CÁC HỢP CHẤT FLAVANOL PHÂN LẬP TỪ CÂY KHÁO *PHOEBE TOVOYANA* (MEISSN.) HOOK. F.

Phạm Hải Yến, Hoàng Lê Tuấn Anh, Dương Thị Dung, Châu Văn Minh, Nguyễn Xuân Nhiệm Đan Thị Thúy Hằng, Dương Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Cúc, Ninh Khắc Bản, Phan Văn Kiệm*

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

Đến Tòa soạn 16-7-2012

Abstract

From the methanol extract of *Phoebe tovoyana*, three compounds: (-)-catechin (**1**), (+)-epicatechin (**2**), and proanthocyandin A-2 (**3**) were isolated by various chromatography methods. Their chemical structures were elucidated by ESI-MS, 1D, 2D NMR experiments and in comparison with previous reported data.

Keyword: *Phoebe tovoyana*.

1. MỞ ĐẦU

Cây Kháo (Sụ lá to, Bời bời cơm) có tên khoa học là *Phoebe tovoyana* (Meissn.) Hook.f. thuộc họ Long não (Lauraceae). Chi Kháo có khoảng 23 loài, phân bố ở miền Nam Trung Quốc và miền Bắc Việt Nam. Cây thường phân bố ở độ cao 700-2500 m. Ở nước ta, cây kháo phân bố nhiều ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc và Như Xuân, Thanh Hóa [1].

Trên thế giới chưa có công bố nào về thành phần hóa học của loài này. Ở Việt Nam, năm 2005 hai tác giả Nguyễn Văn Hùng và Nguyễn Văn Tuyên [2] đã công bố 7 hợp chất ancaloit phân lập từ vỏ thân cây kháo thu hái ở Như Xuân, Thanh Hóa là: corydin, pronuciferin, anonain, norcorydin, stepharin, N-metyllaurotetenin và N-metyllaurolitsin [2]

Bài báo này thông báo việc phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3 hợp chất flavanol từ cây kháo (*P. tovoyana*). Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu thực vật

Mẫu lá cây kháo (*Phoebe tovoyana*) thu tại vườn Quốc gia Tam Đảo vào tháng 8 năm 2011 và được PGS. TS. Ninh Khắc Bản giám định. Mẫu tiêu bản lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Hóa chất thiết bị

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715), RP18 F254s (Merck); phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 µm, FuJisilisa Chemical Ltd.).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Đo trên máy Bruker AM500 của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ khối lượng (ESI-MS): Đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phân lập các chất

Lá cây kháo được phơi khô, nghiền thành bột (5,0 kg), ngâm chiết với metanol ba lần, sau đó loại dung môi thu được 300 g cặn chiết metanol. Cặn này được hoà tan vào 3 lít nước cất và chiết lần lượt bằng hexan, cloroform và etyl axeat. Sau khi loại dung môi dưới áp suất thấp thu được cặn hexan (50 g), cloroform (90 g), etyl axetat (75 g) và nước (85 g).

Cặn etyl axetat được tẩm vào 150 g Silica gel, cô đuổi dung môi cho đến khi thu được bột tơi, khô sau đó tiến hành phân lập bằng sắc ký cột nhồi Silica gel pha thường cỡ hạt 230-400 mesh (0,04-0,063 mm), rửa giải bằng hệ dung môi clorofoc/metanol với độ phân cực tăng dần (từ 20/1-2/1, v/v) thu được 5 phân đoạn chính là F1 (20,0 g), F2 (12,5 g), F3 (8,5 g), F4 (12,0 g) và F5 (18,0 g). Phân đoạn F1 (20,0 g) được tiến hành sắc ký trên cột nhồi Silica gel với hệ dung môi rửa giải là clorofoc/metanol (10/1, v/v) thu được hợp chất 1 (20 mg) và hợp chất 2 (30 mg). Phân đoạn F2 (12,5 g) được tiếp tục phân lập bằng sắc ký cột Silica gel với hệ dung môi rửa giải là clorofoc/metanol/axit formic (80/10/1, v/v/v) thu được 4 phân đoạn F2A (5,5 g), F2B (1,4 g), F2C (3,7 g) và F2D (1,6 g). Phân đoạn F2A (1,5 g) được phân lập bằng cột Silica gel với hệ dung môi clorofoc/axeton/axit formic (10/20/1, v/v/v) thu được hợp chất 3 (35 mg).

