

PHÂN LẬP BA XANTHONE TETRAOXYGEN THỂ TỪ DỊCH CHIẾT DICLOMETAN CỦA NHỰA CÂY *GARCINIA HANBURYI*

ISOLATE THREE XANTHONE TETRAOXYGEN FROM THE DICLOMETAN DETAILS OF *GARCINIA HANBURYI*

Nguyễn Thị Hằng¹, Nguyễn Văn Hiến², Nguyễn Thị Oanh³,
Trần Thị Diệu Linh³, Nguyễn Thị Kim An^{4,*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu dịch chiết diclometan từ nhựa cây *Garcinia Hanburyi* Roxb. ex Choisy (*G. Hanburyi*), chúng tôi đã phân lập được ba xanthone tetraoxygen thể (1-3) là Axit Gambogic (1), Axit isogambogic (2) và Axit isomorelic (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.

ABSTRACT

Study on dichloromethane extract from *Garcinia Hanburyi* Roxb. ex Choisy (*G. Hanburyi*), we isolated three substituted tetraoxygen (1-3) xanthone: Gambogic Acid (1), isogambogic acid (2) and isomorelic acid (3). The structure of the compounds was determined by unidirectional and bidirectional NMR spectroscopy methods compared with those published in the references.

¹Lớp Hóa 1 - K10, Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Lớp Hóa 1 - K11, Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Lớp Hóa 2 - K11, Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

⁴Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: kimansp@gmail.com

1. MỞ ĐẦU

Garcinia Hanburyi, 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. Hanburyi* 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, 9]. Theo đó, thành phần hóa học chủ yếu của cây *G. Hanburyi* 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 oxy hóa [3, 7, 8], kháng vi khuẩn gây sốt [9], kháng khuẩn [10], hoạt tính tăng cường miễn dịch [11] và hoạt tính gây độc tế bào [12, 13, 14]. Tuy nhiên, thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. Hanburyi* 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 thể từ dịch chiết diclorometan của nhựa cây *G. Hanburyi* thu hái ở Phú Quốc, Kiên Giang. Các xanthone đó là axit gambogic A (1), axit isogambogic (2) và axit isomorelic (3). Đây là một phần trong nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *G. Hanburyi* 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), diclometan (DCM), hexan, axeton, etylaxetat (EtOAc),... do Trung Quốc sản xuất và được cất lại trước khi dùng. Sắc ký cột sử dụng silica gel 60 (Merck, 5 - 40 μ m), silica gel 100 (Merck, 63 - 200 μ m) 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 H₂SO₄ 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 ¹H và phổ ¹³C 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 CDCl₃ với chất chuẩn là tetrametylsilan (TMS).

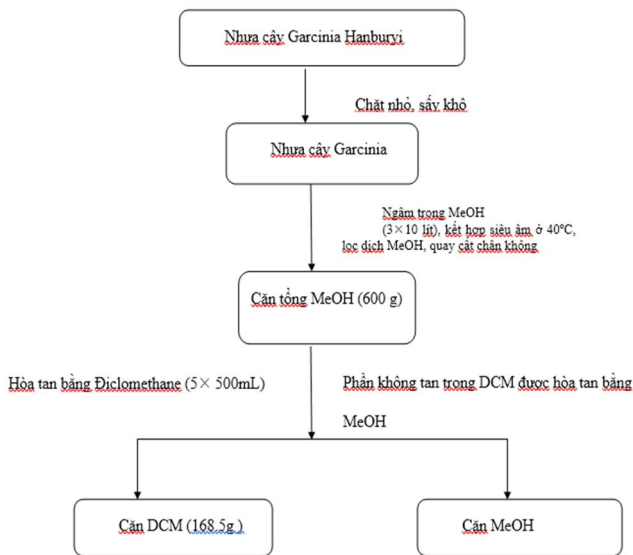
Nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy Buchi B545.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Nhựa cây *G. Hanburyi* 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.

