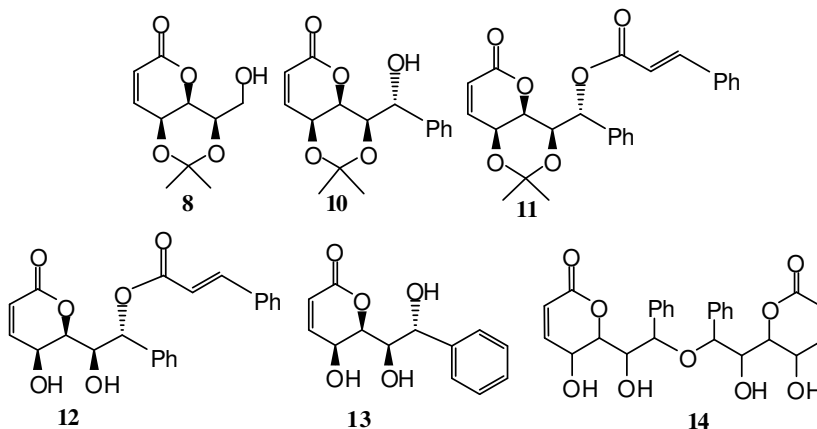


NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ĐỘC TẾ BÀO CỦA GONIOTRIOL, DIMER-GONIOTRIOL, HOWIINOL A VÀ CÁC TIỀN CHẤT CỦA CHÚNG

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, ĐOÀN THỊ MAI HƯƠNG, PHẠM VĂN CƯỜNG,
BÁ THỊ CHÂM, NGUYỄN VĂN HÙNG

1. MỞ ĐẦU

Styryl-lactone là một trong 3 lớp chất chính có trong chi *Goniothalamus* họ na (Annonaceae) [1 - 5], trong đó howiinol A (**12**) và goniotriol (**13**) là hai hợp chất có hoạt tính chống ung thư [6 - 8]. Trước đây, chúng tôi đã công bố quy trình tổng hợp howiinol A và các hợp chất trung gian quan trọng trên tạp chí khoa học và hội nghị khoa học chuyên ngành [9, 10, 11]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày phương pháp tổng hợp chất goniotriol (**13**) và dimer-goniotriol (**14**) đồng thời công bố kết quả nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của howiinol A (**12**), goniotriol (**13**), dimer-goniotriol (**14**) và 1 số tiền chất thuộc lớp chất styryl lacton (**8**, **10**, **11**) đối với 4 dòng tế bào ung thư là ung thư biểu mô KB, ung thư gan HepG₂, ung thư vú MCF₇, ung thư phổi LU-1.



2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị, hoá chất

Phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất chuẩn nội. Phổ khối lượng được đo trên máy MS 5989B Engine (Hewlet Packard) và máy sắc kí lỏng ghép khối phổ với đầu đo MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng mode ESI và đầu dò DAD. Hoá chất dùng cho tổng hợp hữu cơ được mua của hãng Merck và Aldrich.

2.2. Tổng hợp

Phương pháp tổng hợp howiinol A (**12**) và các tiền chất **8**, **10**, **11** đã được chúng tôi trình bày trong công trình công bố trước [11].

Goniotriol 13

Cho 10 ml dung dịch axit axetic 80% vào trong bình cầu có chứa 100 mg alcol **10**, rồi khuấy hỗn hợp phản ứng ở 80 – 90°C trong 4 giờ. Sau khi quay cất chân không dưới áp suất giảm thu được 110 mg cặn chất. Cặn chất được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient thu được 80 mg hợp chất goniotriol tinh khiết. Hiệu suất của phản ứng đạt 93%.

Chất rắn màu trắng (CH₂Cl₂/MeOH) đ.n.c. 177-178°C; ESI-MS: *m/z* 251 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): 4,10 (1H, dd, J=7,9; 3,8 Hz, H-6); 4,36 (1H, dd, J=5,7; 3,0 Hz, H-4); 4,52 (1H, dd, J=3,8; 3,7 Hz, H-5), 4,67 (1H, d, J=7,9 Hz, H-7), 6,10 (1H, d, J=9,7 Hz, H-2); 6,94 (1H, dd, J=9,7; 5,8 Hz, H-3), 7,20-7,41 (5H, m, C₆H₅).

