

NGHIÊN CỨU HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CÂY DIẾP CÁ SUỐI *GYMNOTHECA CHINENSIS* DECNE (SAURURACEAE)

I - CÁC HỢP CHẤT TRITECPEN

Đến Tòa soạn 4-4-2007

HÀ VIỆT SON, HOÀNG THANH HƯƠNG, NGUYỄN HỮU KHÔI

Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

Phytochemical investigation on *Gymnotheca chinensis* Decne growing in Vietnam led to the isolation of three pentacyclic tritecpenoids. On the basis of spectroscopic data, the structures of these compounds were established as 3β -hydroxy-olean-12-en (β -amyrin, I), 3β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid (ursolic acid, II) and 3β -acetoxy-urs-12-en-28-oic acid, (3β -acetoxy ursolic acid, III).

I - MỞ ĐẦU

Diếp cá suối (*G. chinensis* Decne, họ Saururaceae) là loài cây đặc hữu của Việt Nam, thường mọc chỗ ẩm mát ven suối miền núi Lạng Sơn và Ninh Bình [1]. Mặc dù được sử dụng nhiều trong y học dân tộc để trị các bệnh viêm nhiễm, lở loét, cảm sốt... song đến nay loài cây này chưa được nghiên cứu về hoá học và hoạt tính sinh học. Trong chương trình hợp tác với Viện Sinh học và Công nghệ Sinh học Hàn Quốc (KRIBB) về sàng lọc sinh hoá học các loài thảo dược Việt Nam chúng tôi nhận thấy dịch chiết metanol của cây diếp cá suối có tác dụng ức chế mạnh sự hoạt động của yếu tố phiên mã NF- κ B và có thành phần chính là các tritecpen và flavonoid. Tritecpenoid là lớp chất có nhiều hoạt tính sinh học lý thú như chống viêm, điều hoà miễn dịch, bảo vệ gan, ức chế sự phát triển của khối u, kìm hãm hoạt động của yếu tố phiên mã NF- κ B... [2]. Một số kết quả nghiên cứu về thành phần tritecpenoid cây diếp cá suối được trình bày trong bài báo này.

II - THỰC NGHIỆM

1. Phương pháp chung

Điểm nóng chảy được đo trên máy BOETIUS (Đức), độ quay cực được đo trên máy Polatronic D Schmidt + Haensch, phổ IR được ghi trên máy Impact 410-Nicolet FT-IR, phổ khối EI-MS được ghi trên máy HP 5989B, phổ khối ESI-MS được ghi trên máy LC/MSD Trap Agilent Series 1100, phổ 1D- và 2D-NMR ghi trên máy Bruker Avance 500.

2. Nguyên liệu

G. chinensis Decne (toàn bộ phần trên mặt đất của cây) được thu ở rừng Cúc Phương (tháng 1/2005). Mẫu tiêu bản được kỹ sư Vũ Văn Căn (trạm nghiên cứu vườn Quốc gia Cúc Phương) giám định tên khoa học và lưu giữ tại Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên.

3. Thử hoạt tính gây độc tế bào

Tiến hành theo phương pháp của Likhiwitayawuid và cs [3] đang được tiến hành tại Viện nghiên cứu ung thư Quốc gia Mỹ (NCI) trên dòng tế bào KB.

4. Phân lập và xác định cấu trúc các tritecpen

Bột nguyên liệu (2 kg) được chiết siêu âm với metanol trong 12 giờ. Cất loại dung môi,

thêm 100 ml nước và chiết lại với *n*-hexan, etyl axetat và *n*-butanol. Lắc phần cạn chiết etyl axetat với hỗn hợp clorofoc-nước (1:1). Sắc ký phần cạn chiết clorofoc trên cột silicagel với hệ dung môi *n*-hexan-clorofoc-axeton (35:40:40) cho bốn nhóm phân đoạn. Tiến hành sắc ký nhắc lại với nhóm phân đoạn 2 và tinh chế tiếp trên bản mỏng điều chế với hệ dung môi *n*-hexan-axeton 5:1 nhận được chất I (11,2 mg). Bằng sắc ký cột trên pha đảo RP-18 với các hệ dung môi metanol-nước (9:1) và axeton từ nhóm phân đoạn 3 nhận được các chất II (16,3 mg) và III (7,5 mg).