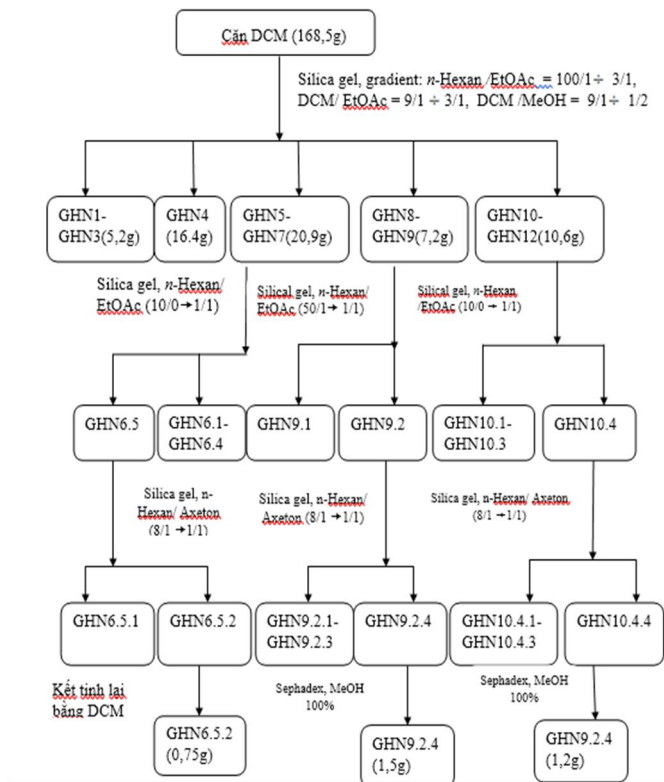
2.3. Quá trình phân lập

Nhựa cây *G. Hanburyi* (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 2,5kg nhựa khô. Ngâm 2,5kg nhựa cây *G. Hanburyi* 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 màu nâu đen. Phần cặn tổng được chiết bằng dung môi DCM (500ml x 3) và dung môi MeOH (500ml x 3) ở nhiệt độ phòng kết hợp với siêu âm thu được 168,5g cặn DCM và 431,5g cặn MeOH.



Hình 1. Quá trình xử lý và phân bố cặn tổng DCM

2.4. Sơ đồ phân lập



Hình 2. Sơ đồ xử lý và phân bố cặn tổng DCM

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 (GHN1-GHN12). Tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel với các phân đoạn GHN5 và GHN7 với hệ dung môi thích hợp thu được các phân đoạn nhỏ GHN6.5, GHN9.2, GHN10.4

Phân đoạn GHN6.5.2 thu được từ phân đoạn GHN6.5 được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi giải li 10% axeton-hexan thu được hợp chất 1. Kết tinh 1 trong dung môi DCM thu được tinh thể hình kim nhỏ màu vàng nhạt (0,75g).

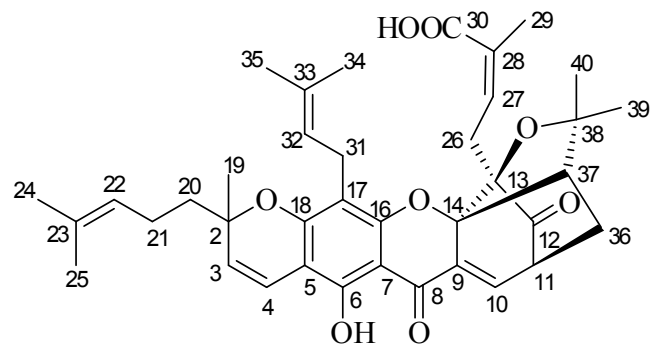
Phân đoạn GHN 9.2.4 thu được từ phân đoạn GHN 9.2 được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi giải li 10% axeton-hexan thu được hợp chất 1. Kết tinh 1 trong dung môi DCM thu được tinh thể hình kim nhỏ màu vàng nhạt (1,5g).

Hợp chất 3 (1,2g) thu được từ phân đoạn GHN 10.2.4 bằng việc lặp lại sắc ký cột với hệ dung môi 50% Aceton-nhexan kết hợp với 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.

2.5. Kết quả phân lập được các hợp chất

2.5.1. Axit gambogic (GHN 6.5.2)

Hợp chất GHN6.5.2 thu được là axit gambogic, là một chất bột màu vàng cam, độ quay cực $\alpha_D^{20} = -578$ (c 0.2, CHCl₃).



