TẠP CHÍ HÓA HỌC 53(6) 786-789 THÁNG 12 NĂM 2015
DOI: 10.15625/0866-7144.2015-00221

VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CÂY NGOẠI MỘC TÁI (*ALLOPHYLUS LIVESCENS* GAGNEP.) THU HÁI TẠI VÙNG VỊNH HẠ LONG

Khiếu Thị Tâm[1], Đào Đức Thiện[2], Nguyễn Thị Hoàng Anh[2*], Trịnh Thị Thủy[2], Trần Văn Lộc[2], Trần Văn Sung[2]

[1]*Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái nguyên*

[2]*Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Đến Toà soạn 02-10-2015; Chấp nhận đăng 20-12-2015

Abstract

Allophylus livescens Gagnep, a flowering plant of Sapindaceae family. It is an endemic plant growing in limestone mountains of Halong bay. Until now, there have been no phytochemical and biological activity works about this species. This is the first report on the isolation and structural elucidation of five constituents from *A. livescens*'s leaves and twigs. These compounds named: 1,6,10,14-phytatetraene-3-ol, catechin, stigmasterol, β-sitosterol and β-sitosterol glucoside. The cytotoxic assay on five human cancer cell lines (KB, Hep G2, LU-1, MCF-7, SK) of compound 1,6,10,14-phytatetraene-3-ol showed negative result.

Keywords. *Allophylus livescens* Gagnep, endemic, 1,6,10,14-phytatetraene-3-ol.

1. MỞ ĐẦU

Vịnh Hạ Long, hai lần là di sản thiên nhiên thế giới và vừa được chọn là một trong bảy kỳ quan thiên nhiên thế giới mới, là nơi chứa đựng đầy đủ các giá trị về địa chất, địa mạo và đa dạng sinh học. Cho đến nay, 17 loài thực vật đặc hữu của Vịnh Hạ long đã được phát hiện [1], trong đó có cây Ngoại mộc tái (*Allophylus livescens* Gagnep.). Đây là một loài thực vật có hoa thuộc chi Ngoại mộc (*Allophylus* L.), một trong các chi lớn nhất của họ Bồ hòn (Sapindaceae). Cho đến nay, thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của cây này chưa được nghiên cứu. Chi *Allophylus* L. gồm khoảng 200 loài, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Một số loài thuộc chi này được sử dụng làm thuốc ở trên thế giới, ví dụ như loài *Allophylus serratus* dùng làm thuốc chống viêm, thuốc tống hơi, chữa bệnh sùi da, phù thũng, gãy xương và làm thuốc bổ [2] ở Ấn Độ. Y học dân gian vùng đông Bangladesh sử dụng *A. cobbe* làm thuốc chữa tiêu chảy [3]. *A. africanus* cùng với 5 loài thuộc họ Bồ hòn được sử dụng trong dân gian làm thuốc chữa vết thương, kháng viêm và bệnh truyền nhiễm [4]. Kết quả nghiên cứu hóa học một số loài thuộc chi này (*A. longipes*, *A. serratus*, *A. edulis*, *A. cobbe*,...) cho thấy chúng là nguồn chứa các lớp chất phenolic, flavonoid, tannin, saponin, axit béo, và đặc biệt là cyanolipid [2]. Dầu hạt loài *A. natalensis* và *A. dregenus* giàu các hợp chất cyanolipid [5]. Ngoài ra, một số lớp chất, hợp chất mới cũng đã được tìm thấy, ví dụ như các α-transpolyprenol, alloprenol phân lập từ loài *A. caudatus* hay sesquiterpen 11-acetoxy-4-α-methoxyeudesman từ loài *A. laevigatus* [2, 6]. Mặc dù các kết quả về chi *Allophylus* đáng quan tâm như nêu trên, nhưng 24 loài *Allophylus* của Việt nam [7, 8] hầu như đều chưa được nghiên cứu. Kết quả khảo sát thành phần hóa học cao chiết n-hexan và etyl axetat của lá và cành cây Ngoại mộc tái thu được 5 hợp chất. Cấu trúc của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ kết hợp như MS, NMR và so sánh với tài liệu tham khảo là 1,6,10,14-phytatetraen-3-ol (**1**), catechin (**2**), stigmasterol (**3**), β-sitosterol (**4**) và β-sitosterol glucosid (**5**). Đây là công bố đầu tiên về loài *A. livescens*.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

Sắc ký bản mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F_{254} (Merck) và RP_{18} F_{254} (Merck), thuốc thử Vanilin/H_2SO_4. Sắc ký cột được thực hiện trên chất hấp phụ pha thường (Silica gel

230-400 mesh (0,040-0,063 mm, Merck, Darmstadt, Germany), Sephadex LH-20.

