

CÁC TRITERPENE KHUNG OLEANAN VÀ URSAN TỪ VỎ CÂY *EBERHARDTIA AURATA* (SAPOTACEAE)

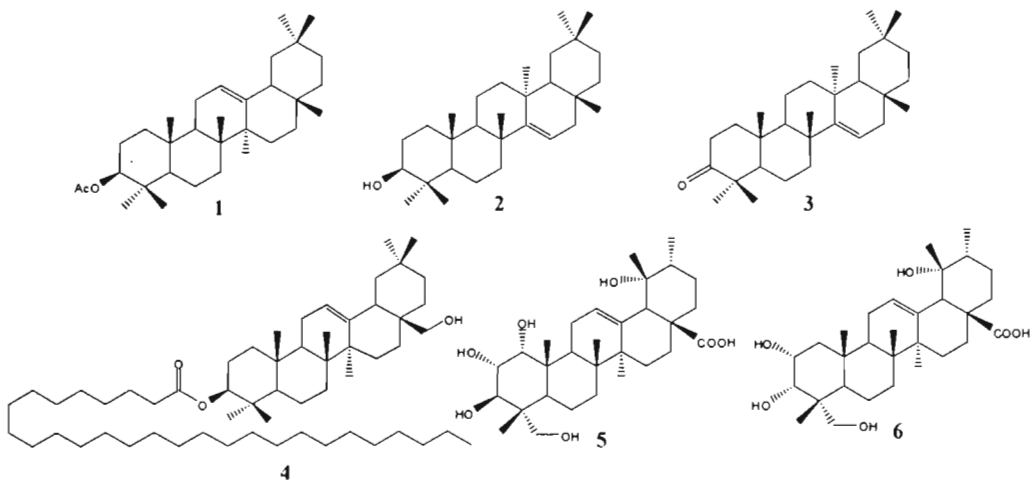
ĐOÀN THỊ MAI HƯƠNG, NGUYỄN VĂN HÙNG, MARC LITAUDON,
FRANCOISE GUÉRITTE

1. MỞ ĐẦU

Cây Cồng sữa vàng hay còn gọi là cây Bára vàng là loại cây đại mộc cao khoảng 6 - 8 m, lá có phiến bầu dục mọc so le dài 16 - 25 cm, rộng 4 - 6 cm. Cây có tên khoa học là *Eberhardtia aurata* (Pierre ex Dubard) Lecomte thuộc họ Hồng xiêm (Sapotaceae), thường phân bố ở Nam Trung Quốc và Bắc Việt Nam [1, 2]. Lá của cây được dùng làm thuốc trị ho, ho gà [1]. Trong khuôn khổ hợp tác Việt Pháp về nghiên cứu thảm thực vật Việt Nam, chúng tôi đã thử hoạt tính sinh học dịch chiết EtOAc của vỏ cây Cồng sữa vàng, kết quả cho thấy dịch chiết ức chế 49% dòng tế bào ung thư KB ở nồng độ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu nào về thành phần hoá học của loài này. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi thông báo về việc phân lập được 4 triterpen khung oleanan và 2 triterpen khung ursan từ vỏ cây Cồng sữa vàng.

2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ cặn dịch EtOAc sau khi tiến hành sắc kí cột nhiều lần và kết tinh chúng tôi thu được 4 triterpen khung oleanan là β -amyrin acetate (1), taraxerol (2), taraxerone (3), 3 β -3 δ -octacosanoyloxy-12-oleanen-28-ol (4) và 2 triterpen khung ursan là gamboukokoensein A (5), axit myrianthic (6). Cấu trúc của các hợp chất trên được xác định bằng sự kết hợp các phương pháp 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.



Chất 1 được phân lập dưới dạng tinh thể màu trắng, đnc 238-239 °C. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 469 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $C_{32}H_{52}O_2$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của 32 cacbon trong đó có 9 nhóm methyl, 10 nhóm metylen, 5 nhóm metin, 1 nhóm cacbonyl và 7 cacbon bậc bốn. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu đặc trưng cho 8 nhóm methyl ở δ_H 0,82; 0,86; 0,86; 0,87 (2 x CH_3), 0,96; 0,96; 1,12, 1 nhóm axetat ($OCOCH_3$) ở δ_H 2,04 và một tín hiệu của proton metin olefinic ở δ_H 5,17 (t, $J=3,5$ Hz, H-12). Thêm vào đó, trên phổ 1H -NMR có tín hiệu của 1 nhóm metin ở vị trí C-3 đã được acyl hoá ở δ_H 4,49, proton này bị tách dưới dạng triplet với hằng số tương tác $J=8,0$ Hz cho biết cấu hình α của nó. Trên phổ HMBC thấy tín hiệu của H-3 tương tác với cacbon carbonyl $C=O$ ở δ_C 170,9 chứng tỏ rằng nhóm $OCOCH_3$ gắn với khung terpen ở vị trí C-3. Từ các dữ kiện phổ MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC và so sánh với tài liệu tham khảo [3,4] cho phép xác định cấu trúc của chất 1 là β -amyrin axetat.

