

NEOLIGNAN TỪ VỎ CÂY KHÁO NHẬM (*MACHILUS ODORATISSIMA* NEES, LAURACEAE)

Phan Tổng Sơn, Phan Minh Giang, Trần Thị Quỳnh Hoa, Đỗ Thị Việt Hương
Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMMARY

For the first time the neolignans (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3'-methoxy-8-methyl-1'-trans-propenylbenzofuran (Licarin A) and (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3'-hydroxy-8-methyl-1'-trans-propenylbenzofuran were isolated from the bark of Machilus odoratissima Nees (Lauraceae), a herbal remedy used in the folk medicine for the treatment of dysentery and diarrhoea. The structures of the isolated compounds were elucidated by spectral analyses (MS, IR, NMR).

PHÂN MỞ ĐẦU

Chi *Machilus* (Lauraceae) rất phong phú về loài. Các loài *Machilus* mọc hoang ở nhiều nước, như Ấn Độ, Nhật Bản, Triều Tiên, Malaixia,... Trên thế giới, một số loài *Machilus* đã được nghiên cứu khá sâu về thành phần hóa học, như *Machilus thunbergii* Sieb. et Zucc. [1], *M. japonica* Sieb. et Zucc. [2], *M. obovatifolia* Kanehira et Sasaki [3].

Ở nước ta cho đến nay đã có 14 loài *Machilus* được tìm thấy [4,5]. Chúng phần lớn là những loài cây gỗ, một số cao tới 15 m hoặc hơn. Các loài *M. velutina* Champ. ex Benth. (Kháo lông nhung), *M. odoratissima* Nees (Kháo nhậm) cho gỗ dùng trong xây dựng hoặc làm đồ dùng trong nhà [5], vỏ cây *M. odoratissima* còn được dùng làm nhang trầm [4,5]. Công dụng làm thuốc của các loài *Machilus* còn ít được nêu trong các sách viết về cây thuốc ở nước ta, trừ một vài ứng dụng nhỏ, như vỏ và tinh dầu của cây *M. velutina* được dùng làm thuốc chữa cảm gió [5]. Tuy nhiên trong nhân dân, nhất là ở miền núi, một số loài *Machilus* được dùng chữa bệnh. Nước sắc từ vỏ cây Kháo nhậm (*M. odoratissima* Nees) được đồng bào miền núi dùng khá phổ biến để chữa lỵ và tiêu chảy, cũng như làm thuốc sát trùng hoặc tiêu viêm. Dựa trên kinh nghiệm dân gian, Viện Quân y 10 cũng đã thử dùng nước sắc của cây Kháo nhậm để điều trị bệnh nhân bị viêm đại tràng mạn, kết quả điều trị khá tốt [6]. Mặc dầu đã được dùng chữa bệnh, cho đến nay cây Kháo nhậm (*M. odoratissima* Nees) còn chưa được nghiên cứu về mặt hóa thực vật.

Chúng tôi nghiên cứu cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees) nhằm góp phần tìm hiểu về các chất có thể có tác dụng chữa bệnh cũng như các chất có thể gây ra các tác dụng phụ của cây này.

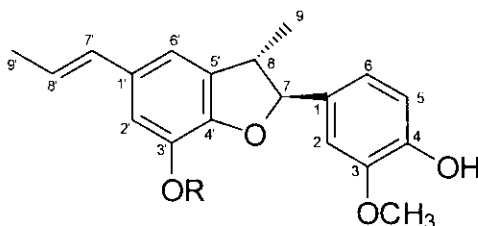
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bột khô vỏ cây kháo nhậm (*M. odoratissima* Nees) được ngâm chiết nhiều lần với etanol 96% ở nhiệt độ phòng. Sau khi gộp chung, dịch chiết etanol được cô bót dung môi dưới áp suất giảm, rồi pha loãng với nước. Dịch etanol-nước được phân bố lần lượt với n-

hexan, etyl axetat và n-butanol để thu các dịch chiết tương ứng. Sau khi cất loại dung môi, ta thu được một cách tương ứng các phần chiết n-hexan (**HK**, hiệu suất: 4,1% so với nguyên liệu thực vật khô), etyl axetat (**EK**, 12,1%) và n-butanol (**BK**, 0,3%).