Phổ khối được đo trên máy HP 5989B-MS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Chiết tách và phân lập

600 g lá và cành cây Ngoại mộc tái khô được xay nhỏ và ngâm chiết 4 lần với metanol:nước (95:5) ở nhiệt độ phòng. Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm, dịch nước còn lại được chiết lần lượt với *n*-hexan, etyl axetat và butanol. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết tương ứng có khối lượng là 9, 8 và 26,3 g.

Cặn chiết *n*-hexan (9 g) được phân tách trên cột silica gel, hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan:EtOAc (95:5-0:100, v/v) thu được 11 phân đoạn, kí hiệu là H1–H11. Phân đoạn H3 (1,7 g) được tiếp tục tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:diclometan (95:5) thu được hợp chất **1** (1,3 g). Phân đoạn H4 (1,2 g) được đưa lên cột silica gel, giải hấp bằng hệ dung môi *n*-hexan:diclometan (90:10) thu được hỗn hợp chất **3** và **4** (30 mg) dưới dạng bột trắng.

Cặn chiết EtOAc (8g) được tinh chế bằng cột silica gel, hệ dung môi *n*-hexan với lượng etyl axetat tăng dần từ 1 đến 100 % thu được 9 phân đoạn (E1-E9). Phân đoạn E8 (1,7g) được tinh chế tiếp trên cột silica gel, hệ dung môi diclometan:metanol (95:5) thu được chất **2** (63 mg) và **5** (35 mg).

Chất **1**: dạng dầu, ESI-MS, *m/z* = 291 $[M+H]^+$, 273. $[M-OH]^+$. ^{1}H, ^{13}C NMR (500/125 MHz, $CDCl_3$), bảng 1.

Chất **3**: ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 3,51 (m, H-3); 5,34 (m, H-5); 0,92 (d, 6,5, CH_3-19); 5,01 (dd, 8,5; 15,0, H-20); 5,15 (dd, 8,5; 15,0, H-21); 0,84 (t, 7,2, CH_3-24); 0,83 (d, 6,5, CH_3-26), 0,80 (d, 6,6, CH_3-27), 0,70 (s, CH_3-28), 1,03 (s, CH_3-29).

Chất **4**: ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 3,51 (m, H-3); 5,34 (m, H-5); 0,92 (d, 6,5, CH_3-19); 0,85 (t, 7,2, CH_3-24); 0,83 (d, 6,5, CH_3-26); 0,81 (d, 6,6, CH_3-27); 0,68 (s, CH_3-28); 1,02 (s, CH_3-29).

2.3. Thử hoạt tính sinh học

Phép thử hoạt tính sinh học được thực hiện tại Phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hoạt tính gây độc tế bào được tiến hành theo phương pháp của Likhiwitayawuid [9] và Skehan [10] trên các dòng tế bào ung thư ở người: KB (biểu mô), HepG2 (gan), Lu (phổi), MCF7 (ung thư vú), SK (ung thư da).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng dầu. Phổ khối ESI-MS ion dương cho píc ion phân tử ở *m/z* = 291 $[M+H]^+$ và phân mảnh ở *m/z* = 273 $[M-OH]^+$. Phổ ^{1}H-NMR cho thấy tín hiệu của 6 olefinic proton, cộng hưởng trong vùng từ 5 đến 6 ppm; tín hiệu của 5 nhóm methyl ở δ_H = 1,27; 1,59; 1,68 (mỗi tín hiệu 3H, s) và 1,60 (s, 6H). Ngoài các tín hiệu trên, 12 aliphatic proton (1,25-2,09) cũng được quan sát thấy trong phổ. Các tín hiệu trong phổ ^{13}C-NMR hoàn toàn phù hợp với phổ ^{1}H-NMR, bao gồm 8 olefinic cacbon (δ_C = 111,61; 124,09; 124,20; 124,37; 131,16; 134,97; 135,49 và 145,05) của 4 nối đôi trong đó có 1 nối đôi thế 1 lần và 3 nối đôi thế 3 lần; một cacbon bậc 4 gắn với nguyên tử oxi (δ_C = 73,41), 5 nhóm metyl (δ_C = 15,96; 15,98; 17,63; 25,64 và 27,81) cùng với 6 nhóm aliphatic metylen. Vị trí kết nối của nhóm hydroxy ở C-3 được khẳng định qua tương tác của C-3 (δ_C = 73,41) với H-2 (δ_H = 5,91); H_2-1 (δ_H = 5,05 & 5,21); H_2-4 (δ_H = 1,55); H_2-5 (δ_H = 1,95-2,09) và H_3-16 (δ_H = 1,27) trong phổ HMBC. Các số liệu phổ phân tích trên đây, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [11] cho phép dự đoán chất **1** có cấu trúc là 1,6,10,14-phytatetraene-3-ol hay là geranyl linalool. Việc gán các số liệu phổ ^{1}H và ^{13}C (bảng 1) của chất **1** dựa vào việc phân tích phổ 1D và 2D NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [11]. Giá trị $[\alpha]_D$ = +13,06 (CH_2Cl_2, c 0,375), phù hợp với số liệu của (+)-(S)- geranyl linalool {$[\alpha]^{20}_D$ = +18,2 ($CHCl_3$, c 0,06)} trong tài liệu [11]. Chất này đã được phân lập trước đây từ nhiều chi khác nhau như *Picea*, *Laurencia*, *Reticulitermes*,... [8, 12].

