

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CÂY KYDIA GLABRESCENS

Đến Tòa soạn 6-5-2003

NGUYỄN QUYẾT CHIẾN, NGUYỄN VĂN HÙNG, TRẦN VĂN SUNG

Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

Taraxerol (1), scopoletin (2) and (-)-epicatechin (3) were isolated from Kydia glabrescens along with β -sitosterol and β -sitosterol glucoside. The identification of the isolates were made by spectroscopic techniques. In addition, the ^{13}C -NMR assignments of taraxerol were revised, based on 2D NMR data.

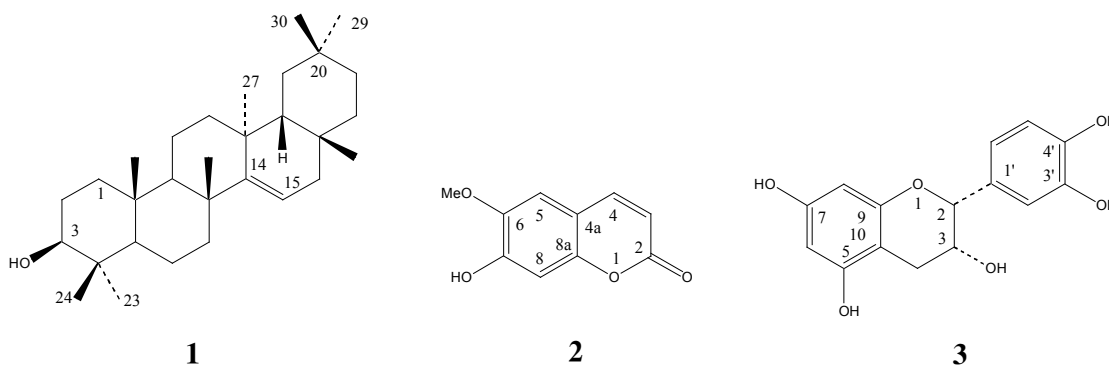
I - MỞ ĐẦU

Cây *Kydia glabrescens* Masters in Hook là cây đại mộc thuộc họ Bông (Malvaceae) [1]. Trong việc thực hiện dự án “Điều tra cơ bản tài nguyên thực vật tỉnh Hòa Bình” [2] chúng tôi đã thu được các mẫu của cây này mọc tự nhiên tại huyện Mai Châu, tỉnh Hòa Bình. Dựa trên kết quả sàng lọc hóa học sơ bộ, đồng thời được biết cây Vông quả cánh (*Kydia calycina*) cùng chi là một cây thuốc dân gian của ta và cũng được dùng làm thuốc ở Trung Quốc và Ấn Độ [3], chúng tôi đã chọn cây *Kydia glabrescens* làm đối tượng nghiên cứu sâu hơn. Từ lá của cây, bên cạnh β -sitosterol chúng tôi đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất tritepen taraxerol (1). Từ vỏ của cây, bên cạnh

β -sitosterol glucosit chúng tôi đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất scopoletin (2) và (-)-epicatechin (3). Các chất tách ra được xác định cấu trúc bằng sự kết hợp các phương pháp quang phổ hồng ngoại (FTIR), quang phổ tử ngoại (UV), phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ proton và cacbon (^1H - và ^{13}C -NMR) và các phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều COSY, HMQC, HMBC, NOESY. Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên được biết về thành phần hóa học của cây *Kydia glabrescens*.

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cao chiết metanol của lá và vỏ cây *Kydia glabrescens* được phân bố lần lượt trong các dung môi n-hexan, diclometan, etylaxetat và n-butanol.



Dung môi được cất loại dưới chân không cho các cao chiết tương ứng. Từ các cao chiết n-hexan và diclometan của lá đã phân lập và xác định được cấu trúc của taraxerol (**1**) (0,005% so với nguyên liệu khô) và β -sitosterol. Taraxerol cũng còn được phát hiện thấy trong cao chiết etyl axetat. Từ cao chiết etyl axetat của vỏ đã phân lập và xác định được cấu trúc của scopoletin (**2**), (-)-epicatechin (**3**) và β -sitosterol glucosit.