***Chất I:**

Tinh thể hình kim màu trắng, đ.n.c 197 - 198°C, $[\alpha]_D +91$ (c 0,5, CHCl₃).

EI-MS: m/z 426 [M]⁺, 408 [M-H₂O]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃): δ_H ppm 0,84 (3H, s, CH₃), 0,88 (12H, s, 4CH₃), 0,98 (6H, s, 2CH₃), 1,14 (3H, s, CH₃), 3,2 (1H, dd, J = 10,8 Hz, 4,2 Hz, H-3), 5,25 (1H, t, J = 3,5 Hz, H-12).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ_C ppm 38,8 (C-1), 27,8 (C-2), 78,9 (C-3), 39,1 (C-4), 55,4 (C-5), 18,6 (C-6), 33,0 (C-7), 40,0 (C-8), 48,0 (C-9), 36,9 (C-10), 23,8 (C-11), 122,2 (C-12), 145,0 (C-13), 42,1 (C-14), 27,5 (C-15), 26,0 (C-16), 32,8 (C-17), 48,2 (C-18), 46,7 (C-19), 31,2 (C-20), 34,2 (C-21), 37,0 (C-22), 28,1 (C-23), 15,7 (C-24), 17,3 (C-25), 17,3 (C-26), 26,2 (C-27), 27,5 (C-28), 33,4 (C-29), 23,5 (C-30).

***Chất II**

Tinh thể màu trắng, đ.n.c 285 - 287°C, $[\alpha]_D +67,8$ (c 0,5, CHCl₃).

EI-MS: m/z 456 [M]⁺.

ESI-MS: m/z 457,3 [M+1]⁺, 439,3 [M+1-H₂O]⁺.

IR(KBr): ν_{max} (cm⁻¹) 3456 (OH), 1693 (C=O), 1640 (C=C).

¹H-NMR (CDCl₃): δ_H ppm 0,78 (3H, s, H₃-25), 0,83 (3H, s, H₃-24), 0,86 (3H, d, J = 6,2 Hz, H₃-29), 0,92 (3H, s, H₃-26), 0,95 (3H, d, J = 5,9 Hz, H₃-30), 0,98 (3H, s, H₃-23), 1,09 (3H, s, H₃-27), 3,20 (1H, dd, J = 10,8 Hz, 4,1 Hz, H-3), 5,25 (1H, t, J = 3,5 Hz, H-12).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ_C ppm 38,8 (C-1), 27,0 (C-2), 79,0 (C-3), 39,0 (C-4), 55,3 (C-5), 18,6 (C-6), 33,1 (C-7), 37,2 (C-8), 48,0 (C-9), 39,5 (C-10), 23,3 (C-11), 125,0 (C-12), 138,0 (C-13), 42,2 (C-14), 31,0 (C-15), 24,5 (C-16), 48,3 (C-17), 53,5 (C-18), 39,2 (C-19), 39,0 (C-20), 30,8 (C-21), 36,8 (C-22), 28,0 (C-23), 16,0 (C-24), 15,5 (C-25), 15,7 (C-26), 23,6 (C-27), 181,0 (C-28), 17,1 (C-29), 21,2 (C-30).

***Chất III:**

Tinh thể hình kim màu trắng, đ.n.c 286 - 287°C, $[\alpha]_D + 61,8$ (c 0,5, CHCl₃).

EI-MS: m/z 498 [M]⁺, 454 [M-1-CH₃CO]⁺.

