XÁC ĐỊNH (−)-LICARIN A TỪ CÂY KHÁO NHẬM (*MACHILUS ODORATISSIMA* NEES, LAURACEAE) BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF (−)-LICARIN A FROM *MACHILUS ODORATISSIMA* NEES (LAURACEAE)

Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, Phan Tống Sơn
Phòng thí nghiệm Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

ABSTRACT

Machilus odoratissima Nees (Vietnamese name: Khao nham or Re vang) is a timber tree of Lauraceae family growing up to a height of 8-10 m. Based on the experiences of the local healers, a decoction from the leaves and the bark of the plant is used in the treatment of dysentery and diarrhoea. The leaves are also used to treat snake bite and burn wounds. In our recent investigation on *M. odoratissima* eight neolignans and lignans were isolated from the dry bark of the plant, of which four were new. (−)-Licarin A (1) was found to be the major component of the *n*-hexane-soluble fraction of the MeOH extract and the compound may play an important role in the ethnomedicinal use of *M. odoratissima*. In the present study a modified isolation procedure was used to isolate pure (−)-licarin A from the dry bark of this plant. The content of (−)-licarin A as estimated using HPLC-DAD calibration curves was found to be 3.71×10^{-2}% of the dry bark (w/w). The mixture of volatile constituents from the dry bark (0.12%, w/w) was examined by GC-MS to reveal the accumulation of mainly sesquiterpenoids. Together with (−)-licarin A the other non-polar compounds isolated were a mixture of □-sitosterol and stigmasterol and (*rel* 7*R*,8*R*,7′*S*,8′*R*)-3,4:3′,4′-bis(methylenedioxy)-7,7′-epoxylignan (2). The structure of the isolated compounds were determined by IR, EI-MS, ^{1}H-, ^{13}C-NMR, and DEPT spectra. The relative stereochemistry of 2 was deduced from ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectroscopic data.

PHẦN MỞ ĐẦU

Cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) là một loài cây thân gỗ thường mọc ở vùng đồi trọc hoặc rừng thưa. Nghiên cứu hoá học và hoạt tính sinh học của chúng tôi bắt nguồn từ công dụng của cây thuốc này trong điều trị lỵ và tiêu chảy. Cao lỏng từ vỏ cây Kháo nhậm có tác dụng kháng vi khuẩn, đặc biệt là chủng *Staphylococcus aureus*. Nước sắc vỏ cây và viên Kháo được điều chế từ tannin Kháo nhậm cũng đã được thử nghiệm lâm sàng hiệu quả trong điều trị viêm đại tràng [1]. Nghiên cứu thành phần hoá học của chúng tôi đã xác định được các lớp hoạt chất thành phần chính của vỏ cây Kháo nhậm, các tannin trong các phần chiết phân cực và các neolignan và lignan trong các phần chiết ít phân cực hơn [2]. Tám neolignan và lignan trong số đó có 4 hợp chất mới đã được phân lập [3] và licarin A là thành phần neolignan chính trong lớp hoạt chất này. Các lignan là lớp hợp chất thiên nhiên có các cấu trúc thu hút được nhiều sự quan tâm do các hoạt tính chống ung thư, kháng virus, giảm huyết áp và tác dụng lên hệ thần kinh trung ương [4]. Như vậy tác dụng chữa bệnh của vỏ cây Kháo nhậm có thể được nghiên cứu như là kết

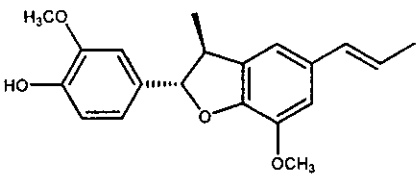
quả sự biểu hiện các hoạt tính của các (neo)lignan. Tiếp tục hướng nghiên cứu này các phân đoạn ít phân cực của phần chiết *n*-hexan đã được phân tách và một lignan khác (*rel* 7*R*,8*R*,7′*S*,8′*R*)-3,4:3′,4′-bis(metylendioxy)-7,7′-epoxylignan đã lần đầu tiên được phân lập. Licarin A đã được định lượng trong vỏ cây Kháo nhậm từ phần chiết *n*-hexan bằng HPLC-DAD trong nghiên cứu này.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