Taraxerol (1): Phổ khối và chạm electron (EIMS) cho pic phân tử m/z 426 (32) $[M]^+$, ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{50}O$. Pic cơ bản m/z 204 (100) và pic m/z 302 (53) thể hiện sự phân mảnh đặc trưng của các hợp chất tritecpen thuộc

nhóm taraxeran có nối đôi giữa C-14 và C-15 [4]. Phân tích các phổ NMR và so sánh các tính chất hóa lý khác cho thấy **1** là hợp chất đã biết taraxerol. So sánh phổ ^{13}C -NMR của **1** với phổ của taraxerol ghi trong cùng một dung môi đã công bố trong tư liệu [5] cho thấy các số liệu khớp nhau cơ bản về giá trị, nhưng khác nhau về kết quả gán các giá trị đó. Đó là một việc thường gặp phải, do lúc đó chưa có các phương pháp NMR hai chiều như ngày nay. Phân tích các kết nối thể hiện trên các phổ NMR hai chiều (COSY, HMQC, HMBC và NOESY) của **1** cho phép chúng tôi đưa ra kết quả gán giá trị mới thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1: Kết quả gán giá trị phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của **1** so sánh với tư liệu [5]

C	Số liệu đo			Tư liệu
	δ_H (J = Hz) ($CDCl_3$, 300 MHz)	δ_C ($CDCl_3$, 100 MHz)	HMBC	δ_C ($CDCl_3$, 25 MHz)
1	1,3 m 1,1 m	37,77 t		38,1
2	1,6 m	27,18 t		27,3
3	3,19 dd (10,3; 4,9)	79,08 d	C-23, 24	79,2
4		38,78 s		39,1
5	0,8 m	55,57 d		55,7
6	1,6 m	18,82 t		19,0
7	2,03 m 1,3 m	41,36 t	C-5, 6, 8	35,3
8		39,0 s		38,9
9	1,45 m	49,31 d		48,9
10		37,59 s		37,9
11	1,45 m	17,52 t		17,7
12	1,60 m	33,73 t		35,9
13		38,03 s		37,9
14		158,12 s		158,1
15	5,53 dd	116,89 d	C-8, 13, 16, 17	117,0
16	1,90 m 1,70 m	37,77 t	C-14, 15, 17, 18	36,9
17		35,8 s		38,1
18	0,95 m	48,8 d		49,4
19	1,60 m	36,7 t		41,4
20		28,81 s		29,0

21	1,30 m	33,12 t		33,9
22	1,40 m	35,15 t		33,2
23	0,97 s	28,01 q	C-3, 5, 24	28,1
24	0,80 s	15,43 q	C-3, 5, 23	15,6
25	0,92 s	15,46 q	C-1, 5, 9, 10	15,6
26	1,09 s	25,92 q	C-7, 8, 9, 14	30,1
27	0,91 s	21,33 q	C-12, 13, 14, 18	26,0
28	0,82 s	29,85 q	C-16, 17, 18, 22	30,1
29	0,91 s	33,36 q	C-19, 20, 21, 30	33,5
30	0,95 s	29,93 q	C-19, 20, 21, 29	21,5

Scopoletin (2): thu được từ cao etylaxetat của vỏ cây. Trong khi phân lập bằng sắc ký cột trên silicagel, **2** được rửa giải ra cùng với một chất khác và đồng kết tinh với nó dưới dạng tinh thể hình kim trong n-hexan/axeton. Phân tích bằng sắc ký bản mỏng chỉ thấy một vết ở $R_f = 0,54$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH } 95 : 5$) phát huỳnh quang xanh dưới UV₃₅₄. Tinh chế tiếp bằng sắc ký lỏng cao áp điều chế trên cột ngược pha Grom-Suphir 110 C18 với hệ dung môi MeCN / H₂O (6 : 4) cho **2** sạch. Phổ khối phân giải cao ion hóa bụi electron, thức dương (HRESIMS) cho pic m/z 193,0555 $[\text{M}+\text{H}]^+$, suy ra công thức phân tử C₁₀H₈O₄. Phân tích các phổ NMR và so sánh các tính chất hóa lý khác cho thấy **2** là hợp chất đã biết scopoletin thuộc nhóm các hợp chất cumarin. Kết quả phân tích các phổ NMR của **2** phù hợp với các số liệu đã được công bố [6].

(-)-Epicatechin (3): thu được từ cao etyl axetat của vỏ cây. Phổ khối phân giải cao ion hóa bụi electron, thức âm (HRESIMS) cho pic m/z 289,073 $[\text{M}-\text{H}]^-$, suy ra công thức phân tử C₁₅H₁₄O₆. Hợp chất **3** cho các phổ UV và IR đặc trưng cho các hợp chất flavan. Phân tích các phổ NMR và so sánh các tính chất hóa lý khác cho thấy **3** là hợp chất đã biết (-)-epicatechin. Kết quả phân tích các phổ NMR phù hợp với các số liệu đã được công bố [7]. Khác với (+)-catechin, dạng (2R-trans), có góc quay cực dương, (-)-epicatechin (**3**), dạng (2R-cis) có $[\alpha]_D - 50,4^0$ (c 0,25; EtOH) (tư liệu [8] -68⁰, trong EtOH).