Dimer 14

Nhỏ 5 giọt BF₃.OEt₂ vào bình cầu có chứa 50 mg alcol **10** và 3 ml CH₂Cl₂ khan. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết thúc phản ứng, thêm 10 ml dung dịch NaHCO₃ và chiết 3 lần với CH₂Cl₂. Pha hữu cơ được rửa một lần bằng dung dịch NaCl và làm khan bằng MgSO₄. Sau khi quay khô dung môi dưới áp suất thấp, cặn thô được tinh chế qua cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient cho 20 mg chất rắn màu trắng dimer-goniotriol (**14**). Hiệu suất của phản ứng là 20%.

ESI-MS: *m/z* 483 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): 4,39 (d, J=3,0 Hz, H-6 + H-6'); 4,80 (dd, J=5,2; 4,7 Hz, H-4 + H-4'); 4,96 (dd, J=4,4; 1,2 Hz, H-5 + H-5'), 5,14 (d, J=3,0 Hz, H-7 + H-7'); 6,10 (d, J=9,9 Hz, H-2 + H-2'); 6,96 (dd, J=9,9; 5,2 Hz, H-3 + H-3'); 7,20-7,33 (m, 2 x C₆H₅). ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): 69,1 (C-4 + C-4'), 78,7 (C-5 + C-5'), 84,9 (C-7 + C-7'), 86,8 (C-6 + C-6'), 123,3 (C-2 + C-2'), 128,4 (C-9 + C-9' + C13 + C-13'), 128,7 (C-11 + C-11'), 128,9 (C-10 + C-10' + C-12 + C-12'), 140,9 (C-3 + C-3'), 141,3 (C-8 + C-8'), 163,4 (2 x C=O).

2.3. Phương pháp thử hoạt tính độc tế bào

Độ độc tế bào *in vitro* được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991), được Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ (NCI) xác nhận là phép thử độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro* [12].

Tủ âm CO₂ INNOVA CO-170, tủ cấy sinh học an toàn cấp II, máy li tâm Universal 320R, kính hiển vi ngược Zeiss, tủ lạnh sâu -25⁰C, -80⁰C, buồng đếm tế bào của Fisher, máy quang phổ Genios Tecan được sử dụng để thử hoạt tính gây độc tế bào. Bốn dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATTC gồm: KB - ung thư biểu mô (CCL - 17TM); Hep G2 - ung thư gan (HB - 8065TM); MCF-7 - ung thư vú (HTB - 22TM) và LU-1 HTB-57TM - ung thư phổi.

Phương pháp nuôi cấy

Các dòng tế bào ung thư nghiên cứu được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy RPMI 1640 và DMEM có bổ xung thêm 10% huyết thanh phôi bò (FBS) và các thành phần kèm theo gồm 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, hỗn hợp kháng sinh 100 đơn vị Penicillin và 100 µg Streptomycin, điều kiện nuôi là 5% CO₂; 37°C; độ ẩm 98%; vô trùng tuyệt đối. Thời gian cấy chuyển khác nhau tùy thuộc vào đặc tính của từng dòng tế bào. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Phép thử sinh học xác định độ độc tế bào

200 μ l dung dịch tế bào sau khi thu hoạch ở pha log với nồng độ 3×10^4 tế bào/ml được cho vào phiến vi lượng 96 giếng trong môi trường RPMI 1640 cho các dòng tế bào HepG₂, MCF₇, KB và môi trường DMEM cho dòng tế bào LU-1. Mẫu chất thử pha ở các nồng độ 64 μ g/ml; 16 μ g/ml; 4 μ g/ml; 1 μ g/ml và 0,25 μ g/ml được cho thêm vào phiến vi lượng 96 giếng ở trên. Giếng điều khiển (chuẩn) gồm 200 μ l dung dịch tế bào 3×10^4 tế bào/ml cũng được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thêm 50 μ l MTT (1mg/ml pha trong môi trường nuôi cấy không huyết thanh) vào phiến vi lượng 96 giếng và giếng điều khiển rồi ủ tiếp ở 37°C trong 4 giờ, sau đó loại bỏ môi trường, thêm 100 μ l DMSO lắc đều, đọc kết quả ở bước sóng 540 nm trên máy spectrophotometer Genios TECAN.

