

CÁC HỢP CHÁT LANOSTAN TRITECPEN TỪ CÂY NA RỪNG *KADSURA COCCINEA*

Phạm Thị Hồng Minh¹, Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Nguyễn Quyết Tiến¹, Trương Thị Thanh Nga¹,
Nguyễn Quảng An¹, Bùi Văn Thành², Phan Văn Kiệm³

¹Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Hải sinh biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 10-8-2011

Abstract

Kadsura coccinea (Schisandraceae) is widely used in Vietnamese traditional medicine for the treatment of several diseases such as epilepsy, sleeplessness, enteritis, gastritis, colitis, rheumatism, and postpartum hemorrhage. Phytochemical investigation of the ethyl acetate extract of stems of *K. coccinea* led to the isolation of three triterpenoids, mangiferonic acid (3-oxocycloart-24E-en-26-oic acid) (3), nigranoic acid (3,4-seco cycloart-4(28),24-diene-3,26-dioic acid) (4), and lancifolic acid (4-hydroxy-3,4-seco cycloart-24E-ene-3,26-oic acid) (5) together with two phytosterols β-sitosterol (1) and β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranosid (2). Their chemical structures were determined by extensive spectroscopic methods including FT-IR, MS, 1D and 2D NMR.

Keywords: *Kadsura coccinea*, Schisandraceae.

I. MÔ ĐÀU

Cây Năm cõm hay còn gọi là cây Na rừng, ngũ vị nam (*Kadsura coccinea*), thuộc họ Ngũ vị, Schisandraceae. Cây thuộc dạng dây leo, mọc rải rác trong rừng, thường ở độ cao 400-800 m [2]. Cây ra hoa vào tháng 5-6, có quả vào tháng 8-9. Cây phân bố ở các vùng Lào Cai, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Quảng Trị và Lâm Đồng. Ngoài ra cây còn có ở Trung Quốc và Lào. Trong dân gian, quả được rang dùng làm thuốc an thần, gây ngủ. Rễ cây dùng trị bệnh viêm ruột mãn tính, viêm dạ dày cấp và loét hành tá tràng, ngoài ra còn để trị bệnh phong thấp, đau xương, đau bụng bể kinh, xung huyết, tìn thương do ngã, sán hậu Vô thân và vỏ rễ ngâm rượu làm thuốc bắc, kích thích tiêu hóa [1]. Ở Trung Quốc hạt của loài *Kadsura coccinea* là một vị thuốc dân gian được dùng để điều trị bệnh viêm dạ dày, rối loạn tiêu hóa, té thấp, viêm khớp. Nhiều nghiên cứu về hóa học của hạt đã cho biết trong đó có chứa các hợp chất lignan [3]. Gần đây kết quả nghiên cứu thành phần hóa học rễ cây *Kadsura coccinea* ở Việt Nam cho biết đã phân lập được các dibenzocyclooctadiene lignan cùng với các tritecpen lanostan và dẫn xuất của nó [4].

Bài báo này trình bày kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3 hợp chất tritecpen từ dịch chiết EtOAc của thân cây Na rừng.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu cây được thu hái tại Tam Đảo, Vĩnh Phúc vào tháng 10 năm 2010, được ThS. Bùi Văn Thành, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam xác định tên khoa học là *Kadsura coccinea*.

2.2. Thiết bị nghiên cứu

Điểm cháy được đo trên máy Electrothermal IA-9200 (Anh). Phô IR được ghi trên máy IMPACT 410 sử dụng đĩa nén tĩnh KBr. Phô ESI-MS do trên máy HP-1100 LS/MS Trap. Phô $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR và TMS được sử dụng là chât nội chuẩn.

Sắc ký cột (CC) sử dụng chât nhồi Silica gel cỡ hạt 0,040-0,063 mm (Kieselgel 60-230 mesh) và 0,063-0,200 mm (Kieselgel 230-400 mesh, Merck).