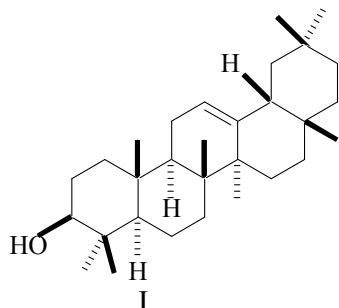
¹H-NMR (CDCl₃): δ_H ppm 0,76 (3H, s, CH₃), 0,78 (3H, s, CH₃), 0,87 (3H, d, J = 6,2 Hz, CH₃), 0,94 (3H, s, CH₃), 0,96 (3H, d, J = 5,9 Hz, CH₃), 0,98 (3H, s, CH₃), 1,17 (3H, s, CH₃), 2,04 (3H, s, CH₃), 4,49 (1H, dd, J = 10,63 Hz, 4,1 Hz, H-3), 5,25 (1H, t, J = 3 Hz, H-12).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ_C ppm 38,8 (C-1), 24,0 (C-2), 81,0 (C-3), 37,7 (C-4), 53,5 (C-5), 18,4 (C-6), 32,9 (C-7), 38,6 (C-8), 47,5 (C-9), 37,0 (C-10), 32,2 (C-11), 125,7 (C-12), 137,9 (C-13), 41,9 (C-14), 28,3 (C-15), 24,0 (C-16), 47,9 (C-17), 53,5 (C-18), 39,6 (C-19), 38,8 (C-20), 30,6 (C-21), 36,9 (C-22), 27,9 (C-23), 17,1 (C-24), 15,5 (C-25), 16,7 (C-26), 23,58 (C-27), 180,7 (C-28), 17,0 (C-29), 21,1 (C-30), 171,0 (C-31), 21,3 (C-32).

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất I có dạng tinh thể hình kim màu trắng, đ.n.c. 197 - 198°C, $[\alpha]_D +91$ (c 0,5, CHCl₃). Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT cho biết phân tử bao gồm 30 nguyên tử C với 8 nhóm methyl bậc 3 ứng với các singlet ở δ_H (ppm) 0,84 (3H, s, CH₃), 0,88 (12H, s, 4CH₃), 0,98 (6H, s, 2CH₃), 1,14 (3H, s, CH₃), 10 nhóm metylen, 5 nhóm metin trong đó có một nhóm metin cacbinol ở δ_C (ppm) 78,9/δ_H 3,2 và 7 carbon bậc bốn. Các tín hiệu cộng hưởng ở δ_C 145,0/δ_C 122,5 và δ_H 5,21 chứng tỏ có mặt một liên kết đôi dạng > C = CH. Kết hợp với pic ion phân tử trên phổ EI-MS ở m/z 426 có thể suy ra I có công thức C₃₀H₅₆O và cấu trúc hydroxy

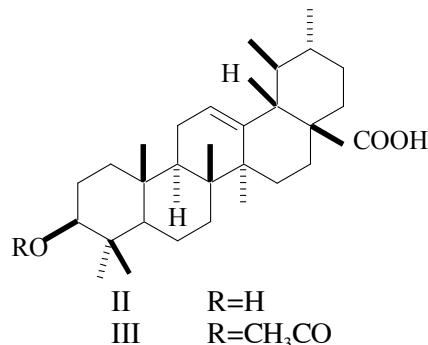
olean-12-en [4]. So sánh với tư liệu phổ của các amyrin [5, 6] đã xác định được hợp chất phân



Hợp chất II kết tinh dạng sợi mảnh trong cồn tuyệt đối có đ.n.c 285 – 287°C. Phổ IR cho các vân đặc trưng cho nhóm hydroxy (3640 cm^{-1}), nhóm cacboxyl (1690 cm^{-1}) và nối đôi (1640 cm^{-1}). Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho thấy II cũng là một tritecpen 5 vòng có 30 nguyên tử C và một nhóm metin cacbinol ở δ_{C} (ppm) 79,0/ δ_{H} (ppm) 3,2 (dd, $J = 10,8$ Hz, 4,1 Hz). Sự có mặt chỉ có 7 nhóm metyl gồm 5 nhóm metyl bậc ba và 2 nhóm metyl bậc hai cùng với độ chuyển dịch hoá học của các cacbon olephin dạng $>\text{C}=\text{CH}$ ở δ_{C} 138,0/ δ_{C} 125,0 và δ_{H} 5,25 chứng tỏ II có cấu trúc urs-12-en [6]. Ngoài ra so với chất I, ở trường hợp II cùng với sự thiếu một nhóm metyl bậc ba là sự xuất hiện thêm một nhóm cacboxyl (vân hấp thụ ở 3460 cm^{-1} trên phổ IR và tín hiệu cộng hưởng ở δ_{C} 181) và sự hiện diện của pic ion phân tử với m/z 456 trên phổ EI-MS. Từ đó có thể suy ra nhóm cacboxyl đã thế chỗ cho nhóm metyl gắn kết ở vị trí C-17. Giả thiết này hoàn toàn được khẳng định bởi tương tác giữa các tín hiệu cộng hưởng của cacbon cacboxyl với các proton H-18 và H-16 trên phổ HMBC. Vị trí gắn kết của nhóm hydroxy vào C-3 cũng được xác định bởi tương tác HMBC giữa các tín hiệu cộng hưởng của cacbon metin cacbinol δ_{C} 79,0 với H-2 cũng như với H₃-23 và H₃-24 ở mạch gem-dimetyl. Cấu hình 3 β -hydroxy được khẳng định bởi hằng số tương tác lớn của doublet ứng với H-3 ở δ_{H} 3,2 ($J = 10,8$ Hz, 4,1 Hz).

