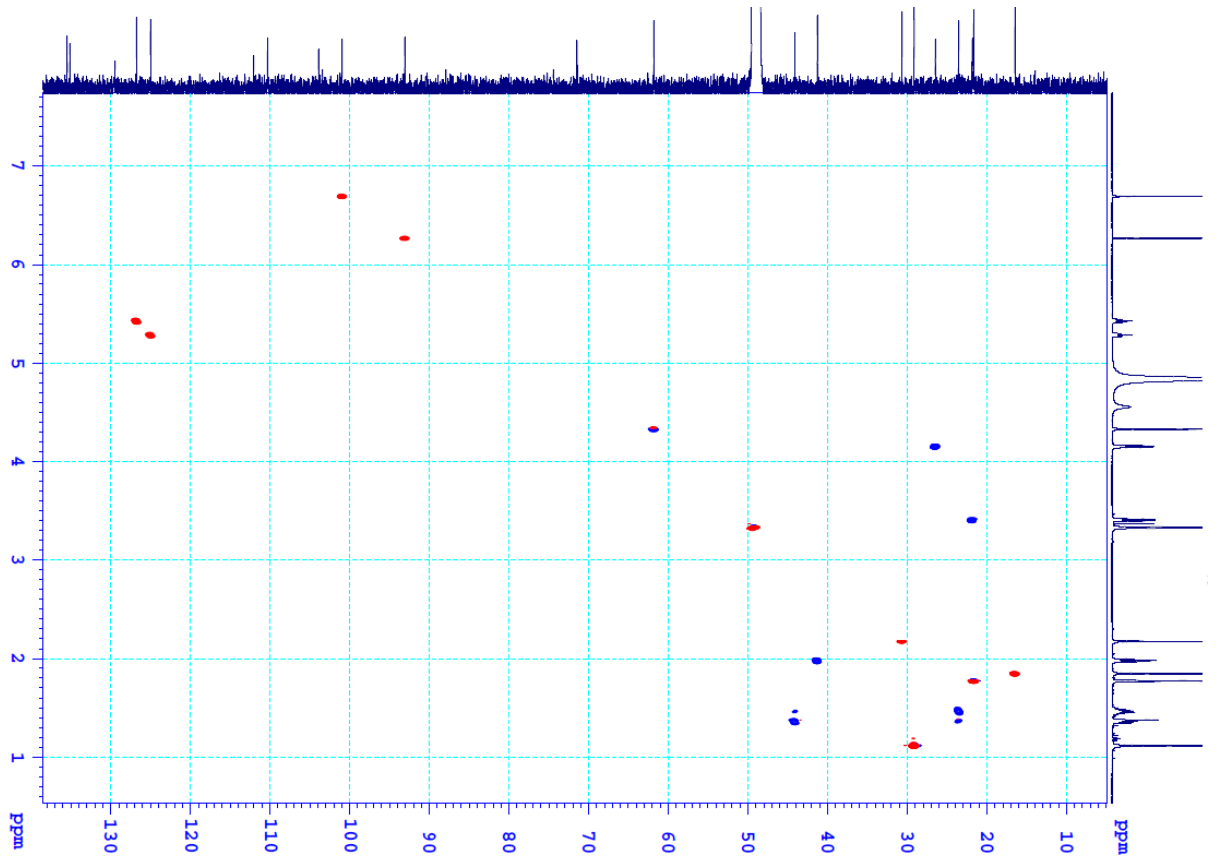
Hình PL18. Phổ IR của hợp chất G4



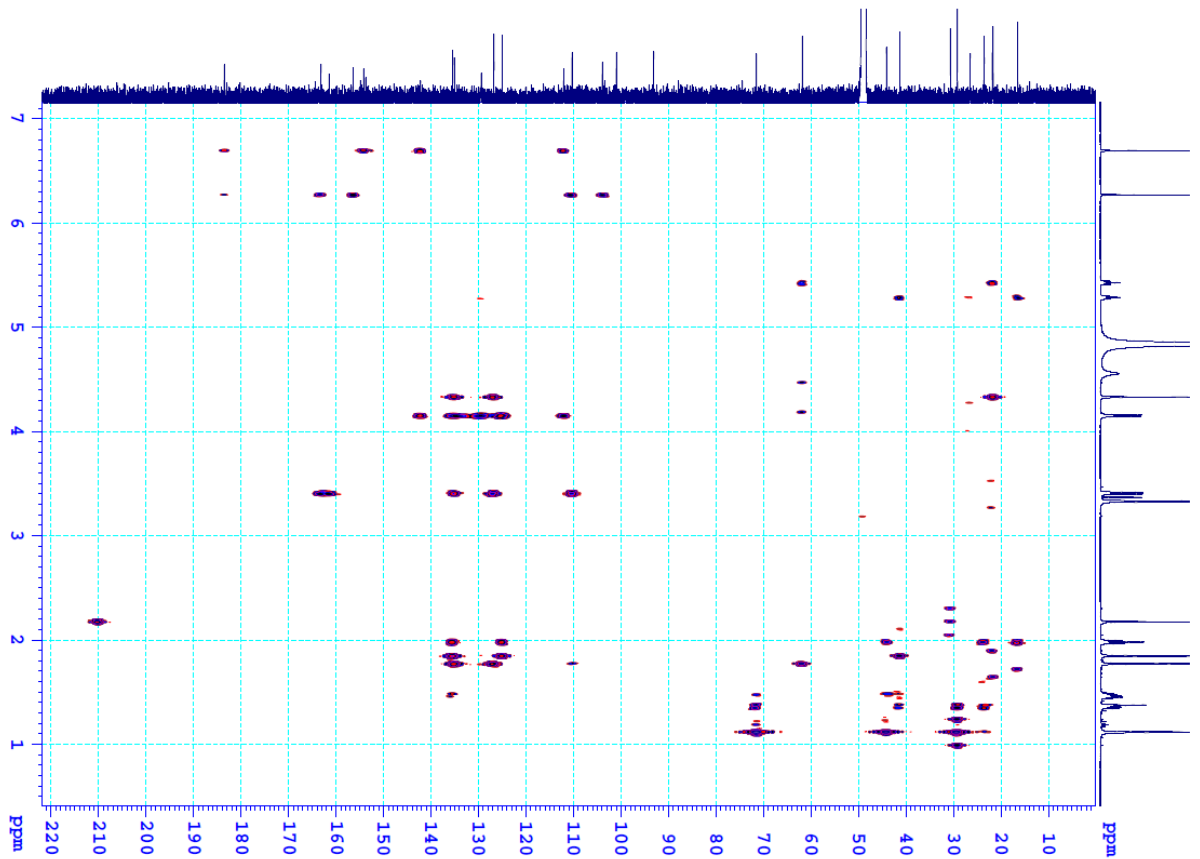
Hình PL19. Phổ ^1H NMR của hợp chất **G5**



