

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT TRITECPEN TỪ CÂY XẠ ĐEN

Đến Tòa soạn 8-10-2007

TRỊNH THỊ THỦY, NGUYỄN HUY CƯỜNG, PHẠM THỊ NINH, TRẦN VĂN SÙNG

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

SUMMARY

*Chemical investigation of *Celastrus hindsii* Benth. growing in Quang Binh province, Vietnam led to the isolation and structural elucidation of clionasterol, D:A-friedo-oleanane-3,21-dione, lup-20(29)-ene-3 β -ol and lup-12-ene-3 β -ol. Their structures were determined on the basis of MS, NMR spectra and comparison with reported data.*

Keywords: *Celastrus hindsii*; Celastraceae; triterpenes.

I - MỞ ĐẦU

Cây Xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) là loại cây nhỏ, mọc hoang hoặc được trồng phổ biến ở các tỉnh như Sơn La, Hoà Bình, Nam Hà, Quảng Bình. Xạ đen được dùng trong y học cổ truyền Việt Nam để chữa các bệnh như viêm dạ dày, ung nhọt, trị khối u, chống oxy hoá [1, 2]. Kết quả thử hoạt tính *in vitro* cho thấy dịch chiết cồn của vỏ Xạ đen có hoạt tính kháng tế bào ung thư gan (*Hepatocellular carcinoma*, Hep-G2), ung thư mũi (*Nasopharynx carcinoma*), ung thư ruột kết (*Colon carcinoma*, COLO-205), kháng virus HIV H-9 [2]. Trong bài báo trước, chúng tôi đã thông báo việc phân lập và xác định cấu trúc hoá học của 3 α -friedelanol, 3-friedelanon, canophyllol, lup-20(29)-en-3 β ,11 β -diol và axit glucosyringic [3]. Bài này sẽ thông báo kết quả về phân lập và xác định cấu trúc hoá học của clionasterol (1) và ba triterpen II: D:A-friedo-oleanan-3,21-dion (2), lup-20(29)-en-3 β -ol (3), lup-12-en-3 β -ol (4) từ cây Xạ đen. Cấu trúc hoá học của các chất được xác định bằng phương pháp phổ khối (EI-, ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton, các bon 13 (^1H -, ^{13}C -NMR) và so sánh với các tài liệu đã công bố.

II - THỰC NGHIỆM

1. Thiết bị, máy móc

Điểm chảy được đo bằng máy BÜCHI Melting Point B545-Thủy Sĩ. Phổ hồng ngoại FT-IR được đo dưới dạng viên nén KBr bằng máy IMPACT-410, Nicolet-Carl Zeiss Jena, CHLB Đức. Phổ khối EI-MS: Mass spectrometer 5989B (Hewlett Packard, USA). ESI-MS: LC-MSD-Trap-SL Agilen. NMR: BRUKER Avance 500 spectrometer [499,8 MHz (^1H) và 125 MHz (^{13}C , DEPT)]. Chất nội chuẩn TMS ($\delta=0$ cho ^1H) và tín hiệu dung môi CDCl_3 ($\delta=77,0$ cho ^{13}C). Tất cả các loại phổ được đo tại Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. CC: Silica gel 60, 0,06-0,2 mm (Merck) cho cột đầu, silicagel 60, 40-63 μm (Merck) cho các cột tiếp theo. Silicagel 60 F-254 (Merck) được dùng cho sắc ký lớp mỏng.

2. Mẫu thực vật

Mẫu Xạ đen (*C. hindsii* Benth.) được thu hái tại Quảng Bình vào tháng 10/2005. Tiêu bản số: VN 1379 (14/9/2004) do Th. S. Nguyễn Quốc Bình xác định, được lưu giữ tại Viện Sinh thái và

Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3. Chiết, tách và số liệu phổ

Mẫu cành cây Xa đen (1,7 kg) được phơi khô, xay nhỏ và chiết bằng EtOH (90%) ở nhiệt độ phòng, cất loại EtOH dưới áp suất giảm ở 45°C. Dịch nước còn lại được phân lớp bằng *n*-hexan, EtOAc và *n*-BuOH. Cất loại dung môi thu được 25,5; 16 và 55 g các dịch chiết tương ứng. Dịch chiết EtOAc (16 g) được phân tách bằng cột silicagel, dung môi CH₂Cl₂-MeOH (90:10→80:20) thu được 13 phân đoạn (F-1→F-13).

