

ĐÓNG GÓP VÀO VIỆC NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CÂY THÔNG ĐỎ (*TAXUS WALLICHIANA* ZUCC.) MỘC Ở LÂM ĐỒNG, VIỆT NAM

Mai Văn Trì¹, **Dương Anh Tuấn¹**, **Dương Ngọc Tú¹**, **Phan Tống Sơn²**

**1-PTN Hoá Hữu cơ và PTN Hoá Bảo vệ Thực vật, Viện Hoá học, Trung tâm
KHTN&CNQG**

2-Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

CONTRIBUTION TO THE STUDY ON THE CHEMICAL CONSTITUTENTS OF *TAXUS WALLICHIANA* ZUCC. GROWING IN LAM DONG, VIETNAM

Abstract: 10- Deacetylbaecatins III and 7,7'',4'-tri-O-methylamentoflavone, a rare biflavone, have been isolated from the leaves of *Taxus wallichiana* Zucc. (Taxaceae) growing in Lam Dong, Viet Nam, and identified by spectral data.

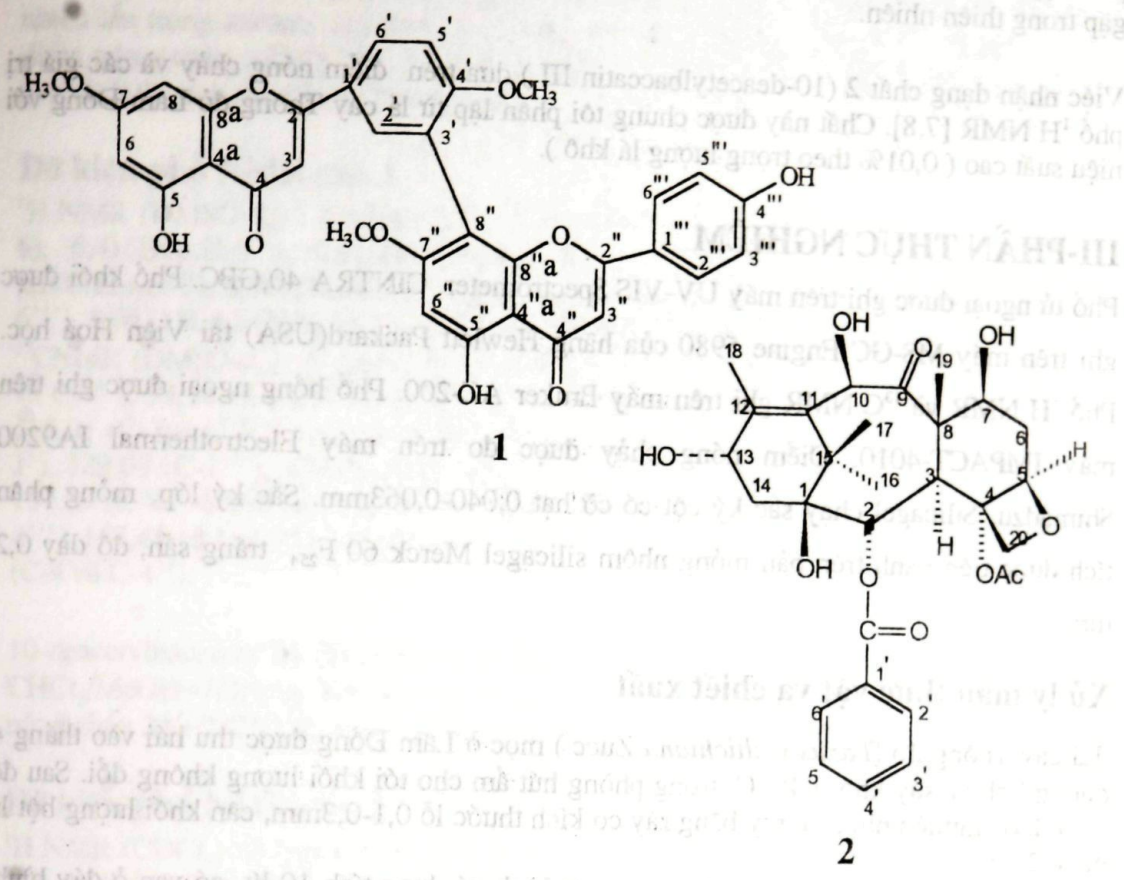
I-PHÂN MỞ ĐẦU

Cây Thông đỏ, *Taxus wallichiana* Zucc., Taxaceae, thuộc loài cây gỗ thường xanh, cao tới 20m. Nhánh con mảnh, màu lục. Lá mọc so le, hầu như không cuống, cong hình cung nhiều hay ít, thót lại ở gốc, dài 2,5-3,5cm, rộng 2-3mm, xếp thành hai hàng. Hoa khác gốc. Nón đực ở nách lá, hình cầu, kèm theo ở gốc những lá bắc lợp; nón cái gồm những nhánh ngắn, có vẩy dạng gai lợp, xếp thành 4 dãy đứng. Hạt hình trứng dài, nằm trong một đĩa dạng đầu, màu đỏ, nạc và có thịt[1].