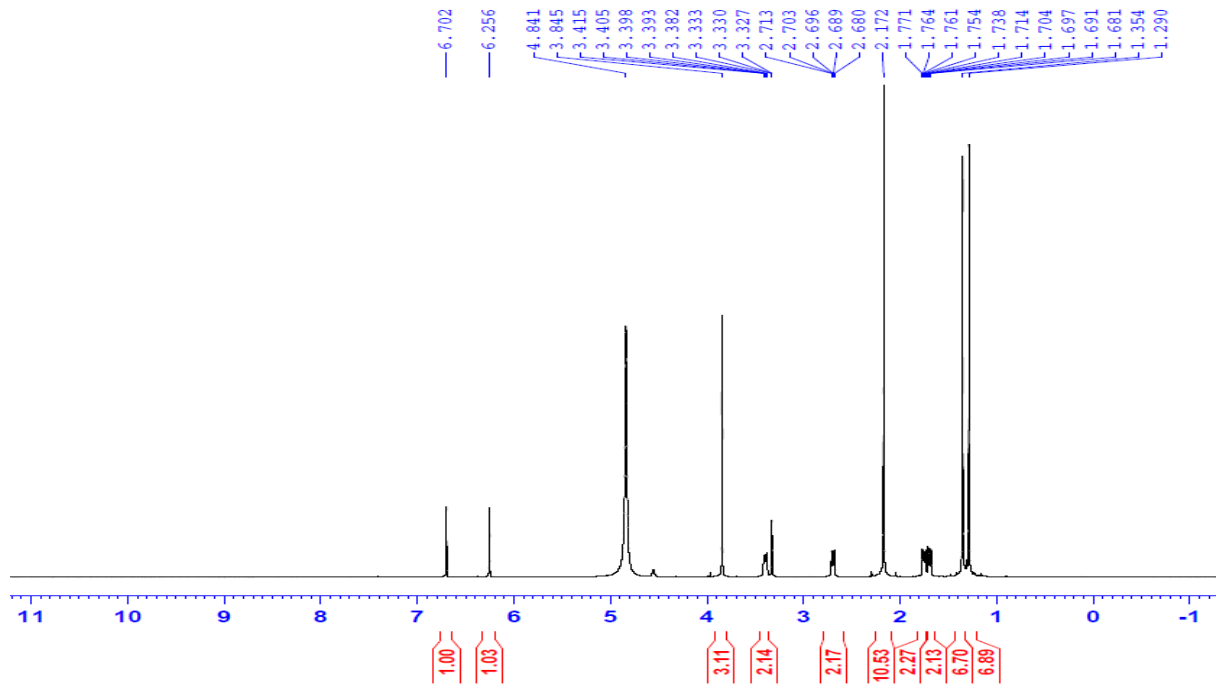
Hình PL20. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **G5**