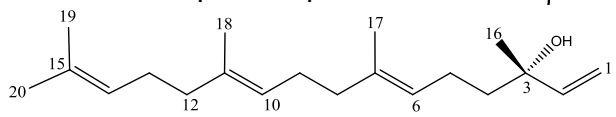
Chất **3** và **4** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ^{1}H NMR của nó cho biết đây là hỗn hợp của stigmaterol và β-sitosterol theo tỉ lệ 3:7, tương ứng. Điều này được chứng minh qua các tín hiệu sau: hai tín hiệu ở δ_H = 5,34 (m) và ở δ_H = 3,51 (m) có cường độ (integral) tương đương 1 proton là tín hiệu H-5 và H-3, tương ứng của chất **3** và **4**; tín hiệu ở δ_H = 5,15 (dd, 8,5; 15,0) và 5,01 (dd, 8,5; 15,0) với integral tương đương 0,3 H là tín hiệu H-20 và H-21 của stigmasterol. Bên cạnh đó, tín hiệu 6 nhóm methyl của mỗi chất **3** và **4** cũng được quan sát thấy trên phổ, chúng gồm có 2 tín hiệu singlet của nhóm methyl bậc ba (CH_3-28, CH_3-29), 3 tín hiệu doublet của nhóm methyl bậc hai (CH_3-19, CH_3-26, CH_3-27) và 1 tín hiệu triplet của nhóm methyl bậc một (CH_3-24). Các số liệu phổ phân tích trên đây của chất **3** và **4** (phần thực nghiệm) hoàn

toàn phù hợp với số liệu trong tài liệu [13]. Stigmaterol và β-sitosterol là 2 phytosterol tồn tại rất phổ biến trong thực vật, cấu trúc của chúng chỉ khác nhau ở một nối đôi nên khó tách từng chất riêng biệt, thường chúng được phân lập dưới dạng hỗn hợp với các tỉ lệ khác nhau.

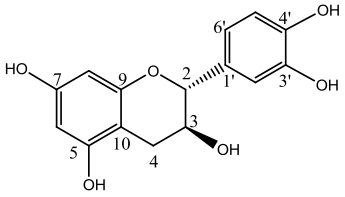
Chất **2** và **5** được xác định là catechin và β-sitosterol glucoside, tương ứng nhờ so sánh với chất chuẩn.

Theo tra cứu tài liệu của chúng tôi, đây là lần đầu tiên các chất 1,6,10,14-phytatetraen-3-ol (**1**) và catechin (**2**) được phân lập từ chi *Allophylus*.

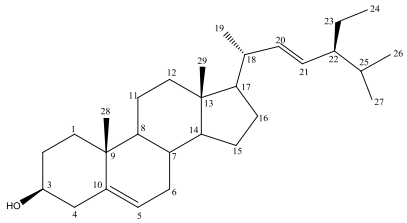
Chất **1** thể hiện kết quả âm tính khi thử hoạt tính gây độc tế bào trên 5 dòng tế bào ung thư ở người (KB, Hep G2, Lu, MCF–7, SK).