Trên thế giới đã có nhiều công trình khoa học nghiên cứu về thành phần hoá học của cây Thông đỏ. Thông đỏ là nguyên liệu để chiết xuất taxol, và 10-deacetylbaecatins III, nguyên liệu để tổng hợp taxol và taxotere là những thuốc chống ung thư có giá trị[2]. Ở Việt Nam, theo điều tra của các nhà thực vật học có loài Thông đỏ mọc ở Lâm Đồng, Đà Lạt. Nhóm nghiên cứu của Mai Văn Trì và cộng sự đã thông báo kết quả nghiên cứu về một số thành phần taxoit trong cây này[3,4]. Trong bài này, chúng tôi thông báo kết quả phân lập và xác định 10- deacetylbaecatins III (2) và 7,7'',4'-tri-O-methylamentoflavon (1), một biflavon rất hiếm thấy trong thiên nhiên, từ lá cây Thông đỏ mọc ở Lâm đồng [5].

II-KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Từ cặn dịch chiết clorofoc của lá cây Thông đỏ Lâm Đồng, ký hiệu là A, sau khi chiết lấy các chất kém phân cực bằng n-hexan và xử lý như nêu ở phần thực nghiệm ta thu được một cặn D. Tiến hành chạy sắc ký cột cặn D này với hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradien, từ phân đoạn 6-7, ứng với tỷ lệ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1(\text{v/v})$, sau khi làm sạch bằng kết tinh nhiều lần trong axeton chúng tôi thu được chất 1 màu vàng có điểm nóng chảy $>300^\circ\text{C}$. Còn ở phân đoạn 9-12, ứng với tỷ lệ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 7/3(\text{v/v})$, chúng tôi thu được chất 2 màu trắng, kết tinh trong CHCl_3 , đnc $240-242^\circ\text{C}$.



Phổ UV của **1** có $\lambda_{\max}$ ở 268,5 và 330nm, gợi ra một khung flavon. Phổ MS của **1** có pic M^+ ở m/z 580 ($C_{33}H_{24}O_{10}$) phù hợp với một biflavon có ba nhóm hidroxi và ba nhóm metoxi. Ở phổ UV của **1** có sự chuyển dịch hướng hồng (bathochromic shift) khi có mặt $AlCl_3/HCl$, chỉ ra sự có mặt các nhóm hidroxi ở các vị trí 5,5". Cực đại hấp thụ tử ngoại không bị ảnh hưởng bởi natri axetat, cho thấy không có mặt nhóm hidroxi tự do ở C-7 và C-7". Phổ IR cung cấp một số thông tin về các nhóm chức với $\nu_{\max}(cm^{-1})$ ở 3400 (ν_{OH}); 3100-3000, 1608, 1500 (vòng thơm); 1660 ($\nu_{C=O}$); 1246, 1200 ($\nu_{as}C-O-C$ của ete thơm kiểu Ar-O-R).

Phổ cộng hưởng từ proton (1H NMR) cung cấp những thông tin đầy đủ hơn về biflavon **1**. Chẳng hạn các singlet ở δ 3,73 ppm, δ 3,78 ppm và δ 3,80ppm là ứng với ba nhóm CH_3-O- . Các tín hiệu ở δ 6,91 ppm và δ 7,55 ppm đều là doublet ($J=9Hz$) (hệ phổ A_2B_2) và thuộc về vòng B của một khung flavon. Khung flavon kia có vòng B chứa 3 proton thơm, thể hiện dưới dạng một doublet ở δ 7,35 ppm ($J=9Hz$, một proton tương tác *ortho*), một doublet ở δ 8,06ppm ($J=2Hz$, một proton tương tác *meta*) và một dd ở 8,22 ppm ($J=9Hz$ và $2Hz$, một proton tương tác *ortho* và *meta*). Vòng A của một đơn vị flavon nổi

với vòng B của đơn vị khác theo kiểu của một biflavin không đối xứng, điều này được chứng minh bởi sự có mặt của chỉ một cặp proton tương tác *meta* ở δ 6,33 ppm ($d, J=2\text{Hz}$) và δ 6,86ppm ($d, J=2\text{Hz}$) (H-6 và H-8). Các dữ kiện phổ nêu ở trên cùng với các dữ kiện phổ ^{13}C NMR (xem Phần thực nghiệm) phù hợp với chất 7,7", 4'-tri-O-metylamentoflavin (1) [6]. Đây là một biflavin rất hiếm gặp trong thiên nhiên.

