

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA
LOÀI DÂY GỐI HIMALAYA (*CELASTRUS HOOKERI* Prain)
Ở VIỆT NAM**

NGUYỄN THỊ HIỀN, TRẦN MINH HỘI

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

PHAN VĂN KIỂM

Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên

Loài Dây gối himalaya (*Celastrus hookeri* Prain) thuộc chi Dây gối (*Celastrus*), họ Dây gối (*Celastraceae*). Các loài dây gối có chứa các hợp chất diterpenoid, triterpenoid, alcanoid và các sesquiterpen có nhiều triển vọng ứng dụng trong y dược và được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu [3, 6, 7]. Hiện nay ở nước ta có 8 loài thuộc chi Dây gối đã được biết đến, chiếm khoảng 8% các loài trong cả họ này, trong đó có một loài và một thứ là đặc hữu của Việt Nam. Loài Dây gối himalaya (*C. hookeri* Prain) mới gặp ở Sa Pa (Lào Cai), Cúc Phương (Ninh Bình) [1, 4]. Trên thế giới, loài *C. hookeri* Prain còn gặp ở Himalaya (Trung Quốc) [1]. Đây là một loài hiếm và chưa được nghiên cứu nhiều cả về hoá học và hoạt tính sinh học ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là loài Dây gối himalaya (*C. hookeri* Prain) thu tại Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Điều tra thu mẫu trên thực địa tại Bản Khoang, Sa Pa, Lào Cai.

- Tìm hiểu kinh nghiệm sử dụng trong dân gian bằng cách phỏng vấn người dân địa phương.

- Phương pháp phân lập các hợp chất:

Sử dụng các phương pháp sắc ký cột 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 μ m, Fuji Silica Chemical Ltd.).

- Phương pháp nghiên cứu cấu trúc hoá học các hợp chất:

+ Phổ khối lượng

Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electrospray Ionization mass) được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer.

- Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định:

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các mẫu được tiến hành trên các phiến vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp hiện đại của Vander Bergher và Vlietlinck

theo hai bước; Bước 1: sàng lọc sơ bộ tìm chất có hoạt tính; Bước 2: tìm nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chất có hoạt tính.

Các chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm:

- + Vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923)
- + Vi khuẩn Gr (+): *Bacillus subtilis* (ATCC 27212), *Staphylococcus aureus*
- + Nấm sợi: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*
- + Nấm men: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*
- + Kháng sinh kiểm định: Ampicilin đối với vi khuẩn Gr(+), Tetracylin đối với vi khuẩn Gr(-), Nystatin đối với nấm sợi và nấm men. Mẫu thô có giá trị MIC $\leq 200\mu\text{g/ml}$; mẫu tinh khiết có giá trị MIC $\leq 50\mu\text{g/ml}$ là có hoạt tính.

- Tách chiết các hợp chất:

Bột lá khô được nghiền nhỏ (200g) và chiết bằng metanol thu được 20 g dịch cô metanol. Dịch cô này được chiết phân bố trong nước lần lượt bằng clorofoc, butanol thu được các cặn chiết clorofoc (7,0 g), butanol (5,0 g) và cặn nước (7,0 g). Sau khi tiến hành phân lập cặn clorofoc (7,0 g) bằng các sắc ký cột lặp lại thu được hợp chất 1 (12 mg) và 2 (16 mg) dưới dạng tinh thể hình kim có màu trắng.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Mô tả và phân bố