a) Clionasterol (1)

Từ phân đoạn F-9 tiếp tục chạy sắc ký cột silicagel và kết tinh lại thu được chất 1 (40 mg, hs. 0,0023%). Đnc. 132 - 134°C (MeOH-EtOAc). Phổ FT-IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm⁻¹): 3433 (OH),

2934, 2866 (CH₂, CH₃), 1660, 1463, 1375, 105. Phổ EI-MS (*m/z*, %): 414 [M]⁺ (26), 396 [M-18]⁺, 329 (12), 273 [M-C₁₀H₂₁]⁺, 255 (21), 213 (31), 145 (38), 95 (54), 55 (100). Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,68 (3H, *s*), 0,82 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (3H, *d*, 6,8 Hz, H-21), 0,85 (3H, *t*, *J* ≈ 8 Hz), 0,93 (3H, *d*, *J* = 6,5 Hz), 1,01 (3H, *s*), 1,99 (2H, *m*), 2,27 (2H, *m*), 3,52 (1H, *m*, H-3 α), 5,35 (1H, *m*, H-6); ¹³C-NMR, bảng 1.

b) D: A-Friedo-oleanan-3,21-dion (2)

Từ phân đoạn F-3 tiếp tục chạy sắc ký cột silicagel và kết tinh lại thu được chất 2 (15 mg, hl. 0,0009%), đnc. 211 - 213°C (MeOH-CHCl₃).

Phổ FT-IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm⁻¹): 2979, 2936, 2879 (CH₂, CH₃), 1717 (C=O), 1461, 1388, 1208. Phổ EI-MS (*m/z*, %): 440 [M]⁺ (8), 425 [M+H-H₂O]⁺ (9), 293 (9), 232 (7), 219 (6), 203 (8), 189 (5), 121 (57), 109 (68), 69 (86), 55 (100). Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 0,73 (3H, *s*, Me-24), 0,88 (3H, *s*, Me-27), 0,89 (3H, *d*, *J* = 6,5 Hz, Me-23), 1,05 (3H, *s*, Me-26), 1,08 (3H, *s*, Me-30), 1,16 (6H, *s*, Me-25, Me-28), 1,17 (3H, *s*, Me-29), 1,32 (1H, *m*, H-19B); 1,48 (1H, *m*, H-19A), 1,50 (1H, *m*, H-10), 1,61 (1H, *m*, H-8),

1,81 (1H, *d*, *J* = 13 Hz, H-22B), 1,82 (1H, *br d*, *J* = 4 Hz), 2,31 (1H, *dd*, *J* = 7,5; 14 Hz, H-2B), 2,41 (1H, *ddd*, *J* = 5, 7, 14 Hz, H-2A), 2,60 (1H, *d*, *J* = 13 Hz, H-22A). Phổ ¹³C-NMR, bảng 1.

c) Sản phẩm XD-2 [lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol, 3) và lup-12-en-3 β -ol (4)]

Sản phẩm XD-2 (230 mg, 0,0135%) được tách từ dịch chiết *n*-hexan của lá xạ đen bằng sắc ký cột silicagel và sephadex LH-20. XD-2 chỉ cho 1 vết tròn trên sắc ký lớp mỏng và không thể tách tiếp bằng sắc ký cột. Thành phần của XD-2 gồm ba tritecpen với tỉ lệ ≈ 10:7:3, trong đó hai chất chính là 3 (≈50%) và 4 (≈35%). Phổ FT-IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm⁻¹): 3405 (OH),

2946, 2870 (CH₂, CH₃), 1459, 1380, 1038. Phổ EI-MS (*m/z*, %): 426 [M]⁺ (24), 411 [M-15]⁺ (7), 409 [M-H-H₂O]⁺ (14), 218 (100), 203 (37), 189 (28), 161 (14), 135 (25), 121 (32), 95 (51), 69 (45), 55 (42).

- Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol, 3): ¹H-NMR, *d* ppm: 0,76; 0,79; 0,84; 0,87; 0,94; 0,95; 0,97; 1,00; 1,32; 1,68 (Me), 2,37 (1H, *dt*, *J* = 11,1; 5,8 Hz, H-19 β), 3,21 (*m*, H-3 α), 4,68 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-29B), 4,56 (1H, *br s*, H-29A), Số liệu phổ ¹³C-NMR, bảng 1.

