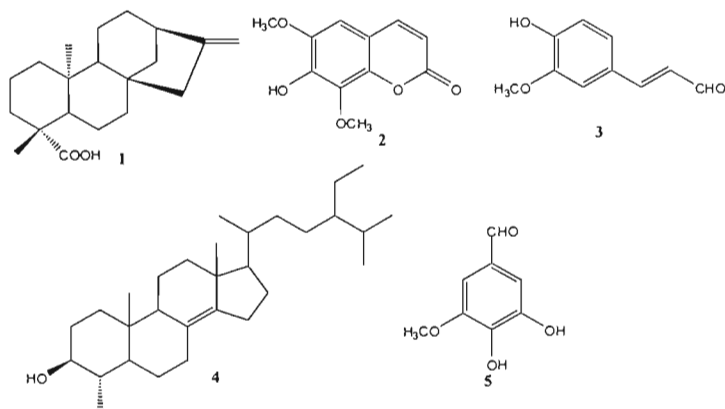


THÀNH PHẦN HOÁ HỌC THÂN CÂY *CROTON TOURANENSIS* GAGNEP.

ĐOÀN THỊ MAI HƯƠNG, NGUYỄN THỊ TÚ OANH, PHẠM VĂN CƯỜNG,
MARC LITAUDON, NGUYỄN VĂN HÙNG

1. MỞ ĐẦU

Chi *Croton* thuộc họ Thầu dầu (Eupobiaceae) có khoảng 300 loài, chủ yếu phân bố ở các vùng nhiệt đới [1]. Ở Việt Nam, chi *Croton* có 32 loài trong đó một số loài được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền. Cây *Croton touranensis* Gagnep có tên là Ba đậu Hội An hay Cù đen Đà Nẵng là loại cây tiểu mộc, lá nhẵn, mọc chum ở đầu cành, hình mác ngược, dài 6 – 10 cm thường phân bố ở Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng [2]. Trong khuôn khổ hợp tác Việt – Pháp về nghiên cứu thảm thực vật Việt Nam, chúng tôi đã thử hoạt tính sinh học sơ bộ dịch chiết EtOAc các bộ phận của cây này, kết quả cho thấy dịch chiết EtOAc của thân cây ức chế 55,9% dòng tế bào ung thư KB ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$. Cho đến nay, chưa có công trình nào công bố về việc nghiên cứu thành phần hóa học cây Ba đậu Hội An. Trong bài báo này, chúng tôi thông báo về việc phân lập và xác định cấu trúc của 5 hợp chất từ cặn dịch CH_2Cl_2 của thân cây Ba đậu Hội An. Cấu trúc của các chất được xác định là axit kaurenoic (1), isofraxidin (2), coniferaldehyde (3), 4-methyl-24-ethylcholest-8(14)-en-3 β -ol (4) và 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde (5).

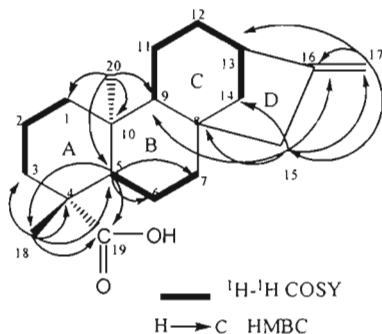


2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ cặn dịch CH_2Cl_2 , sau khi tiến hành sắc kí cột nhiều lần trên cột sephadex và silica gel chúng tôi thu được 5 hợp chất 1-5. Cấu trúc của các hợp chất trên được xác định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 và 2 chiều và phổ khối lượng.

Chất 1 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, đnc. 163 - 164°C. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa tại m/z 303 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ ^{13}C -NMR và phổ ^1H -NMR của 1 cho thấy phân tử có 20 cacbon, trong đó có tín hiệu của 1 nhóm cacboxyl ở δ_{C} 184,5; hai nhóm methyl [δ_{H} 0,95 (3H, s, CH_3 -20) và 1,24 (3H, s, CH_3 -18); δ_{C} 15,6 (CH_3 -20); 28,9 (CH_3 -18)] và 1