Dây leo gỗ, dài tới 15 m, vỏ thân màu nâu đen, có khía bì trắng. Lá đơn, mọc cách, phiến lá có dạng hình trái xoan ngược hoặc gần tròn, kích thước 4-6 × 7-13 cm, màu xanh lục, đầu lá tròn, gốc lá hơi nhọn, gân bên có 4-6 đôi, mép lá có răng cưa nhỏ, cuống dài 1 - 2,5 cm. Cụm hoa dạng tán, mọc ở nách lá hoặc rải rác trên những nhánh nhỏ, dài khoảng 2,5-3,5 cm. Hoa nhỏ, mẫu 5, màu vàng. Quả nang 3 ô, mỗi ô có 1 hạt, áo hạt màu vàng da cam, hạt hình thận. Quả mở khi để khô trong không khí. Cây thụ phấn nhờ côn trùng. Quả chín vào tháng 9 - 10. Tại Sa Pa, loài Dây gối himalaya mọc rải rác trong vùng rừng thứ sinh, ở độ cao trên 1500m, mọc leo trên những cây gỗ bên đường, ven nương, trên vùng đất cát nhiều mùn hay đất sét, cây ưa ẩm, ánh sáng. Ngoài ra cây còn phân bố ở những nơi rợp bóng. Cây phân bố ở Sa Pa (Lào Cai) và Cúc Phương (Ninh Bình).

2. Kinh nghiệm sử dụng loài Dây gối himalaya trong dân gian

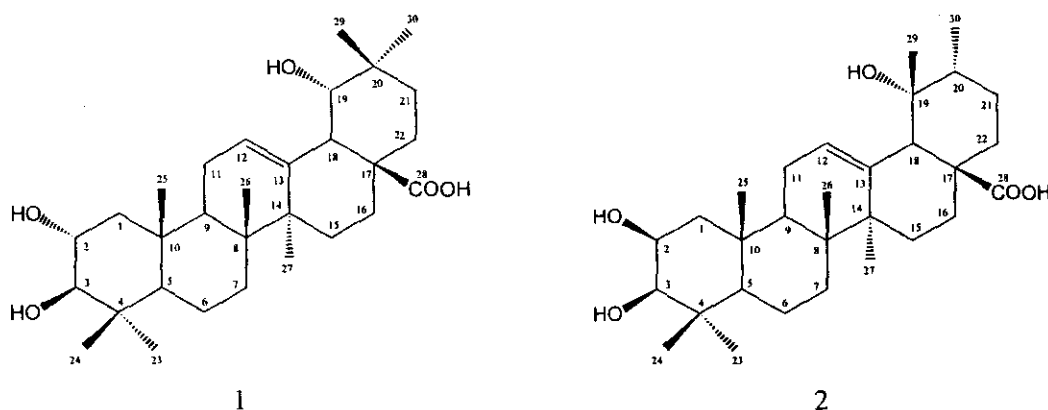
Theo kết quả điều tra ban đầu của chúng tôi, loài Dây gối himalaya được đồng bào dân tộc Dao (Sa Pa) dùng làm nước sắc để tắm chữa bệnh đau nhức xương.

3. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Bằng các phương pháp sắc ký, hai hợp chất 1 và 2 được phân lập từ dịch chiết clorofoc của lá cây. Hợp chất 1 nhận được dưới dạng chất kết tinh tinh thể hình kim, có nhiệt độ nóng chảy 334-335°C. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ($^1\text{H-NMR}$) có dạng phổ của một hợp chất tritecpen với 5 vòng sáu. Trên phổ này xuất hiện tín hiệu của 7 nhóm metyl, tất cả đều là các tín hiệu singlet tại δ_{H} 1,04 (s, H-23), 0,83 (s, H-24), 1,02 (s, H-25), 0,78 (s, H-26), 1,34 (s, H-27), 0,96 (s, H-28) và 0,98 (s, H-29); tín hiệu của proton olefin tại δ 5,34 (br t, $J = 3,5$ Hz, H-12). Ngoài ra còn có các tín hiệu của nhóm oximetin tại δ 3,64 (dt, 4,5, 9,5 Hz, H-2), 2,93 (d, 9,5 Hz,