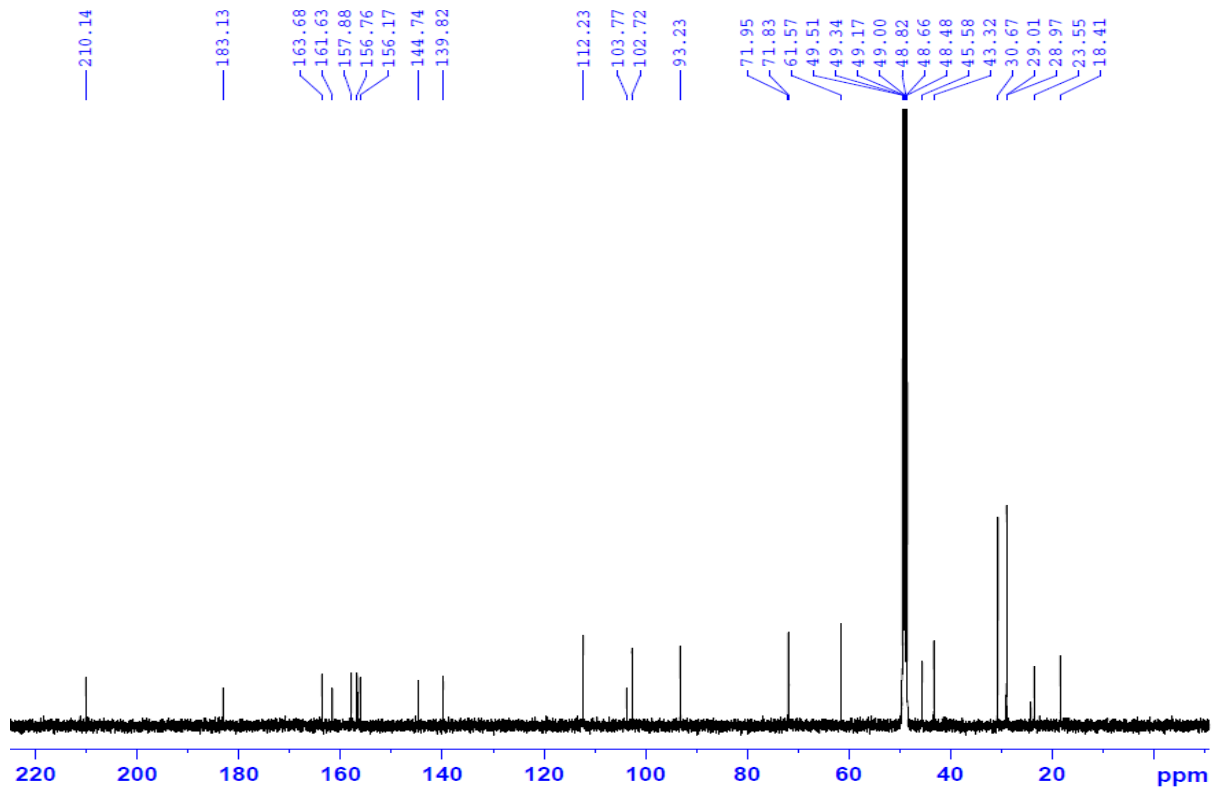
Hình PL21. Phổ HSQC của hợp chất G5



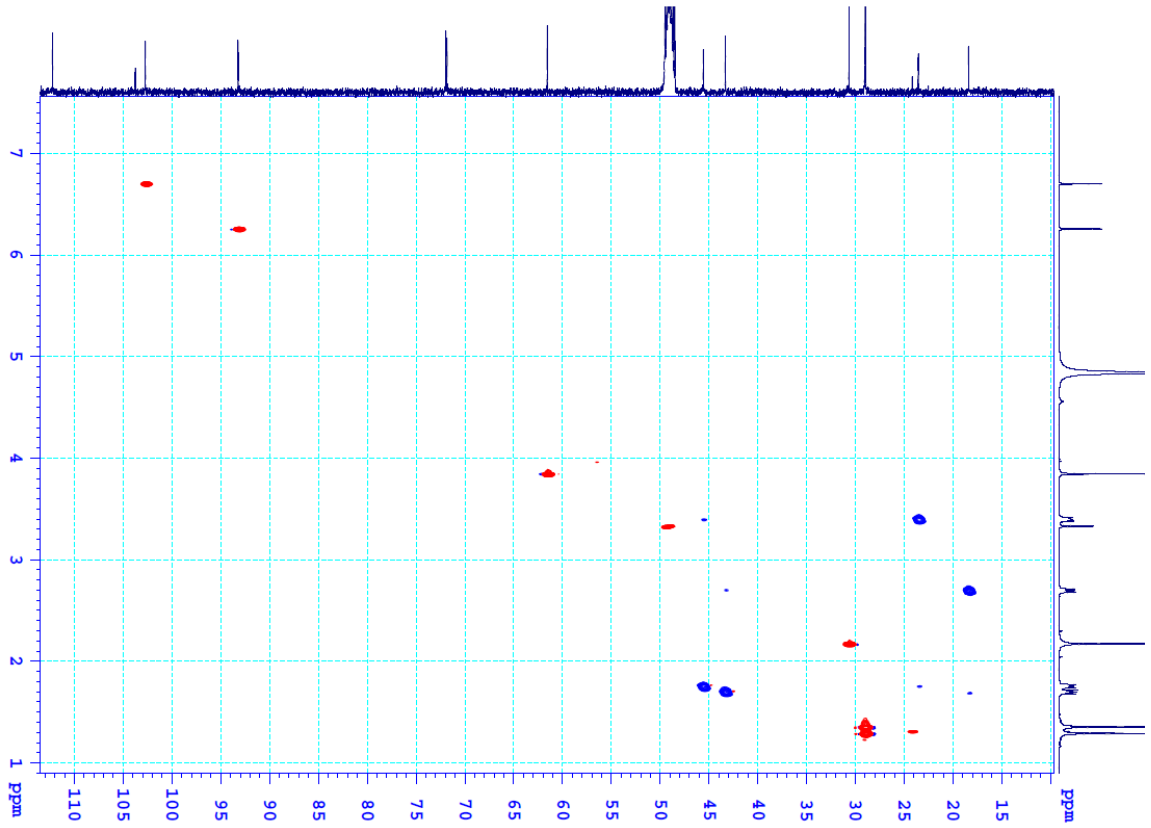
Hình PL22. Phổ HMBC của hợp chất G5