Chất 2 được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 270 - 271°C. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của 30 cacbon trong đó có 8 nhóm methyl, 10 nhóm metylen, 5 nhóm metin và 7 cacbon bậc bốn. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 427 $[M+H]^+$. Các dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và MS cho phép xác định công thức phân tử của chất 2 là $C_{30}H_{50}O$ và cho biết đây là 1 triterpen 5 vòng cùng với 1 liên kết đôi và 1 nhóm hydroxy trong phân tử. Phổ 1H -NMR cho 8 tín hiệu singlet của 8 nhóm methyl ở δ_H 0,70; 0,73; 0,81; 0,81; 0,83; 0,85; 0,87; 0,99 và đặc biệt là tín hiệu ở δ_H 5,53 (dd, $J=8,0$; 3,0 Hz) của metin olefinic H-15 và tín hiệu của nhóm hydroxy metin ở δ_H 3,07 (dd, $J=9,0$; 7,0 Hz, H-3). Kết hợp phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR, phổ NMR 2 chiều và so sánh với tài liệu tham khảo [5] cho phép kết luận hợp chất 2 chính là taraxerol.

Chất 3 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 425 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $C_{30}H_{48}O_2$. Các dữ liệu phổ của hợp chất này gần giống dữ liệu của hợp chất 2. Giống như chất 2, trên phổ 1H -NMR của 3 có tín hiệu của 8 nhóm methyl và 1 nhóm metin olefinic H-15 ở δ_H 5,55 (dd, $J=8,0$; 3,0 Hz). Khác với 2, trên phổ 1H -NMR mất đi tín hiệu cộng hưởng của proton thuộc nhóm hydroxymetin. Trên phổ ^{13}C -NMR dễ dàng nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của 1 nhóm cacbonyl ở δ_C 217,5, không có tín hiệu của nhóm hydroxymetin. Như vậy có thể kết luận rằng chất này là một triterpen thuộc khung olean như chất 2 trong đó nhóm hydroxymetin được thay thế bằng nhóm cacbonyl. Các dữ liệu phổ và tài liệu tham khảo [6,7] đã cho phép xác định cấu trúc của chất này là taraxerone.

Chất 4 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 849 $[M+H]^+$. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu đặc trưng cho 8 nhóm methyl và 1 tín hiệu triplet của nhóm metylen bên cạnh nhóm este ở δ_H 2,89 ($J=7,0$ Hz), 2 tín hiệu double doublet của nhóm CH_2OH ở δ_H 3,22 ($J=11,0$; 5,5 Hz, H-28a) và 3,55 ($J=11,0$; 6,5 Hz, H-28b). Thêm vào đó, trên phổ 1H -NMR có tín hiệu của 1 nhóm metin ở vị trí C-3 đã được este hoá ở δ_H 4,50, proton này bị tách dưới dạng double doublet với hằng số tương tác $J=10,5$; 5,5 Hz cho biết cấu hình α của nó. Cụm tín hiệu chông chéo ở vùng δ_H 1,22-1,28 đặc trưng cho các nhóm metylen mạch dài. Các dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, DEPT hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu phổ 1H -NMR đã phân tích ở trên, bao gồm 1 cacbonyl este ở δ_C 173,6, một nhóm metin gắn với oxi ở δ_C 80,5, các tín hiệu của khung terpen olean và axit béo mạch thẳng. Sau khi so sánh với tài liệu tham khảo [8] chúng tôi đi đến kết luận hợp chất 4 chính là 3 α -octacosanoyloxy-12-oleanen-28-ol.

