

CÁC ISOPRENOID VÀ COUMARIN TỪ CÂY KHỔ SÂM MỀM (*Brucea mollis* Wall. ex Kurz)

Mai Hùng Thanh Tùng*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: maihungthanhtung@gmail.com

Ngày nhận bài: 30/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 16/01/2018

TÓM TẮT

Hai isoprenoid, blumenol A (**1**), vomifoliol 9-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**) và một coumarin là cleomiscosin A (**3**) được tách ra từ các dịch chiết hữu cơ của lá, thân và rễ loài *Brucea mollis*. Cấu trúc của các hợp chất này được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D, 2D NMR và phổ khối lượng MS.

Từ khóa: *Brucea mollis*, isoprenoids, coumarin, blumenol A, cleomiscosin A.

1. MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, một số loài thuộc chi *Brucea* đã được sử dụng làm vị thuốc từ lâu trong dân gian. Cây sấu đầu cút chuột (*Brucea javanica*) và khổ sâm mềm (*Brucea mollis*) được dùng để chữa các bệnh sốt rét, đau bụng, u nhọt...[1]. Nhằm khai thác, sử dụng nguồn tài nguyên cây thuốc có sẵn, nghiên cứu đã được tiến hành và phát hiện dịch chiết MeOH từ lá cây mật sạ *Meliosma pinnata* (đã được xác định lại là *Brucea mollis* [2]) có tác dụng ức chế rất mạnh dòng tế bào ung thư phổi người A549 (96%) ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [3]. Về mặt hóa học, các hợp chất được phân lập từ chi *Brucea* có cấu trúc khá đa dạng, bao gồm các nigakilacton, alkaloid, triterpenoid, steroid, và flavonoid... Các hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng u, kháng sốt rét, kháng ung thư dạ dày, kháng amid [4].

Cho đến nay, đã có một số nghiên cứu về thành phần hóa học cây khổ sâm mềm (*Brucea mollis*) [5, 6]. Bài báo này công bố kết quả phân lập và xác định cấu trúc của ba hợp chất blumenol A (**1**), vomifoliol 9-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**) và cleomiscosin A (**3**) từ lá, thân và rễ của cây *Brucea mollis* Wall. ex Kurz.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Cây khổ sâm mềm (*Brucea mollis* Wall. ex Kurz) được thu hái tại Hòa Bình. Tên cây do Trần Thế Bách giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản của cây khổ sâm mềm (*Brucea mollis* Wall ex. Kurz) được lưu trữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, ký hiệu mẫu là VK 2211 (HN) [2].

Mẫu cây (gồm lá, thân và rễ) được loại bỏ phần hỏng, phơi khô và xay nhỏ thành bột.

2.2. Thiết bị và hóa chất

Phổ khối ion hóa bụi điện tử ESI-MS được ghi trên máy ghi Agilent 6310 Ion Trap của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều được ghi trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker Avance 500 MHz với TMS

(tetramethylsilane) là chất chuẩn nội tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng đế nhôm tráng sẵn silica gel Merck 60 F₂₅₄.

Sắc ký cột sử dụng pha tĩnh là silica gel pha thường (40-63 µm, Merck) hoặc pha đảo (loại YMC-ODS, RP-18, 30-50 µm, Fujisilica Chemical Ltd., Nhật).

Dung môi chạy cột *n*-hexan, diclometan, etyl acetat, aceton, methanol là loại tinh khiết (SK Global Chemical Co., Ltd., Korea).

2.3. Thực nghiệm

Từ 2,6 kg bột lá cây ngâm chiết 3 lần với dung môi methanol (4 lít/1 lần), dịch chiết sau đó được quay khô ở áp suất thấp, thu được 191 g cặn. Cặn methanol được phân bố lần lượt bằng *n*-hexan, diclometan, etyl acetat cho các cặn chiết *n*-hexan (A, 80g), diclometan (B, 21 g), etyl acetat (C, 8 g) và dịch nước.