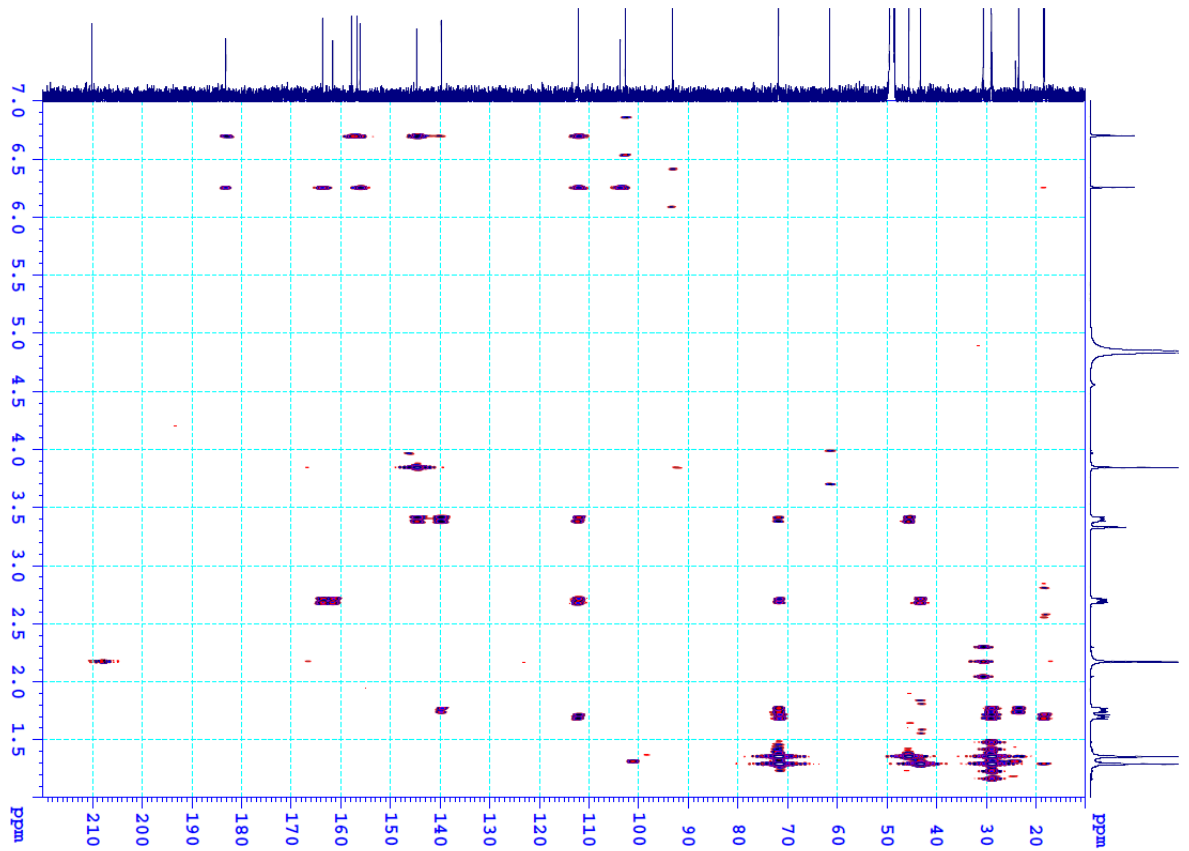
Hình PL23. Phổ ^1H NMR của hợp chất **G6**



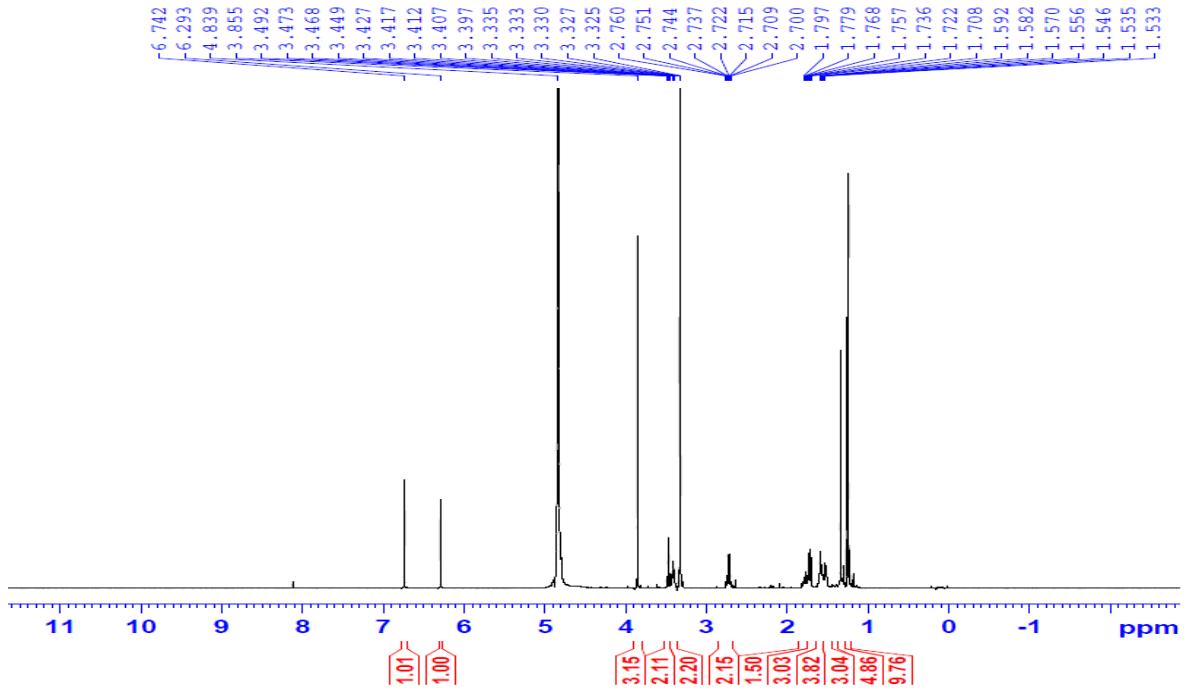