(-)-Epicatechin (1): tinh thể màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 242°C. Độ quay cực $[\alpha]^{25}_D$: -68 (EtOH, *c*: 1,0). ESI-MS *m/z* 313 $[M+Na]^+$, 289 $[M-H]^-$, công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_6$, M = 290.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4,83 (1H, s, H-2), 4,19 (1H, m, H-3), 2,77 (1H, dd, *J* = 16,5, 2,5 Hz, H_a-4), 2,89 (1H, dd, *J* = 16,5, 4,5 Hz, H_b-4), 5,94 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 5,97 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 7,00 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,77 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5') và 6,83 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6'). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 79,8 (C-2), 67,4 (C-3), 29,2 (C-4), 157,6 (C-5), 95,9 (C-6), 157,3 (C-7), 96,4 (C-8), 157,9 (C-9), 100,1 (C-10), 132,2 (C-1'), 115,9 (C-2'), 145,9 (C-3'), 145,7 (C-4'), 115,3 (C-5') và 119,4 (C-6').

(+)-Catechin (2): Tinh thể màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 93-96°C. Độ quay cực: $[\alpha]^{25}_D$: +17 (EtOH, *c*: 1,0). ESI-MS *m/z*: 313 $[M+Na]^+$, 289 $[M-H]^-$, công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_6$, M = 290.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 4,57 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-2), 3,99 (1H, m, H-3), 2,53 (1H, dd, *J* = 16,0, 8,5 Hz, H_a-4), 2,88 (1H, dd, *J* = 16,0, 5,5 Hz, H_b-4), 5,87 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-6), 5,94 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-8), 6,86 (1H, d, *J* = 1,5 Hz, H-2'), 6,77 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5') và 6,74 (1H, dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, H-6').

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 82,9 (C-2), 68,8 (C-3), 28,5 (C-4), 157,6 (C-5), 96,3 (C-6), 157,8 (C-7), 95,6 (C-8), 156,9 (C-9), 100,9 (C-10), 132,3 (C-1'), 115,3 (C-2'), 146,3 (C-3'), 146,3 (C-4'), 116,1 (C-5') và 120,0 (C-6').

Proanthocyanidin A-2 (3): Tinh thể hình kim không màu, nhiệt độ nóng chảy 273°C. Độ quay cực $[\alpha]_D$: +55,63° (*c* 1,0, axeton). ESI-MS *m/z* 577 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{30}H_{24}O_{12}$, M = 576.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), xem bảng 1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 thu được dưới dạng tinh thể màu vàng, phổ khối lượng xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 313 $[M+Na]^+$ và 289 $[M-H]^-$ kết hợp với phổ NMR dự đoán công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$. Phổ ^{1}H-NMR của chất 1 xuất hiện tín hiệu của hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại *δ* 5,94 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6) và 5,97 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), đồng thời cũng xác định sự xuất hiện của một vòng thơm thế kiểu 1,3,4 xác định bởi các tín hiệu tại *δ* 7,00 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,77 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5') và 6,83 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6'). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của hai nhóm metin có nối với nguyên tử ôxi tại δ 4,83 (1H, s, H-2) và *δ* 4,19 (1H, m, H-3) và hai proton của nhóm metylen tại *δ* 2,77 (1H, dd, *J* = 16,5, 2,5 Hz, H_a-4), 2,89 (1H, dd, *J* = 16,5, 4,5 Hz, H_b-4). Phổ ^{13}C-NMR của chất 1 xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon đặc trưng của một hợp chất flavon, trong đó tín hiệu của hai nhóm metin tại *δ* 79,8 và 67,4 tương ứng phù hợp với vị trí C-2 và C-3 của khung 3*α*-hydroxyflavan. Tín hiệu H-2 xuất hiện ở dạng singlet khẳng định proton H-2 và H-3 cùng chiếm vị trí *β* [3]. So sánh các dữ kiện phổ của hợp chất 1 với các dữ kiện phổ của (-)-epicatechin cho thấy sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy chất 1 được khẳng định là (-)-epicatechin, một hợp chất đã được phân lập từ nhựa loài *Croton lechleri* [3].

Hợp chất 2 thu được dưới dạng tinh thể màu vàng, phổ khối lượng xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 313 $[M+Na]^+$ và 289 $[M-H]^-$ gợi ý công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$. Phổ ^{1}H-NMR của 2 khá giống với 1, trong đó có hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại δ 5,87 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-6) và 5,94 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-8); một vòng thơm bị thế 1,3,4 được khẳng định bởi các tín hiệu tại δ 6,86 (1H, d, *J* = 1,5 Hz, H-2'), 6,77 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5') và 6,74 (1H, dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, H-6'); hai nhóm metin có nối với nguyên tử ôxi tại δ 4,57 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-2) và 3,99 (1H, m, H-3); hai proton của nhóm metilen tại *δ* 2,53 (1H, dd, *J* = 16,0, 8,5 Hz, H_a-4) và 2,88 (1H, dd, *J* = 16,0, 5,5 Hz, H_b-4).

