

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA LÁ CÂY THÔNG ĐỎ *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC., HỌ THÔNG ĐỎ (TAXACEAE)

Nguyễn Thị Thanh Tâm⁽¹⁾, Nguyễn Trung Nhân⁽²⁾

(1) Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM

(2) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 21 tháng 05 năm 2009)

TÓM TẮT: Từ cao methanol của lá cây Thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. họ Thông đỏ thu hái tại tỉnh Lâm Đồng, 2 hợp chất diterpen có khung taxan đã được cô lập có tên gọi là taxuspine F (1) và 10-deacetyltaxuspine F (2), trong đó 10-deacetyltaxuspine F là chất mới. Cấu trúc của các hợp chất được xác định bởi các phương pháp phổ nghiệm hiện đại và so sánh với tài liệu tham khảo.

Từ khóa: *Taxus wallichiana* Zucc., thông đỏ, khung taxan

1. MỞ ĐẦU

Cây thông đỏ có tên khoa học là *Taxus wallichiana* Zucc., thuộc họ thông đỏ (Taxaceae) là dạng cây to, thường xanh, cao đến 20m. Phân bố rải rác ở vùng núi cao thuộc các tỉnh Lào cai (Hoàng Liên Sơn), Khánh Hòa, Lâm Đồng (Đà Lạt, Đơn Dương), Hà Giang (Thái An- Quản Bạ) độ cao phân bố từ 1400-1600m hoặc hơn.

Trong bài viết này, chúng tôi tiến hành khảo sát thành phần hóa học lá cây thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.) thu hái tại viện sinh học Tây Nguyên - tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5 năm 2006. Bằng các phương pháp sắc ký cột silica gel và sắc ký bản mỏng, chúng tôi cô lập được hai hợp chất từ phân đoạn tan trong cloroform của cao metanol trích từ lá cây khô. Sử dụng các phương pháp phổ nghiệm: MS, 1D và 2D-NMR kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, hai hợp chất này đã được nhận danh là taxuspine F (1) và 10-deacetyltaxuspine F (2). Trong đó 10-deacetyltaxuspine F là chất mới.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Điều kiện thực nghiệm

- Điểm nóng chảy được đo trên máy Büchi Melting Point B-545
- Phổ ¹H-NMR (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) được đo trên máy BRUKER AV 500 sử dụng cloroform-d₁ và metanol-d₄ làm dung môi, nội chuẩn TMS.
- Sắc ký bản mỏng thực hiện trên silica gel (Merck Kielselgl 60 F₂₅₄, 250 mm) và silica gel pha đảo RP-18 (Whatman, KC₁₈F, 200 mm).
- Sắc ký cột được thực hiện trên silica gel (40-60 mm, Merck) hoặc RP silica gel (Cosmisil 75 C18-OPN, Nacalai Tesque Inc. Kyoto).

2.2. Cô lập chất

Lá cây thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.) được thu hái tại viện sinh học Tây Nguyên - tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5 năm 2006. 1.0 kg bột lá khô được ngâm dầm với metanol ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, dịch sau khi ngâm đem cô quay thu được cao thô. Cao thô metanol (250 gam) được hòa tan vào nước, lần lượt trích với các dung môi eter dầu hòa, cloroform và etyl acetat thu được các cao tương ứng. Thực hiện sắc ký trên cao cloroform (25 gam) sử dụng hệ dung môi CHCl₃-MeOH có độ phân cực tăng dần thu được 7 phân đoạn. Tiến hành sắc ký

cột phân đoạn 3 (3.6 g) dùng hệ dung môi giải ly eter dầu hòa – etyl acetat thu được 4 phân đoạn. Chạy sắc kí cột phân đoạn 2 với hệ dung môi CHCl_3 – MeOH (95:5) thu được hợp chất **1** (120 mg) và **2** (25 mg).

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Hợp chất **1** được cô lập dưới dạng tinh thể hình kim không màu. Nhiệt độ nóng chảy 238-240 °C.