Theo tư liệu [8], taraxerol có hoạt tính kháng vi sinh vật, chống viêm và chống khối u; scopoletin có hoạt tính chống co thắt cơ trơn;

(-)-epicatechin có hoạt tính chống viêm tấy.

III - THỰC NGHIỆM

Điểm nóng chảy được đo trên máy Boetius. Góc quay cực đo trên máy tự động Perkin-Elmer model 241 polarimeter. Phổ UV ghi trên máy UV 1201. Phổ hồng ngoại ghi dưới dạng viên nén KBr trên máy FTIR Impact-410. Phổ khối EIMS ghi trên máy HP 5989B MS. Phổ khối phân giải cao ion hóa bụi điện tử thức dương và âm (HRESIMS) được ghi trên máy Q-ToF-2. Phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance DPX-300 MHz với TMS là chất chuẩn nội.

Sắc ký bản mỏng được tiến hành trên bản mỏng trắng sẵn silicagel Merck 60 F₂₅₄, hiện hình bằng thuốc thử CeSO₄. Sắc ký cột được tiến hành với silicagel (230-400 mesh, Whatman). Sắc ký lỏng cao áp được thực hiện trên hệ thiết bị gồm bơm cao áp Waters 600E và PDA detector của Waters 996, cột ngược pha Grom-Suphir 110 C18, 12 μm , 300 \times 40 mm.

Lá và vỏ của cây *Kydia glabrescens* được thu hái vào tháng 6 năm 1999 tại xã Pà Cò, huyện Mai Châu, tỉnh Hòa Bình. Tên cây do TS Vũ Xuân Phương xác định; tiêu bản (số 2308) được lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

1. Xử lý và chiết tách chất từ lá

Lá và vỏ cây được phơi khô trong bóng râm ở nhiệt độ phòng và nghiền thành bột. Bột lá (2,4 kg) được chiết với metanol. Dịch chiết sau khi cô trong chân không loại phần lớn metanol được phân bố lần lượt trong n-hexan, etyl axetat

và diclometan. Cô khô các dung dịch cho các cao tương ứng: hexan (18,9 g), etyl axetat (14 g) và diclometan (1 g).

Cao hexan (18,9 g) được tách sơ bộ trên cột silicagel với các hệ dung môi là hexan, hexan/diclometan (1 : 2) và (1 : 4) thành 3 phân đoạn gộp. Phân đoạn 2 (2 g) kết tinh trong diclometan/metanol cho **1** (17 mg). Phần còn lại được tách tinh trên cột silicagel, rửa giải bằng hệ dung môi gồm n-hexan và lượng tăng dần diclometan và etyl axetat, thu được thêm **1** (50 mg) và β -sitosterol (100 mg).

Cao diclometan (1 g) được tách trên cột silicagel, rửa giải bằng hệ dung môi gồm hexan và lượng tăng dần etyl axetat cho **1** (62 mg). Các phân đoạn sau (62 mg) chứa chất chính là β -sitosterol. Tổng số **1** thu được qua các lần chiết tách là 129 mg (0,005% so với nguyên liệu khô). Kiểm tra trên bản mỏng (n-hexan/diclometan 1 : 4) cho thấy chất **1** cũng có trong cao etyl axetat.

2. Xử lý và chiết tách chất từ vỏ

Bột vỏ (3,6 kg) được chiết với metanol. Dịch chiết sau khi cô trong chân không loại phần lớn metanol được phân bố lần lượt trong n-hexan, etyl axetat và butanol. Cô khô các dung dịch cho các cao tương ứng: hexan (8,1 g), etyl axetat (7,8 g). Dịch chiết butanol qua kiểm tra sơ bộ cho thấy chỉ chứa các chất màu polyphenol nên không được nghiên cứu tiếp.

Cao etyl axetat (7,8 g) được tách sơ bộ trên cột silicagel với hệ dung môi gồm diclometan và các lượng metanol tăng dần (tới 20%) thành 15 phân đoạn gộp. Phân đoạn 2 (220 mg) kết tinh trong etyl axetat cho β -sitosterol (39 mg). Phân đoạn 4 (100 mg) chỉ cho một vết trên bản mỏng ($R_f = 0,54$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH } 95 : 5$) và kết tinh tự nhiên trong dung môi chạy cột dưới dạng các tinh thể hình kim (13 mg). Kiểm tra trên HPLC cho thấy đây là một hỗn hợp gồm 2 chất có phổ UV khác nhau. Hỗn hợp này được tách bằng sắc ký lỏng cao áp điều chế trên cột ngược pha Grom-Suphir 110 C18, 12 μm , 300 \times 40 mm, MeCN / H_2O (60 : 40), 20 ml/min cho **2** (3,1 mg) và một chất sạch khác có thời gian lưu cao hơn (4,5 mg). Cấu trúc của chất này đang được nghiên cứu tiếp.