Hợp chất 5 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 521 $[M+H]^+$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của 30 cacbon trong đó

có 6 nhóm CH₃, 8 nhóm CH₂, 8 nhóm CH, 1 nhóm cacbonyl và 7 cacbon bậc bốn. Các dữ liệu phổ ¹³C-NMR và MS cho phép xác định công thức phân tử của chất **5** là C₃₀H₄₈O₇ và cho biết đây là 1 triterpen 5 vòng cùng với 1 liên kết đôi, 5 nhóm hydroxy và 1 axit trong phân tử. Trên phổ ¹H-NMR có tín hiệu của 1 broad singlet ở δ_H 2,51 đặc trưng cho H-18 của terpen khung ursan có nhóm thế O-R ở vị trí 19 [9], cùng với tín hiệu của 5 methyl dưới dạng singlet ở δ_H 0,83 (2 xCH₃); 1,06; 1,22; 1,38; 1 methyl dưới dạng doublet ở δ_H 0,95 (d, J=6,5 Hz, CH₃-30) và 1 proton olefinic ở δ_H 5,31 (t, J=3,5 Hz, H-12). Đồng thời trên phổ ¹H-NMR còn cho tín hiệu của 2 proton thuộc nhóm CH₂OH ở 3,41 δ_H (d, J=11,0 Hz, H-23a) và 3,54 (d, J=11,0 Hz, H-23b) cùng tín hiệu của 3 nhóm hydroxy metin ở δ_H 3,50 (d, J=9,5 Hz, H-3); 3,62 (dd, J=9,5, 3,0 Hz, H-2); 3,70 (d, J=3,0 Hz, H-1). Hằng số tương tác J_{H-1 H-2} = 3,0 Hz và J_{H-2 H-3} = 9,5 Hz cho phép xác định 3 proton metin ở vị trí 1,2 và 3 dưới dạng H-1β, H-2β và H-3δ. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [9, 10] cho phép kết luận hợp chất **5** chính là gamboukokoensein A.

Hợp chất **6** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) có pic ion ở m/z 505 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử là C₃₀H₄₈O₆. Các dữ liệu phổ ¹H-NMR của **6** gần giống với dữ liệu phổ của hợp chất **5**, khác với chất **5**, hợp chất **6** chỉ có 2 nhóm hydroxy metin ở δ_H 3,62 (1H, d, J=2,5 Hz, H-3); 3,89 (1H, m, H-2). Sau khi so sánh với tài liệu tham khảo [10] chúng tôi đi đến kết luận hợp chất **6** chính là axit myrianthic.

3. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thiết bị và nguyên liệu

Điểm nóng chảy được đo trên máy Boetius. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ với đầu dò MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng mode ESI và đầu dò DAD.

Vỏ cây Công sữa vàng (*Eberhardtia aurata* (Pierre ex Dubard) Lecomte), được ThS. Đào Đình Cường và ThS. Nguyễn Quốc Bình thu hái ở Thuận Châu, Sơn La vào tháng 10/2005. Mẫu tiêu bản có tên VN 1575 được lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật – Viện KH&CN VN.

3.2. Xử lý mẫu thực vật và chiết tách

Mẫu vỏ cây sau khi được phơi khô, nghiền nhỏ (1,12 kg) được ngâm chiết với dung môi EtOH (4 lần trong 96 giờ). Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn dịch EtOH. Cặn dịch EtOH được thêm H₂O rồi chiết tiếp bằng EtOAc và BuOH, cất loại dung môi thu được 33 g cặn dịch EtOAc và 20 g cặn dịch BuOH. Từ cặn dịch EtOAc, sau khi tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc-MeOH gradient chúng tôi thu 12 phân đoạn chính F1-F12. Từ phân đoạn F1, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc gradient cho 70 mg chất **1**. Từ phân đoạn F6, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc gradient cho 10 mg chất **2**. Từ phân đoạn F5, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc gradient cho 7 mg chất **3** và 71 mg chất **4**. Từ phân đoạn F10, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH gradient cho 17 mg chất **5** và 5 mg chất **6**.

β-amyryn acetate (1): Chất rắn màu trắng, đnc: 238-239°C, ESI-MS m/z: 469 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 0,82 (3H, s, CH₃), 0,86 (3H, s, CH₃), 0,86 (3H, s, CH₃), 0,87 (6H, s, 2 x CH₃), 0,96 (3H, s, CH₃), 0,96 (3H, s, CH₃), 1,12 (3H, s, CH₃), 2,04 (3H, s, OCOCH₃),

4,49 (1H, t, J=8,0 Hz, H-3), 5,17 (t, J=3,5 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 15,5; 16,7; 16,8; 18,2; 21,3; 23,5; 23,6; 23,7; 25,9; 26,1; 26,9; 28,0; 28,4; 31,0; 32,5; 32,6; 33,3; 34,7; 36,8; 37,1; 37,7; 38,2; 39,8; 41,7; 46,7; 47,2; 47,5; 55,2; 80,9; 121,6; 145,2; 170,9