nhóm *exo*-metylen [δ_H 4,74 (s (br), H-17a) và 4,80 (s (br), H-17b); δ_C 103,0 (C-17) và 155,9 (C-16)]. Các dữ liệu phổ trên đặc trưng cho diterpenoit dạng kaurane có một axit cacboxylic và 1 nhóm *exo*-metylen trong phân tử. Trên phổ COSY cho thấy sự tương tác giữa H_a -17 và H_b -17 với H-15; H-9 với H_a -11 và H_b -11; H-13 với H-12, H_a -14 và H_b -14; H-5 với H-6. Trên phổ HMBC cho thấy sự tương tác giữa CH_3 -18 với C-3, C-4, C-5 và C=O; CH_3 -20 với C-1, C-5, C-9, C-10; H-3 và H-5 tương tác với C=O chứng tỏ rằng CH_3 -18 và axit cacboxylic gắn với khung diterpen ở vị trí C-4 còn CH_3 -20 gắn với khung diterpen ở vị trí C-10. Đồng thời H-15 tương tác với C-8, C-9, C-14, C-16 và C-17; H_a -17 và H_b -17 tương tác với C-13, C-15 và C-16 chứng tỏ CH_2 -17 gắn với vòng D của khung diterpen ở vị trí C-16. Từ các dữ kiện phổ NMR 1 và 2 chiều đồng thời so sánh với tài liệu tham khảo [3] cho phép xác định cấu trúc của chất **1** là axit kaurenoic. Đây là một diterpen có hoạt tính kháng khuẩn, giảm co thắt, ức chế protein tyrosine phosphatase và có hoạt tính ức chế này mẫn [3, 4].



Hình 1. Một số tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của chất **1**

Chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối EI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 222 $[M]^+$. Trên phổ 1H -NMR của **2** cho tín hiệu của 2 nhóm methoxy ở δ_H 3,94 (3H, s, 6-OCH₃) và 4,09 (3H, s, 8-OCH₃), 3 proton vòng thơm trong đó có 2 proton vinylic tương tác với nhau ở δ_H 7,58 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-4) và 6,27 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3) và 1 proton ở δ_H 6,66 (1H, s, H-5). Từ các dữ liệu phổ 1H -NMR của chất **2** và so sánh với tài liệu tham khảo [5, 6] cho phép xác định cấu trúc của chất này là isofraxidin.

Chất **3** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối EI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 178 $[M]^+$. Phổ 1H -NMR của **3** có tín hiệu của 1 nhóm methoxy ở δ_H 3,95 và 3 proton vòng thơm tương tác kiểu ABX ở δ_H 6,96 (d, $J=8,2$ Hz, H-5); 7,07 (d, $J=1,9$ Hz, H-2); 7,12 (dd, $J=8,2$; 1,9 Hz, H-6). Trên phổ 1H -NMR của **3** cũng có tín hiệu 1 nhóm CHO ở δ_H 9,65 (1H, d, $J=7,7$ Hz) và tín hiệu của 2 proton olefinic ở δ_H 6,59 (dd, $J=15,8$; 7,7 Hz, H-8) và 7,39 (d, $J=15,8$ Hz, H-7). Dựa vào giá trị của hằng số tương tác spin-spin giữa H-7/H-8 ($J=15,8$ Hz), chúng tôi đi đến kết luận rằng mạch nhánh có nối đôi là đồng phân hình học dạng *trans*. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [7] cho phép kết luận hợp chất **3** chính là coniferaldehyde.

Hợp chất **4** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối và chạm electron (EI-MS) cho pic ion phân tử m/z 428 $[M]^+$. Sự phân mảnh trên phổ khối lượng đặc trưng cho các steroid với các mảnh ở m/z 413 $[M-CH_3]$, m/z 395 $[M-CH_3 - H_2O]$, m/z 287 $[M-141]$ (mạch nhánh)]. Phổ 1H -NMR của chất **4** cho thấy sự có mặt của 2 nhóm metyl bậc 3 (δ_H 0,70 và 0,83), bốn nhóm metyl bậc 2 và 1 nhóm metyl bậc một ở δ_H 0,84 (t, $J=7,5$ Hz). Trên phổ cũng xuất hiện tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxy methin ở δ_H 3,67. Kết hợp dữ liệu phổ MS, NMR và

so sánh với tài liệu tham khảo [8] cho phép kết luận hợp chất **4** chính là 4-methyl-24-ethylcholest-8(14)-en-3 β -ol.