Công thức tính:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{[\text{OD (chất thử)} - \text{OD (ngày 0)}]}{\text{OD (điều khiển)}} \times 100\%$$
$$\% \text{ Kìm hãm} = 100\% - \text{OD (điều khiển)}$$

Giá trị IC₅₀ được tính dựa trên kết quả số liệu phần trăm kìm hãm sự phát triển của tế bào bằng phần mềm Tablecurve. Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

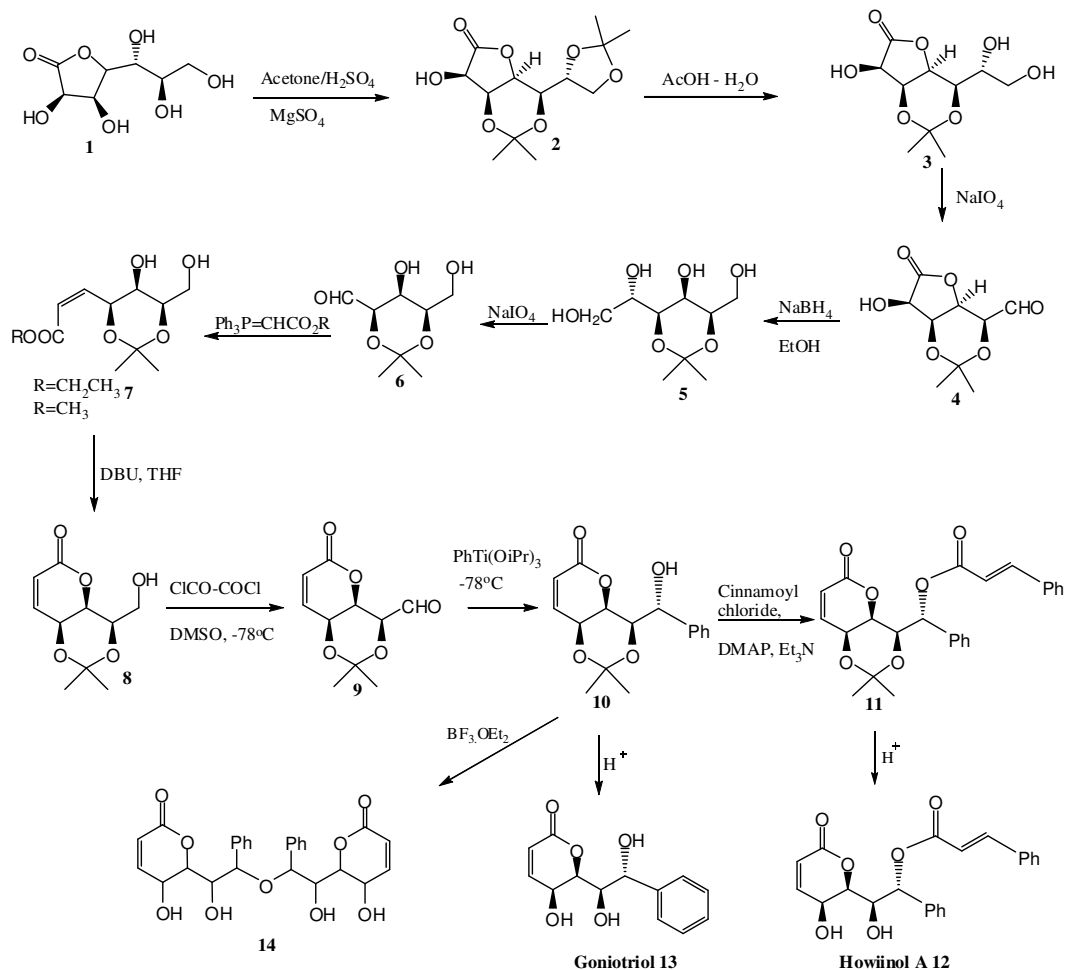
Việc tổng hợp howiinol A (**12**) được thực hiện qua 10 bước đi từ chất thương mại D-glycero-D-gulo-heptono- γ -lactone đã được chúng tôi công bố trong công trình trước [11]. Hợp chất goniotriol (**12**) và dimer-goniotriol (**14**) được tổng hợp qua 1 bước đi từ hợp chất trung gian **10** với sự có mặt của xúc tác axit (hình 1).