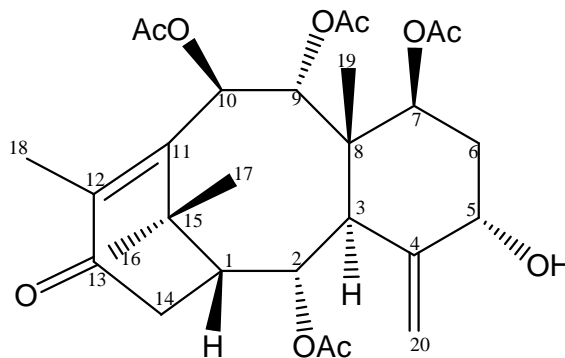
Phổ ^1H NMR của **1** xuất hiện bốn nhóm methyl tứ cấp [δ_{H} 1.74 (s, 16-Me), 1.12 (s, 17-Me), 2.31 (s, 18-Me) và 0.98 (s, 19-Me)] đặc trưng cho khung taxan-diterpen. Bốn nhóm -OAc [δ_{H} 2.02 (s), 2.05 (s), 2.05 (s) và 2.08 (s)], năm proton oxymetin [δ_{H} 5.60 (1H, dd, H-2), 4.22 (1H, d, H-5), 5.52 (1H, dd, H-7), 5.90 (1H, d, H-9), 6.25 (1H, d, H-10)], hai nhóm metylen [δ_{H} 1.61, 1.94 (H-6a và H-6b) và 2.33, 2.76 (H-14a và H-14b)], hai proton metin [δ_{H} 2.20 (1H, dd, H-1) và 3.55 (1H, d, H-3)] và một nhóm exometylen [δ_{H} 4.82 (s, H-20a) và 5.23 (s, H-20b)] tại C-4.

Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ DEPT 90 và DEPT 135 của **1** cho các mũi cộng hưởng ứng với 28 carbon bao gồm một carbon carbonyl [δ_{C} 199.6 (s, C-13)], bốn carbon carbonyl ester [δ_{C} 169.2 (s), 169.4 (s), 169.8 (s) và 169.8 (s)], hai carbon olefin tứ cấp [δ_{C} 139.2 (s, C-11) và 144.8 (s, C-12)] và năm carbon tứ cấp mang oxygen [δ_{C} 69.0 (d, C-2), 74.5 (d, C-5), 69.6 (d, C-7), 75.2 (d, C-9) và 72.8 (d, C-10)].

Từ các kết quả phổ nghiệm trên cho thấy hợp chất này có công thức phân tử là $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$ và có 4 nhóm -OAc.

Phổ COSY của **1** cho thấy H-2 [δ_{H} 5.60 (dd, $J=2.0$; 6.0 Hz)] có tương quan với proton có δ_{H} 3.55 là H-3 ($J_{2,3}=6.0$ Hz) và với proton có δ_{H} 2.20 là H-1 (dd, $J_{2,1}=2.0$ Hz, $J_{1,14b}=6.5$ Hz). Mặt khác, phổ COSY cho tương quan H-3 và H-20a chứng tỏ nhóm exometylen gắn vào vị trí C-4. Một proton δ_{H} 2.33 (d, $J=19.5$ Hz) và proton δ_{H} 2.76 (dd, $J=6.5$; 19.5 Hz) là H-14a và H-14b, dựa vào sự ghép cặp gem ($J_{14a,14b}=19.5$ Hz) và ghép cặp với H-1 tại δ_{H} 2.20 ($J_{14b,1}=6.5$, $J_{2,1}=2.0$ Hz). Mũi H-5 xuất hiện như một proton mũi đôi tại δ_{H} 4.22 (d, $J=2.0$ Hz), và ghép cặp cả H-6a và H-6b có mũi cộng hưởng tại δ_{H} 1.61 (m) và 1.94 (ddd, $J=3.0$; 5.5; 13.5 Hz). H-6a và H-6b cũng ghép cặp với proton tại δ_{H} 5.52 là H-7 ($J_{7,6b}=11.5$ Hz, $J_{7,6a}=5.5$ Hz). Hai tín hiệu δ_{H} 5.90 và 6.25 lần lượt là H-9 và H-10 với hằng số ghép cặp kề cận lớn ($J_{9,10} = 10.5$ Hz) biểu thị cấu hình định hướng *trans*. Dựa vào giá trị cộng hưởng của các proton oxymetin [δ_{H} 5.60 (H-2), 5.52 (H-7), 5.90 (H-9), 6.25 (H-10)] ta xác định các carbon tương ứng C-2, C-7, C-9, C-10 mang các nhóm thế OAc. Ở vị trí C-5, δ_{H} 4.22 và δ_{C} 74.5 đề nghị gắn nhóm -OH.

