PHÂN LẬP PARIS V VÀ POLYPHYLLIN D TỪ LOÀI BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS YUNNANENSIS* FRANCH.) ĐƯỢC THU HÁI TẠI KONTUM

Châu Thị Nhã Trúc, Lâm Bích Thảo*, Trần Lê Quan**, Trần Công Luận**

TÓM TẮT

Mục tiêu: *Mục tiêu của đề tài là phân lập và xác định cấu trúc một số saponin steroid có trong thân rễ cây Bảy lá một hoa được thu hái tại Kontum.*

Phương pháp: *Thân rễ cây Bảy lá một hoa được chiết với EtOH 70%, sau đó phân tách thành các phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng. Phân đoạn cao ethyl acetat được lựa chọn để phân tách các saponin steroid. Các chất được phân lập bằng các kĩ thuật sắc kí và được xác định cấu trúc hóa học bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và 2 chiều.*

Kết quả: *Phân lập được haihợp chất gồm: Paris V và polyphyllin D.*

Từ khóa: *Bảy lá một hoa,polyphyllin D, paris V, Paris yunnanensis.*

ABSTRACT

ISOLATION FOR PARIS V AND POLYPHYLLIN D FROM PARISYUNNANENSIS FRANCH. GROWNIN KONTUM, VIETNAM

Chau Thi Nha Truc, Lam Bich Thao, Tran Le Quan, Tran Cong Luan

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 138 - 142

Objectives: *The aim of this research is isolation and structure determination of compounds from Paris yunnanensis Franch. grown in Kontum province.*

Methods: *The dried powder of rhizome of Paris polyphylla was percolated with70% aqueous ethanol. The ethanolic extract was separated by liquid-liquid extraction. The ethyl acetate extract was chosen for isolation of steroid saponins. Compounds were purified by chromatographic methods and their structures were elucidated by using Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy*

Results: *Two compounds were identified as Paris V and polyphyllin D.*

Key words: *Paris yunnanensis Franch., paris V, polyphyllin D.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bảy lá một hoa có tên khoa học là *Paris yunnanensis* Franch. Trong y học dân gian, cả cây được sử dụng làm thuốc thanh nhiệt giải độc, tiêu thũng chỉ thống, lương can định kinh. Thân rễ giã đắp chữa rắn cắn, ngã bị sưng[4]… Đã có nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng dược lý của Bảy lá một hoa cho thấy ngoài những tác dụng kể trên còn có nhiều tác dụng khác như ức chế khả năng tăng trưởng tế bào ung thư vú[3], ung thư đường ruột[2], ung thư buồng trứng[6], ức chế co bóp tử cung[7], tác dụng kháng nấm[1].

*Paris yunnanensis*mọc nhiều ở Ấn Độ, Myanma, Trung Quốc. Tại Việt Nam, loài này thường được phân bố ở Lào Cai (Sa Pa), Lai Châu (Phong Thổ), chưa có báo cáo nào công bố loài này được tìm thấy ở các tỉnh phía nam[4,5].

Loài Bảy lá một hoa *Paris yunnanensis* và những loài cùng chi là những cây thuốc thuộc diện quý hiếm cần được bảo vệ. Trong báo cáo này, chúng tôi khảo sát loài *Parisyunnanesis* được thu hái ở Kontum, và xác định các hợp chất saponin steroid trong loài này để góp phần cho việc nâng cao giá trị cây thuốc, qua đó giúp bảo

* Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp Hồ Chí Minh ** Đại học Khoa học Tự nhiên Tp Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: Lâm Bích Thảo *ĐT*: 0909325233 *Email*: thaonhi19842002@yahoo.com

tồn và phát triển một cây thuốc quí hiếm của nước ta.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris yunnanensis* Franch.) được thu hái tại Kon Plong – Kontum vào tháng 10 năm 2011 bởi Bộ môn Tài Nguyên – Dược Liệu thuộc Trung Tâm Sâm và Dược Liệu TP.HCM. Mẫu được định danh bởi GS. TSTrần Hợp tại đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM. Đây là lần đầu tiên loài *Paris yunnanensis* được tìm thấy ở Kontum[6].