2.3. Phân lập các hợp chất

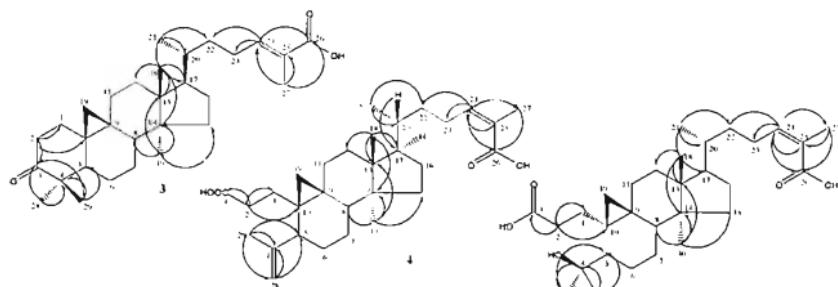
Mẫu sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khi lượng không đổi được 5,0 kg, đem nghiên nhỏ và ngâm chiết 5 lần với EtOH trong thiết bị siêu âm ở nhiệt

độ phông. Dịch tổng thu được các loại dung môi dưới áp suất giảm được cân cỗ EtOH. Cân cỗ EtOH được thêm nước và chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, EtOAc và MeOH. Sau khi dưới dung môi thu được 15,3 g cặn dịch *n*-hexan (KcH), 40,2 g cặn dịch etyl axetat (KcE) và 52,1 g cặn metanol (KcM).

Phân đoạn KcH (15,3 g) được tách trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-EtOAc có tỷ lệ tăng dần từ 10-100% thu được 4 phân đoạn. Phân đoạn 2 và 3 (1,7 g) được tách lại trên cột silica gel sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexan-EtOAc cho chất β -sitosterol (1, 37,7 mg) ở dạng kết tinh hình kim, điểm nóng chảy 135-136°C, *Rf* = 0,50 (hệ dung môi *n*-hexan-EtOAc 4:1).

Phân đoạn KcE (40,2 g) cũng được tách trên cột

silica gel, hệ dung môi rửa giải cloroform-metanol có tỷ lệ tăng dần từ 0-100% MeOH thu được 5 phân đoạn. Phân đoạn 1 (10,5 g) được tách lặp lại trên cột silica gel 2 lần hệ dung môi rửa giải cloroform-metanol và kết tinh phân đoạn bằng MeOH thu được chất hợp β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosid (2, 75,9 mg). Phân đoạn 2 (2,3 g) được tách lại 2 lần trên cột silica gel hệ dung môi rửa giải cloroform-metanol và kết tinh phân đoạn bằng MeOH thu được axit mangiferonic (axit 3-oxocycloart-24E-en-26-oic) (3, 1,05 g). Các phân đoạn 3 và 4 tiếp tục được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel hệ dung môi rửa giải cloroform-metanol thu được axit nigranoic (axit 3,4-seco cycloart-4(28),24-diene-3,26-dioic (4, 37,1 mg), và axit lancisioic (axit 4-hydroxy-3,4-seco cycloart-24(E)-en-3,26-oic) (5, 30 mg).



Hình 1: Cấu trúc hóa học của 1-3

Bảng 1 Số liệu phổ ^{13}C -NMR (ppm) của các chất 3, 4 và 5

C	3 ^a	4 ^{b,c}	5 ^{b,c}	C	3 ^a	4 ^{b,c}	5 ^{b,c}
1	33,41	28,79	30,06	16	26,70	27,86	26,42
2	37,45	31,20	31,93	17	52,21	51,96	52,17
3	216,63	176,5	177,41	18	18,10	17,84	18,35
4	50,23	149,34	76,21	19	29,54	29,77	30,95
5	48,42	45,65	45,21	20	35,95	35,79	35,82
6	21,49	27,56	28,06	21	18,10	17,84	17,88
7	28,14	24,79	25,48	22	34,77	35,39	34,72
8	47,85	47,53	48,5	23	25,85	25,59	25,69
9	21,06	21,88	22,56	24	145,75	143,97	143,99
10	25,91	26,86	26,53	25	126,67	126,89	126,96
11	25,97	26,72	26,53	26	173,32	170,81	170,68
12	32,79	34,66	35,88	27	11,94	11,84	11,97
13	45,38	44,97	44,80	28	20,76	111,19	19,36
14	48,74	48,74	49,50	29	22,18	19,47	25,59
15	35,53	32,85	33,04	30	19,29	19,04	31,50