Cho 10 ml dung dịch axit axetic 80% vào trong bình cầu có chứa 100 mg alcol **10**. Hỗn hợp phản ứng được đun ở 80-90°C trong 4 giờ, sau đó quay cất chân không dưới áp suất giảm thu được 110 mg cặn chất. Sau khi chạy sắc kí cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient (0% - 5%) cho 80 mg hợp chất **13** dưới dạng rắn màu trắng. Hiệu suất của phản ứng đạt 93%. Phổ ESI-MS của **13** cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 251 [M+H]⁺ ứng với công thức phân tử C₁₃H₁₄O₅. Trên phổ ¹H-NMR, có tín hiệu của 2 proton thuộc vòng lactone không no ở δ_H 6,10 (1H, d, J=9,7 Hz, H-2); 6,94 (1H, dd, J=9,7; 5,8 Hz, H-3), 4 nhóm metin gắn với oxy ở δ_H 4,10 (1H, dd, J=7,9; 3,8 Hz, H-6); 4,36 (1H, dd, J=5,7; 3,0 Hz, H-4); 4,52 (1H, dd, J=3,8; 3,7 Hz, H-5), 4,67 (1H, d, J=7,9 Hz, H-7) và 5 proton vòng thơm ở 7,20-7,71 (5H, m, C₆H₅). Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định chất thu được chính là goniotriol [8].

Hợp chất dimer-goniotriol **14** được tổng hợp từ alcol **10** với sự có mặt của xúc tác axit BF₃.OEt₂ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ với hiệu suất đạt 20%. Phổ ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 483 [M+H]⁺ ứng với công thức phân tử C₂₆H₂₆O₉. Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của **14** rất giống với chất **13**. Kết hợp dữ liệu phổ MS, ¹H-NMR và ¹³C-NMR cho phép xác định chất **14** chính là dimer đối xứng của goniotriol.

Howiinol A (**12**), goniotriol (**13**), dimer-goniotriol (**14**) và các tiền chất **8**, **10**, **11**, được thử hoạt tính độc tế bào đối với 4 dòng tế bào ung thư LU-1, HepG₂, KB và MCF₇. Kết quả thử hoạt tính được trình bày trong bảng 1. Hợp chất goniotriol (**13**) có hoạt tính đối với dòng tế bào ung

thư vú MCF₇ với giá trị IC₅₀ = 5,46 µg/ml. Chất dimer-goniotriol **14** không có hoạt tính đối với dòng tế bào ung thư gan HepG₂ nhưng có hoạt tính đối với 3 dòng ung thư KB, MCF₇, LU-1. Tất cả 4 chất còn lại là **8**, **10**, **11** và howiinol A (**12**) đều có hoạt tính độc tế bào đối với cả 4 dòng tế bào ung thư. Đặc biệt, hợp chất **11** có hoạt tính cao nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,53; 0,71; 0,66 và 0,58 µg/ml đối với 4 dòng tế bào ung thư LU-1, HepG₂, KB và MCF₇.



Hình 1. Quy trình tổng hợp howiinol A (**12**), goniotriol (**13**) và dimer-goniotriol (**14**)

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính độc tế bào của các chất

TT	Kí hiệu mẫu	Dòng tế bào			
		LU-1 HTB IC ₅₀ (µg/ml)	HepG ₂ IC ₅₀ (µg/ml)	KB IC ₅₀ (µg/ml)	MCF ₇ IC ₅₀ (µg/ml)
01	8	4,23	7,36	3,55	2,78
02	10	3,12	2,44	3,15	3,16

03	11	0,53	0,71	0,66	0,58
04	Howiinol A (12)	6,46	8,63	6,0	5,33
05	Goniotriol (13)	>10	10,4	10,27	5,46
06	Dimer-goniotriol (14)	7,42	>10	9,50	8,24
	Ellipticine	0,31-0,62	0,31-0,62	0,31-0,62	0,31-0,62