Hóa chất

Các dung môi công nghiệp dùng cho chiết xuất và phân lập đều có nguồn gốc Trung Quốc, gồm: Diethyl ether, methanol, *n*-butanol, chloroform, ethyl acetate, ethanol. Các dung môi sử dụng trong sắc ký lỏng điều chế, dung môi sử dụng đo NMR ($CDCl_3$, C_5D_5N) có nguồn gốc của Merck.

Trang thiết bị

Phổ ^1H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz) và 2D NMR được ghi trên máy Bruker Avance III 500Mhz. Độ dịch chuyển hóa học tính bằng ppm, sử dụng TMS làm chất nội chuẩn.

Máy sắc ký lỏng điều chế Shimadzu LC-20A (Nhật), máy cô quay Buchi Rotavapor R-20 (Thụy Sỹ), bình hút ẩm, bình chiết siêu âm Elma LC60H (Đức), Bếp đun cách thủy Memmert (Đức), cân phân tích Melter Toledo AB-204 (Thụy Sĩ), tủ sấy Sanyo Mov-112 (Nhật), đèn soi UV-Vis Desaga Sarstedt Gruppe (Đức), bình triển khai SKLM, cột sắc kí các loại kích thước khác nhau.

Phương pháp nghiên cứu

Bột nguyên liệu (2,5 kg) được làm ẩm và ngâm 24 giờ, chiết ngấm kiệt bằng EtOH 70% (tỉ lệ nguyên liệu (kg): EtOH 70% (L) = 1:6), thu được dịch chiết. Cô giảm áp dịch chiết đến dạng cao sệt, thu được cao EtOH thô (300 g). Cao EtOH thô hòa với nước rồi chiết phân đoạn lần lượt với diethyl ether, ethyl acetat, và *n*-butanol. Dịch chiết các phân đoạn được cô giảm áp thu được các cao diethyl ether (**DE**), ethyl acetat (**EA**), và *n*-butanol(**NB**). Tiến hành sắc kí cột trên phân đoạn ethyl acetat (**EA**, 51,2 g) với hệ dung môi giải li EtOAc-MeOH (10:0–0:10) thu được chín phân đoạn **EA1** (4,3 g), **EA2** (2,7 g), **EA3** (1,5 g), **EA4** (2,3 g), **EA5** (2,2 g), **EA6** (3,4 g), **EA7** (1,8 g), **EA8** (0,9 g), và**EA9** (1,2 g). Sắc ký cột nhiều lần phân đoạn EA4 (2,3 g) trên silica gel với pha động là $CHCl_3$ – MeOH (100:0 – 50:50) thu được hợp chất **1** (10 mg). Sắc ký cột nhiều lần phân đoạn EA6 (3,4 g) trên silica gel với hệ dung môi $CHCl_3$ – MeOH (100:0 – 30:70) thu được phân đoạn chính EA6.2. Tiếp tục tinh chế phân đoạn này bằng sắc ký cột trên RP18 với hệ dung môi MeOH – H_2O (80:20) thu được hợp chất **2** (10 mg).

BÀN LUẬN

Hợp chất 1 (paris V): Chất bột màu trắng, tan tốt trong hệ dung môi $CHCl_3$ – MeOH (1:1) hoặc pyridin.

^1H-NMR (500Mhz, C_5D_5N): 3,93 (*m*, 1H, H-3); 2,79 (*m*, 2H, H-4); 5,3 (*d*, *J* = 5,0, 1H, H-6); 0,81 (*s*, 3H, H-18); 1,06 (*s*, 3H, H-19); 1,12 (*d*, *J* = 7,0, 3H, H-21); 0,68 (*d*, 3H, H-27); 5,03 (*d*, *J* = 7,5, 1H, H-1′); 4,26 (*m*, 1H, H-2′); 4,26 (*m*, 1H, H-3′); 4,15 (*m*, 1H, H-4′); 3,88 (*m*, 1H, H-5′); 4,34 (*m*, 1H, H-6′a); 4,53 (*m*, 1H, H-6′b); 6,36 (*br*, 1H, H-1″); 4,83 (*br*, 1H, H-2″); 4,61 (*dd*, *J*= 9; 3, 1H, H-3″); 4,34 (*m*, 1H, H-4″); 4,98 (*m*, 1H, H-5″); 1,76 (*d*, *J* = 6,5, 3H, H-6″).