^aĐo trong CDCl_3 . ^bĐo trong $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$. ^c125 MHz.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết hợp các phương pháp chiết phân đoạn, sắc ký lớp mỏng, tách trên cột nhồi silica gel và kết tinh phân đoạn với các hệ dung môi thích hợp

từ dịch chiết hexan và etyl axetat của thân cây *K. coccinea* đã phân lập được 7 chất sach. Dựa vào các phương pháp hóa lí hiện đại: IR, MS, và 1D, 2D-NMR và so sánh với số liệu phổ các chất đã biết đã nhận dạng được cấu trúc hóa học 5 trong số 7 chất

gồm β -sitosterol (1, 37,7 mg), β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosid (2, 75,9 mg) từ dịch n-hexan. Các hợp chất axit mangiferonic (axit 3-oxocycloart-24E-en-26-oic) (3, 1,05 g), axit nigranoic (axit 3,4-secocycloarta-4(28),24-dien-3,26-dioic (4, 37,1 mg), và axit lancifolic (axit 4-hydroxy-3,4-secocycloart-24E-en-3,26-oic) (5, 30 mg) từ dịch etyl axetat.

Hợp chất 3: Chất bột rắn, không màu (1,05 g), có $R_f = 0,74$ (hệ dung môi cloroform:methanol = 9:1), điểm nóng chảy 183-184°C.

Phô IR của 3 cho biết một số dao động đặc trưng (v_{max} , cm⁻¹) như: 2941-2869 (dao động hóa trị CH), 1713, 1684 (dao động hóa trị C=O), 1641 (C=C)

Phô ESI-MS positive cho pic giả phân tử [M+H]⁺ ở m/z 455, phù hợp với công thức phân tử M = C₁₉H₃₀O₁

Phô ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) cho một tín hiệu proton olefin đặc trưng ở δ_H 6,89 (1H, dt, $J = 1,0$ và 6,8 Hz, H-24) và tín hiệu của 6 nhóm methyl ở các δ_H 0,99 (3H, s, 18-Me); 0,92 (3H, d, $J = 2$ Hz, 21-Me); 1,83 (3H, s, 27-Me); 1,09 (3H, s, 28-Me); 1,04 (3H, s, 29-Me), 0,90 (3H, d, $J = 2,3$ Hz, 30-Me). Ngoài ra, phô ¹H-NMR của 3 còn cho biết thêm một số tín hiệu proton khác như 2 proton H-2 ở δ_H 2,70 (1H, dt, $J = 6,5$ và 14,0 Hz, H-2) và 2,3 (1H, dt, $J = 3,5$ và 14,0 Hz, H-2); proton H-5 ở δ_H 1,70 (1H, dd, $J = 4,5$ và 12,3 Hz, H-5); proton H-19a,b thuộc vòng cyclopropan ở δ_H 0,78 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, H-19a) và 0,57 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-19b).