Lời cảm ơn. Các tác giả xin cảm ơn Bộ KH&CN, Vụ Khoa học Xã hội và Tự nhiên đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài nghiên cứu cơ bản 2006-2008.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fang X. P., Anderson J. E., Chang C. J., Fanwick P. E., and McLaughlin J. L. - Novel bioactive styryl-lactones: goniofufurone, gonioypyprone, and 8-acetylgoniotriol from *Goniothalamus giganteus*(annonaceae). X-Ray molecular structure of goniofufurone and of gonioypyprone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1990) 1655-1661.
2. Fang X. P., Anderson J. E., Chang C. J., McLaughlin J. L., Fanwick P. E. - Two new styryl lactones, 9-deoxygonioypyprone and 7-epi-goniofufurone, from *Goniothalamus giganteus*, *J. Nat. Prod.* **54** (4) (1991) 1034-1043.
3. Fang X. P., Anderson J. E., Chang C. J., Qiu X. X., Kozlowski J. F., Chang C. J., and McLaughlin J. L. - Gonioheptolides A and B: Novel eight-membered-ring lactones from *Goniothalamus giganteus* (*Annonaceae*), *Tetrahedron* **49** (8) (1993) 1563-1570.
4. Ze Tian, Sibao Chen, Yaou Zhang et al. - The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones, *Phytomedicine* **13** (2006) 181-186.
5. M. Amparo Blazquez, Lamudela Bermejo, M. Carmen Zafra-Polo and Diego Cortes - Styryl-lactones from *Goniothalamus* Species A Review, *Phytochemical analysis* **10** (1999) 161-170.
6. Chen R., Yu D., Wu F., Song W. - The chemical constituents of *Goniothalamus howii* Merr., *Acta Pharmaceutia Sinica* **33** (6) (1998) 453-456.
7. He J., Ye Y., Xu C. - Antitumor activity of howiinol (GHM-10) on L1210 cells in vitro, *Acta Pharmaceutia Sinica* **33** (8) (1998) 566-570.
8. Alkofahi A., Ma W. W., McKenzie A. T., Byrn S. R., McLaughlin J. L. - Goniotriol from *Goniothalamus giganteus*, *J. Nat. Prod.* **52** (6) (1989) 1371-1373.
9. Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng - Tổng hợp (Z) Methyl 4,6-O-Isopropylidene-D-xylo-hept-2-enolate, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **45** (3A) (2007) 190-194.
10. Nguyen Thi Hong Hanh, Doan Thi Mai Huong, Pham Van Cuong, Nguyen Van Hung, Lidia Dumitrescu, Danièle Bonnet-Delpon - Synthesis of 4,6-O-Isopropylidene-7-C-phenyl-D-gluco-hept-2-enono- δ -lactone, *Proceeding International Scientific Conference on "Chemistry for Development and Integration"*, Hanoi, 2008, p.185-190.
11. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Đoàn Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng - Nghiên cứu quy trình tổng hợp howiinol A, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **46** (6) (2008) 83-90.

12. Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Kenneth D. P., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R. - Cancer Reseach **48** (1988) 4827-4833.

SUMMARY

STUDY ON SYNTHESIS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF GONIOTRIOL, DIMER- GONIOTRIOL, HOWIINOL A AND THEIR PRECURSOR

The styryl-lactones belong to a group of secondary metabolites commonly isolated from the family Annonaceae. Among them, Howiinol A (**12**) has shown in vitro cytotoxic effect against the cancer cell line L1210 and goniotriol (**13**) has shown in vitro cytotoxic effect against the cancer cell line MCF₇. Recently, we have announced the synthesis of howiinol A. Herein, we report the synthesis of goniotriol (**13**) and dimer-goniotriol (**14**) from precursor **10**. Simultaneously, cytotoxic evaluation of these compounds againts several cancer cell lines was performed. One of them, specially, compound **11** has high activity against 4 human cancer cell lines LU-1, HepG₂, KB và MCF₇ with IC₅₀ = 0.53, 0.71, 0.66 and 0.58 µg/ml, respectively.

Địa chỉ:

Viện Hóa học, Viện KH&CNVN.

Nhận bài ngày 10 tháng 6 năm 2009