^{13}C-NMR (125 Mhz,C_5D_5N): 37,5 (C-1); 30,0 (C-2); 78, 0 (C-3); 39,0 (C-4); 140.9 (C-5); 121,7 (C-6); 32,3 (C-7); 31,7 (C-8); 50,3 (C-9); 37,2 (C-10); 21,1 (C-11); 39,9 (C-12); 40,5 (C-13); 56,6 (C-14); 32,2 (C-15); 81,1 (C-16); 62,9 (C-17); 16,3 (C-18); 19,4 (C-19); 42,0 (C-20); 15,0 (C-21); 109,3 (C-22); 31,8 (C-23); 29,3 (C-24); 30,6 (C-25); 66,9 (C-26); 17,3 (C-27); 100,4 (C-1′); 77,9 (C-2′); 79,7 (C-3′); 71,8 (C-4′); 78,3 (C-5′); 62,7 (C-6′); 102,1 (C-1″); 72,6 (C-2″); 72,9 (C-3″); 74,2 (C-4″); 69,5 (C-5″); 18,7 (C-6″).

Phổ ^{1}H-NMR xuất hiện hai nhómmethyl tứ cấp tại δ_H 0,81 (*s*), 1,06 (*s*) và hai nhómmethyl bậc hai tại δ_H 0,68 (*d*), 1,12 (*d, J* = 7,0 Hz) tương ứng với những nhómmethyl của steroid sapogenin. Ngoài ra, phổ ^{1}H-NMR hiển thị một tín hiệu mũi đôi tại δ_H 5,30 (*br d, J* = 5,0 Hz), đây là đặc trưng của sterol có nối đôi tại vị trí số 5. Phổ ^{1}H-NMR cho thấy 2 tín hiệu protoncủa anomer tại δ_H 5,03 (*d, J* = 7,5 Hz) và 6,36 (*br s*) chứng tỏ có 2 monosacharid trong cấu trúc. Tín hiệu nhómmethyl tại δ_H1,76 (*d, J* = 6,5 Hz) được gắn cho nhóm methyl của đường deoxyhexose.

Phổ ^{13}C-NMR và DEPT cho thấy hợp chất **1** có 39 carbon. Trong đó, có 4 carbon loại >C<, 19 carbon loại >CH– (với 8 carbon loại –CH–O, 2 carbon anomer, 1 carbon loại –CH=, 7 carbon loại >CH–); 11 carbon loại –CH_2– (với 2 carbon loại –CH_2–O, 9 carbon –CH_2–); 5 carbon loại –CH_3. Tín hiệu những nhómmethyl tại δ_C 15,0 (C-21); 16,3 (C-18); 17,3 (C-27); 19,4 (C-19) tương ứng với cấu trúc của steroid sapogenin. Các nối đôi trên khung được củng cố bởi tín hiệu tại δ_C 121,7 (C-6) và 140, 9 (C-5). Ngoài ra, sự xuất hiện một tín hiệu carbon tứ cấp tại δ_C 109,3 (C-22) cho biết sự tồn tại của một spirocetal carbon[8]. Như vậy, hợp chất **1** có phần aglycon là spirostanol. Sự hiện diện hai carbon anomer qua hai mũi cộng hưởng tại δ_C 100,4 (C-1′) và 102,1 (C-1″) cùng với 8 carbon loại >CH–O của phân tử đường cộng hưởng trong vùng 69 – 80 ppm cho phép dự đoán hợp chất **1** là một spirostanol glycoside gắn hai phân tử đường. Trong đó, một đường là glucose ($\delta_{C6'}$ 62,7) và một đường là rhamnose ($\delta_{C6''}$ 18,7).