Tiến hành sàng lọc hóa thực vật bằng các phản ứng thử đặc trưng [7,8] đã phát hiện được sự có mặt của các phytosterol và lignan trong phần chiết n-hexan (**HK**), flavonoid trong phần chiết etyl axetat (**EK**), và saponin trong phần chiết n-butanol (**BK**). Đồng thời việc phân tách cũng được định hướng bởi sự thử sinh học (*bioassay-guided fractionation*) thông qua việc thử tác dụng kháng vi sinh vật. Phần chiết n-hexan (**HK**) đã chứng tỏ có tác dụng ức chế mạnh các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella shiga*, và *Salmonella typhi* A. Kết hợp với việc lưu ý đến các lignan là các chất có thể có hoạt tính lý thú, chúng tôi đã chọn phần chiết n-hexan (**HK**) để phân tách tiếp.

Tiến hành phân tách phần chiết n-hexan (**HK**) bằng sắc ký lỏng trung áp (MPLC) trên silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/axeton (5/1, v/v), tiếp đó tinh chế nhóm phân đoạn ít phân cực hơn nhờ chạy sắc ký cột (CC, FC) nhiều lần (silica gel, dung môi: n-hexan/axeton, gradient), đã dẫn đến sự phân lập một hỗn hợp 6:1 của sitosterol (**1**) và stigmaterol (**2**); các hợp chất này được nhận dạng nhờ so sánh phổ (MS, IR, ^1H NMR và ^{13}C NMR) của chúng với các phổ tương ứng trong tài liệu tham khảo [9].



3 R = CH₃

4 R = H

Hợp chất **3**, C₂₀H₂₂O₄ (M⁺: 326) được phân lập từ nhóm phân đoạn phân cực hơn của lần chạy MPLC thông qua chạy sắc ký cột (CC) nhiều lần trên silica gel (dung môi: n-hexan/axeton, gradient) rồi kết tinh lại trong metanol dưới dạng chất rắn kết tinh, đ.n.c. 107-108°C. Phổ hồng ngoại cho thấy **3** là một hợp chất vòng thơm được hydroxyl hóa (ν_{max} cm⁻¹ 3512, 3021, 1609, 1517, 1493). Trên phổ ^1H NMR xuất hiện các tín hiệu ở δ 6.76 (1H, sbr), 6.81 (1H, sbr), 5.30 (1H, d, J = 9.2 Hz), 3.35 (1H, m), và tín hiệu của một nhóm methyl bậc hai ở δ 1.32 (3H, d, J = 7Hz), chứng tỏ sự có mặt của một vòng benzofuran được methyl hóa ở vị trí 8. Hằng số tương tác lớn giữa H-7 và H-8 (d, J = 9.2 Hz) cho thấy đây là sự tương tác *trans*-vicinal. Các tín hiệu của vòng thơm ở δ 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.84 (1H, dd, J = 8.1 Hz, 1.8 Hz), 6.98 (1H, d, J = 1.8 Hz) cho thấy vòng thơm bị thế ở 1, 3, 4. Trên phổ ^1H NMR có thể thấy rõ các tín hiệu của hai nhóm methyl ở δ 3.81 (3H, s) và 3.83 (3H, s); của nhóm *trans*-isopropenyl ở δ 1.83 (3H, dd, J = 1.5 Hz, 7 Hz), 6.10 (1H, dq, J = 7.0 Hz, 16.8 Hz), 6.33 (1H, dq, J = 16.8 Hz, 1.5 Hz). Trên cơ sở các dữ kiện phổ nêu ở trên hợp chất **3** đã được xác định là (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3'-methoxy-8-methyl-1'-*trans*-propenylbenzofuran (Licarin A) [10].

Từ nhóm phân đoạn phân cực hơn nữa của lần chạy MPLC hợp chất **4**, đ.n.c. 85 °C,

đã được phân lập bởi sắc ký cột nhanh (silica gel, dung môi: n-hexan/CH₂Cl₂/MeOH) và kết tinh lại trong diethyl ete. Phổ hồng ngoại của **4** tương tự phổ của **3** (ν_{\max} cm⁻¹ 3474, 3029, 1617, 1538, 1497). Trên phổ MS, **4** có đỉnh ion phân tử M⁺ ở m/z 312 (C₁₉H₂₀O₄); và các đỉnh mảnh ở m/z 297 [M-CH₃]⁺, 294 [M-H₂O]⁺, 269 [M-CH₃CO]⁺, 189 [(CH₃O)C₆H₃(OH)]⁺. Vì vậy cấu trúc của **4** đã được xác định là (7S,8S)-7,8-dihydro-7-(3-metoxy-4-hydroxyphenyl)-3'-hydroxy-8-metyl-1'-trans-propenylbenzofuran [10].