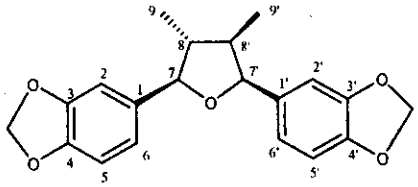
Bột vỏ cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng. Phần chiết MeOH nhận được được phân tách thành các phần chiết *n*-hexan, EtOAc và *n*-BuOH bằng một qui trình phân bố lần lượt dịch chiết MeOH-H_2O 1:1 với các dung môi nói trên theo độ phân cực tăng dần. Nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập licarin A, một trong các hoạt chất thành phần chính của vỏ cây Kháo nhậm, và các hợp chất từ các phân đoạn kém phân cực hơn của phần chiết *n*-hexan. Phần chiết *n*-hexan nhận được với hiệu suất chiết 1,51% so với lượng nguyên liệu khô và cho kết quả dương tính với các lignan bằng phản ứng định tính Baduin.

Phân tách phần chiết n-hexan (MH1), phân lập licarin A (1) và lignan 2

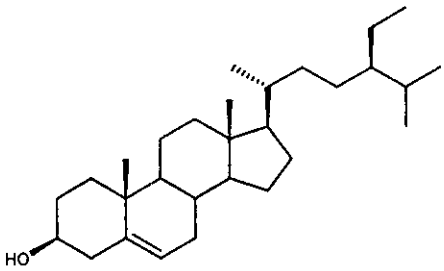
Phần chiết *n*-hexan (**MH1**) được phân tách theo một qui trình cải tiến sử dụng sự kết hợp của các phương pháp phân tách sắc ký hiện đại, sắc ký lỏng trung áp (MPLC), sắc ký cột thường (CC) và sắc ký cột nhanh (FC). Kết quả phân tích trên sắc ký lớp mỏng (TLC) cho thấy một sự phân tách sắc ký gradient trên silica gel với hệ dung môi *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ thích hợp cho việc phân lập các nhóm hợp chất thành phần riêng rẽ với các tính chất phân cực khác nhau. Qui trình phân tách MPLC đầu tiên đã dẫn đến sự phân lập 11 nhóm phân đoạn. Phân đoạn đầu **MH1.1** (8% phần chiết *n*-hexan) chứa các hợp chất dễ bay hơi của vỏ cây Kháo nhậm; các hợp chất này đã được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ liên hợp (GC-MS). Kết quả so sánh các phổ EI-MS nhận được với thư viện phổ đã cho phép nhận dạng được một phần phân đoạn này, chủ yếu là các hợp chất mono- và sesquitecpenoit. *trans*-Calamenen là thành phần chính được nhận dạng chiếm 18,5% của phân đoạn **MH1.1** (% TIC trên cột HP-5-MS). Các thành phần khác là bocnyl axeat (0,4%), α-copaen (7,0%), β-caryophyllen (3,1%), axit undecanoic (0,4%), α-humulen (0,8%), γ-cadinen (1,7%), α-cubeben (0,3%), γ-muurolen (1,0%), α-muurolen (3,5%), δ-cadinen (1,1%), α-calacoren (1,3%), β-calacoren (1,6%), guaiol (0,4%), β-eudesmol (0,4%), α-eudesmol (2,8%), azulen (0,3%) và cadalen (0,3%). Từ phân đoạn **MH1.2** và **MH1.4** bằng sắc ký cột CC và FC đã cho tương ứng một lignan, (*rel* 7*R*,8*R*,7′*S*,8′*R*)-3,4:3′,4′-bis(metylendioxy)-7,7′-epoxylignan (**2**) và một neolignan, licarin A (**1**). Licarin A được phân lập với hiệu suất 33,3% của phân đoạn **MH1.4**, được xác định cấu trúc bằng các dữ kiện phổ IR, EI-MS, ^{1}H- và ^{13}C-NMR. Hỗn hợp β-sitosterol (**3a**) và stigmasterol (**3b**) cũng đã được phân lập và xác định cấu trúc (IR, EI-MS, ^{1}H- và ^{13}C-NMR) từ phân đoạn **MH1.2** của phần chiết *n*-hexan.