H-3) và 3,27 (d, $J = 3,5$ Hz, H-19). Phân tích chi tiết hằng số tương tác của các proton H-2 và H-3 cho thấy $J_{H-2/H-3} = 9,5$ Hz chứng tỏ H-3 có cấu hình axial và H-2 cũng có cấu hình axial. Điều này có nghĩa là nhóm hydroxy tại C-2 và C-3 đều có cấu hình equatorial. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy hợp chất 1 có 30 cacbon tương ứng với 30 vạch, trong đó bằng phổ DEPT 135 và DEPT 90 đã xác định được từng loại cacbon bao gồm 7 CH_3 , 8 CH_2 , 7 CH và còn lại là 8 C. Giá trị δ_{C} 182,28 (s, C-28) hoàn toàn phù hợp với nhóm cacboxylic, tín hiệu tại δ_{C} 124,73 (CH, C-12) và 144,71 (C, C-13) tương ứng với sự có mặt của một nối đôi trong vòng thế ba lần. Ba carbon oximetin tại 69,52 (d, C-2), 84,55 (d, C-3) và 82,46 (d, C-19), trong đó cặp tín hiệu 69,52 (d, C-2), 84,55 (d, C-3) rất phù hợp với cấu hình $2\alpha\text{-OH}$ và $3\beta\text{-OH}$ [5]. Ngoài ra sự có mặt của 7 nhóm methyl bậc bốn cũng được khẳng định bằng các tín hiệu tại δ_{C} 29,60 (q, C-23), 17,38 (q, C-24), 19,64 (q, C-25), 17,76 (q, C-26), 25,05 (q, C-27), 28,65 (q, C-29) và 25,13 (q, C-30). Các giá trị độ dịch chuyển hoá học được xác định thêm bằng phổ HSQC và HMBC. Kết quả phổ NMR và MS của 1 hoàn toàn phù hợp với hợp chất $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyolean-12-en-28-oic acid hay còn gọi là arjunic acid [5]. Một hợp chất đã được biết đến với những tác dụng bảo vệ tim mạch, ngăn ngừa sự suy giảm các chất chống oxy hoá như superoxide dismutase, catalase, glutathione, α -tocopherol và ascorbic acid [8].

Hợp chất 2 có các phổ NMR gần tương tự như các phổ tương ứng của 1, tuy nhiên có sự khác nhau về giá trị khi so sánh trực tiếp với nhau. Tín hiệu nhóm metincabinol tại C-19 của 1 mất đi và thay bằng tín hiệu cacbon bậc ba nối với oxy, cùng với sự xuất hiện thêm tín hiệu của nhóm methyl bậc ba, và sự dịch chuyển các giá trị độ dịch chuyển hoá học của vòng A đưa đến dự đoán hợp chất 2 là $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid. Kết quả so sánh các giá trị phổ NMR và MS của 2 với $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid cho sự trùng hợp hoàn toàn. Điều này có thể khẳng định hợp chất 2 là $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid hay còn gọi là 2-epitormentic acid [2].



Hình 1: Cấu trúc hoá học của 1 và 2

$2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (arjunic acid, 1)

Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$; Khối lượng phân tử: $M = 488$; Điểm nóng chảy: $334\text{--}335^\circ\text{C}$; Độ quay cực: $[\alpha_D] +20$ (c, 1.1, EtOH).

^1H -NMR (500 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 0,92 (d, $J = 12,5$ Hz, Ha-1), 1,91 (dd, 4,5, 12,5 Hz, Hb-1), 3,64 (dt, 4,5, 9,5 Hz, H-2), 2,93 (d, 9,5 Hz, H-3), 0,89 (H-5), 1,60 (m, Ha-6), 1,48 (m, Hb-6), 1,35 (m, Ha-7), 1,55 (m, Hb-7), 1,80 (d, $J = 9,0$ Hz, H-9), 2,01 (dd, $J = 3,5, 9,0$ Hz, H-

