PHÂN LẬP BA XANTHONE TETRAOXYGEN THẾ TỪ DỊCH CHIẾT ĐICLOMETAN CỦA NHỰA CÂY *GARCINIA COWA* ROXB. EX CHOISY

ISOLATION OF THREE TETRAOXYGENATED XANTHONES FROM DICHLOROMETHANE EXTRACT OF *GARCINIA COWA* ROXB. EX CHOISY LATEX

Nguyễn Thị Kim An[1,*], Nguyễn Thùy Dương[1], Nguyễn Thị Hằng[1], Nguyễn Thị Duyên[1], Trần Thị Thu Thủy[2], Đinh Thị Hà[2]

TÓM TẮT

Nghiên cứu dịch chiết điclometan từ nhựa cây *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy (*G. cowa*) thu mua tại Phú Quốc - Kiên Giang, chúng tôi đã phân lập được ba xanthone tetraoxygen thế (**1**-**3**) là cowagarcinone A (**1**), cowanin (**2**) và cowanol (**3**). Cấu trúc của các hợp chất đã được xác định bằng các phương pháp phổ NMR một chiều và hai chiều kết hợp so sánh với các hợp chất đã được công bố trong các tài liệu tham khảo.

Từ khóa: *Nhựa cây Garcinia cowa, xanthone tetraoxygen thế, cowagarcinone A, cowanin, cowanol.*

ABSTRACT

Study the dichloromethane extract of the *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy latex collected in Phu Quoc - Kien Giang, we have isolated three tetraoxygenated xanthones (**1**-3), namely cowagarcinone A (**1**), cowanin (**2**) and cowanol (**3**). The structures of these xanthones were elucidated by analysis of spectroscopic data, especially by 1D and 2D NMR as well as comparison with reported compounds in the literature.

Keywords: *Garcinia cowa latex, tetraoxygenated xanthones, cowagarcinone A, cowanin, cowanol.*

[1]Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

[2]Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

*Email: kimansp@gmail.com

Ngày nhận bài: 14/01/2018

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 02/04/2018

Ngày chấp nhận đăng: 25/04/2018

1. MỞ ĐẦU

Garcinia cowa Roxb. ex Choisy, họ *Clusiaceae* (còn gọi là cây Tai chua) tương đối phổ biến ở Việt Nam. Chúng phân bố trên cao nguyên các tỉnh từ miền núi phía Bắc như: Lào Cai, Hà Giang, Thái Nguyên, Lạng Sơn,… cho tới huyện đảo Phú Quốc của Việt Nam [1]. Từ xa xưa, nhân dân ta thường dùng vỏ quả tai chua để nấu canh hoặc sắc nước uống chữa sốt. Quả và lá non của cây *G. cowa* được dùng để chế biến thức ăn ở các nước Đông Nam Á. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. cowa* thu hái ở Thái Lan mới được công bố gần đây [2,3,5,8]. Theo đó, thành phần hóa học chủ yếu của cây *G. cowa* là các xanthone với rất nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng vi khuẩn sốt rét [2], kháng vi khuẩn [3,4], kháng viêm [5,6], chống oxi hóa [3,7], kháng vi khuẩn gây sốt [8], kháng khuẩn [9], hoạt tính tăng cường miễn dịch [10] và hoạt tính gây độc tế bào [11,12,13]. Tuy nhiên, thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. cowa* mọc ở Việt Nam chưa được nghiên cứu đầy đủ. Vì vậy, chúng tôi trình bày ở đây phương pháp phân lập và kết quả phân tích cấu trúc của ba xanthone tetraoxygen thế từ dịch chiết điclometan của nhựa cây *G. cowa* thu mua ở Phú Quốc - Kiên Giang. Các xanthone đó là cowagarcinone A (**1**), cowanin (**2**) và cowanol (**3**). Đây là một phần trong nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. cowa* mọc ở Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và phương pháp phân tích

Các hóa chất dùng cho quá trình sắc ký cột như metanol (MeOH), điclometan (DCM), hexan, axeton, etylaxetat (EtOAc),… do Trung Quốc sản xuất và được cất lại ngay trước khi dùng. Sắc ký cột sử dụng silica gel 60 (Merck, 5–40 µm), silica gel 100 (Merck, 63–200 µm), và cột sephadex LH-20 (GE Healthcare). Sắc ký bản mỏng được quan sát trên đèn UV hai bước sóng (254 và 365nm), thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% hoặc dung dịch vanilin 10%.