Các phổ COSY, HSQC, HMBC giúp xác định vị trí các phân tử đường gắn vào nhau và nối vào phần aglycon. Phổ HMBC cho thấy tương quan giữa proton anomer H-1′ ($\delta_{H1'}$ 5,03) với C-3 (δ_{C3} 78,0). Phổ COSY xuất hiện tương quan giữa H-1′ và H-2′ ($\delta_{H2'}$ 4,26); H-2′ trùng vị trí với H-3′; H-3′ với H-4′ ($\delta_{H4'}$ 4,15); H-4′ với H-5′ ($\delta_{H5'}$ 3,88); H-5′ với H-6′ ($\delta_{H6'}$ 4,34). Vậy một đường glucose gắn trực tiếp vào khung spirostanol tại vị trí C-3. H-2′ có sự tương quan với C-1″ ($\delta_{C1''}$ 102,1 trong phổ HMBC. Phổ COSY xuất hiện tương quan giữa H-1″ ($\delta_{H1''}$ 6,36) với H-2″ ($\delta_{H2''}$ 4,83); H-2″ với H-3″ ($\delta_{H3''}$ 4,61); H-3″ với H-4″ ($\delta_{H4''}$ 4,34); H-4″ với H-5″($\delta_{H5''}$ 4,98); H-5″ với H-6″ ($\delta_{H6''}$ 1,76). Vậy một phân tử đường rhamnose gắn vào phân tử đường glucose tại vị trí C-2′.

Từ những dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo[8], hợp chất **1** được xác định là diosgenin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosid (paris V).

Hợp chất 2 (polyphyllin D): Chất bột màu trắng, tan tốt trong hệ dung môi $CHCl_3$ – MeOH (1:1) hoặc pyridin.

^{1}H-NMR (500 MHz, C_5D_5N): δ (ppm) 3,92 (*m*, 1H, H-3); 2,80 (*m*, 2H, H-4); 5,5 (1H, H-6); 4,61 (*m*, 1H, H-16); 0,88 (*s*, 3H, H-18); 1,08 (*s*, 3H, H-19); 1,99 (*m*, 1H, H-20); 1,19 (*d*, J = 6,95, H-21); 0,75 (*d. J* = 4,3, 3H, H-27); 4,96 (*d, J* = 7,75, 1H, H-1′); 4,21 (*m*, 1H, H-2′); 4,28 (*m*, 1H, H-3′); 4,94 (*m*, 1H, H-4′); 3,81 (*m*, 1H, H-5′); 4,28 (*m*, 2H, H-6′); 6,24 (*brs*, 1H, H-1″); 4,82 (*m*, 1H, H-2″); 4,63 (*m*, 1H, H-3″); 4,39 (*m*, 1H, H4″); 4,94 (*m*, 1H, H-5″); 1,79 (*d, J* = 6,1, 3H, H-6″); 5,92 (*brs*, 1H, H-1‴); 4,91 (*m*, 1H, H-2‴); 4,87 (*m*, 1H, H-3‴); 4,22 (*m*, 1H, H5‴).

^{13}C-NMR (125MHz, C_5D_5N): δ (ppm) 38,2 (C-1); 30,9 (C-2); 79,0 (C-3); 39,6 (C-4); 141,5 (C-5); 122,6 (C-6); 33,0 (C-7); 32,4 (C-8); 51,0 (C-9); 37,8 (C-10); 21,8 (C-11); 40,6 (C-12); 41,2 (C-13); 57,4 (C-14); 32,9 (C-15); 81,9 (C-16); 63,5 (C-17); 17,1 (C-18); 20,1 (C-19); 42,7 (C-20); 15,7 (C-21); 110,4 (C-22); 32,5 (C-23); 29,9 (C-24); 31,3 (C-25); 67,6 (C-26); 18,0 (C-27); 100,9 (C-1′); 78,2 (C-2′); 78,6 (C-3′); 78,5 (C-4′); 77,3 (C-5′); 62,1 (C-6′); 102,7 (C-1″); 73,0 (C-2″); 73,4 (C-3″); 74,7 (C-4″); 70,2 (C-5″); 19,3 (C-6″); 110,1 (C-1‴); 83,6 (C-2‴); 78,2 (C-3‴); 87,1 (C-4‴); 63,3 (C-5‴).