11), 5,34 (br t, $J = 3,5$ Hz, H-12), 1,01 (m, Ha-15), 1,77 (m, Hb-15), 2,33 (dt, $J = 3,5, 13,0$ Hz, H-16), 3,08 (br s, H-18), 3,27 (d, $J = 3,5$ Hz, H-19), 1,05 (m, Ha-21), 1,68 (m, Hb-21), 1,80 (m, Ha-22), 1,64 (m, Hb-22), 1,04 (s, H-23), 0,83 (s, H-24), 1,02 (s, H-25), 0,78 (s, H-26), 1,34 (s, H-27), 0,96 (s, H-28) và 0,98 (s, H-29).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 48,00 (t, C-1), 69,52 (d, C-2), 84,55 (d, C-3), 40,51 (s, C-4), 56,82 (d, C-5), 19,70 (t, C-6), 33,91 (t, C-7), 40,78 (s, C-8), 49,45 (d, C-9), 39,39 (s, C-10), 24,88 (t, C-11), 124,73 (d, C-12), 144,71 (s, C-13), 42,64 (s, C-14), 29,52 (t, C-15), 28,62 (t, C-16), 46,70 (s, C-17), 45,18 (d, C-18), 82,46 (d, C-19), 36,30 (s, C-20), 29,42 (t, C-21), 34,02 (t, C-22), 29,60 (q, C-23), 17,38 (q, C-24), 19,64 (q, C-25), 17,76 (q, C-26), 25,05 (q, C-27), 182,28 (s, C-28), 28,65 (q, C-29) và 25,13 (q, C-30).

2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (2-epitormentic acid, 2)

Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$; Khối lượng phân tử: $M = 488$; Điểm nóng chảy: $276-278^\circ\text{C}$; Độ quay cực: $[\alpha_{\text{D}}] +99$ (c, 1.1, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 1,31 (m, Ha-1), 1,60 (m, Hb-1), 3,90 (ddd, $J = 12,0, 4,5, 3,0$ Hz, H-2), 3,34 (d, $J = 3,0$ Hz, H-3), 1,30 (m, H-4), 1,43 (m, Ha-6), 1,50 (m, Hb-6), 1,23 (m, Ha-7), 1,62 (m, Hb-7), 1,89 (dd, $J = 3,5, 9,5$ Hz, H-9), 2,00 (Ha-11), 2,03 (Hb-11), 5,31 (br t, $J = 4,0$ Hz, H-12), 1,02 (m, Ha-15), 1,84 (m, Hb-15), 1,55 (m, Ha-16), 2,61 (dt, $J = 4,5, 13,5$ Hz, Hb-16), 2,52 (br s, H-18), 1,37 (m, H-20), 1,26 (m, Ha-21), 1,77 (m, Hb-21), 1,65 (m, Ha-22), 1,74 (m, Hb-22), 1,01 (s, H-23), 0,89 (s, H-24), 1,01 (s, H-25), 0,81 (s, H-26), 1,37 (s, H-26), 1,21 (s, H-29) và 0,95 (d, $J = 6,5$ Hz, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 42,49 (t, C-1), 67,16 (d, C-2), 80,10 (d, C-3), 39,37 (s, C-4), 49,34 (d, C-5), 19,28 (t, C-6), 34,06 (t, C-7), 41,25 (s, C-8), 48,20 (d, C-9), 39,47 (s, C-10), 24,70 (t, C-11), 129,36 (d, C-12), 140,06 (s, C-13), 42,73 (s, C-14), 29,57 (t, C-15), 26,60 (t, C-16), 48,83 (s, C-17), 55,07 (d, C-18), 73,59 (s, C-19), 43,08 (d, C-20), 27,28 (t, C-21), 39,00 (t, C-22), 29,24 (q, C-23), 22,45 (q, C-24), 16,88 (q, C-25), 17,54 (q, C-26), 24,91 (q, C-27), 182,27 (s, C-28), 27,08 (q, C-29) và 16,60 (q, C-30).