Các hằng số vật lý và dữ kiện phổ của II hoàn toàn trùng khớp với axit 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic (axit ursolic) [7].

lập được là 3 β -hydroxy-olean-12-en (β -amyrin, I).



Hợp chất III có dạng tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c. 286 - 287°C, $[\alpha]_{\text{D}} +61,8$ (c 0,5, CHCl_3). Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT cho thấy chất phân lập được cũng là một tritecpen có cấu trúc khung urs-12-en-28-oic. Sự có mặt các tín hiệu cộng hưởng ở δ_{C} (ppm) 171,0, 21,3, 81,0 và δ_{H} (ppm) 2,04, 4,49 (dd, $J = 10,63$ Hz, 4,1 Hz) chứng tỏ III chính là dẫn xuất 3 β -axetoxi của II. Do gắn kết với nhóm β -axetoxi tín hiệu cộng hưởng của C-3 trong trường hợp chất III đã chuyển dịch về phía trường thấp hơn so với chất II khoảng 2 ppm. Sự có mặt nhóm axetoxi cũng được chứng minh qua sự phân mảnh của phổ EI-MS ở m/z 498 (pic ion phân tử) và 454 (ứng với sự mất nhóm axetoxi).

Từ các hằng số vật lý và dữ kiện phổ đã xác định được chất III là axit 3 β -axetoxi-urs-12-en-28-oic (axit β -axetoxi-ursolic) [5, 6].

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư biểu mô người KB cho thấy các chất II và III có hoạt tính khá tốt với các giá trị IC_{50} là 6,0 và 3,5 $\mu\text{g/ml}$ trong khi chất I (β -amyrin) không có hoạt tính.

Hoạt tính chống viêm, gây độc trên một số dòng tế bào ung thư khác cũng như hoạt tính kháng NF- κB của axit ursolic và một số dẫn xuất của nó gần đây đã được thông báo [8, 9]. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả sàng lọc hoạt tính kháng NF- κB của dịch chiết metanol và góp phần lý giải tác dụng chữa bệnh trong dân gian của *Gymnotheca chinensis* Decne.

IV - KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ đã phân lập và nhận dạng được ba triterpen từ phân chiết etyl axetat của cây diếp cá suối *G. chinensis* Decne là β -amyrin (I), axit ursolic (II) và axit 3 β -axetoxxy ursolic (III). Các hợp chất II và III có hoạt tính kháng dòng tế bào KB với các giá trị IC₅₀ là 6,0 và 3,5 μ g/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nxb. Y học, 407 (1997).
2. L. Fu, S. Zhang, N. Li, J. Wang, M. Zhao, T. Mitsui. J. Nat. Prod. 68, 198 - 206 (2006).
3. K. Likhitwitayawuid. et al. J. Nat. Prod., 56 (1), 30 (1993).
4. S. B. Mahato, A. P. Kundu. Phytochemistry, 37, 1517 - 1575 (1994).
5. V. U. Ahmad, A. Rahman. Hanbook of Natural Products Data, Amsterdam-London-New york-Tokyo, Vol. 2 (1994).
6. SK. Sam. Kor. J. Pharmacogn, 18 (3), 151 - 167 (1987).
7. S. W. Park, C. S. Yook, H. Lee. Kor. J. Phamacogn. 25 (4), 328 - 335 (1995).
8. S. Cao, R. C. Guza, J. S. Miller. J. Nat. Prod., 67, 986 - 989 (2004).
9. S. Shishodia, S. Majumdar, S. Banerjee & B. B. Aggarwal. Cancer Research, 63, 4375 - 4384 (2003).

Phytochemical investigation on *Gymnothecca chinensis* Decne (Saururaceae)