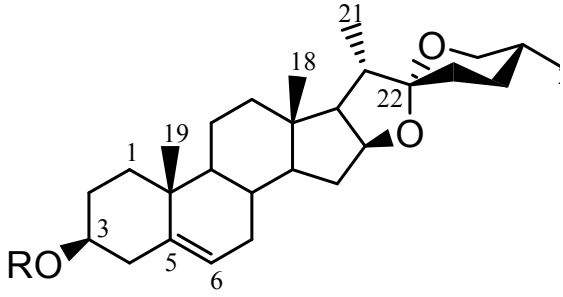
Phổ ^{1}H-NMR xuất hiện hai nhóm methyl tứ cấp tại δ_H 0,88 (*s*), 1,08 (*s*) và hai nhóm methyl bậc hai tại δ_H 0,75 (*d, J* = 4,3 Hz), 1,19 (*d, J* = 6,95 Hz) tương ứng với những nhóm methyl của steroid sapogenin. Ngoài ra, phổ ^{1}H-NMR, HSQC hiển thị một tín hiệu tại δ_H 5,5, đây là đặc trưng của sterol có nối đôi tại vị trí số 5. Phổ ^{1}H-

NMR cho thấy 3 tín hiệu protoncủa anomer tại δ_H 4,96 (*d, J* = 7,75 Hz), 5,92 (*s*), 6,24 (*s*) chứng tỏ có 3 monosacharid trong cấu trúc. Tín hiệu nhóm methyl tại δ_H1,79 (*d, J* = 6,1 Hz) được gắn cho nhóm methyl của đường deoxyhexose.

Phổ ^{13}C-NMR và DEPT cho thấy hợp chất **2** có 44 carbon. Trong đó, có 4 carbon loại >C<, 23 carbon loại >CH– (với 13 carbon loại –CH–O, 3 carbon anomer, 1 carbon loại –CH=, 6 carbon loại >CH–); 12 carbon loại $-CH_2-$ (với 3 carbon loại $-CH_2-O$, 9 carbon $-CH_2-$); 5 carbon loại $-CH_3$. Tín hiệu những nhóm methyl tại δ_C 15,7 (C-21); 17,1 (C-18); 18,0 (C-27); 20,1 (C-19) tương ứng với cấu trúc của steroid sapogenin. Nối đôi trên khung được củng cố bởi tín hiệu tại δ_C 122,6 (C-6) và 141,5 (C-5). Ngoài ra, xuất hiện một tín hiệu carbon tứ cấp tại δ_C 109,3 (C-22) cho biết sự tồn tại của một carbonspirocetal[8]. Như vậy, hợp chất **2** có phần aglycon là spirostanol. Sự hiện diện ba carbon anomer qua ba mũi cộng hưởng tại δ_C 100,9 (C-1′), 102,7 (C-1″) và 110,2 (C-1‴) cùng với 11 carbon loại >CH–O của phân tử đường cộng hưởng trong vùng 70 – 90 ppm cho phép dự đoán hợp chất **2** là một spirostanol glycoside gắn ba phân tử đường. Trong đó, 2 đường pyranose là glucose ($\delta_{C6'}$ 62,07), rhamnose ($\delta_{C6''}$ 19,3) và một đường furan là arabinose ($\delta_{C5'''}$ 63,3).