Hình 3. Công thức cấu tạo của GHN6.5.2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm):

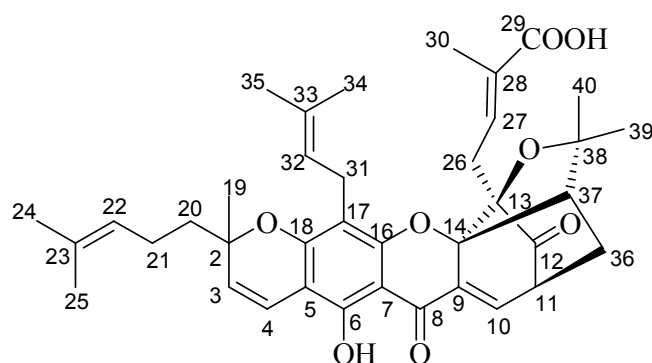
12.77 (OH-6), 7.55 (1H, d, J 7.0 Hz, H-10), 6.60 (1H, d, J 10.0 Hz, H-4), 6.09 (1H, t, J 7.5 Hz, H-27), 5.38 (1H, d, J 10.0 Hz, H-3), 5.04 (2H, overlap, H-22, H-32), 3.47 (1H, m, H-11), 3.29 (1H, dd, J 8.0 & 15.0 Hz, H-31), 3.14 (1H, dd, J 5.0 & 15.0 Hz, H-31), 2.95 (2H, dd, J 8.0 & 15.0 Hz, H-26), 2.51 (1H, d, J 9.5 Hz, H-37), 2.31 (1H, dd, J 5.0 & 13.0 Hz, H-36), 2.01 (1H, m, H-21), 1.76 (1H, m, H-20), 1.74 (3H, s, H-29), 1.72 (3H, s, H-34), 1.69 (3H, s, H-39), 1.64 (3H, s, H-24), 1.62 (3H, s, H-35), 1.59 (1H, m, H-20), 1.55 (3H, s, H-25), 1.38 (3H, s, H-19), 1.36-1.34 (1H, overlap, H-37), 1.29 (3H, s, H-40).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ(ppm):

203.3 (C-12), 178.9 (C-8), 170.2 (C-30), 161.5 (C-6), 157.6 (C-16), 157.4 (C-18), 137.8 (C-27), 135.3 (C-10), 133.4 (C-9), 131.8 (C-23), 131.5 (C-33), 127.8 (C-28), 124.5 (C-3), 123.8 (C-22), 122.3 (C-32), 115.9 (C-40), 107.6 (C-17), 102.8 (C-5), 100.5 (C-7), 90.9 (C-14), 84.1 (C-38), 83.8 (C-13), 81.3 (C-2), 49 (C-37), 46.8 (C-11), 42 (C-20), 29.9 (C-39), 29.3 (C-26), 28.8 (C-40), 27.7 (C-19), 25.6 (C-24, C-35), 25.2 (C-36), 22.7 (C-21), 21.6 (C-31), 20.7 (C-29), 18.2 (C-34), 17.6 (C-25).

2.5.2. GHN9.2.4: Axit isogambogic

Hợp chất sạch GHN9.2.4 thu được là chất dầu màu vàng sáng.