Phân đoạn C được tách phân đoạn trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải aceton/cloroform/nước là 3/1/0,1, thu được 8 phân đoạn C1-C8. Từ phân đoạn C1 (2 g) chạy tách chất trên cột silica gel pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol/nước là 2/3, thu được 5 phân đoạn D1-D5. Phân đoạn D3 được tách chất trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/*n*-hexan/aceton là 4/1/1, thu được hợp chất **1** (20 mg).

Phân đoạn C4 (1,5 g) chạy tách phân đoạn trên cột silica gel pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol/nước là 1/2, thu được 4 phân đoạn E1-E4. Phân đoạn E1 (200 mg) được tách chất trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/methanol là 10/1, thu được hợp chất **2** (30 mg).

Từ 8,6 kg thân và rễ đã nghiền thành bột được ngâm chiết 3 lần trong methanol (10 lít/1 lần), dịch chiết sau đó được quay khô ở áp suất thấp, thu được 300 g cặn. Cặn methanol được phân bố lần lượt bằng *n*-hexan, diclometan, etyl acetat cho các cặn chiết *n*-hexan (F, 60 g), diclometan (G, 85 g), etyl acetat (H, 15 g) và dịch nước còn lại.

Phân đoạn G được tách phân đoạn trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/MeOH lần lượt là 100/0, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2,5/1, 1/1 và 0/100, thu được 8 phân đoạn G1-G8. Gộp 2 phân đoạn (G1+G2) (31,5 g) và tách phân đoạn trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/aceton lần lượt là 3/1, 2/1 và 1/1, thu được 9 phân đoạn I1-I9. Phân đoạn I9 (2 g) tiếp tục được tách phân đoạn trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/etyl acetat lần lượt là 6/1, 4/1 và 1/1, thu được 4 phân đoạn K1-K4. Phân đoạn K4 (270 mg) xuất hiện tinh thể, lọc rửa bằng methanol thu được hợp chất **3** (11 mg).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

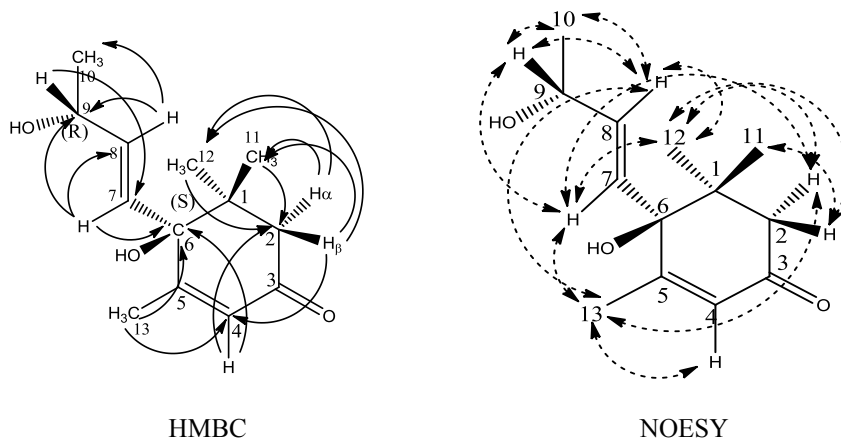
Hợp chất **1** được tách ra từ phân đoạn etyl acetat của lá cây, có dạng bột trắng, tan trong MeOH. Phổ ¹H-NMR của **1** chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 4 nhóm methyl tại δ_H 1,26 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H-10); 1,03 (3H, s, H-11); 1,06 (3H, s, H-12); 1,94 (3H, d, *J* = 1,5 Hz, H-13), 1 nhóm metylen tại δ_H 2,53 (1H, d, *J* = 17 Hz, H-2α); 2,18 (1H, d, *J* = 17 Hz, H-2β), 4 nhóm methyl tại δ 5,90 (1H, brs, H-4); 5,79 (1H, d, *J* = 15,5 Hz, H-7); 5,81 (1H, dd, *J* = 6,0; 15,5 Hz, H-8); 4,34 (1H, dq, *J* = 6,0; 6,5 Hz, H-9). Trong đó, H-7 và H-8 có tương tác rất mạnh (*J* = 15,5 Hz), chứng tỏ hai proton của nối đôi C₇=C₈ có cấu hình *trans*.