Phân đoạn 10 (200 mg) kết tinh trong metanol nóng cho β -sitosterol glucosid (51 mg). Phân đoạn 12 (426 mg) được kết tinh trong etyl axetat nóng cho chất **3** (63 mg).

Taraxerol (1): Tinh thể hình kim màu trắng, đnc 281 - 282°C; TLC: $R_f = 0,53$ (n-hexan/ CH_2Cl_2 1 : 4); $[\alpha]_D^{25} + 1,4^\circ$ (c 1,2; CHCl_3); IR (KBr) ν_{max} 3489 (OH), 2939 (CH), 1474 (CH_2), 1386, 1037, 1003 cm^{-1} ; EIMS (70 eV) m/z 426 $[\text{M}]^+$ (32), 411 (16), 302 (53), 287 (47), 204 (100), 189 (31); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz): xem bảng 1.

Scopoletin (2): Tinh thể hình kim màu trắng (trong metanol). đnc 203 - 204°C; TLC: $R_f = 0,54$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 95 : 5$); UV (EtOH) λ_{max} (\log_ϵ) 227 (4,14); 255 (3,63); 259 (3,61, vai); 298 (3,66); 345 (4,05) nm; IR (KBr) ν_{max} 3285 (OH), 1703 (C=O), 1561 (aromat), 1506, 1291, 1143, 858 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 193,0555 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính cho $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$: 193,0501); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ 7,85 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4); 7,19 (1H, s, H-5); 6,79 (1H, s, H-8); 6,17 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3); 3,90 (3H, s, 6-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz) δ 161,2 (s, C-2); 151,8 (s, C-6); 151,1 (s, C-8a); 145,9 (s, C-7); 144,6 (d, C-4); 113,3 (d, C-5); 112,0 (s, C-4a); 109,9 (d, C-3); 103,7 (d, C-8); 56,69 (q, 6-OMe).

(-)-Epicatechin (3): Tinh thể hình kim màu trắng (trong EtOAc nóng), đnc 245°C; TLC: $R_f = 0,12$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 9 : 1$); $[\alpha]_D^{25} - 50,4^\circ$ (c 0,25; EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (\log_ϵ) 231 (4,296); 279 (3,717) nm; IR (KBr) ν_{max} 3455 (OH); 1628 (aromat); 1521 (aromat); 1259, 1144, 1091; 795 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 289,0733 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (tính cho $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6$: 289,0712); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ 6,97 (1H, s rộng, H-2'); 6,80 (1H, dd, $J = 8,1$; 1,3 Hz, H-6'); 6,75 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 5,94 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); 5,92 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6); 4,81 (1H, cụm pic trùng nhau, H-2); 4,17 (1H, s rộng, H-3); 2,86 (1H, dd, $J = 17,0$; 2,4 Hz, H-4b); 2,73 (1H, dd, $J = 17,0$; 4,4 Hz, H-4a); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz) δ 158,01 (s, C-9); 157,68 (s, C-5); 157,39 (s, C-7); 145,95 (s, C-3'); 145,79 (s, C-4'); 138,31 (s, C-1'); 119,4 (d, C-6'); 115,9 (d, C-5'); 115,3 (d, C-2'); 100,13 (s, C-10); 96,4 (d, C-8);

95,9 (d, C-6); 79,8 (d, C-2); 67,5 (d, C-3); 29,2 (t, C-4).

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ tài chính của Dự án cấp nhà nước 1999 - 2000 “Điều tra cơ bản tài nguyên thực vật tỉnh Hòa Bình”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ Việt Nam (An illustrated flora of Vietnam), Quyển I., Tr. 5300. NXB Trẻ, Hà Nội (1999).
2. Trần Văn Sung. Báo cáo kết quả thực hiện Dự án cấp nhà nước 1999 - 2000 “Điều tra cơ bản tài nguyên thực vật tỉnh Hòa Bình”.
3. Võ Văn Chi. Từ điển Cây thuốc Việt Nam, Tr. 1334. NXB Y học (1996).
4. K. Shiojima, Y. Arai, K. Masuda, Y. Takase, T. Ageta, H. Ageta. Chem. Pharm. Bull. Vol. 40, Tr. 1683 - 1690 (1992)
5. N. Sakurai, Y. Yaguchi, T. Inoue. Phytochemistry, Vol. 26, P. 217 - 219 (1987).
6. Aldrich Library of ^{13}C & ^1H FT NMR Spectra, 2, 1314 (1992).
7. B. E. Breitmaier, W. Voelter, Carbon-13 NMR Spectroscopy. VCH Publishers, New York, P. 455 (1987).
8. Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 9: 1, Chapman & Hall/CRC (2000).