Taraxerol (2) ESI-MS *m/z*: 427 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD 500 MHz) δ (ppm): 0,68 (1H, d, H-5); 0,70 (3H, s, CH₃); 0,73 (3H, s, CH₃), 0,81 (6H, s, 2x CH₃), 0,83 (3H, s, CH₃), 0,85 (3H, s, CH₃), 0,87 (3H, s, CH₃), 0,99 (3H, s, CH₃), 1,82 (1H, dd, J=15,0, 3,0 Hz, H-16), 1,94 (1H, dt, J=12,5; 3,0 Hz, H-7); 3,07 (1H, dd, J=9,0; 7,0 Hz, H-3); 5,43 (1H, dd, J=8,0; 3,0 Hz, H-15). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm): 15,1; 15,2; 17,3; 18,6; 21,0; 25,6; 26,6; 27,7; 28,6; 29,5; 29,6; 32,9; 33,1; 33,5; 34,9; 35,6; 36,5; 37,4; 37,5; 37,6; 37,8; 38,5; 38,8; 41,1; 48,6; 55,4; 78,7; 116,6; 157,9.

Taraxerone (3) : ESI-MS *m/z*: 425 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃ 500 MHz) δ (ppm): 0,83 (3H, s, CH₃), 0,89 (3H, s, CH₃), 0,91 (3H, s, CH₃), 0,95 (3H, s, CH₃), 1,06 (3H, s, CH₃), 1,08 (3H, s, CH₃), 1,09 (3H, s, CH₃), 1,14 (3H, s, CH₃), 2,34 (1H, m, H-1), 2,56 (1H, m, H-2), 5,55 (1H, dd, J=8,0; 3,0 Hz, H-15). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 14,8; 17,4; 19,9; 21,3; 21,4; 25,5; 26,1; 28,8; 29,7; 29,8; 29,9; 33,1; 33,3; 33,6; 34,1; 35,1; 35,7; 36,7; 37,5; 37,7; 37,7; 38,3; 38,9; 40,6; 47,5; 48,7; 48,8; 55,8; 117,2; 157,6; 217,5

3β-Octacosanoyloxy-12-oleanen-28-ol (4) ESI-MS *m/z*: 849 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃ 500 MHz) δ (ppm): 0,86-0,89 (15H, m, 5 x CH₃), 0,94 (3H, s, CH₃), 0,95 (3H, s, CH₃), 1,16 (3H, s, CH₃), 2,89 (2H, t, J=7,0 Hz, -CH₂COO-), 3,22 (1H, dd, J=11,0; 5,5 Hz, H-28a), 3,55 (1H, dd, J=11,0; 6,5 Hz, H-28b), 4,50 (1H, dd, J=10,5; 5,5 Hz, H-3), 5,19 (1H, t, J=3,5 Hz, H-12). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 14,1; 15,5; 16,7; 16,7; 18,2; 22,0; 22,6; 23,5; 23,6; 25,1; 25,5; 25,9; 28,0; 29,1; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 29,6; 29,7 (CH₂)_n; 30,9; 31,0; 31,9; 32,5; 33,1; 34,1; 34,8; 36,8; 36,9; 37,3; 38,2; 39,8; 41,7; 42,3; 46,4; 47,5; 55,2; 69,7; 80,5; 122,3; 144,2; 173,6.

Gamboukokoensein A (5) ESI-MS *m/z*: 521 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) 0,83 (6H, s, 2 x CH₃), 0,95 (3H, d, J=6,5 Hz, CH₃), 1,06 (3H, s, CH₃), 1,22 (3H, s, CH₃), 1,38 (3H, s, CH₃), 3,41 (1H, d, J=11,0 Hz, H-23a), 3,50 (d, J=9,5 Hz, H-3), 3,54 (1H, d, J=11,0 Hz, H-23b), 3,62 (1H, dd, J=9,5; 3,0 Hz, H-2), 3,70 (1H, d, J=3,0 Hz, H-1), 5,31 (1H, t, J=3,5 Hz, H-12); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm) 13,3; 16,5; 17,6; 17,8; 19,1; 24,9; 26,6; 27,0; 27,3; 28,2; 29,6; 33,8; 39,0; 41,6; 41,9; 42,5; 43,0; 44,0; 44,1; 54,9; 71,1; 71,9; 73,6; 79,3; 81,1; 130,6; 138,8; 182,4.