Việc nhận dạng chất 2 (10-deacetylbaecatin III) dựa trên điểm nóng chảy và các giá trị phổ ^1H NMR [7,8]. Chất này được chúng tôi phân lập từ lá cây Thông đỏ Lâm Đồng với hiệu suất cao (0,01% theo trọng lượng lá khô).

III-PHẦN THỰC NGHIỆM

Phổ tử ngoại được ghi trên máy UV-VIS Spectrometer, CINTRA 40, GBC. Phổ khối được ghi trên máy MS-GC Engine 5980 của hãng Hewlett Packard(USA) tại Viện Hoá học. Phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR ghi trên máy Bruker AC-200. Phổ hồng ngoại được ghi trên máy IMPACT-4010. Điểm nóng chảy được đo trên máy Electrothermal IA9200 Shimadzu. Silicagel chạy sắc ký cột có cỡ hạt 0,040-0,063mm. Sắc ký lớp mỏng phân tích được tiến hành trên bản mỏng nhôm silicagel Merck 60 F₂₅₄ tráng sẵn, độ dày 0,2 mm.

Xử lý mẫu thực vật và chiết xuất

Lá cây Thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.) mọc ở Lâm Đồng được thu hái vào tháng 4 dương lịch và sấy khô ở 45^o C trong phòng hút ẩm cho tới khối lượng không đổi. Sau đó mẫu được nghiền nhỏ, rồi rây bằng rây có kích thước lỗ 0,1-0,3mm, cân khối lượng bột lá được 2 kg.

Lượng mẫu này được ngâm chiết trong một bình có dung tích 10 lít, có van ở đáy bình, lần lượt với clorofoc và metanol.

Thứ tự chiết được tiến hành như sau:

Cho mẫu vào bình rồi đổ khoảng 2,5 lít clorofoc (chú ý luôn phải để mẫu ngập trong dung môi khoảng 2,5-3cm), để ngâm qua đêm. Sau 24 giờ mở van cho dịch clorofoc chảy ra rồi cho lượng clorofoc mới vào và lại để như vậy qua đêm. Lặp lại việc này thêm hai lần nữa để thu dịch chiết tổng rồi đem cô cạn dung môi bằng thiết bị cô quay dưới áp suất giảm, ta thu được cặn dịch clorofoc, ký hiệu là A. Sau đó tiếp tục chiết với dung môi metanol.

Cũng tiến hành tương tự như trên đối với dung môi metanol, sau khi cất loại dung môi ta thu được cặn dịch chiết metanol và ký hiệu là B. Từ cặn chiết A ta lại chiết tiếp với n-hexan để loại các chất mẫu và các chất kém phân cực khác bằng cách như sau: Mỗi lần cho khoảng 30 ml n-hexan vào bình đựng cặn dịch chiết A rồi lắc chiết để cho các chất mẫu hoà tan vào đó rồi gạn ra riêng phần tan vào n-hexan. Lặp lại 4 lần chiết rồi đem tổng dịch chiết n-hexan thu được cô cạn dung môi, thu được cặn dịch chiết mới, ký hiệu là C. Phần không tan trong n-hexan (rắn) cũng được làm bay hơi hết dung môi và ký hiệu là cặn D. Tiến hành khảo sát sắc ký lớp mỏng với các hệ dung môi khác nhau để tìm được hệ dung môi phù hợp cho sắc ký cột cho cặn D. Hệ dung môi thích hợp cho sắc ký lớp

mỏng cặn D là $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1). Hệ dung môi chạy sắc ký cột cặn D là $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ với sự tăng dần nồng độ của metanol.

7,7'',4'-tri-o-metylamentoflavin (1) được phân lập bằng sắc ký cột từ cặn D, phân đoạn 6+7, ứng với tỷ lệ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=9/1(\text{v/v})$. Sau khi làm bay hơi bớt dung môi, kết tinh lại nhiều lần trong axeton thu được 1, là một chất rắn, có dạng tinh thể nhỏ, màu vàng, có điểm nóng chảy $>300^\circ\text{C}$, $R_f=0,75$ (n-Hexan:MeOH, 8: 2). Hiệu suất 1 thu được là 0,000225%, tính theo trọng lượng lá khô.

Dữ kiện phổ NMR của 1

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 3,73; 3,78; 3,80 (9H, 3s, $3\times\text{-OCH}_3$), 6,33 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6,41 (1H, s, H-3''), 6,91 (2H, d, $J=9\text{Hz}$, H-3''' và H-5'''), 6,86 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6,80 (1H, s, H-3), 6,96 (1H, s, H-6''), 7,35 (1H, d, $J=9\text{Hz}$, H-5'), 7,55 (2H, d, $J=9\text{Hz}$, H-2''' và H-6'''), 8,06 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-2'), 8,22 (1H, dd, $J=9\text{Hz}$ và 2Hz , H-6').