Hợp chất **5** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối EI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 168 [M]⁺. Phổ ¹H-NMR cho tín hiệu của 1 nhóm methoxy ở δ_H 3,97 (3H, s, OCH₃), 1 aldehyde ở δ_H 9,84 (1H, s) và 2 proton vòng thơm ở 7,17 (2H, s, H-2 + H-6). Các dữ liệu phổ ¹H-NMR cho phép kết luận sơ bộ hợp chất **5** là 1 vòng benzen có 4 nhóm thế (1 nhóm CHO, 2 nhóm OH và 1 nhóm OCH₃). So sánh với tài liệu tham khảo [9], chúng tôi xác định được hợp chất **5** chính là 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde.

3. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thiết bị và nguyên liệu

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Phổ khối lượng (EI-MS) được đo trên máy HP 5989B MS và máy sắc ký lỏng ghép khối phổ với đầu dò MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng mode ESI và đầu dò DAD.

Thân cây Ba đậu Hội An, được ThS. Đào Đình Cường và ThS. Nguyễn Quốc Bình thu hái ở A Lưới - Thừa Thiên Huế vào tháng 5/2005. Mẫu tiêu bản có tên VN 1516 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 thân cây sau khi phơi khô, nghiền nhỏ (900 g) được ngâm chiết trong dung môi CH₂Cl₂. Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 10,3 g cặn dịch CH₂Cl₂. Cặn dịch chiết CH₂Cl₂ được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH gradient (0 - 50%) thu được 5 phân đoạn chính F1-F5. Từ phân đoạn F1, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc gradient cho 76,8 mg chất **1**. Từ phân đoạn F2, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH gradient cho 5 mg chất **3** và 2 mg chất **5**. Từ phân đoạn F3, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi n-hexan-axeton gradient và cột sephadex với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (1/9) thu được 2 mg chất **2**. Từ phân đoạn F5, sau khi chạy cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH gradient (0-50%) và cột sephadex với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (1/9) cho 9 mg chất **4**.

Axit kaurenoid (1): Chất rắn màu trắng, đnc. 163 - 164°C, ESI-MS: m/z 303 [M+H]⁺ (C₂₀H₃₀O₂); ¹H-NMR (CDCl₃ 500 MHz) δ (ppm): 4,80 (1H, br.s, H_b-17); 4,74 (1H, br.s, H_a-17); 2,64 (1H, br.s, H-13); 2,16 (1H, d, J=14,0 Hz, H_b-3); 2,05 (2H, m, H-15); 1,99 (1H, d, J=11,5 Hz, H_b-14); 1,80-1,90 (4H, m, H_b-1 + H-6 + H_b-11); 1,44-1,65 (7H, m, H-2 + H-12 + H-7 + H_a-11); 1,24 (3H, s, CH₃-18); 1,14 (1H, dd, J=11,0; 5,0 Hz, H_a-14); 1,06 (2H, m, H-5 + H-9); 1,01 (1H, dt, J=14,0; 4,0 Hz, H_a-3); 0,95 (3H, s, CH₃-20); 0,81 (1H, dt, J=13,0; 4,0 Hz, H_a-1) ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 184,5 (C-19); 155,9 (C-16); 103,0 (C-17); 57,1 (C-5); 55,1 (C-9); 49,0 (C-15); 44,2 (C-8); 43,9 (C-13); 43,7 (C-4); 41,3 (C-7); 40,7 (C-1); 39,7 (C-14); 39,7 (C-10); 37,8 (C-3); 33,1 (C-12); 28,9 (CH₃-18); 21,8 (C-6); 19,1 (C-2); 18,4 (C-11); 15,6 (CH₃-20).

Isofraxidin (2): EI-MS: m/z 222 [M]⁺ (C₁₁H₁₀O₅); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,58 (1H, d, J=9,5 Hz, H-4); 6,66 (1H, s, H-5); 6,60 (1H, s, OH); 6,27 (1H, d, J=9,5 Hz, H-3); 3,95 (3H, s, OCH₃).