Axit myrianthic (6) ESI-MS *m/z*: 505 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) 0,80 (3H, s, CH₃); 0,82 (3H, s, CH₃); 0,95 (3H, d, J=6,5 Hz, CH₃), 1,04 (3H, s, CH₃), 1,22 (3H, s, CH₃), 1,37 (3H, s, CH₃), 3,42 (1H, d, J=11,0 Hz, H-23a), 3,56 (1H, d, J=11,0 Hz, H-23b), 3,62 (1H, d, J=2,5 Hz, H-3), 3,89 (1H, m, H-2), 5,32 (1H, t, J=3,5 Hz, H-12).

Lời cảm ơn. Các tác giả xin cảm ơn ThS. Đào Đình Cường và ThS. Nguyễn Quốc Bình đã thu hái và xác định mẫu thực vật, cô Nguyễn Thị Hồng Vân đã giúp đỡ thực hiện công trình này. Các kết quả nghiên cứu thu được trong khuôn khổ hợp tác Việt - Pháp về nghiên cứu thảm thực vật Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi - Từ điển thực vật thông dụng, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tập 1, 1035-1036.
2. Phạm Hoàng Hộ - Cây cỏ Việt Nam, Nhà xuất bản Trẻ, Tập I, 2000, tr. 636-637.

3. Shunya Matsunaga, Reiko Tanaka and Masao Akagi - Triterpenoids from *Euphorbia maculata*, *Phytochemistry* **27** (2) (1988) 535-537.
4. Nakane T., Maeda Y. - Fern Constituents : Triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris*. *Chem. Pharm. Bull.* **50** (1002) 1273-1275.
5. Ahashi B. Mahato and Asish P. Kumdu - ¹³C spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features, *Phytochemistry* **17** (4) (1994) 1517-1575.
6. Nobuko Sakurai, Yoshikatsu Yaguchi and Takao Inoue - Triterpenoids from *Myrica rubra*, *Phytochemistry* **26** (1) (1986) 217-219.
7. Arot Manguro, Lawrence O., Midiwo, Jacob O., Kraus, Wolfgang - Triterpenoids and Steroids of *Myrsine africana* Leaves, *Planta Medica* **63** (1997) 290.
8. Wandji Jean, Tillequin Francois, Mulholland Dulcie A., Wansi Jean-Duplex, Fomum Tanee Z., Fuendjiep Victorine, Libot Francine, Tsabang Nole - Fatty Acid Esters of Triterpenoids and Steroid Glycosides from *Gambeya africana*, *Planta Med.* **68** (9) (2002) 822-826.
9. Bao-Zhi Li, Bin-Gui Wang and Zhong-Jian Jia - Pentacyclic triterpenoids from *Rubus xanthocarpus*, *Phytochemistry* **49** (8) (1998) 2477-2481.
10. Jean Wandji, Francois Tillequin, Dulcie A. Mulholland. Jovita Chi Shirri. Nole Tsabang, Rlisabeth Seguin, Philippe Verite, Francine Libot, Z. T. Fomum - Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*, *Phytochemistry* **64** (2003) 845-849.

SUMMARY

OLEANANE- AND URSANE-TRITERPENES FROM THE BARK OF *EBERHARDTIA AURATA* (SAPOTACEAE)

In the framework of scientific cooperation between the Institute of Chemistry (VAST, Vietnam) and the Institute of Natural Product Chemistry (CNRS, France) on phytochemistry of the Vietnamese flora, the plant *Eberhardtia aurata* (Pierre ex Dubard) Lecomte was selected for its cytotoxic activity on KB cell lines (49% inhibition at 1 µg/mL for the EtOAc extract of the bark). From the EtOAc extract of the stem bark of this plant, 4 oleanane triterpenes, β-amyrin acetate (**1**), taraxerol (**2**), taraxerone (**3**), 3 β -octacosanoyloxy-12-oleanen-28-ol (**4**) and 2 ursane triterpenes, gamboukokoensein A (**5**) and myrianthic acid (**6**) were isolated. Their structures were elucidated by using IR, MS and NMR spectroscopic methods, including 2D NMR spectroscopy (COSY, HMQC, HMBC).

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 5 tháng 7 năm 2008

Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Văn Hùng,

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

Marc Litaudon, Françoise Guéritte,

Viện Hóa học Các hợp chất Thiên nhiên, Gif sur Yvette, CH Pháp.