- Lup-12-en-3 β -ol (4): Phổ ¹H-NMR, *d* ppm: 0,76; 0,79; 0,84; 0,87; 0,94; 0,95; 0,97; 1,00; 1,32; 1,68 (Me), 5,18 (1H, *t*, *J* = 3,6 Hz, H-12). Số liệu phổ ¹³C-NMR, bảng 1.

d) Dẫn xuất axetat của XD-2 [lup-20(29)-en-3 β -yl axetat (3a) và lup-12-en-3 β -yl axetat (4a)]

Dẫn xuất axetat của XD-2 được tạo thành từ phản ứng của XD-2 với anhydrid acetic/pyridin ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Phổ EI-MS (*m/z*, %): 468 [M]⁺ (1,8), 408 (1), 249 (4), 218 (100), 204 (22), 203 (41), 189 (44), 149 (26), 135 (30), 133 (22), 107 (43), 95 (57), 69 (74), 55 (73).

- Lup-20(29)-en-3 β -yl axetat (3a): Phổ ¹H-NMR, *d* ppm: 4,68 (1H, *br s*, H-29A), 4,57 (1H, *br s*, H-29B), 4,48 (1H, *m*, H-3 α), 2,38 (1H, *dt*, *J* = 11,2; 5,2 Hz, H-19 β). Số liệu phổ ¹³C-NMR, bảng 1.

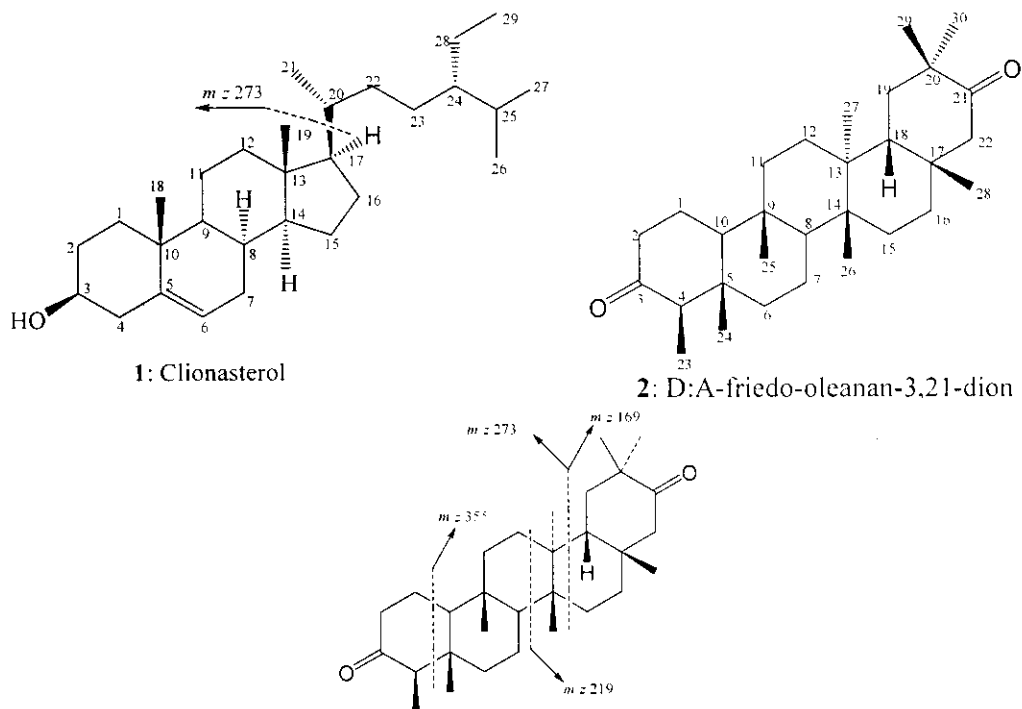
- Lup-12-en-3 β -yl axetat (4a): Phổ ¹H-NMR, *d* ppm: 5,18 (1H, *br t*, *J* = 3,5 Hz, H-12), 4,48

(^1H , m , H-3 α). Số liệu phổ ^{13}C -NMR, bảng 1.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dịch chiết etanol của cành và thân cây

Xạden được phân bố trong *n*-hexan, etyl axetat và *n*-butanol. Cặn dịch chiết ethyl acetat được phân tách bằng sắc ký cột, chất hấp phụ là silicagel thu được các chất **1** và **2**.