Như vậy từ vỏ cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees), chúng tôi đã phân lập được hai neolignan. Các lignan và neolignan thể hiện nhiều tác dụng sinh lý, như chống vi rút, chống khối u, độc hại tế bào, trừ sâu [11].

Kết quả thử tác dụng kháng khuẩn đã cho thấy Licarin A do chúng tôi phân lập được từ vỏ cây Kháo nhậm ức chế mạnh vi khuẩn gây ra bệnh lỵ trực khuẩn *Shigella shiga*, tác dụng này mạnh hơn khi so với phần chiết n-hexan (**HK**) của vỏ cây này. Như vậy kết quả thử tác dụng kháng khuẩn đã cho thấy phần chiết n-hexan (**HK**), và nhất là licarin A, có thể góp phần đáng kể vào tác dụng điều trị lỵ trực khuẩn của vỏ Kháo nhậm.

PHÂN THỰC NGHIỆM

Thiết bị và phương pháp

Các điểm nóng chảy được đo bằng dụng cụ Electrothermal model 9100 và không được hiệu chỉnh. Các phổ ¹H NMR được ghi với thiết bị Bruker Avance 500 (500 MHz). Các phổ IR được ghi trên thiết bị Nicolet Impact 410 FT-IR. Các phổ EIMS (70 eV) được ghi trên các thiết bị Hewlett Packard HP 5898B.

Sắc ký lỏng trung áp (MPLC) được thực hiện trên thiết bị Baeckstroem SEPARO AB, sử dụng một bơm định lượng trung áp QD-O-SSY nên dung môi đi qua cột tách với tốc độ dòng 0 - ~ 100 ml/phút và áp suất 0,5-6,9 bar. Cột tách cao 300 mm có đường kính trong 20 mm, được nhồi silica gel (Merck, cỡ hạt 15-40 μ m).

Sắc ký cột (CC và FC) được tiến hành trên silica gel (Merck, 63-100 μ m cho CC và 15-40 μ m cho FC). Sắc ký lớp mỏng (TLC) được tiến hành trên bản mỏng tráng sẵn silica gel DC Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), vết chất được phát hiện bằng đèn UV ở bước sóng 254 nm và phun thuốc thử vanilin/conc. H₂SO₄ 1%.

Nguyên liệu thực vật

Vỏ cây Kháo nhậm được thu thập tại Đồng Hỷ, Thái Nguyên vào tháng 6 dương lịch. Vỏ cây được phơi khô trong bóng râm, rồi sấy ở 40-50^oC và xay thành bột mịn.

Điều chế các phần chiết

1,8 kg bột vỏ Kháo nhậm khô được ngâm chiết với metanol ở nhiệt độ phòng (3 lần, mỗi lần trong ba ngày). Các dịch chiết metanol được gộp chung và cô quay dưới áp suất giảm cho đến còn 1/10 thể tích. Pha loãng dịch metanol bằng nước, rồi chiết dịch metanol-nước lần lượt với n-hexan, etyl axetat và n-butanol. Các dịch chiết được làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại kiệt dung môi dưới áp suất giảm để thu được các phần chiết tương ứng: phần chiết n-hexan (**HK**; 27,3 g, hiệu suất: 1,51% so với khối lượng vỏ khô), etyl axetat

(EK; 246.9g, 13.71%), và n-butanol (BK ; 5.1 g, 0.28%) .

Phân lập các hợp chất từ phần chiết n-hexan (HK)

Tiến hành sắc ký lỏng trung áp (MPLC) với 10 g phần chiết n-hexan (HK) trên 45 g silica gel, giải hấp phụ bằng n-hexan : axeton (5/1, v/v), thu 100 phân đoạn (mỗi phân đoạn 20 ml), được gom lại thành 11 nhóm phân đoạn (HK1- HK11). Nhóm phân đoạn HK2 (pd 4-16, 0,1 g) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột (CC, silica gel, dung môi: n-hexan/axeton, gradient) rồi bằng sắc ký cột nhanh (FC, silica gel, dung môi: n-hexan/axeton, gradient), cho 10 mg hỗn hợp 6:1 của β -sitosterol (1) và stigmasterol (2). Nhóm phân đoạn HK4 (pd 21-40, 0,3 g) được phân tách tiếp qua hai lần chạy sắc ký cột (CC, silica gel, dung môi: n-hexan/axeton, gradient) rồi kết tinh lại trong metanol, cho licarin A (3, 100 mg). Nhóm phân đoạn HK8 (pd 73-84, 0,1 g) được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (FC, silica gel, dung môi: n-hexan/CH₂Cl₂/MeOH, 8/2/1, v/v) rồi kết tinh lại trong diethylene, cho (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-metoxi-4-hydroxyphenyl)-3'-hydroxy-8-metyl-1'-trans-propenylbenzofuran (4, 30 mg).