Hình PL24. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **G6**



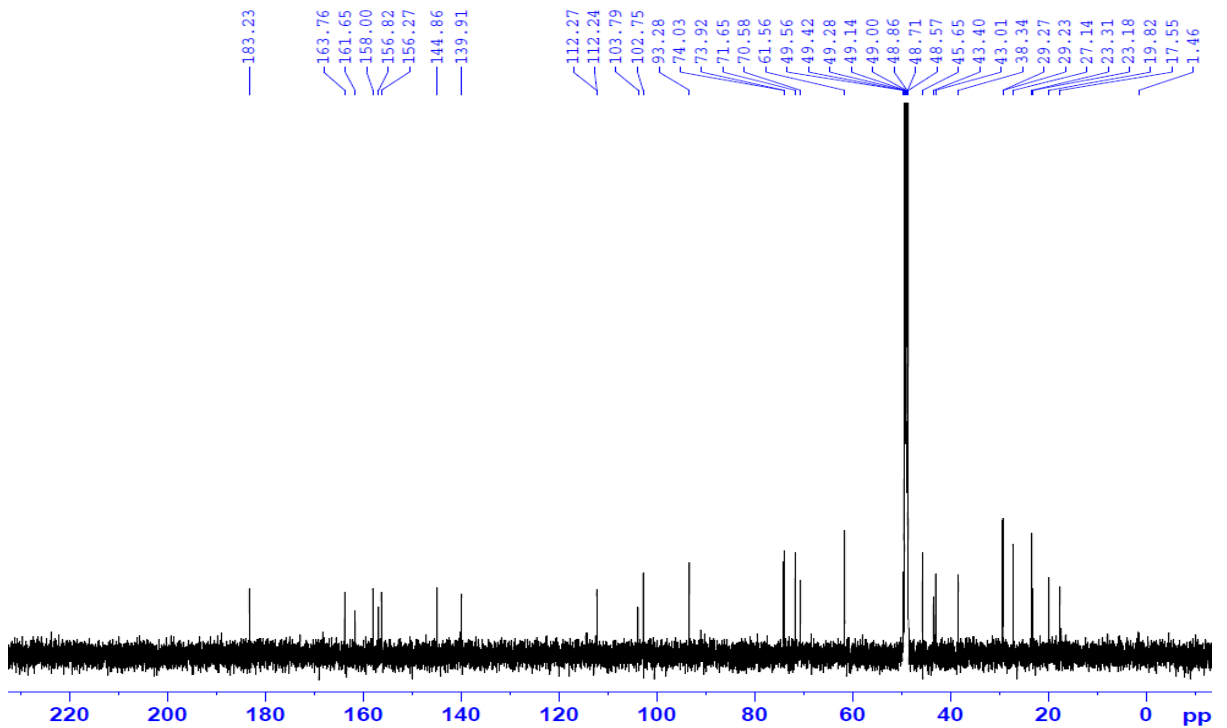
Hình PL25. Phổ HSQC của hợp chất G6