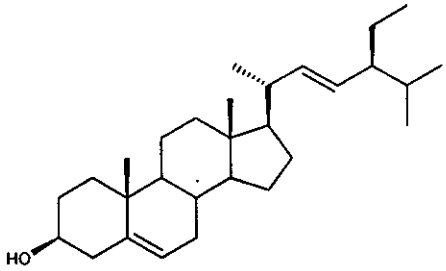
1



2



3a



3b

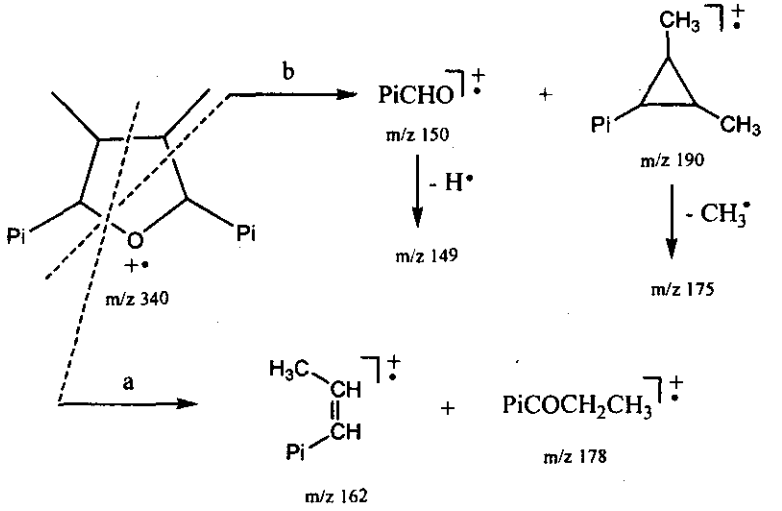
Hợp chất 2 được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c. 104-105°C. Hợp chất này ít phân cực hơn so với licarin A. Phổ EI-MS (m/z 340, M^+) cho giả thiết về công thức phân tử của 2 là $C_{20}H_{20}O_5$. Phổ IR chỉ ra sự có mặt của các vòng thơm (1607, 1491 và 1444 cm^{-1}). Các phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR (DEPT) của 2 cho thấy hợp chất này có 18 nguyên tử cacbon với 2 hệ vòng benzen, 2 nhóm metyl bậc 2 [δ_H 1,02 (3H, d) và 0,65 (3H, d); δ_C 15,3 (q) và 14,9 (q)], 2 nhóm oximetin [δ_H 5,07 (1H, d) và 4,32 (1H, d); δ_C 87,4 (d) và 82,9 (d)] và 2 nhóm metin [δ_C 48,7 (d) và 45,9 (d)]; ngoài ra còn có 2 nhóm metylendioxy [δ_H 5,95 (2H); δ_C 100,98 (t) và 100,9 (t)]. Các đặc điểm phổ này cho thấy 2 có cấu trúc của một lignan có vòng tetrahydrofuran. Các hệ vòng benzen được xác định là 3,4-metylendioxyphenyl (piperonyl, Pi) và do đó 2 phải là một 3,4:3′,4′-bis(metylendioxy)-7,7′-epoxylignan. Hoá lập thể tương đối ở các vị trí 7, 8 và 7′, 8′ của 2 được xác định trên cơ sở các dữ kiện phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR. Trong số các 7,7′-epoxylignan các dữ kiện phổ ^{13}C-NMR ở các vị trí này của 2 tương tự với của veraguesin [8] đã xác định cấu hình tương đối *trans* H-7/H-8, *trans* H-8/H-8′ và *cis* H-7′/H-8′ của vòng tetrahydrofuran. Các dữ kiện phổ ^{1}H-NMR [δ_H 5,07 (1H, d, *J*=9,5 Hz, H-7′), 2,18 (1H, m, H-8′), 0,65 (3H, d, *J*=7,0 Hz, H_3-9′) và 4,32 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-7), 1,7 (1H, m, H-8), 1,02 (3H, d, *J*=6,5 Hz, H_3-9)] cũng hoàn toàn phù hợp với của các ligan dạng 7,8-*trans*-8,8′-*trans*-7′,8′-*cis*-tetrahydrofuran [9,10]. Điều này phù hợp với hiệu ứng anisotropic trong trường hợp cấu hình *cis* của nhóm aryl ở C-7′ và nhóm metyl ở C-8′ ($\Delta\delta_{H\text{-}9'\text{–}H\text{-}9}$ −0,37). Trên cơ sở các phân tích phổ cấu trúc của 2 đã được xác định là (*rel* 7*R*,8*R*,7′*S*,8′*R*)-3,4:3′,4′-bis(metylendioxy)-7,7′-epoxylignan.