Axit isogambogic

Hình 4. Công thức cấu tạo của GHN9.2.4

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

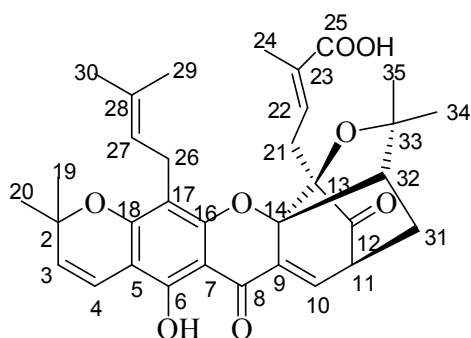
12.75 (OH-6), 7.55 (1H, dd, J 2.5 & 7.0 Hz, H-10), 6.67 (1H, dd, J 2.5 & 10.5 Hz, H-4), 6.49 (1H, t, J 7.0 Hz, H-27), 5.44 (1H, dd, J 6.5 & 7.0 Hz, H-3), 5.13 (1H, dt, J 1.5 & 7.0 Hz, H-32), 5.07 (1H, dt, J 2.5 & 8.5 Hz, H-22), 3.50 (1H, dt, J 2.5 & 7.0 Hz, H-11), 3.29 (1H, dd, J 6.5 & 16.0 Hz, H-31), 2.63 (1H, dd, J 3.0 & 6.0 Hz, H-26), 2.58 (1H, dd, J 6.0 Hz, H-26), 2.52 (1H, d, J 9.5 Hz, H-37), 2.33 (1H, dd, J 4.5 & 13.5 Hz, H-36), 2.03 (2H, m, H-21), 1.78 (1H, overlap, H-20), 1.73 (3H, s, H-34), 1.71 (3H, s, H-39), 1.66 (3H, s, H-24), 1.65 (1H, overlap, H-20), 1.65 (3H, s, H-35), 1.55 (3H, s, H-25), 1.38 (3H, s, H-19), 1.36 (3H, s, H-30), 1.36 – 1.34 (1H, m, H-36), 1.29 (3H, s, H-40).

$^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ (ppm):

202.9 (C-12), 178.8 (C-8), 171.1 (C-29), 161.4 (C-6), 157.6 (C-16), 157.4 (C-18), 136.8 (C-27), 135.3 (C-10), 133.4 (C-9), 131.9 (C-33), 131.8 (C-23), 128.9 (C-28), 124.8 (C-3), 123.8 (C-22), 122.2 (C-32), 115.9 (C-4), 107.9 (C-17), 102.9 (C-5), 100.5 (C-7), 90.7 (C-14), 83.7 (C-13, C-38), 81.3 (C-2), 49.1 (C-37), 46.9 (C-11), 41.9 (C-20), 39 (C-30), 29.1 (C-40), 29 (C-26), 27.4 (C-19), 25.7 (C-24), 25.5 (C-35), 25.4 (C-36), 22.7 (C-21), 21.6 (C-31), 18.1 (C-34), 17.6 (C-25), 11.4 (C-30).

2.5.3. GHN10.4.4: Axit isomorellic

Hợp chất sạch GHN10.4.4 thu được là tinh thể hình kim màu vàng cam, kết tinh trong MeOH-H₂O.



Hình 5. Công thức cấu tạo của hợp chất GHN10.4.4

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

12.80 (OH-6), 7.55 (1H, d, J 6.5 Hz, H-10), 6.58 (1H, d, J 10 Hz, H-4), 6.02 (1H, t, J 6.5 & 7.0 Hz, H-22), 5.48 (1H, d, J 10 Hz, H-3), 5.05 (1H, t, J 6.5 & 6.0 Hz, H-27), 3.48 (1H, m, H-11), 3.32 (1H, dd, J 8.0 & 9.0 Hz, H-26), 3.16 (1H, dd, J 5.0 & 14.5 Hz, H-26), 2.92 (2H, t, J 7.0 & 7.5 Hz, H-21), 2.53 (1H, d, J 9.5 Hz, H-32), 2.32 (1H, dd, J 4.5 & 13.5 Hz, H-31), 1.74 (6H, s, H-25, H-29), 1.65 (6H, s, H-30, H-35), 1.44 (3H, s, H-20), 1.40 (3H, s, H-19), 1.38 (1H, overlap, H-31), 1.29 (3H, s, H-34).