Phổ ¹³C-NMR, DEPT 90, 135 của hợp chất **1** cho thấy sự có mặt của 13 carbon, trong đó có 1 nhóm carbonyl được xác định bằng tín hiệu cộng hưởng tại δ_C 201,2 (C-3), 3 carbon bậc IV ở δ 42,4 (C-1); 167,4 (C-5); 79,9 (C-6), 4 nhóm methyl tại δ_C 23,8 (C-10); 24,5 (C-11);

23,5 (C-12); 19,6 (C-13), 1 nhóm metylen ở δ 50,7 (C-2) và 4 nhóm metyl tại δ 127,1 (C-4); 130,1 (C-7); 137,0 (C-8); 68,7 (C-9).

Cấu hình của các nguyên tử carbon bất đối C-6, C-9 được xác định chủ yếu dựa vào các tương tác trong phổ NOESY. Proton H_{2 α} có tương tác với H-7, H-12, H-13 trong khi đó H-2 β tương tác với cả H-11, H-12 chứng tỏ H-2 α , H-11 và nhóm 3-hydroxybut-1-enyl ở vị trí axial còn H-12, H-2 β ở vị trí equatorial. Các dữ kiện trên khẳng định cấu hình của C-6 là (S). Các tương tác của H-12, H-13 với H-7, H-8 trên phổ NOESY khẳng định thêm cho lập luận trên.

Trong phổ NOESY còn thấy proton H-9 tương tác mạnh với H-7, H-8, H-10, và có tương tác yếu với H-2 α và H-12. Điều đó chứng tỏ H-9 về mặt không gian gần với H-2 α và H-12, tạo thành trạng thái ổn định nhất của phân tử. Đồng thời, sự xuất hiện tương tác mạnh giữa H-8 và H-10 cho phép khẳng định cấu hình của C-9 là (R). Qua phân tích phổ và so sánh với dữ kiện phổ cho thấy hợp chất **1** là blumenol A [7-10].

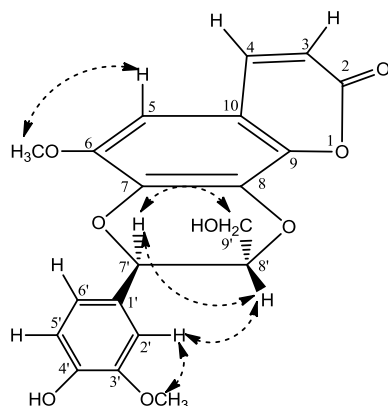


Hình 1. Các tương tác HMBC và NOESY chính của Blumenol A (**1**)

Sau khi phân lập và tinh chế, cấu trúc hóa học của hợp chất **2** được xác định dựa vào các phương pháp phổ. Phổ 1D-NMR và 2D-NMR của hợp chất **2** cho thấy các tín hiệu giống với **1**, chỉ thêm các tín hiệu của đường -O- β -glucopyranoside. Trong phổ ¹H-NMR các hydro của đường có các tín hiệu tại δ _H 3,10 - 3,36, trong phổ ¹³C-NMR các carbon của đường có các tín hiệu tại δ _C 101,2 (C-1'); 75,0 (C-2'); 78,2 (C-3'); 71,7 (C-4'); 78,4 (C-5'); 62,8 (C-6'). Proton anome ở δ _H 4,29 với $J = 7,5$ Hz chứng tỏ đường thể có cấu hình β . Ngoài ra, trong phổ HMBC của **2** có tương tác giữa H-9 và C-1', điều đó chứng tỏ nhóm đường -O- β -glucopyranoside gắn ở C-9. Từ các dữ kiện phổ và so sánh với kết quả nghiên cứu của Sevil Oksuz *et al.* đã khẳng định hợp chất **2** là vomifoliol 9-O- β -D-glucopyranoside. Hai hợp chất **1** và **2** thuộc lớp chất isoprenoid, và đã được phân lập từ loài *Euphorbia heteradena* (thuộc họ Thầu dầu Euphobiaceae) [10].