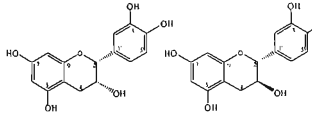
Phổ ^{13}C-NMR của chất 2 cũng xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon của một hợp chất flavon, trong đó tín hiệu của hai nhóm metin tại δ 82,9 và 68,8 tương ứng phù hợp với C-2 và C-3 của khung 3*β*-hydroxyflavan. So sánh các dữ kiện phổ của hợp chất 2 với các dữ kiện phổ của chất (+)-catechin [3] thấy có sự phù hợp hoàn toàn. Từ những phân tích nêu trên, hợp chất 2 được khẳng định là (+)-catechin, một thành phần quan trọng của tannin

trong lá chè xanh đã được chứng minh có tác dụng chống oxi hóa hiệu quả [5].

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của **3** và của proanthocyanidin A-2

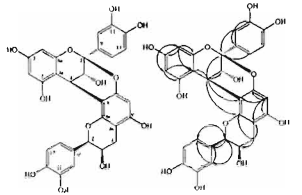
C	*δ	δ_C[a,b]	δ_H[a,c]	HMBC (H→C)
2	100,21	100,2	-	
3	68,12	68,1	4,08 d (3,5 Hz)	4a
4	29,31	29,3	4,43 d (3,5 Hz)	2, 3, 4a, 8', 8'a
4a	104,29	104,3	-	
5	157,05	157,0	-	
6	98,34	98,4	6,03 d (2,0 Hz)	4a, 5, 8
7	158,16	158,2	-	
8	96,67	96,7	6,09 d (2,0 Hz)	4a, 6, 7, 8a
8a	154,31	154,3	-	
9	132,50	132,5	-	
10	115,66	115,7	7,16 d (2,0)	2, 9, 11, 14
11	146,34	146,3	-	
12	145,69	145,7	-	
13	116.08	116,1	6,84 d (8,0)	
14	120,41	119,8	7,04 dd (8,0, 2,0)	2
2'	81,81	81,8	4,95 s	9'
3'	67,02	67,0	4,26 m	
4'	29,93	29,9	2,78 dd (17,0, 3,2) 2,98 dd (17,0, 4,5)	2', 4', 4'a, 8'a
4'a	102,46	102,5	-	
5'	156,65	156,6	-	
6'	96,53	96,6	6,11 s	4'a, 5', 8', 8'a
7'	152,34	152,3	-	
8'	107,25	107,3	-	
8'a	152,18	152,2	-	
9'	131,24	131,2	-	
10'	115,70	115,7	7,18 d (2,0)	2', 9', 14'
11'	146,80	146,8	-	
12'	146,03	146,1	-	
13'	115,97	115,9	6,82 d (8,0)	
14'	119,81	120,4	7,01 dd (8.0, 2,0)	2'

*δ_C của proanthocyanidin A-2 đo trong CD_3OD, 67,5 MHz [4], [a]đo trong CD_3OD, [b]125 MHz, [c]500 MHz.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất **1** và **2**

Chất **3** phân lập được dưới dạng tinh thể hình kim không màu. Độ quay cực $[\alpha]^{25}_D$ = +55,63° (axeton, *c*: 1,08). Công thức phân tử được xác định là $C_{30}H_{24}O_{12}$ bằng phổ khối lượng với sự xuất hiện pic ion tại *m/z* 557 $[M+H]^+$. Phổ NMR của chất **3** xuất hiện các tín đặc trưng cho cấu trúc proanthocyanidin, một cấu trúc dạng biflavanol. Trên phổ ^{1}H-NMR của chất **3** xuất hiện hai tín hiệu