Vậy hợp chất **1** là taxuspine F, so với các dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của tài liệu tham khảo thấy có sự trùng khớp ². Taxuspine F đã được cô lập từ *Taxus cupidata* Sieb. Et Zucc năm 1995. Taxuspine F có hoạt tính chống lại tế bào bạch cầu L 1210 với IC_{50} 0.33 (mg/ml) và tế bào ung thư biểu mô KB (người) với $\text{IC}_{50} > 10$ (mg/ml).



Bảng 1. Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz) và tương quan ^1H - ^1H COSY của taxuspine F (**1**) trong CDCl_3

Vị trí	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	^1H - ^1H COSY
1	2.20 (dd, J=2.0; 6.5 Hz)	48.8 (d)	H2, H14b
2	5.60 (dd, J=2.0; 6.0 Hz)	69.0 (d)	H1, H3
3	3.55 (d, J=6.0 Hz)	39.7 (d)	H2
4		149.9 (s)	
5	4.22 (d, J=2.0 Hz)	74.5 (d)	H6a, H6b
6a	1.61 (m)	37.6 (t)	H5, H6b, H7
6b	1.94 (ddd, J=3.0; 5.5; 13.5 Hz)		H5, H6a, H7
7	5.52 (dd, J=5.5; 11.5 Hz)	69.6 (d)	H6a, H6b
8		47.9 (s)	
9	5.90 (d, J=10.5 Hz)	75.2 (d)	H10
10	6.25 (d, J=10.5 Hz)	72.8 (d)	H9
11		139.2 (s)	
12		144.8 (s)	
13		199.6 (s)	
14a	2.33 (d, J=19.5 Hz)	36.1 (t)	H14b
14b	2.76 (dd, J=6.5; 19.5 Hz)		H1, H14a
15		37.8 (s)	
16	1.12(s)	37.4 (q)	H17
17	1.74 (s)	25.4 (q)	H16
18	2.31 (s)	14.5 (q)	
19	0.98 (s)	12.9 (q)	
20a	4.82 (s)	115.5 (t)	H3, H20b
20b	5.23 (s)		H20a
-OAc	2.02 (s)	20.7 (q)	
	2.05 (s)	20.9 (q)	
	2.05 (s)	21.3 (q)	
	2.08 (s)	21.4 (q)	
		169.2 (s)	
		169.4 (s)	
		169.8 (s)	
		169.8 (s)	

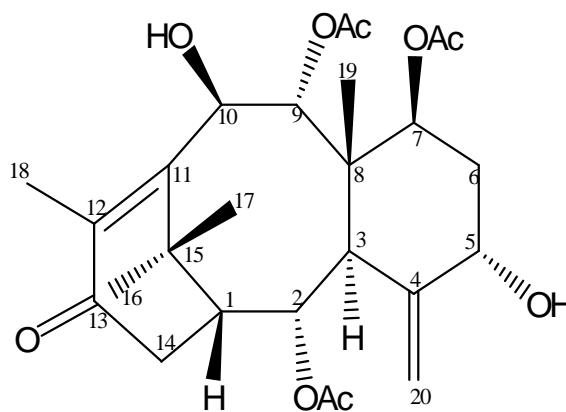
Hợp chất **2** được cô lập dưới dạng tinh thể hình kim không màu. Nhiệt độ nóng chảy 256-258 °C.

Phổ ¹H NMR của **2** cho các tín hiệu proton tương tự như của hợp chất taxuspine F, tuy nhiên chỉ có sự hiện diện của ba nhóm -OAc [δ_H 2.08 (s, 9-OAc), 2.06 (s, 2-OAc), 2.11 (s, 7-OAc)].