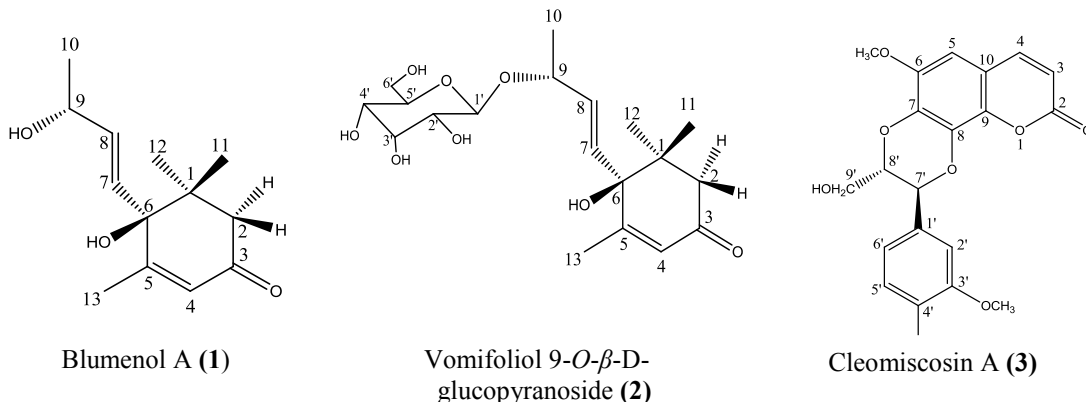
Hợp chất **3** được phân lập từ phân đoạn diclometan của thân và rễ cây có dạng bột màu trắng. Phổ ¹³C-NMR, DEPT-90, và DEPT-135 cho thấy sự có mặt của 20 carbon, trong đó có một nhóm carbonyl ở δ _C 161,5 (C-2), 8 carbon bậc IV ở δ _C 146,0 (C-6), 137,7 (C-7), 132,0 (C-8), 138,5 (C-9), 111,5 (C-10), 126,6 (C-1'), 147,5 (C-3'), 146,8 (C-4'), 2 nhóm metyl tại δ _C 55,8 (OCH₃); 56,1(OCH₃), một nhóm metylen ở δ 60,6 (C-9'), 8 nhóm metyl δ 113,3 (C-3); 144,5 (C-4); 100,2 (C-5); 110,4 (C-2'); 115,0 (C-5'); 120,7 (C-6'); 78,6 (C-7') và 77,2 (C-8'). Ngoài ra, phổ ¹H-NMR của **3** chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm metyl tại δ _H 3,89 (3H, s, OCH₃); 3,91 (3H, s, OCH₃), 1 nhóm metylen tại δ _H 3,84 (1H, dd, $J = 2,5; 12,5$ Hz, H-9'a); 3,56 (1H, dd, $J = 4; 13$ Hz, H-9'b), 8 nhóm metyl thơm tại δ _H 6,33 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3); 7,71 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4); 6,60 (1H, s, H-5); 6,95

(1H, s, H-2'); 6,93 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-5'); 6,94 (1H, m, H-6'); 4,11 (1H, m, H-7'); 5,02 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-8').



Hình 2. Các tương tác NOESY chính của Cleomiscosin A (3)

Các phân tích phổ NOESY cho thấy proton H-9' tương tác rất mạnh với H-7' nhưng lại không có tương tác với các proton ở vòng thơm. Mặt khác, proton H-8' tương tác với H-7' với cường độ yếu hơn so với tương tác H-7'/H-9', và H-8' tương tác rất mạnh với H-2'. Từ đó có thể kết luận rằng nhóm $-CH_2OH$ tại C-8' và ở vị trí α . So sánh với kết quả nghiên cứu của Sandeep Kumar *et al.* và Anil B. Ray *et al.* cho phép kết luận hợp chất **3** là cleomiscosin A [11, 12].



Hình 3. Cấu trúc các hợp chất 1-3

Dữ liệu phổ và trạng thái vật lý của các hợp chất 1-3:

Blumenol A (1): $C_{13}H_{20}O_3$, có dạng bột màu trắng, tan trong MeOH.