Phổ NMR được đo trên máy Bruker Advance 500 với tần số 500 và 125MHz lần lượt cho phổ ^{1}H-NMR và phổ ^{13}C-NMR tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Độ dịch chuyển hóa học của các chất được đo theo đơn vị ppm trong dung môi $CDCl_3$ với chất chuẩn là tetrametylsilan (TMS).

Nhiệt độ nóng chảy của các chất được đo trên máy Buchi B545.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Nhựa cây *G. cowa* được thu mua tại Phú Quốc - Kiên Giang vào tháng 12 năm 2015 và được định danh bởi Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình - Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

2.3. Quá trình phân lập

Nhựa cây *G. cowa* (3,0kg) có dạng chất rắn màu nâu, sau khi thu mua về được đập thành các cục nhỏ và được sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 45°C trong ba ngày để loại bỏ hơi ẩm, kết quả thu được 2,8kg nhựa khô. Ngâm 2,8kg nhựa cây *G. cowa* vào 3 lít dung môi MeOH ở nhiệt độ phòng, kết hợp với siêu âm trong hai ngày. Thực hiện chiết lại 3 lần, mỗi lần 3 lít dung môi MeOH. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được 500g cặn tổng có dạng nhựa. Phần cặn tổng được chiết lần lượt bằng dung môi DCM (500ml x 3) và dung môi EtOAc (500ml x 3) ở nhiệt độ phòng kết hợp với siêu âm, cất loại dung môi dưới áp suất thấp thu được 96,7g cặn DCM (96,7g) và 145,1g cặn EtOAc.

Cặn DCM được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi giải li gradient DCM-MeOH (v/v, từ 100:0 tới 0:100) thu được 5 phân đoạn (GCN1-GCN5). Tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel với các phân đoạn GCN1 và GCN2 với hệ dung môi thích hợp thu được các phân đoạn nhỏ tương ứng (GCN1.1-GCN1.10 và GCN2.1-GCN2.12). Kiểm tra trên bản mỏng silica gel và hiện hình bằng thuốc thử vanilin thấy phân đoạn GCN1.4, GCN1.6 và GCN2.6 có các chất tập trung nên chúng tôi tiến hành xử lý các phân đoạn này.

Phân đoạn GCN1.4 được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi giải li 10% axeton-hexan thu được hợp chất **1**. Kết tinh lại **1** trong dung môi DCM thu được tinh thể hình kim nhỏ màu vàng nhạt (0,71g).

Tiến hành lặp lại sắc ký cột silica gel phân đoạn GCN1.6 với hệ dung môi 50% DCM-hexan kết hợp với sắc ký cột sephadex LH-20 sử dụng dung môi giải li 5% DCM-MeOH thu được hợp chất **2** (1,43g) có dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất **3** thu được từ phân đoạn GCN2.6 bằng việc lặp lại sắc ký cột silica gel với hệ dung môi 50% DCM-hexan sau đó chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi giải li 5% DCM-MeOH thu được chất rắn màu vàng. Kết tinh **3** trong dung môi DCM thu được tinh thể hình kim màu vàng (2,2g).