Phô ¹³C-NMR và DEPT (125 MHz, CDCl₃) của 3 cho biết trong phân tử có tổng cộng 30 nguyên tử C gồm 8 carbon bậc 4 với 2 carbon carbonyl, 1 nhóm carbonyl ở δ_C 216,63 (C-3) và 1 nhóm carboxyacarbonyl ở δ_C 173,32 (C-26); 1 carbon olefin ở δ_C 126,67 (C-25); 5 carbon bậc 4 còn lại ở các δ_C 50,23 (C-4); 21,06 (C-9); 25,91 (C-10); 45,38 (C-13) và 48,74 (C-14); 5 carbon bậc 3 ở các δ_C 145,75 (carbon olefin C-24); 48,42 (d, C-5); 47,85 (C-8); 52,21 (C-17), và 35,95 (d, C-20); 11 carbon bậc 2 ở các δ_C 33,41 (C-1), 37,45 (C-2); 21,49 (C-6); 28,14 (C-7), 25,97 (C-11); 32,79 (C-12); 35,53 (C-15); 26,70 (C-16); 29,54 (C-19); 34,77 (C-22); 25,85 (C-23); và 6 nhóm methyl (carbon bậc 1) ở các δ_C 18,10 (C-18); 18,10 (C-21); 11,94 (C-27); 20,76 (C-28); 22,18 (C-29) và 19,29 (C-30). Trên phô HMBC của 3 có thể quan sát thấy các tương tác xa như hình 1. Qua phân tích các phô của 3 như trên, các số liệu phô của 3 được gần và tổng kết trong bảng 1. Các số liệu này hoàn toàn phù hợp với số liệu phô của axit mangiferonic (axit 3-oxocycloart-24E-en-26-oic) trong tài liệu [5]. Do vậy, chất 3 được xác định là axit mangiferonic.

Hợp chất 4: Chất bột rắn trắng (37,1 mg), có $R_f = 0,69$ (hệ dung môi cloroform:methanol (9:1), điểm nóng chảy 196-197°C.

Phô ESI-MS negative của 4 cho pic giả phân tử

[M-H]⁻ ở m/z 469, phù hợp với công thức phân tử C₁₉H₃₀O₁.

Phô ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) cho một số tín hiệu proton như các proton olefin ở δ_H 6,82 (1H, dt, $J = 7,0$ và 14,5 Hz, H-24) và 4,82 (1H, s, H-28a); 4,73 (1H, s, H-28b); 5 nhóm methyl với các proton ở δ_H 0,97 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-21); 1,83 (3H, s, H-27); 1,69 (3H, s, H-29) và 0,95 (3H, s, H-30). Ngoài ra, còn quan sát thấy tín hiệu proton của nhóm metilen (CH₂) thuộc vòng cyclopropan ở δ_H 0,73 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-19a) và 0,41 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-19b)

Phô ¹³C-NMR và DEPT (125 MHz, CDCl₃) của 4 cho biết trong phân tử có tổng cộng 30 nguyên tử C (phô hợp với công thức phân tử thu được từ phô ESI/MS) gồm 8 carbon bậc 4 với 2 carbon cacboxyl ở các δ_C 176,5 (C-3) và 170,81 (C-26); 6 carbon bậc 4 còn lại ở các δ_C 149,34 (C-4); 21,88 (C-9); 25,91 (C-10); 45,38 (C-13), 48,74 (C-14) và 126,89 (C-25); 5 tín hiệu của các C bậc 3 ở các δ_C 45,65 (C-5); 47,53 (C-8); 51,96 (C-17); 35,79 (C-20) và 143,97 (C-24); 12 tín hiệu carbon bậc 2 (CH₂) ở các δ_C 28,79 (C-1); 31,20 (C-2); 27,56 (C-6); 28,14 (C-7); 26,72 (C-11); 34,66 (C-12); 35,53 (C-15); 27,86 (C-16); 29,77 (C-19); 35,39 (C-22); 25,59 (C-23) và 111,19 (C-28); 5 nhóm methyl (CH₃) với các tín hiệu carbon ở các δ_C 17,84 (C-18), 17,84 (C-21), 11,84 (C-27); 19,47 (C-29) và 19,04 (C-30). Các tương tác xa quan sát được từ phô HMBC của 4 xem hình 1. Đem so sánh các dữ liệu phô của 4 với số liệu phô NMR của axit nigranoic thu được từ các loài *Schisandra sphaerandra*, *Schisandra henryi* và *Schisandra lanceifolia* trong các tài liệu [6, 7, 9] cho thấy chúng hoàn toàn phù hợp. Do đó, chất 4 được xác định là axit nigranoic (axit 3,4-secocycloarta-2(8),24-dien-3,26-dioic) (hình 1).