Coniferaldehyde (3): EI-MS: m/z 178 $[M]^+$ ($C_{10}H_{10}O_3$); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 9,65 (1H, d, $J=7,7$ Hz, CHO); 7,39 (d, $J=15,8$ Hz, H-7); 7,12 (dd, $J=8,2$; 1,9 Hz, H-6); 7,07 (d, $J=1,9$ Hz, H-2); 6,96 (d, $J=8,2$ Hz, H-5); 6,59 (1H, dd, $J=15,8$; 7,7 Hz, H-8) 3,79 (3H, s, OCH_3).

4-methyl-24-ethylcholest-8(14)-en-3 β -ol (4): EI-MS: m/z 428 $[M]^+$ ($C_{30}H_{52}O$), 413 $[M-CH_3]$, 395 $[M-CH_3 - H_2O]$, 287 $[M-141(\text{mạch nhánh})]$; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 3,67 (1H, m, H-3); 1,03 (3H, d, $J=6,6$ Hz, H-30); 0,94 (3H, d, $J=6,6$ Hz, H-21); 0,84 (3H, t, $J=7,5$ Hz, H-29); 0,83 (3H, d, $J=7,1$ Hz, H-27); 0,83 (3H, s, H-18); 0,81 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-26); 0,70 (3H, s, H-19).

3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde (5) EI-MS: m/z 168 $[M]^+$ ($C_8H_8O_4$); 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm) 9,84 (1H, s, CHO); 7,17 (2H, s, H-2 + H-6); 3,97 (3H, s, OCH_3).

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. Các kết quả nghiên cứu thu được trong khuôn khổ dự án hợp tác Việt - Pháp về nghiên cứu thảm thực vật Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kuo P. -C., Shen Y. -C., Yang M. -L., Wang S. -H., Tran D. T., Nguyen X. D., Chiang P. -C., Lee K. -H., Lee E. -J., Wu T. -S. - Crotonkinins A and B and Related Diterpenoids from croton kokinensis as Anti-inflammatory and Antitumor Agents, J. Nat. Pro. **70** (2007) 1906-1909.
2. Phạm Hoàng Hộ - Cây cỏ Việt Nam, Nhà xuất bản trẻ, Tập II, 2000, pp. 238-246.
3. Zhang G., Shimokawa S., Mochizuki M., Kumamoto T., Nakanishi W. et al. - Chemical Constituents of *Aristolochia constricta*: Antispasmodic effects of its Constituents in Guinea-Pig Ileum and Isolation of diterpeno-Lignan Hybrid, J. Nat. Pro. **71** (2008) 1167-1172.
4. Wilkens M., Alarcon C., Urzua A., Mendoza L. - Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid, Planta Med. **68** (5) (2002) 452-454.
5. Panichayupakaranant P., Noguchi H., De-Eknamkul W., and Sakawa U. - Naphthoquinones and coumarins from Impatiens balsamina root cultures, Phytochemistry **40** (4) (1995) 1141-1143.
6. Tsukamoto H., Hisada S., Nishibe S. - Coumarins from Bark of Fraxinus japonica and F. mandshurica var. japonica., Chem. Pharm. Bull. **33** (9) (1985) 4069-4073.
7. Sy L. -K., Brown G. D. - Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*, Phytochemistry **50** (1999) 781-785.
8. Kokke W. C. M. C., Fenical W., Djerassi C. - Sterols with unusual nuclear unsaturation from three cultured marine dinoflagellates, Phytochemistry **20** (1981) 127-134 (1981).
9. Zouhiri F., Mouscadet J. -F., Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., and Angelo J. - Structure-Activity Relationships and Binding Mode of Styrylquinolines as Potent Inhibitors of HIV-1 Integrase and Replication of HIV-1 in Cell Culture, J. Med. Chem. **43** (8) (2000) 1533-1540.

SUMMARY

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE STEMS OF *CROTON TOURANENSIS* GAGNEP.

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 *Croton touranensis* was selected for its cytotoxic activity on KB cell lines (55.9% inhibition at 1 μ g/mL for the EtOAc extract of the stems). From the dichloromethane extract of the stems of this plant, 5 compounds: kaurenoic acid (1), isofraxidin (2), coniferaldehyde (3), 4-methyl-24-ethylcholest-8(14)-en-3 β -ol (4) and 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde (5) were isolated. Their structures were identified by MS and NMR spectroscopic methods.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 22 tháng 3 năm 2009

Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Tú Oanh,

Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng,

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

Marc Litaudon,

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