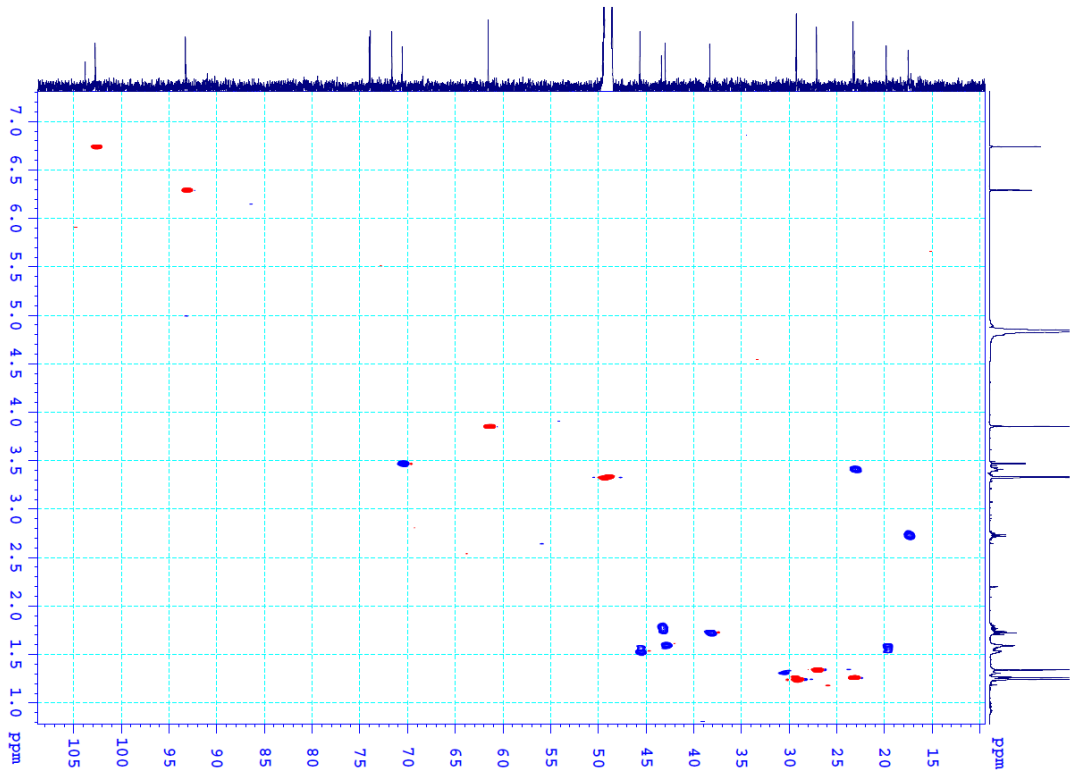
Hình PL26. Phổ HMBC của hợp chất G6



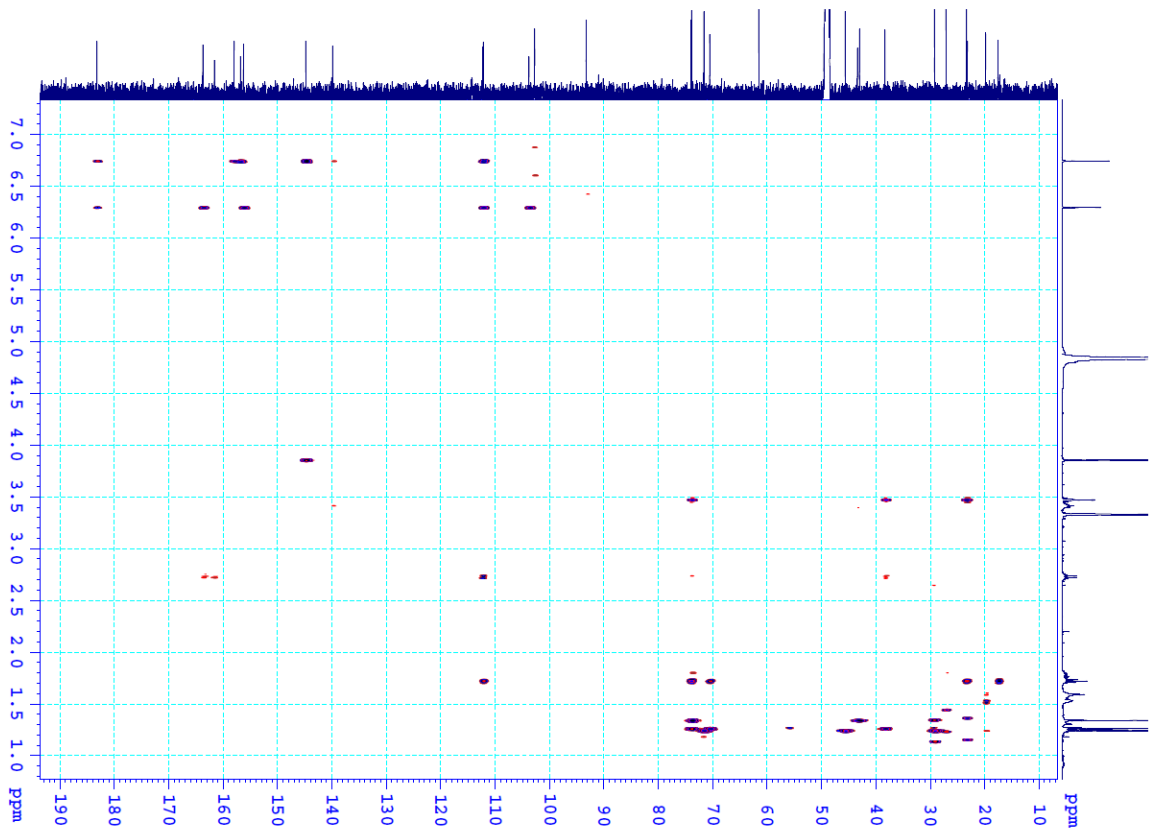