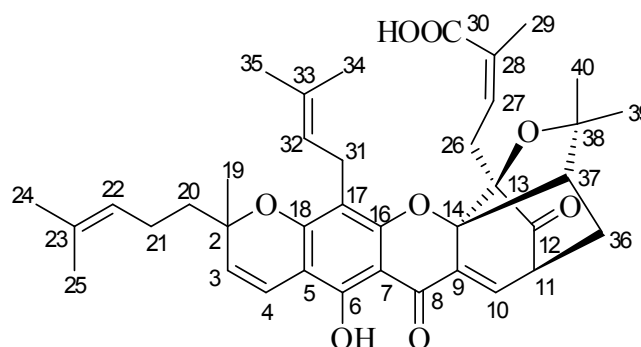
$^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ (ppm):

203.5 (C-12), 179 (C-8), 170.1 (C-24), 161.2 (C-18), 157.6 (C-16), 157.3 (C-6), 136.8 (C-22), 135.4 (C-10), 133.8 (C-9), 131.6 (C-28), 126.1 (C-3, C-23), 122.2 (C-27), 115.4 (C-4), 108.1 (C-17), 103.2 (C-5), 100.6 (C-7), 90.9 (C-14), 84.1 (C-13), 83.8 (C-33), 78.7 (C-2), 49.1 (C-32), 46.9 (C-11), 29.9 (C-35), 29.4 (C-21), 28.9 (C-34), 28.3 (C-19, C-20), 25.7 (C-30), 25.2 (C-31), 21.7 (C-26), 20.8 (C-25), 18.2 (C-29).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các hợp chất **1-3** được phân lập từ cặn chiết DCM của nhựa cây *G. Hanburyi* bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và sắc ký cột sephadex LH-20 giải li bằng hệ dung môi thích hợp. Các hợp 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 thể với những tín hiệu tương tự trên phổ ^1H và $^{13}\text{C NMR}$ (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 $^1\text{H NMR}$ của hợp chất **1** xuất hiện tín hiệu của $7x\text{CH}_3$, $4x\text{CH}=\text{}$, $5x\text{CH}_2$ and $4x\text{Csp}^2$ bậc 4. Điều này chứng tỏ hợp chất **1** có 2 nhóm prenyl và một nhóm geranyl. Vị trí của các nhóm prenyl và geranyl được xác định dựa vào phổ HMBC, trong đó xuất hiện các tương tác C-2/H-1', H-2'; C-8/H-1'', H-2'' and C-5/H-1''', H-2'''. So sánh dữ kiện phổ ^1H và $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất **1** với Axit Gambogic trong tài liệu tham khảo [7] chúng tôi thấy các kết quả thu được hoàn toàn trùng khớp với hợp chất đã công bố. Do vậy chúng tôi kết luận hợp chất **1** chính là Axit gambogic.



Hình 6. Cấu trúc các hợp chất 1-3

Các tín hiệu cộng hưởng trên phổ ^1H và $^{13}\text{C NMR}$ của hợp chất **2** khá tương đồng với các tín hiệu của hợp chất **1** ngoại trừ sự xuất hiện của một proton thơm ở 6,83ppm và sự biến mất của một nhóm prenyl. Các tương tác trên phổ

HMBC cho thấy vẫn có tương tác C-2/H-1', H-2', chứng tỏ **2** chứa một nhóm prenyl liên kết với C-2 và một nhóm geranyl liên kết với C-8. Tham khảo tài liệu [9] chúng tôi thấy hợp chất **2** trùng khớp với hợp chất đã được công bố Axit Isogambogic.

Dữ kiện phổ NMR của hợp chất **3** hoàn toàn tương tự như hợp chất **2**. Tuy nhiên, trên phổ ^1H NMR của **3** chỉ còn $4\times\text{CH}_3$ so với $5\times\text{CH}_3$ ở hợp chất **2**, đồng thời xuất hiện một pic singlet tương ứng với 2H ở 4,35ppm và trên phổ ^{13}C cũng xuất hiện một cacbon ở 62,7ppm là cacbon liên kết với O. Điều này chứng tỏ một nguyên tử H trong nhóm CH_3 đã bị thay thế bằng nhóm hydroxyl. Dữ kiện trên phổ HMBC cho thấy nhóm CH_3 này thuộc nhóm prenyl. So sánh với tài liệu tham khảo [9], chúng tôi kết luận hợp chất **3** chính là Axit isomorelic.

4. KẾT LUẬN

Từ dịch chiết diclometan của nhựa cây *Garcinia hanburyi* đã phân lập được ba hợp chất là Axit gambogic, Axit isomorelic và Axit isogambogic bằng các phương pháp sắc ký cột kết hợp với sắc ký lớp mỏng.