Hình 2. Cấu trúc và tương tác HMBC của **3**

đặc trưng cho vị trí nối vòng AB tại δ 4,08 (1H, d, H-3) và 4,43 (1H, d, H-4) với hằng số tương tác J = 3,5 Hz; hai proton thơm ở vị trí *meta* của vòng A tại δ 6,03 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-6) và 6,09 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8); một proton thơm duy nhất của vòng D xuất hiện dưới dạng tín hiệu singlet tại δ 6,11 (1H, s, H-6'); còn lại là các tín hiệu của 6 proton thơm của vòng B và E nằm trong khoảng δ 6,82-7,18 ppm. Trên phổ ^{13}C-NMR và DEPT của chất **3** xuất hiện tín hiệu của 30 nguyên tử cacbon. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các nguyên tử cacbon của **3** khá tương đồng với **1** và **2**. Trong đó có 13 nhóm metin tại δ 68,1 (C-3), 29,3 (C-4), 98,4 (C-6), 96,7 (C-8), 115,7 (C-10), 116,1 (C-13), 119,8 (C-14), 81,8 (C-2'), 67,0 (C-3'), 96,6 (C-6'), 115,7 (C-10'), 115,9 (C-13') và 120,4 (C-14'); một nhóm metilen tại δ 29,9 (C-4') và 16 cacbon không nối với nguyên tử hiđrô nào xuất hiện tại δ 100,2 (C-2), 104,3 (C-4a), 157,0 (C-5), 158,2 (C-7), 154,3 (C-8a), 132,5 (C-9), 146,3 (C-11), 145,7 (C-12), 102,5 (C-4'a), 156,6 (C-5'), 152,3 (C-7'), 107,3 (C-8'), 152,2 (C-8'a), 131,2 (C-9'), 146,8 (C-11') và 146,1 (C-12'). Đáng chú ý là độ chuyển dịch hóa học của cacbon tại vị trí C-2 (δ 100,2) cao hơn bình thường (khoảng 81-83 ppm) và vị trí C-4 là cacbon bậc 3 cho phép ta dự đoán vị trí nối giữa 2 đơn vị flavanol là C-2→O→C-7' và C-4→C-8'. Bên cạnh đó, mỗi hợp phần flavanol của **3** được xác định là (-)-epicatechin và (+)-catechin bằng việc so sánh dữ kiện phổ ^{13}C-NMR của chất **3** với hợp chất proanthocyanidin A-2 [4]. Để xác định chính xác cấu trúc của khung và vị trí các liên kết chúng tôi tiến hành đo phổ 2 chiều HSQC và HMBC. Các tương tác trên phổ HMBC giữa H-4 (δ 4,43) với C-2/C-3/C-4a/C-8'/C-8'a khẳng định vị trí nối giữa C-4 (vòng C) với C-8' (vòng D). Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HSQC và HMBC (hình 2) một lần nữa khẳng định hợp chất **3** có cấu trúc gồm phân tử epicatechin liên kết với catechin. Từ những phân tích nêu trên cùng với việc so sánh các dữ kiện phổ của **3** với các dự liệu phổ tương ứng đã công bố [4], hợp chất **3** được xác định là proanthocyanidin A-2, một hợp chất đã được phân lập từ vỏ loài *Arachis hypogaea* [4].

4. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp, ba hợp chất (-)-epicatechin (**1**), (+)-catechin (**2**) và proanthocyanidin A-2 (**3**) đã được phân lập từ lá cây khảo (*Phoebe tovoyana*). Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1 Võ Văn Chi. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, 696-697 (1999).

2. Nguyễn Văn Hùng, Nguyễn Văn Tuyến. *Các hợp chất aporphin ancaloit từ cây khảo (su lá to). Phoebe tovoyana (Meissn.)* Hook F. *(Ho Long não)*. Tạp chí Hóa học, **43(5)**, 586-589 (2005).

3. Y. Cai, F. J. Evans, M. F. Roberts, J. D. Phillipson, M. H. Zenk and Y. Y. Gleba. *Polyphenolic compounds from Croton lechleri*, Phytochemistry, **30(6)**, 2033-2040 (1991).

4 H. Lou, Y. Yamazakib, T. Sasaki, M. Uchida, H. Tanaka. *A-type Proanthocyanidins from peanut skins*, Phytochemistry, **51**, 297-308 (1999).

5 S. Tsukamoto, K. Hirotsu, M. Kumazoe, Y. Goto, K. Sugihara, T. Suda, Y. Tsurudome, T. Suzuki, S Yamashita, Y. Kim, Y. Huang, K. Yamada, H. Tachibana. *Green tea polyphenol EGCG induces lipid-raft clustering and apoptotic cell death by activating protein kinase Cδ and acid sphingomyelinase through a 67 kDa laminin receptor in multiple myeloma cells*, Biochem J., **443(2)**, 525-34 (2012).

Liên hệ: **Phan Văn Kiệm**

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: phankiem@vast.ac.vn.

Điện thoại: 0983555031.