Phổ 1H -NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 2,53 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-2 α); 2,18 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-2 β); 5,90 (1H, brs, H-4); 5,79 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-7); 5,81 (1H, dd, $J = 6,0 ; 15,5$ Hz, H-8); 4,34 (1H, dq, $J = 6,0 ; 6,5$ Hz, H-9); 1,26 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-10); 1,03 (3H, s, H-11); 1,06 (3H, s, H-12); 1,94 (3H, d, $J = 1,5$ Hz, H-13).

Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ (ppm): 42,4 (C-1); 50,7 (C-2); 201,2 (C-3); 127,1 (C-4); 167,4 (C-5); 79,9 (C-6); 130,1 (C-7); 137,0 (C-8); 68,7 (C-9); 23,8 (C-10); 24,5 (C-11); 23,5 (C-12); 19,6 (C-13).

Vomifoliol 9-O-β-D-glucopyranoside (2): C₁₉H₃₀O₈, có dạng bột màu trắng, tan trong MeOH.

Phổ ESI-MS cho peak ion giả phân tử m/z 388,3 [M+2H]⁺.

Phổ ¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 2,63 (1H, d, J = 17 Hz, H-2α); 2,19 (1H, d, J = 17 Hz, H-2β); 5,90 (1H, brs, H-4); 5,99 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-7); 5,75 (1H, dd, J = 7,0; 15,5 Hz, H-8); 4,55 (1H, qn, J = 6,5 Hz, H-9); 1,31 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-10); 1,03 (3H, s, H-11); 1,06 (3H, s, H-12); 1,96 (3H, d, J = 1,5 Hz, H-13); 4,29 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1'); 3,22 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-2'); 3,18 (1H, m, H-3'); 3,19 (1H, m, H-4'); 3,28 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-5'); 3,65 (1H, dd, J = 6,0; 11,5 Hz, Ha-6'); 3,87 (1H, dd, J = 2,5; 12 Hz, Hb-6').

Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD) δ (ppm): 42,4 (C-1); 50,7 (C-2); 201,2 (C-3); 127,1 (C-4); 167,1 (C-5); 80,0 (C-6); 130,7 (C-7); 133,7 (C-8); 74,6 (C-9); 22,3 (C-10); 24,7 (C-11); 23,4 (C-12); 19,5 (C-13); 101,2 (C-1'); 75,0 (C-2'); 78,2 (C-3'); 71,7 (C-4'); 78,4 (C-5'); 62,8 (C-6').

Cleomiscosin A (3): C₂₀H₂₀O₈, có dạng bột màu trắng, tan trong hỗn hợp (CHCl₃ + MeOH).

Phổ ¹H-NMR (500 MHz, MeOD+CDCl₃) δ (ppm): 6,33 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-3); 7,71 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-4); 6,60 (1H, s, H-5); 6,95 (1H, s, H-2'); 6,93 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-5'); 6,94 (1H, m, H-6'); 4,11 (1H, m, H-7'); 5,02 (1H, d, J = 8 Hz, H-8'); 3,84 (1H, dd, J = 2,5; 12,5 Hz, H-9'a); 3,56 (1H, dd, J = 4; 13 Hz, H-9'b); 3,89 (3H, s, OCH₃); 3,91 (3H, s, OCH₃).

Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD+CDCl₃) δ (ppm): 161,5 (C-2); 113,3 (C-3); 144,5 (C-4); 100,2 (C-5); 146,0 (C-6); 137,7 (C-7); 132,0 (C-8); 138,5 (C-9); 111,5 (C-10); 126,6 (C-1'); 110,4 (C-2'); 147,5 (C-3'); 146,8 (C-4'); 115,0 (C-5'); 120,7 (C-6'); 78,6 (C-7'); 77,2 (C-8'); 60,6 (C-9'); 55,8 (OCH₃); 56,1 (OCH₃).