Đã xác định và chứng minh được cấu trúc của ba hợp chất phân lập được là Axit gambogic, Axit isomorelic và Axit isogambogic bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều: ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HSQC, NOESY kết hợp với tham khảo tài liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Ngọc Hàn, Trần Thế Bách, 2015. *Giá trị kinh tế của họ bứa (clusiaceae lindl.) ở Việt Nam*. Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. (<http://iebr.ac.vn/database/HNTQ6/1106.pdf>)
- [2]. Lien Hoa D. Nguyen, Leslie J. Harrison, 2000. *Xanthonoids and triterpenoids from the bark of Garcinia vilersiana*. *Phytochemistry*, Volume 53, Issue 1, Pages 111-114.
- [3]. Sen A. K., Sarkar K. K., Majumder P. C., Banerij N., Usvuori R., Hase T. A., 1981. *The structures of garcinones A, B and C. Three new xanthonoids from Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 21, pp. 1947-1950.
- [4]. Gey C., Kyrilenko S., Hennig L., Nguyen D. L. H., Buttner A., Pham H. D., Giannis A., 2007. *Phloroglucinol derivatives guttiferone G, aristoforin and hyperforin: inhibitors of human sirtuins SIRT 1 and SIRT 2*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, pp. 5219-5222.
- [5]. Angiosperm Phylogeny Group, 1998. *An ordinal classification for the families of flowering plants*. *Bot. J. Linn. Soc.* 141, pp. 399-436.
- [6]. Angiosperm Phylogeny Group, 2003. *An update of the phylogeny for the orders and families of flowering plants: APG II*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 85, pp. 531-553.
- [7]. Gustafsson M. H. G., Bittrich V., Stevens P. F., 2002. *Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences*. *Int. J. Plant Sci* 163(6), pp. 1045-1054.
- [8]. Kubitzki K. Bayer C. Stevens P. F., 2007. *The families and genera of vascular plants. Vol. IX*. Springer. Hamburg, pp. 48-66, 194-201.
- [9]. Rezende C. M. A. D. M., Gorlied O. R., 1973. *Xanthonoids as systematic markers, biochemical systematic markers*. *Biochem. Syst.* 1, pp. 111-118.

[10]. Phạm Hoàng Hộ, 1999. *Cây cỏ Việt Nam, quyển 1*. NXB Trẻ Tp. Hồ Chí Minh, tr. 457-461.

[11]. Đỗ Huy Bích và các tác giả, 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 3p.

[12]. Bennett, G.J., Lee, H., 1989. *Xanthonoids from the Guttiferae*. *Phytochemistry* 28, 967-998

[13]. Waterman, P.G., Hussain, R.A., 1983. *Systematic significance of xanthonoids, benzophenones and biflavonoids in Garcinia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 11, 21-28.

[14]. Luận văn *Khảo sát thành phần hóa học cây Bứa Đông Garcinia Schomburgiana, Họ Bứa (Guttiferae)* (<http://doan.edu.vn/do-an/luan-van-khao-sat-thanh-phan-hoa-hoc-cay-bua-dong-garcinia-schomburgiana-ho-bua-guttiferae-30749/>).

[15]. Hồ Đình Hải, 2006. *Rau rừng Việt Nam*. (<https://sites.google.com/site/raurungvietnam/rau-than-go-lon/cay-bua>)

[16]. Nguyễn Thị Ngọc Thảo, 2006. *Khảo sát thành phần hóa học cao eter dầu hỏa của vỏ cây bứa nhà (G. cochinchinensis), họ Bứa (Guttiferae)*. Luận văn thạc sĩ Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh.

[17]. Nguyễn Thị Ngọc Tuyết, 2012. *Khảo sát thành phần hóa học cây bứa đông (G. schomburgiana), họ Bứa (Guttiferae)*. Luận văn thạc sĩ Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh.

[18]. Kumar P., Baslas R. K., 1980. *Phytochemical and biological studies of the plants of genus Garcinia*. *Herba Hungarica* 19 (1), pp. 81-91.