2.3.1. Cowagarcinone A (1): Tinh thể hình kim nhỏ màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 258-259°C. ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm): 13.85 (1H, s, OH-1), 6.41 (s, OH-6), 6.33 (1H, s, H-4), 6.13 (1H, s, OH-3), 5.31 (1H, m, H-2′), 5.28 (1H, m, H-2‴), 5.26 (1H, m, H-2″), 5.03 (1H, br t, *J* 6.5 Hz, H-6″), 4.07 (2H, d, *J* 6.0 Hz, H-1″), 3.80 (3H, s, OCH_3-7), 3.58 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-1‴), 3.46 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-1′), 2.01 (2H, m, H-5″), 1.99 (2H, m, H-4″), 1.88 (3H, s, H-4‴), 1.85 (3H, s, H-4′), 1.82 (3H, s, H-10″), 1.77 (3H, s, H-5′), 1.69 (3H, s, H-5‴), 1.60 (3H, s, H-8″), 1.55 (3H, s, H-9″). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm): 182.3 (C-9), 161.6 (C-3), 160.5 (C-1), 155.1 (C-5a), 155.8 (C-6), 154.5 (C-4a), 142.6 (C-7), 137.1 (C-8), 135.8 (C-3′), 135.6 (C-3″), 133.9 (C-3‴), 131.3 (C-7″), 124.3 (C-6″), 123.2 (C-2″), 121.5 (C-2′), 121.1 (C-2‴), 101.5 (C-5), 112.3 (C-8a), 108.4 (C-2), 103.7 (C-9a), 93.3 (C-4), 62.1 (7-OMe), 39.7 (C-5″), 26.6 (C-4″), 26.5 (C-1″), 25.8 (C-5′), 25.6 (C-5‴), 25.6 (C-9″), 22.6 (C-1‴), 21.5 (C-1′), 17.9 (C-4′), 18.0 (C-4‴), 17.7 (C-8″), 16.5 (C-10″).

2.3.2. Cowanin (2): Chất rắn màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 136-137°C. ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 13.79 (1H, s, OH-1), 6.83 (1H, s, H-5), 6.32 (1H, s, OH-6), 6.29 (1H, s, H-4), 6.14 (1H, s, OH-3), 5.29 (1H, m, H-2′), 5.26 (2H, m, H-2″), 5.03 (2H, t, *J* 7.0 Hz, H-6″), 4.10 (2H, d, *J* 6.5 Hz, H-1″), 3.80 (3H, s, OCH_3-7), 3.46 (2H, d, *J* 7.0 Hz, H-1′), 2.06 (2H, m, H-5″), 2.01 (2H, m, H-4″), 1.84 (3H, s, H-4′), 1.83 (3H, s, H-10″), 1.77 (3H, s, H-5′), 1.59 (3H, s, H-9″), 1.55 (3H, s, H-8″). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 182.0 (C-9), 161.6 (C-3), 160.7 (C-1), 155.1 (C-5a), 155.8 (C-6), 154.5 (C-4a), 142.6 (C-7), 137.1 (C-8), 135.8 (C-3′), 135.6 (C-3″), 131.3 (C-7″), 124.3 (C-6″), 123.2 (C-2″), 121.5 (C-2′), 101.5 (C-5), 112.3 (C-8a), 108.4 (C-2), 103.7 (C-9a), 93.3 (C-4), 62.1 (7-OMe), 39.7 (C-5″), 26.6 (C-4″), 26.5 (C-1″), 25.8 (C-5′),25.6 (C-9″), 21.5 (C-1′), 17.9 (C-4′), 17.7 (C-8″), 16.5 (C-10″).