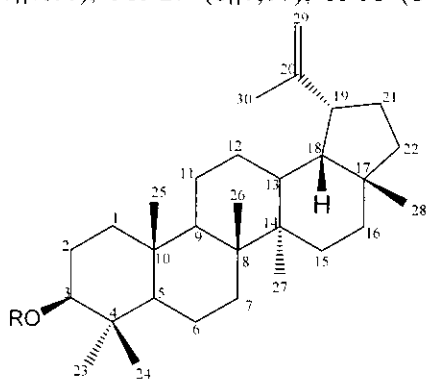
Sơ đồ 1: Sự phân mảnh của chất **2** trong phổ khối EI-MS

Phổ FT-IR của chất **1** cho đỉnh hấp thụ rộng, từ ở $\nu^*3410\text{ cm}^{-1}$, cho thấy phân tử có nhóm hydroxy. Phổ khối EI-MS có pic ion phân tử ở $m/z\ 414\ [\text{M}]^+$, kết hợp với phổ ^{13}C -NMR đã xác định được công thức phân tử của chất **1** là $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. Phổ khối EI-MS có pic quan trọng ở $m/z\ 273\ [\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]$, cho biết phân tử bị phân cắt mạch nhánh. Phổ ^1H -NMR có sáu nhóm methyl, một proton gắn với nối đôi ($\delta\ 5,35$, H-6) và một proton methinoksi ($\delta\ 3,52$, H-3 α). Phổ ^{13}C -NMR đã khẳng định thêm điều này qua các tín hiệu ở $\delta_{\text{C}}\ 71,78$ (C-3), $121,69$ (C-6) và $140,83$ (C-5). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy phân tử có 29 carbon bao gồm: $6\times\text{CH}_3$, $11\times\text{CH}_2$, $9\times\text{CH}$, $3\times\text{Cq}$. So sánh phổ ^{13}C -NMR của chất **1** với phổ của β -sitosterol ta thấy phổ của hai chất này khá phù hợp với nhau nhưng có sự thay đổi đáng kể ở C-24, cho thấy cấu hình ở đây khác với β -sitosterol. Qua phân tích số liệu phổ và so sánh

với tài liệu đã công bố [4], cấu hình của C-3 được xác định là β -OH và cấu hình của C-24 là *S*. Như vậy cấu trúc của chất **1** đã được xác định là clionasterol (γ -sitosterol). Chất này được tách ra lần đầu tiên từ cây *Cliona celata* [4].

Phổ FT-IR của chất **2** cho hấp thụ của nhóm keton ($>\text{C}=\text{O}$, $\nu^*1710\text{ cm}^{-1}$). Phổ khối EI-MS cho pic ion phân tử ở $m/z\ 440\ [\text{M}]^+$, kết hợp với phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR đã xác định được công thức phân tử của chất **2** là $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$. Một số pic quan trọng ở $m/z\ 169$, 219 , 273 , 355 , gợi ý cho thấy triterpen 5 vòng này có khung friedelan và có hai nhóm keton ở vòng A và E (Sơ đồ 1) [5]. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho biết phân tử có 30 carbon: $8\times\text{CH}_3$, $10\times\text{CH}_2$, $4\times\text{CH}$, $8\times\text{Cq}$ (có 2 nhóm keton ở $\delta\ 218,85$ và $212,96\text{ ppm}$). Phổ ^1H -NMR có một nhóm methyl gắn với carbon bậc ba ($\delta\ 0,89$, *d*, $J = 6,5\text{ Hz}$, Me-23), bảy tín hiệu đơn của nhóm methyl gắn với

carbon bậc bốn (δ 73, 0,88, 1,05x2, 1,08, 1,17, 1,16) và có hai nhóm methylen cạnh nhóm keton ở δ 2,41 (*ddd*, $J = 5, 7, 13$ Hz, H-2A); 2,31 (*dd*, $J = 7; 13$ Hz, H-2B) và hai doublet ở δ 2,60 (1H, *d*, $J = 13$ Hz, H₂-22A); 1,81 (1H, *d*, $J = 13$ Hz, H₂-22B). Để xác định chính xác vị trí của hai nhóm keton này chúng tôi đã sử dụng phổ hai chiều HMBC, NOESY và ¹H-¹H-COSY. Tương tác của C-3 (δ 12,96)/Me-23 (δ 10,89), H-2_{A,B} (δ 12,41; 2,31) và C-21 (δ 218,85)/Me-28 (δ 11,16), Me-29 (δ 11,17), H-18 (δ 1,82) trong