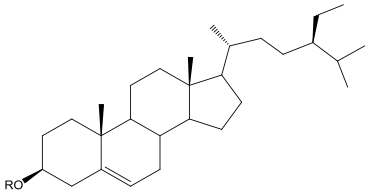
1: 1,6,10,14-phytatetraene-3-ol



2: Catechin



3: Stigmasterol



4: R = H, β-Sitosterol

5: R = Glucose, β-Sitosterol glucoside

Bảng 1: Số liệu phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của chất **1** (500 MHz và 125 MHz, $CDCl_3$)

Vị trí	^{1}H	^{13}C	Vị trí	^{1}H	^{13}C
1	5,21 d, 1H, 17,5 5,05 d, 1H, 11,0	111,61 CH_2	11	-	134,97 C
2	5,91 dd, 1H, (10,5 & 17,5)	145,05 CH	12	1,95-2,09 m	39,68 CH_2
3	-	73,41 C	13	1,95-2,09 m	26,73 CH_2
4	1,55 m, 2H	42,07 CH_2	14	5,11 t, 6,5	124,20 CH
5	1,95-2,09 m	22,68 CH_2	15	-	131,16 C
6	5,14 t, 1H, 7,0	124,37 CH	16	1,68 s, 3H	25,64 CH_3
7	-	135,49 C	17	1,59 s, 3H	17,63 CH_3
8	1,95-2,09 m	39,66 CH_2	18	1,27 s, 3H	27,81 CH_3
9	1,95-2,09 m	26,53 CH_2	19		15,96 CH_3
10	5,11 t, 6,5	124,09 CH	20	1,60 s, 6H, 2xCH_3	15,98 CH_3

Lời cảm ơn. *Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua Đề tài Nghiên cứu cơ bản mã số 104.01-2013.59.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. http://halongbay.com.vn/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=315&lang=vi.
2. Priya, E. Sanmuga; Selvan, P. Senthamil; Tamilselvan, R. *Phytochemical Investigation of Allophylus serratus* Kurz Leaves by UV and GC-MS Analysis. Research Journal of Phytochemistry, **6(1)**, 17-24 (2012).
3. Md. T. Islam, Md. Abdun Noor, Bijoy Karon, Rivelilson Mendes de Freitas. *In vitro antimicrobial and brine shrimp lethality of* Allophylus cobbe *L.* Ayu, An International Quarterty Journal of Research in Ayuveda, **33(2)**, 299-302 (2012).
4. M. O. Sofidiya, F. O. Jimoh, A. A. Aliero, A. J. Afolayan, O. A. Odukoya, O. B. Familoni. *Evaluation of antioxidant and antibacterial*

properties of six Sapindaceae members. J. Medicinal Plants Research, **6(1)**, 154-160 (2012).

5. P. Avato, I. Rosito, P. Papadia, F. P. Fanizzi. *Cyanolipid-rich seed oils from Allophylus natalensis and A. dregenus*, Lipids, **40(10)**, 1051-1056 (2005).
6. J. P. David, Ihanmarck D. dos Santos, Jorge M. David. *A new sesquitrepene from the fruits of Allophylus laevigatus*, Fitoterapia, **75**, 795-798 (2004).
7. Phạm Hoàng Hộ. *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ (1999).
8. CD Rom of Dictionary of Natural Products. Version 18.1.
9. Likhitwitayawuid K., Angerhofer C. K., Cordell G. A., & Pezzuto J. M. *Cytotoxic antimalarial bisbenzylisoquinoline aklaloids from Stephania erecta*. Journal of Natural Products, **56**, 30-38 (1993).
10. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., Mc Mahon J., Vistica D. Warren J. T. *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. Journal of the National Cancer Institute, **82**, 1107-1112 (1990).
11. Ales Svatos, Klára Urbanová, Irena Valterová. *The First Synthesis of Geranyllinalool enantiomers.* Collect. Czech. Chem. Commun., **67**, 83-90 (2002).
12. Alexandre Quintana, Judith Reinhard, Robert Faure, Paolo Uva, Anne-Genevi Eve Bagn Eres, Georges Massiot, Jean-Luc Clement. *Interspecific variation in terpenoid composition of defensive secretions of European Reticulitermes termites,* Journal of Chemical Ecology, **29(3)**, 639-652 (2003).
13. Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Indra Prakash. *Isolation of Stigmasterol and β-Sitosterol from the dichloromethane extract of Rubus suavissimus* International Curent Pharmaceutical Journal, **1(9)**, 239-242 (2012).

Liên hệ: **Nguyễn Thị Hoàng Anh**
Viện Hoá học
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
E-mail: hoanganhvhh@gmail.com; Điện thoại 04-32121149; Fax. 0084-4-8361283.