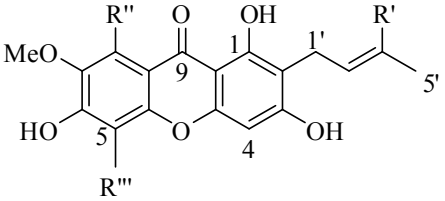
2.3.3 Cowanol (3): Tinh thể hình kim màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 123-124°C .^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm): 13.83 (1H, s, OH-1), 6.77 (1H, s, H-5), 6.26 (1H, s, H-4), 5.49 (1H, dt, *J* 8.0 Hz, 1.5Hz, H-2′), 5.25 (1H, dt, J 6.0 Hz, 1.0Hz, H-2″), 5.03 (1H, m, H-6″), 4.35 (2H, s, H-4′), 4.08 (2H, d, *J* 6.5 Hz, H-1″), 3.80 (3H, s, OCH_3-7), 3.46 (2H, d, *J* 7.0 Hz, H-1′), 2.04 (2H, m, H-5″), 1.99 (2H, m, H-4″), 1.83 (3H, br s, H-10″), 1.79 (3H, s, H-5′), 1.60 (3H, d, *J* 1.0 Hz, H-9″), 1.54 (3H, s, H-8″).^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 181.9 (C-9), 161.6 (C-3), 160.8 (C-1), 155.2 (C-4a), 155.8 (C-5a), 154.7 (C-6), 142.8 (C-7), 137.3 (C-8), 135.5 (C-3″), 133.5 (C-3′),131.2 (C-7″), 126.9 (C-2′), 124.4 (C-6″), 123.4 (C-2″), 112.3 (C-8a), 108.4 (C-2), 103.5 (C-9a), 101.7 (C-5), 93.6 (C-4), 62.7 (C-4′), 61.9 (7-OMe), 39.7 (C-4″), 26.7 (C-5″), 26.5 (C-1″), 25.5 (C-9″), 22.6 (C-5′), 21.5 (C-1′), 17.6 (C-8″), 16.5 (C-10″).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các hợp chất **1**-**3** được phân lập từ cặn chiết DCM của nhựa cây *G. cowa* bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và sắc ký cột sephadex LH-20 giải li bằng hệ dung môi thích hợp. Các chất đều hấp thụ mạnh ánh sáng ở bước sóng 254nm. Dữ kiện phổ NMR của các hợp chất **1**-**3** đều có tín hiệu đặc trưng của khung xanthone tetraoxygen thế với những tín hiệu tương tự trên phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR (12 cacbon thơm và một nhóm C=O). Các hợp chất này đều chứa ba nhóm -OH tại các vị trí C-1, -3, -6 và một nhóm metoxy tại C-7.

Trên phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR của hợp chất **2** xuất hiện tín hiệu của 5xCH_3, 3xCH=, 4xCH_2 và 3xCsp^2 bậc 4. Điều này chứng tỏ hợp chất **2** có một nhóm prenyl và một nhóm geranyl. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **2** cũng cho thấy sự xuất hiện của một proton thơm ở 6,83ppm và tín hiệu doublet của nhóm –CH_2 thuộc nhóm geranyl hoặc prenyl ở trường yếu 4.10ppm. Dữ kiện trên phổ HMBC cho thấy nhóm –CH_2 này thuộc nhóm geranyl, đồng thời proton của nhóm này

có tương có tương tác với C-7,8 thuộc khung xanthone. Điều này chứng tỏ nhóm geranyl liên kết với C-8 là phù hợp với dữ kiện tín hiệu proton H-1″ dịch về phía trường yếu (do sự hút electron của nhóm C=O làm giảm sự chắn màn của C-1″). Trên phổ HMBC cũng xuất hiện tương tác C-1,2/H-1′ chứng tỏ nhóm prenyl liên kết với C-2. Tham khảo tài liệu [8], chúng tôi thấy hợp chất **2** trùng khớp với hợp chất đã được công bố cowanin.



1 R' = CH_3, R'' = geranyl, R''' = prenyl

2 R' = CH_3, R'' = geranyl, R''' = H

3 R' = CH_2OH, R''= geranyl, R''' = H

Hình 1. Cấu trúc các hợp chất 1-3

Các tín hiệu cộng hưởng trên phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR của hợp chất **1** khá tương đồng với các tín hiệu của hợp chất **2** ngoại trừ sự biến mất của một proton thơm ở 6,83ppm và sự xuất hiện của một nhóm prenyl, các tín hiệu khác gần như không thay đổi. Kết quả trên phổ NMR của 1 xuất hiện tín hiệu của 7xCH_3, 4xCH=, 5xCH_2 và 4xCsp^2 bậc 4, tương ứng với hai nhóm prenyl và một nhóm geranyl. Chúng tôi dự đoán nhóm geranyl mới gắn vào vị trí C-5 tương tự như cowagarcinone A đã được công bố trong tài liệu [7]. So sánh dữ kiện phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR của hợp chất **1** với cowagarcinone A trong tài liệu tham khảo [7] chúng tôi thấy các kết quả thu được hoàn toàn trùng khớp. Do vậy chúng tôi kết luận hợp chất **1** chính là cowagarcinone A.