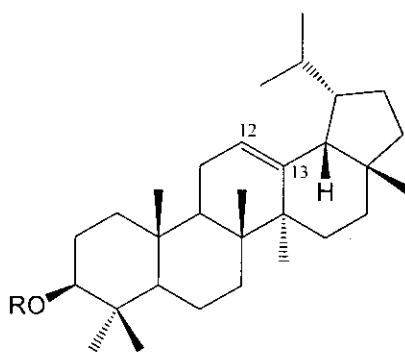


3: R=H, lup-20(29)-en-3 β -ol

3a: R=Ac, lup-20(29)-en-3 β -yl acetat

Sản phẩm ký hiệu là **XD-2** chỉ cho 1 vết tròn trên sắc ký lớp mỏng, ngay cả khi chạy lặp lại 2-3 lần với các hệ dung môi khác nhau và không thể tách tiếp bằng sắc ký cột. Tuy nhiên, phổ ¹H- và ¹³C-NMR cho biết đây là hỗn hợp của ba triterpen (có tỉ lệ khoảng 10:7:3), được xác định qua đường tích phân trong phổ ¹H-NMR. Phổ khối EI-MS chỉ có một pic ion phân tử ở m/z 426 [M]⁺, cho biết ba chất này có cùng khối lượng phân tử. Một số pic quan trọng khác ở m/z 218, 203, 189 và 95 trong phổ EI-MS gợi ý cho thấy đây là triterpen 5 vòng có khung lupan và có một nhóm hydroxi ở vòng A [3]. Nhóm hydroxi ở vòng A được khẳng định thêm qua các tín hiệu δ _{13,21} (H-3 α) và δ _{79,01/79,03} trong phổ NMR. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của đồng phân có hàm lượng lớn hơn (3, $\approx$ 50%) có một nhóm metylen có nối đôi (=CH₂, δ _{14,56}; 4,68 và δ _{109,33}; 150,95), trong khi chất có hàm lượng thấp hơn (4, $\approx$ 35%) chỉ có một proton gắn với nối đôi (δ _{15,18} và δ _{121,75};

phổ HMBC cho thấy hai nhóm keton ở C-3 và C-21. Kết luận này được khẳng định thêm qua tương tác của H₂-22/H-18, Me-28 trong phổ NOESY. Phổ COSY cũng cho tương tác của H₂-22/ H-18, Me-29. Như vậy cấu trúc của chất **2** được xác định là D:A-friedo-oleanan-3,21-dion (21-oxofriedelan-3-on). Chất này lần đầu tiên được phân lập từ cây *Kokoona zeylanica* [5] và được bán tổng hợp từ D:A-friedo-oleanan-3-on-21-ol và 3 α ,21 α -diacetoxy-D:A-friedo-oleanan qua phản ứng oxi hoá bằng CrO₃ [6,7].



4: R = H, lup-12-en-3 β -ol

4a: R = Ac, lup-12-en-3 β -yl acetat

145,19) các tín hiệu còn lại của hai chất khá tương tự nhau. Tín hiệu doublet của triplet ở δ _{12,37} (*dt*, $J = 11,1$ và 5,8 Hz) cho thấy cấu hình của H-19 là β (H-19 β). Qua phân tích phổ và so sánh với tài liệu, chúng tôi dự đoán cấu trúc của **3** là lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol) [8] và của **4** là lup-12-en-3 β -ol [10].

Để khẳng định thêm cấu trúc của hai chất này chúng tôi đã tiến hành acetyl hoá sản phẩm XD-2 (**3+4**) bằng anhydrid acetic trong pyridin. Phổ khối EI-MS và phổ ¹³C-NMR của dẫn xuất acetat **3a** (tín hiệu có cường độ lớn hơn) hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ của lup-20(29)-en-3 β -yl acetat [8, 9]. Kết hợp số liệu phổ và so sánh với tài liệu, chúng tôi xác định được cấu trúc hai chất chính của XD-2 là lupeol (**3**) và lup-12-en-3 β -ol (**4**) [8 - 10]. Lupeol là một triterpen năm vòng phổ biến trong thiên nhiên, lần đầu tiên được tách ra từ cây *Lupinus luteus* vào năm 1889 [11].