Hợp chất 5: Chất rắn màu trắng, vô định hình (30,0 mg), có $R_f = 0,45$ (hệ dung môi cloroform:methanol (9:1), điểm nóng chảy 157-158°C.

IR: (v_{max} cm⁻¹): 3400, 3028, 2850, 1702, 1685.

Phô ESI-MS negative của 5 cho pic giả phân tử [M-H]⁻ ở m/z 487, phù hợp với công thức phân tử M = C₁₉H₄₈O₅.

Phô ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-MeOD) của 5 cho một số tín hiệu proton đặc trưng là: tín hiệu của một proton olefin xuất hiện ở δ_H 6,83 (1H, dt, $J = 1,0$ và 7,0 Hz, H-24); các tín hiệu proton của 6 nhóm methyl ở δ_H 0,96 (3H, s, 18-Me); 0,89 (3H, d, $J = 10,5$ Hz, 21-Me); 1,83 (3H, s, 27-Me), 0,92 (3H, s, 28-Me); 1,23 (3H, s, 29-Me) và 1,22 (3H, s, 30-Me); các tín hiệu proton của 1 nhóm metilen (CH₂) thuộc vòng cyclopropan ở trường cao tại δ_H 0,68 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-19a), 0,56 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-19b); Ngoài ra, kết hợp với phô HMBC của 5 có thể nhận dạng được các tín hiệu proton của nhóm metilen (CH₂) tại các δ_H 2,67 (2H, dt, $J = 5,5$ và 15,0 Hz, H-1) và 2,58 (2H, dt, $J = 5,5$ và 15,5 Hz, H-2); tín hiệu

của nhóm metin (CH) σ δ_H 1.70 (1H, dd, J = 4.5 và 12.3 Hz, H-5).

Phô ¹³C-NMR và DEPT của hợp chất 5 cho biết trong phân tử có tổng số 30 cacbon, trong đó có 6 nhóm methyl, 12 nhóm metilen, 5 nhóm metin và 8 cacbon bậc 4 phù hợp với công thức phân tử thu được từ phô ESI/MS. Các dữ kiện phô của chất 5 gần giống với các dữ kiện phô của chất 4. Cũng tương tự như hợp chất 4, phô ¹¹H và ¹³C-NMR cũng chỉ ra sự có mặt của một nhóm CH thuộc nối dõi olefin xuất hiện ở δ_H 6.83 (1H, dt, J ~ 1.0 và 7.0 Hz, H-24) và δ_C 126.96 (C-24); 143.99; (C-25). Trong phô ¹³C-NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai nhóm C=O axit (δ_C 177.41; C-3 và δ_C 170.68, C-26). Khác với hợp chất 4, o hợp chất 5 tín hiệu của nhóm metilen liên kết với C-4 được thay thế bởi một nhóm methyl (CH₃) và một nhóm hydroxi (OH) liên kết với C-4 làm thay đổi độ diech chuyên hóa học của C-4 về trường thấp (δ_C 76 ppm). Các tín hiệu của các cacbon khác trong phân tử 5 thay đổi không nhiều so với các tín hiệu tương ứng của chất 4. Phân tích các phô ¹¹H, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC của chất 5 cho phép gán các tín hiệu của các proton và các cacbon tương ứng trong hợp chất 5 (bảng 1). Các tương tác HMBC được chỉ ra trên hình 1. Dем các số liệu thu được như trên so sánh với các số liệu phô NMR của axit lancifolic phân lập được từ loài *Schisandra lancifolia* đã được công bố trong tài liệu [8] cho thấy chúng có sự phù hợp hoàn toàn. Do vậy, hợp chất 5 được xác định là axit lancifolic (4-hydroxy-3,4-secoecloart-24(E)-en-3,26-oic axit).