(7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-metoxi-4-hydroxyphenyl)-3'-metoxi-8-metyl-1'-trans-propenylbenzofuran (Licarin A, 3)

Tinh thể hình kim không màu, đ.n.c.107-108°C.

IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3512, 3021, 2957, 2923, 2874, 1609, 1517, 1493, 1452, 1334, 1271, 1204, 1144, 1124, 1028, 959, 857, 806, 755.

MS: m/z (%) 326 (M⁺, C₂₀H₂₂O₄, 100), 311 (14.7), 283 (5.9), 251 (3.2), 202 (10.4), 165 (6.9), 151 (11.9), 137 (14.6), 115 (12.2), 91 (13.4), 77 (12.5).

¹H-NMR (CD₃OD, δ , ppm): 1.32 (3H, d, J = 7 Hz, 8-CH₃), 1.83 (3H, dd, J = 1.5 Hz, 7.0 Hz, 8'-CH₃), 3.35 (1H, m, H-8), 3.81 (3H, s); 3.83 (3H, s) (3-OCH₃, 3'-OCH₃), 5.30 (1H, d, J = 9.2 Hz, H-7), 6.10 (1H, dq, J = 7.0 Hz, 16.8 Hz, H-7'), 6.33 (1H, dq, J = 16.8 Hz, 1.5 Hz, H-8'), 6.76 (1H, sbr, H-6'), 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.81 (1H, sbr, H-2'), 6.84 (1H, dd, J = 8.1 Hz, 1.8 Hz, H-6), 6.98 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2).

(7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-metoxi-4-hydroxyphenyl)-3'-hydroxy-8-metyl-1'-trans-propenylbenzofuran (4)

Chất bột không màu, đnc. 85°C.

IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3474, 3250, 3029, 2957, 2926, 2878, 1617, 1538, 1497, 1450, 1375, 1337, 1284, 1215, 1142, 1122, 959, 943, 806.

MS: m/z (%) 312 (M⁺, C₁₉H₂₀O₄, 100), 297 (17), 294 (5.3), 269 (8.3), 202 (20), 189 (14.8), 174 (11.1), 165 (14.7), 137 (28.7), 123 (27.0), 115 (32.4), 103 (25.0), 91 (29.5), 77 (23.5).

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên từ vỏ cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae), một vị thuốc thảo mộc được dùng trong y học dân gian để điều trị các bệnh lý và tiêu chảy, đã phân lập được các neolignan (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-metoxi-4-hydroxyphenyl)-3'-metoxi-8-metyl-1'-

trans-propenylbenzofuran (Licarin A) và (7S,8S)-7,8-dihydro-7(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3'-hydroxy-8-methyl-1'-trans-propenyl-benzofuran; cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định nhờ các phương pháp phổ (MS, IR, NMR).

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ của Chương trình Nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học tự nhiên và International Foundation for Science (IFS).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H. Shimomura, Y. Sashida and M. Oohara, *Phytochemistry*, Vol. 26, p. 1513-1515 (1987).
2. H. Shimomura, Y. Sashida and M. Oohara, *Phytochemistry*, Vol. 27, p. 634-636 (1987).
3. Ian-Lih Tsai, Jyh-Huey Chen, Chang-Yih Duh, Ih-Sheng Chen, *Planta Medica*, Vol. 66, p. 403-407 (2000).
4. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, *An Illustrated Flora of Vietnam*, Quyển I, Tập 1, tr. 488-493, Published by the Author, Montreal (1991).
5. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr. 612-613, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội và Thành phố Hồ Chí Minh (1997).
6. Đặng Hanh Khôi, *Công trình nghiên cứu khoa học y dược*, tr. 224, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội (1978).
7. Richard J. P. Cannell (editor), *Natural Products Isolation*, p. 356-358, Humana Press, New Jersey (1998)
8. *Khimicheski analiz lekarstvennykh ractenhi*, Vuischaia shkola, Moskva (1983).
9. L. John Goad and T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, p. 378, 380, Blackie Academic & Professional, London (1997).
10. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hóa học*, T. 40, số ĐB, tr. 189-192 (2002).
11. K. B. G. Torssell, *Natural Product Chemistry*, p. 164-166, Publishing House Apotekarsocieteten, Stockholm (1997).