Bảng 1: Số liệu phổ ^{13}C -NMR của chất 1, 2, 3, 4 và 3a [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	1	2	3 [8]	3'	3a [9]	3a	4''
1	37,29	22,27	38,72	38,87	38,30	38,29	38,78
2	31,69	41,20	27,43	27,54	23,60	23,72	27,54
3	71,78	212,96	79,02	79,01	80,70	80,94	79,03
4	42,34	58,22	38,87	38,87	37,70	37,71	38,09
5	140,83	42,74	55,31	55,33	55,30	55,41	55,21
6	121,69	41,49	18,33	18,34	18,20	18,22	18,40
7	31,94	18,27	34,29	34,32	34,10	34,24	32,68
8	31,94	53,35	40,84	40,86	40,70	40,87	40,02
9	50,18	37,01	50,35	50,47	50,20	50,37	47,66
10	36,54	59,43	37,18	37,19	37,00	37,72	36,97
11	21,11	35,53	20,94	20,96	20,90	20,97	23,55
12	39,81	30,61	25,16	25,17	25,00	25,13	124,45
13	42,35	38,18	38,07	38,08	37,90	37,80	145,19
14	56,80	39,91	42,85	42,85	42,70	42,84	43,01
15	24,33	32,77	27,46	27,47	27,40	27,46	25,17
16	28,26	37,01	35,60	35,60	35,50	35,59	35,60
17	56,10	33,22	43,01	43,01	42,90	43,00	38,78
18	19,41	41,93	48,32	48,32	48,20	48,32	55,20
19	11,88	35,08	48,00	48,00	47,90	47,58	38,09
20	36,17	42,10	150,98	150,98	150,50	150,90	39,62
21	19,06	218,85	29,86	29,86	29,80	29,86	29,88
22	33,99	54,99	40,02	40,02	29,90	29,83	35,61
23	26,15	6,83	28,00	28,00	16,50	16,49	28,41
24	45,88	14,66	15,38	15,38	27,90	27,95	16,83
25	29,21	18,47	16,13	16,12	16,10	16,81	15,63
26	19,83	21,20	15,99	16,00	15,90	15,99	15,69
27	18,80	17,74	14,56	14,57	14,40	14,52	14,57
28	23,11	33,55	18,02	18,02	18,00	18,01	18,02
29	12,00	28,81	109,32	109,33	109,36	109,36	23,71
30	-	26,62	19,32	19,33	19,30	19,30	19,33
Ac	-	-	-	-	170,40 21,00	170,95 21,28	-

* Tín hiệu có cường độ lớn hơn; ** Tín hiệu có cường độ nhỏ hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Ho. Cây cỏ Việt Nam (An Illustrated Flora of Vietnam). Youth Publishing House 1999, II, p.153.
2. Yao-Haur Kuo, Li-Ming Yang Kuo. Phytochemistry, **44** (7), 1275 - 1281 (1997).
3. Trĩ Thị Thủy, Nguyễn Huy Cường, Trần

Văn Sung. Tạp chí Hóa học, T. **45** (3), 373 - 376 (2007).

4. W. F. Reynolds. Magn. Reson. Chem., **35**, 455 - 462 (1997).
5. A. A. Leslie Gunatilaka, N. P. Dhammika Nanayakkara, M. Uvais S. Sultanbawa, Sinnathamby Balasubramaniam. Phytochemistry, **21**(8), 2061 - 2063 (1982).

6. V. Anjaneyulu, J. Suresh Babu, B. Hari Babu, K. Ravi, J. D. Connolly. *Phytochemistry*, **33** (3), 647 - 649 (1993).
7. J. Klass, W. F. Tinto. *J. Nat. Prod.* **55** (11), 1626 - 1630 (1992).
8. Darcy Burns, William F. Reynolds, Greg Buchanan, Paul B. Reese, Raul G. Enriquez. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**, 488 - 493 (2000).
9. E. Wenkert. ^{13}C -NMR of lupane triterpenes. *Org. Magn. Reson.*, **11**, 337 - 342 (1978).
10. D. Burns, et al. *Magn. Reson. Chem.* **38**, 488 - 493 (2000).
11. *Dictionary of Natural Products*, version 16:1, Copyright © 1982-2007 Chapman & Hall/CRC 2007.