4. KẾT LUẬN

Từ lá, thân và rễ cây khỗ sâm mềm (*Brucea mollis* Wall. ex Kurz) đã phân lập và xác định được cấu trúc của hai hợp chất isoprenoid là blumenol A (1), vomifoliol 9-O-β-D-glucopyranoside (2) và một hợp chất coumarin là cleomiscosin A (3). Lần đầu tiên, 3 hợp chất trên được phân lập từ chi *Brucea*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi - Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1997, tr. 1036.
2. Mai Hùng Thanh Tùng, Trần Thu Hương, Trần Thế Bách, Nguyễn Quốc Bình, Nguyễn Mạnh Cường, Tác dụng gây độc tế bào của lá cây khỗ sâm mềm (*Brucea mollis*), Tạp chí Dược liệu **16** (6) (2011) 356-360.
3. Nguyen Manh Cuong, Nguyen Hai Nam, Yong Kim, Young Jae You, KiHwan Bae, Tran Van Sung, and Byung Zun Ahn - Cytotoxic activity of Vietnamese herbal medicines against A549 cells, Korean Journal of Pharmacognosy **33** (1) (2002) 64-68.
4. Jian-Hua Liu, Wei-Dong Zhang, Ski-Kai Yan, Yan-Heng Shen - Chemical constituents of plants from the genus *Brucea*, Chemistry & Biodiversity **6** (2009) 57-70.
5. Mai Hùng Thanh Tùng, Hồ Việt Đức, Bùi Hữu Tài, Nguyễn Mạnh Cường - Các tecpenoit và phenolic glucoside từ cây khỗ sâm mềm (*Brucea mollis* Wall. ex Kurz), Tạp chí Hóa học **49** (6) (2011) 765-768.
6. Mai Hung Thanh Tung, Nguyen Thanh Duong, Ho Viet Duc, Tran Thu Huong, Vu Thi Ha, Do Thi Phuong, Do Thi Thao, Tran The Bach, Bui Huu Tai, Young Ho Kim,

- Nguyen Manh Cuong - Cytotoxic compounds from *Brucea mollis*, VAST-AIST workshop, 18-19/6/2012, Ha Noi, Viet Nam.
7. Gilda Erosa-Rejón, Luis M. Peña-Rodríguez, and Olov Sterner - Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*, Journal of the Mexican Chemical Society **53** (2) (2009) 44-47.
 8. Norio Aimi, Hiroyuki Hoshino, Masashi Nishimura, Shin-ichiro Sakai, and Joju Haginiwa, Chaboside - First natural glycosamptothecin found from *Ophiorrhiza pumila*, Tetrahedron Letters **3** (36) (1990) 5169-5172.
 9. Etsuko Sueyoshi, Hui Liu, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Takakazu Shinzato, Mitsunori Aramoto, Yoshio Takeda - Bridelionosides A–F: Megastigmane glucosides from *Bridelia glauca* f. *balansae*, Phytochemistry **67** (2006) 2483–2493.
 10. Sevil Oksuz, Ayhan Uluberlen, Asli barla - Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*, Turkish Journal of Chemistry **26** (2002) 457-463.
 11. Sandeep Kumar, Anil B. Ray, Chohachi Konno, Yoshiteru Oshima and Hiroshi Hikino - Cleomiscosin D, a coumarino-lignan from seeds of *Cleome viscosa*, Phytochemistry **27** (2) (1988) 636-638.
 12. Anil B. Ray, Sunil K. Chattopadhyay, Chohachi Konno, Hiroshi Hikino - Structure of cleomiscosin A, a coumarino-lignoid of *Cleome viscosa* seeds, Tetrahedron Letters **21** (1980) 4477-4481.

ABSTRACT

ISOPRENOIDS AND COUMARIN FROM *Brucea mollis* (Wall. ex Kurz)

Mai Hung Thanh Tung*

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: maihungthanhtung@gmail.com

Two isoprenoids, blumenol A (**1**), vomifoliol 9-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**), and cleomiscosin A (**3**), were isolated from the organic extract of the leaves, stem and root of *Brucea mollis*. Their structures were determined on the basis of spectral data, including 1D, 2D NMR and MS.

Keywords: *Brucea mollis*, isoprenoids, coumarin, blumenol A, cleomiscosin A.