4. KẾT LUẬN

Tùy chọn chiết *n*-hexan và etyl acetat của thân cây Na leo *Kadsura coccinea* (Schisandraceae) bằng các phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp tinh chế kết tinh lại trong dung môi thích hợp, năm hợp chất β-sitosterol (1), 3β-O-β-sitosterol-glucopyranosid (2), axit mangiferonic (axit 3-oxocycloart-24E-en-26-oic) (3), axit nigranoic (axit 3,4-secoecloart-4(28),24-dien-3,26-dioic (4), và axit lancifolic (axit 4-hydroxy-3,4-secoecloart-24E-en-3,26-oic) (5) đã được phân lập. Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng các phương pháp phô như: phô hồng ngoại, phô khối lượng và phô công hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Ba hợp chất 3, 4 và 5 được phát hiện lần đầu tiên từ loài *Kadsura coccinea* ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự giúp đỡ kinh phí của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia Nafosted NCCB, mã số 104.01-2010.23

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tiến Bán. *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tập 2, 135-137 (2005).
- Võ Văn Chi. *Tác Dụng Cây thuốc Việt Nam*. Nhà Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội 63-64 (1999)
- Jia-Sen Liu and Liang Li. *Schisantherin L-O and Acetylschisantherin L from Kadsura coccinea*. *Phytochemistry*, 32(5), 1293-1296 (1993)
- Ninh Khoa Ban, Bui Van Thanh, Phan Van Kiem, Chau Van Minh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Xuan Nhieu, Hoang Thanh Huong, Ha Tuan Anh, Eun-Jeon Park, Dong Ilwan, Sohn, Young Ho Kim. *Dibenzo(cyclooctadiene Lignans and Lanostane Derivatives from the Roots of Kadsura coccinea and their Protective Effects on Primary Rat Hepatocyte Injury Induced by t-Butyl Hydroperoxide*. *Planta Med*. 69(11), 1266-1272 (2009).
- V. Anjaneyulu, P. Satyanarayana, K.N. Viswanadham, V.G. Jyothi, K. Nagaswara Rao, P. Radhika. *Triterpenoids from Mangifera indica*. *Phytochemistry*, 50, 1229-1236 (1999)
- Han-dong Sun, Sheng-xiang Qiu, Long-ze Lin, Zong-Yi Wang, Zhong-wen Lin, Thituma Pengsuparp, John M. Pezzuto, Harry H.S. Fong, Geoffrey A. Cordell and Norman R. Farnsworth. *Aglyconic acid triterpenoid from Schisandra sphaerandra that inhibits HIV-1 reverse transcriptase*. *J Nat Prod*. 59, 525-527 (1996)
- Ye-Gao Chen, Zheng-Cai Wu, Yu-Ping Lv, Shi-Hong Gui, Jin Wen, Xin-Rong Liao, Li-Ming Yuan and Fathi Halawehi. *Triterpenoids from Schisandra henryi with cytotoxic effect on Leukemia and HeLa cells in vitro*. *Arch Pharm Res*. 26(11), 912-916 (2003).
- Wei-Lie Xiao, Ren-Rong Tian, Jian-Xin Pu, Xian Li, Li Wu, Yang Lu, Sheng-Hong Li, Rong-Tao Li, Yong-Tang Zheng, Qi-Tai Zheng and Han-Dong Sun. *Triterpenoids from Schisandra lancifolia with anti-HIV-1 activity*. *J Nat Prod*. 69, 277-279 (2006)
- I. S. Martin, K. Ohtani, R. Kasai, & Yamasaki. *Phytochemistry*, 42, 153-158 (1996)

Lời hè Phan Văn Kiệm

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

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Email: phankiem@vast.ac.vn