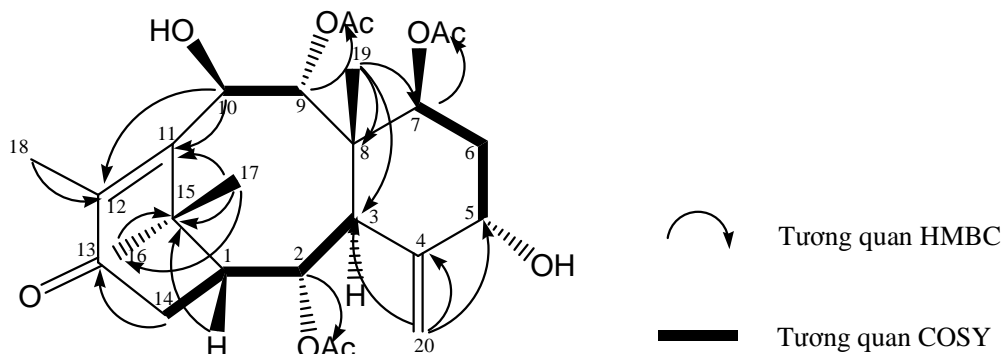
Phổ ¹³C NMR kết hợp với phổ DEPT 90 và DEPT 135 của **2** cho các mũi cộng hưởng ứng với sự hiện diện của 26 carbon trong đó có một carbon carbonyl δ_C 201.1 (s, C-13), nhưng chỉ có 3 carbon carbonyl ester [δ_C 170.8 (s, 9-OAc), 169.5 (s, 2-OAc) và 170.9 (s, 7-OAc)], hai carbon olefin trí hoá [δ_C 155.5 (s, C-11) và 136.1 (s, C-12)] và năm carbon đơn hoá mang oxygen [δ_C 69.1 (d, C-2), 74.0 (d, C-5), 70.1 (d, C-7), 77.7 (d, C-9) và 69.9 (d, C-10)]. Ngoài ra phổ COSY của hợp chất **2** cũng cho các tương quan của proton tương tự như hợp chất **1**. So sánh phổ ¹H và ¹³C NMR nhận thấy hợp chất **2** có khung sườn tương tự taxuspine F nhưng chỉ hiện diện 3 nhóm -OAc và 2 nhóm -OH. Từ các dữ liệu trên, công thức phân tử của hợp chất **2** được đề nghị là C₂₆H₃₆O₉, điều này được xác nhận bởi mũi ion phân tử [M+H] tại m/z = 492.9 trên phổ MS.

Phổ HMBC của hợp chất **2** cho các tương quan giữa: H-2, H-7 và H-9 lần lượt với các carbon carbonyl ester [δ_C 169.5 (s, 2-OAc), δ_C 170.9 (s, 7-OAc), δ_C 170.8 (s, 9-OAc)]. Do đó, tại C-2, C-7 và C-9 lần lượt có mang nhóm thế -OAc. Tương quan HMBC và COSY của **2** được trình bày trong hình 1.

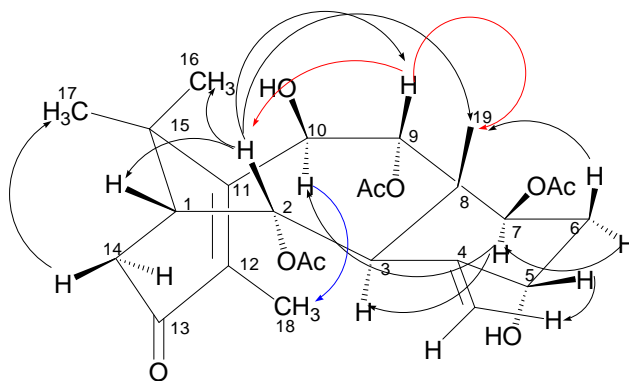
Tại C-5 có δ_H = 4.14 ppm và δ_C = 74.0 ppm, và tại C-10 có δ_H = 5.22 và δ_C = 69.9 ppm nên nhóm -OH lần lượt gắn tại C-5 và C-10. Từ các lý luận trên, hợp chất **2** được đề nghị là 10-deacetyltaxuspine F.



Hóa lập thể của 10-deacetyltaxuspine F được xác định dựa vào phổ ROESY. Các tương quan giữa H-2 với 16-Me, 19-Me và H-9; H-7 với H-3 và H-10; H-9 với 19-Me và H-2; H-10 với 18-Me trên phổ ROESY của 10-deacetyltaxuspine F cho phép kết luận lập thể của nhóm -OAc tại C-2, C-7, và C-9 lần lượt là α -, β -, α - và nhóm -OH tại C-10 định hướng β -. Nhóm -OH tại vị trí C-5 được xác định là α - dựa vào hằng số ghép cặp nhỏ của H-5 (t, J=3.0 Hz). Vậy cấu trúc 10-deacetyltaxuspine F được xác định là 2 α ,7 β ,9 α -triacetoxy-5 α ,10 β -dihydroxytaxa-4(20),11-dien-13-on. Tương quan lập thể trên phổ ROESY của hợp chất **2** được trình bày trong hình 2. Tra cứu trên phần mềm SciFinder cho biết đây là một hợp chất mới chưa được công bố trên thế giới.