4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các dịch chiết metanol của lá, cành, vỏ và gỗ loài Dây gối himalaya đã được thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định. Kết quả thử nghiệm được trình bày trên bảng 1. Kết quả thu được cho thấy dịch chiết metanol lá cây kháng 6 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm, đó là hai chủng vi khuẩn Gram (-) *E. coli* và *P.aeruginosa*, hai chủng vi khuẩn Gram (+) là *B. subtilis* và *S. aureus* và hai chủng nấm mốc là *Asp. niger* và *F. oxysporum*. Dịch chiết metanol vỏ cây kháng một chủng nấm mốc *F. oxysporum*.

Bảng 1

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Dịch chiết metanol	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: $\mu\text{g/ml}$)							
	Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B.subtillis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Asp.niger</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>
Lá	100	200	100	200	200	100	(-)	(-)
Vỏ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)
Gỗ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

III. KẾT LUẬN

- Kết quả điều tra về loài Dây gỏi himalaya (*C. hookery* Prain) cho thấy cây thuốc này được đồng bào dân tộc Dao (Sa Pa) dùng đun nước tắm để trị những bệnh đau nhức xương.

- Kết quả thử nghiệm cho thấy cây thuốc này có hoạt tính kháng sinh khá tốt, đặc biệt dịch chiết metanol lá cây kháng 6 chủng vi sinh vật kiểm định.

- Bằng các phương pháp sắc ký, hai hợp chất $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyolean-12-en-28-oic acid và $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid đã được phân lập. Đây là thông báo đầu tiên về thành phần hoá học của cây thuốc này ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tiến Bân (chủ biên), 2003: Celastraceae R. Br., 1814 - Họ Dây gỏi. Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập II: 1121-1122. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Cheng D., X. Cao, 1992: Phytochemistry, 31: 1317-1320.
3. Võ Văn Chi, 1997: Từ điển cây thuốc Việt Nam: 380- 381. Nxb Y học, Tp. Hồ Chí Minh.
4. Cuc Phuong National Park, 2004: Seed plants of Cuc Phuong National Park of Vietnam. A documented checkedlist: 108 - 109. Agricultural Publishing House.
5. Delgado M. C. C., M. S. Da Silva, R. B. Fo, 1984: Phytochemistry, 23: 2289-2292.
6. Lã Đình Mối, Dương Đức Huyền, 2004: Tài nguyên thực vật Đông Nam Á, Tập 4: 3-6. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Ram P. Rastogi (Editor): Compendium of Indian Medicinal Plants, 5: 1990-1994: 185-186. Central Drug Research Institute, Lucknow & National Institute of Science Communication, New Delhi.
8. Ramesh Chander et al., 2004: Indian Journal of Clinical Biochemistry, 19(2): 141-148.

STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS AND USES OF *CELASTRUS HOOKERY* Prain IN VIETNAM

Nguyen Thi Hien, Tran Minh Hoi, Phan Van Kiem

SUMMARY

Celastrus hookery Prain is a climbing woody plant up to 15 m of height with rough stem bark and many white lenticels. Leaves are alternate, simple, obovate or nearly round, 4 - 6 cm x 7 - 13 cm, lateral veins in 4 - 6 pairs, finely serrate. Inflorescence are axillary umbelliform racemes, about 2.5 - 3.5 cm. Flowers are small, 5-merous, yellow. Fruits are capsular, 3-valved, each containing 1 kidney-shaped seed. Fruiting period is from September to October. This species often climbs up on other trees at elevation of 1.500 m.

According to our study results, *C. hookery* Prain is used to boil as bath water for the treatment of piercing pain in the bone by Dao ethnic group in Lao Cai province. *C. hookery* Prain showed good antimicrobial activity, the methanol extract of the leaves inhibited 6 of 8 tested microbial strains. Two compounds were identified from the leaves extract, including arjunic acid ($C_{30}H_{48}O_5$) and 2-epitormentic acid ($C_{30}H_{48}O_5$). It is the first time these two compounds were isolated from *C. hookery* Prain in Vietnam.