Các phổ COSY, HSQC, HMBC giúp xác định vị trí các phân tử đường gắn vào nhau và nối vào phần aglycon. Phổ HMBC cho thấy tương quan giữa proton anomer H-1′ ($\delta_{H1'}$ 4,96) với C-3 (δ_{C3} 79,0) và giữa proton C-3 (δ_{H3} 3,92) với carbon anomer C-1′ ($\delta_{C1'}$ 100,9). Phổ COSY xuất hiện tương quan giữa H-1′ và H-2′ ($\delta_{H2'}$ 4,21); H-2′ trùng vị trí với H-3′; H-3′ với H-4′ ($\delta_{H4'}$ 4,94); H-5′ ($\delta_{H5'}$ 3,81)với H-6′ ($\delta_{H6'}$ 4,28). Vậy một đường glucose gắn trực tiếp vào khung spirostanol tại vị trí C-3. H-2′ có sự tương quan với C-1″ ($\delta_{C1''}$ 102,7) trong phổ HMBC. Phổ COSY xuất hiện tương quan giữa H-1″ ($\delta_{H1''}$ 6,24) với H-2″ ($\delta_{H2''}$ 4,82); H-2″ với H-3″ ($\delta_{H3''}$ 4,63); H-3″ với H-4″ ($\delta_{H4''}$ 4,39); H-4″ với H-5″($\delta_{H5''}$ 4,94); H-5″ với H-6″ ($\delta_{H6''}$ 1,79). Vậy một phân tử đường rhamnose gắn vào phân tử đường glucose tại vị trí C-2′. Trong phổ HMBC, H-1‴ ($\delta_{H1'''}$ 5,92) có sự tương quan với C-4′ ($\delta_{C4'}$ 78,5), C-2‴ ($\delta_{C2'''}$ 83,6) và C-4‴ ($\delta_{C4'''}$ 87,1). C-5‴ ($\delta_{C5'''}$ 63,3) tương quan với H-4‴ ($\delta_{H4'''}$ 4,9). Vậy một phân tử đường arabinose gắn vào phân tử đường glucose tại vị trí C-4′.

Từ những dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo[8], hợp chất **2** được xác định là diosgenin-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl(1→2)[*α*-L-arabinofuranosyl(1→4)]-*β*-D-glucopyranoside (polyphyllin D).



(1) R =Rha-(1→2)-Glc

(2) R =Rha-(1→2)-[Araf-(1→4)]-Glc

***Hình**: Cấu trúc hợp chất(**1**) paris V, (**2**) polyphyllin D*

KẾT LUẬN

Từ cao phân đoạn ethyl acetat của thân rễ cây *Paris yunnanensis* đã phân lập được hai hợp chất gồm: Paris V và polyphyllin D. Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng việc phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh với tài liệu tham khảo. Đây là công bố đầu tiên về thành phần hóa học của loài *Paris yunnanensis* được tìm thấy ở Kontum và được

định danh bởi GS. TS. Trần Hợp tại đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dawei D., Denis RL., Janine MC., Dwayne JJ., Kirstin VW., Jenine EU., Richard DC., Ming Z. W., Ming Z L. (2008).“Antifungal saponins from *Paris polyphylla* Smith”.*PlantaMed*,74, 1397–1402.
2. Jing S., Bao RL., Wen JH., Li XY. and Xiao PQ. (2007). “Short communication: *in vitro* anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional chinese medicines on human digestive tumor cell lines”. *Phytotherapy research*, 21, 1102-1104.
3. Mei SL., Judy CYW., Siu K K., Biao Y., Vincent OEC., Henry WNC., Thomas MCW., Kwok PF.”Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft”. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 1248-1254.
4. Nguyễn T. Đ. (2007). *Thực vật chí Việt Nam*.NXB Khoa học – Kỹ thuật, 8, 317 – 318.
5. Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*.NXB y học, 2, 774-777.
6. Xue X., Juan Z., Tri MBN., Peng B., Linbo G., Jinsong L., Shanling L., Jianguo X., Xinlian C., Xuemei Z., He W. (2012). “Paris saponin II of rhizoma paridis – a novel inducer of apoptosis in human ovarian cancer cells”. *BioScience Trends*, 6, 201-211.
7. Yan LL., Zhang YJ., Gao WY., Man SL., Wang Y. (2009). “*In vitro* and *in vivo* anticancer activity of steroid saponins of *Parispolyphylla* var. *yunnanensis”*. *Experimental Oncology*, 31, 27–32.
8. Yun H.; Lijian C.; Wenhong Z.; Yuhong D.; Yongli W.; Qiang W.; Ding Z. (2007). “Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines in vitro from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis”*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43 (6), 672-677.

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*

Ngày phản biện nhận xét bài báo: *15/05/2015*

Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*