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 55,74 (OCH_3), 56,19 (OCH_3), 56,29 (OCH_3), 92,97 (C-8 và C-8''), 98,38 và 98,91 (C-6 và C-6'), 103,47 và 103,87 (C-4a và C-4'a), 103,91 và 105,01 (C-3 và C-3'), 112,01 (C-5'''), 114,79 (C-3''' và C-5'), 121,88 (C-3'), 122,64 (C-1'), 123,03 (C-1'''), 128,04 (C-2' và C-2'''), 128,61 (C-6'), 131,12 (C-6''), 154,60 và 157,59 (C-8a và C-8'a), 160,81 và 160,89 (C-5 và C-5'), 161,36 và 162,06 (C-4' và C-4'''), 162,48 và 163,35 (C-2 và C-2''), 163,88 và 165,44 (C-7 và C-7'), 182,21 và 182,33 (C-4 và C-4'').

10-deacetylbaecatin III (2) cũng được phân lập từ cặn D, phân đoạn 9+12, ứng với tỷ lệ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=7/3(\text{v/v})$. Kết tinh lại trong clorofoc, thu được tinh thể màu trắng, có điểm nóng chảy $240-242^\circ\text{C}$, $R_f=0,5$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, 8:2). Hiệu suất 2 thu được là 0,01%.

Dữ kiện phổ NMR của 2

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 5,67 (1H, d, $J=6,9\text{Hz}$, H-2), 4,03 (1H, d, $J=6,9\text{Hz}$, H-3), 4,93 (1H, brd, $J=8,5\text{Hz}$, H-5), 1,88 (m) và 2,08 (m) (2H-6), 4,24 (1H, m, H-7), 4,40 (1H, d, $J=3,6\text{Hz}$, H-10), 4,07 (1H, m, H-13), 2,36 (dd, $J=14\text{Hz}$, $9,6\text{Hz}$) và 2,29 (d, $J=14\text{Hz}$) (2H-14), 1,12 (1H, s, H-16), 1,12 (1H, s, H-17), 2,08 (1H, s, H-18), 1,73 (1H, s, H-19), 4,02 (2H, s, 2H-20), 2,31 (3H, s, CH_3CO), 7,56 (2H, d, $J=7,6\text{Hz}$, H-3' và H-6'), 8,18 (2H, d, $J=7,6\text{Hz}$, H-2' và H-5'), 7,64 (1H, t, $J=7,6$, H-4').

KẾT LUẬN

Từ lá cây Thông đỏ *Taxus wallichiana* Zucc. (Taxaceae) mọc ở Lâm đồng, Việt Nam, đã phân lập được 10-deacetylbaecatin III và 7,7'',4'-tri-O-metylamentoflavin, một biflavin rất hiếm trong thiên nhiên, và nhận dạng chúng nhờ các dữ liệu phổ.

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn TS Luc Van Puyvelde, Khoa Hoá sinh ứng dụng trong nông nghiệp, Trường Đại học tổng hợp Gent, Vương Quốc Bỉ về các phổ.

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ của chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực khoa học tự nhiên.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi, *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, Nhà Xuất bản Y học, 1176, (1999).
2. Mai Văn Trì, *Tổng luận phân tích cây Thông đỏ, một nguồn thuốc chống ung thư quý*, Trung tâm Thông tin tư liệu, Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia (1996).
3. Mai Văn Trì, Nguyễn Quảng An., *Tạp chí Hoá học*, T.33, (1), tr.57(1995).
4. Mai Văn Trì, Lê thị Xuân, Melvyn Shemluck, *Tạp chí Hoá học* T.34(1), tr.80(1996).
5. Dương Ngọc Tú, Luận án Thạc sỹ Hoá học "Nghiên cứu các hợp chất taxoit có hoạt tính chống ung thư từ cây Thông đỏ của Việt nam", Bộ Giáo dục và đào tạo, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 12-1999.
6. Parmar, V.S., Vardhan, A., Bhisht, K.S., Sharma, N.K., Jaiir, R., Taneja, P., and Tyagi, O.D.,, *Indian J.Chem., Sect.B*, 32, p.601. (1993).
7. B. Gabetta, P.de Bellis, R. Pace, G. Appendino, L. Barboni, E. Torregiani, P. Gariboldi, and D. Viterdo, *J. Nat. Prod.* 58 (10), pp. 1508-1514 (1995).
8. G. Appendino, P. Gariboldi, B. Gabetta, R. Pace, E. Bombardelli and D. Viterdo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2925 (1992).