Hình PL27. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G7**



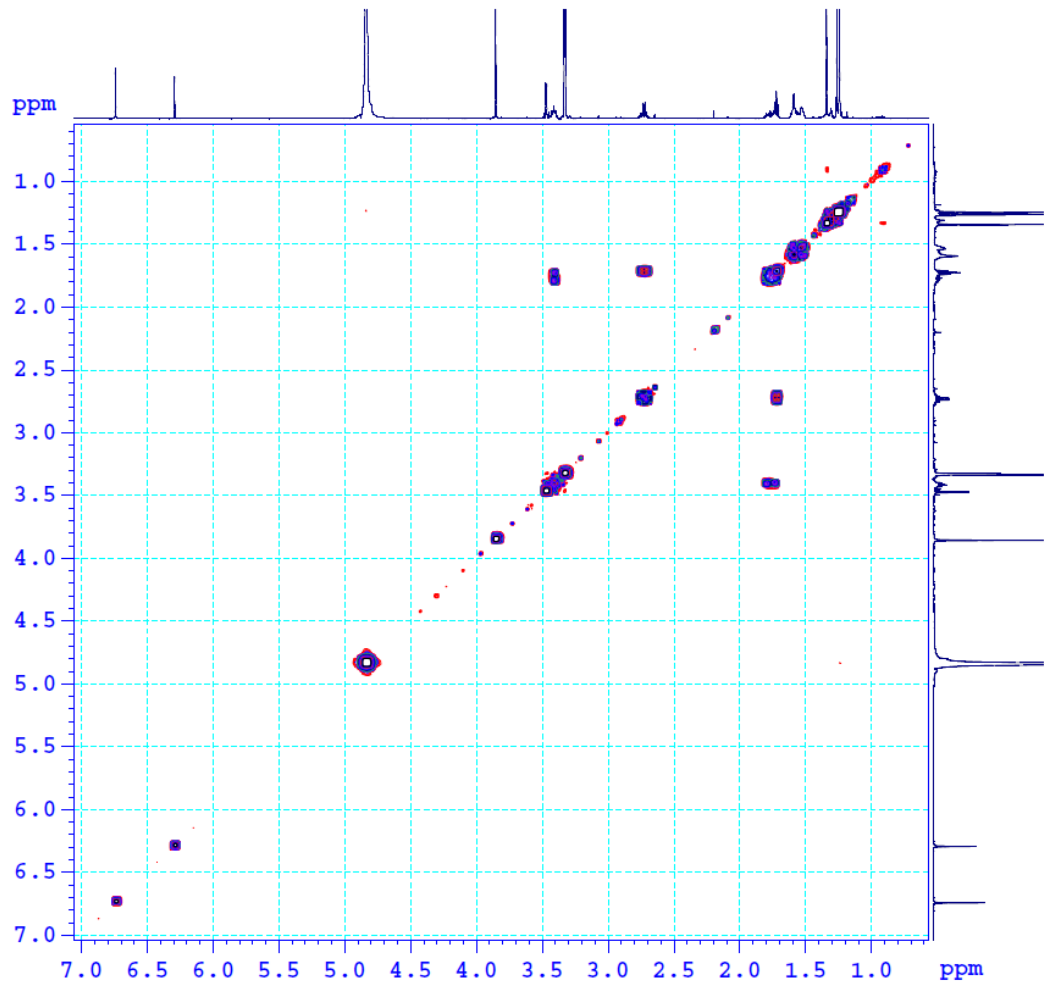
Hình PL28. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G7**



Hình PL29. Phổ HSQC của hợp chất **G7**



Hình PL30. Phổ HMBC của hợp chất **G7**



Hình PL31. Phổ COSY của hợp chất **G7**