Hình 1. Tương quan HMBC và ^1H - ^1H COSY của **2**



Hình 2. Tương quan ROESY của **2**

Bảng 2. Số liệu phổ ^1H NMR (500MHz), ^{13}C NMR (125MHz) và tương quan HMBC và ^1H - ^1H COSY của hợp chất **2** trong CDCl_3 và CD_3OD

Vị trí	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	^1H - ^1H COSY	Tương quan HMBC	
				J_2	J_3
1	2.18 (m)	48.7 (d)	H2, H14b	2, 14	3, 15, 16
2	5.60 (dd, $J=2.0$; 6.5 Hz)	69.1 (d)	H1, H3	1, 3	14, 2-OAc
3	3.54 (d, $J=6.5$ Hz)	39.3 (d)	H2, H20a H20b	2, 4	1, 5, 20, 19
4		145.2 (s)			
5	4.14 (t, $J=3.0$ Hz)	74.0 (d)	H6b, H6b		7, 20
6a	1.62 (ddd, $J=3.0$; 11.5; 13.5 Hz)	37.5 (t)	H5, H7, H6b	7	
6b	1.86 (ddd, $J=3.0$; 5.5; 13.5 Hz)		H5, H7, H6a	5, 7	4
7	5.46 (dd, $J=5.5$; 11.5 Hz)	70.1 (d)	H6a, H6b		19, 7-OAc
8		47.7 (s)			
9	5.77 (d, $J=10.0$ Hz)	77.7 (d)	H10	8, 10	8, 9-OAc
10	5.22 (d, $J=10.0$ Hz)	69.9 (d)	H9	9, 11	12, 15

11		155.5 (s)			
12		136.1 (s)			
13		201.1 (s)			
14a	2.34 (d, J=20.0 Hz)	36.0 (t)	H14b	1, 13	2, 15
14b	2.75 (dd, J=7.0; 20.0 Hz)		H1, H14a	13	2
15		37.8 (s)			
16	1.20 (s)	37.6 (q)		15	1, 11, 17
17	1.79 (s)	25.0 (q)		15	1, 11, 16
18	2.16 (s)	13.9 (q)		12	12
19	0.96 (s)	12.8 (s)		8	3, 7, 9
20a	4.77 (s)	114.8 (s)	H3, H20b	4	3, 5
20b	5.20 (s)		H3, H20a		3, 5
9-OAc		170.8 (s)			
Me	2.08 (s)	21.7 (q)			9-OAc
2-OAc		169.5 (s)			
Me	2.06 (s)	21.3 (q)			2-OAc
7-OAc		170.9 (s)			
Me	2.11 (s)	20.8 (q)			7-OAc

**THE STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS FROM THE NEEDLES OF
TAXUS WALLICHIANA ZUCC. (TAXACEAE)**

Nguyen Thi Thanh Tam⁽¹⁾, Nguyen Trung Nhan⁽²⁾

(1)Ho Chi Minh City University of Industry

(2)University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: A new taxane-type diterpene named 10-deacetyltaxuspine F (2) together with a known compound, taxuspine F (1), were isolated from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. (Taxaceae). Their chemical structures were elucidated by using spectroscopic methods and comparison with published data.

Key words: *Taxus wallichiana* Zucc., Taxaceae, taxane-type diterpene

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Trung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ rung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Trần Toàn. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt nam*, NXB Đại học khoa học kĩ thuật, tập 2, 897-900, (2004).
- [2].Jun'ichi Kobayashi, Akiko Inubushi, Hirokazu Hosoyama, Naotoshi Yoshida, Takuma Sasaki and Hideyuki Shigemori. Taxuspines E-H and J, *New Taxoids from the Japanese Yew Taxus cuspidata*, *Tetrahedron*, 51, 5971-5978,(1995).