Dữ kiện phổ NMR của hợp chất **3** gần như trùng khớp với hợp chất **2**. Tuy nhiên, trên phổ ^{1}H-NMR của **3** chỉ còn 4xCH_3 so với 5xCH_3 ở hợp chất **2**, đồng thời xuất hiện một pic singlet tương ứng với 2H ở 4,35ppm. Mặt khác, trên phổ ^{13}C-NMR của **3** xuất hiện một cacbon ở 62,7ppm là cacbon liên kết với O. Điều này hoàn toàn phù hợp với việc một nguyên tử H trong nhóm -CH_3 đã bị thay thế bằng nhóm hyđroxyl. Dữ kiện trên phổ HMBC cho thấy tương tác của proton singlet của nhóm -CH_2 này với C-3′,5′, chứng tỏ nhóm -CH_2 này thuộc nhóm prenyl. So sánh với tài liệu tham khảo [8], chúng tôi kết luận hợp chất **3** chính là cowanol.

4. KẾT LUẬN

Từ dịch chiết điclometan của nhựa cây *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy (*Clusiaceae*) thu mua ở đảo Phú Quốc - Kiên Giang, ba xanthone tetraoxygen thế đã được phân lập và xác định cấu trúc, đó là cowagarcinone A (**1**), cowanin (**2**) và cowanol (**3**).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Đỗ Huy Bích và cộng sự, 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam.* NXB Khoa học và Công nghệ.

[2]. Likhitwitayawuid K, Phadungcharoen T, Krungkrai J., 1998. *Antimalarial xanthones from Garcinia cowa.* Planta Med 64, 70–72.

[3]. Panthong K, Pongcharoen W, Phongpaichit S, Taylor WC., 2006. *Tetraoxygenated xanthones from the fruits of Garcinia cowa.* Phytochemistry 67, 999-1004.

[4]. Trisuwan K, Ritthiwigrom T., 2012. *Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of Garcinia cowa.* Arch Pharm Res 35, 1733-1738.

[5]. Panthong K, Hutadilok-Towatano N, Panthong A., 2009. *Cowaxanthone F, a new tetraoxygenated xanthone, and other anti-inflammatory and antioxidant compounds from Garcinia cowa.* Can J Chem 87, 1636-1640.

[6]. Ilham, M., Yaday, M., Norhanom, A.W., 1995. *Tumour promoting activity of plants used in malaysian traditional medicine*. Nat. Prod. Sci. 1, 31-42.

[7]. Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC., 2005. *Xanthones from Garcinia cowa Roxb. latex.* Phytochemistry **66**, 1148-1153.

[8]. Pornpipat na Pattalung, Weera Thongtheeraparp, Pichaet Wiriyachitra1, Walter C. Taylor, 1994. *Xanthones of Garcinia cowa*. Planta Med 60, 365-368.

[9]. Chiramet Auranwiwat, Kongkiat Trisuwan, Aroonchai Saiai, Stephen G. Pyne, Thunwadee Ritthiwigrom, 2014. *Antibacterial tetraoxygenated xanthones from the immature fruits of Garcinia cowa.* Fitoterapia 98, 179-183.

[10]. Murakami A, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H., 1995. *Screening for in vitro anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand*. Cancer Lett. 95 (1-2), 139-146.

[11]. Cheenpracha S, Phakhodee W, Ritthiwigrom T, Prawat U, Laphookhieo S., 2011. *A new depsidone from the twigs of Garcinia cowa.* Heterocycles 83, 1139-1144.

[12]. Tian Z, Shen J, Moseman AP, Yang Q, Yang J, Xiao P, et al., 2008. *Dulxanthone A induces cell cycle arrest and apoptosis via up-regulation of p53 through mitochondrial pathway in HepG2 cells.* Int J Cancer Journal International du Cancer 122, 31–38.

[13]. Xu G, Kan LTW, Zhou Y, Song JZ, Han QB, Qiao CF, et al., 2010. *Cytotoxic acylphloroglucinol derivatives from the twigs of Garcinia cowa.* J Nat Prod 73, 104-108.