Phân tích sự phân mảnh trên phổ EI-MS khẳng định cho cấu trúc được đưa ra của 2 (Hình 1).

Phân tích định lượng licarin A trong vỏ cây Kháo nhậm từ phần chiết *n*-hexan bằng phương pháp HPLC-DAD

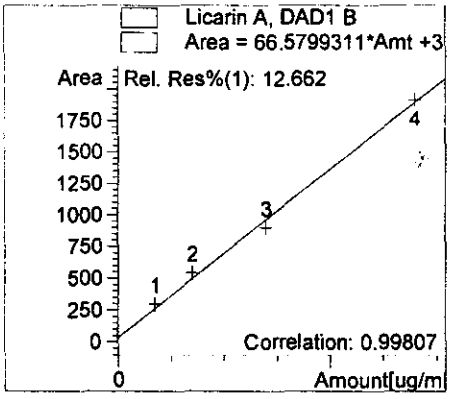
Licarin A được xác định cấu trúc bằng cách so sánh các phổ IR, EI-MS, ^{1}H-và ^{13}C-NMR với của mẫu chuẩn. Hoá lập thể tuyệt đối của hợp chất này được xác định là 2*S*,3*S* trên cơ sở

so sánh dấu và giá trị α_D của nó {$[\alpha]_D^{25}$ −53,8° (*c* 5,58, $CHCl_3$)} với của (−)-licarin A được tổng hợp toàn phần ($[\alpha]_D^{25}$ −44,0°) [5]. Licarin A kìm hãm sự phát triển của ấu trùng *Spodoptera litura* [6] và diệt *Trypanosoma cruzi*, tác nhân gây bệnh Chagas [7].



Hình 1: Các sự phân mảnh chính trên phổ EI-MS của 2

Phân tích định lượng licarin A được thực hiện trên thiết bi HPLC-DAD trên cột ODS-C18 ở nhiệt độ 50°C và ở bước sóng λ 274nm. Ở điều kiện này pha động axetonitril-H_2O 85:15 với tốc độ dòng 1 ml/phút cho độ phân giải tốt. Trên sắc ký đồ HPLC xuất hiện 4 pic với thời gian lưu tương ứng là 1,173; 1,864; 3,076 và 3,681 phút, trong đó pic có thời gian lưu 3,076 phút được xác định là tương ứng với của licarin A tinh khiết được phân lập trong nghiên cứu này. Đường ngoại chuẩn của licarin A được xây dựng sử dụng các mẫu chuẩn trong khoảng nồng độ 3,5-28,0 µg/ml. Đường chuẩn này được xác định là tuyến tính (r^2 = 0,9981) trong khoảng các nồng độ được sử dụng (Hình 2).



Hình 2: Đường ngoại chuẩn của licarin A biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích pic và nồng độ của mẫu chuẩn

Nồng độ licarin A trong mẫu khảo sát được xác định là 16,6274 □g/ml, và hàm lượng licarin A trong phần chiết *n*-hexan là 2,445% (w/w). Như vậy, hàm lượng licarin A trong mẫu vỏ cây Kháo nhậm khô được xác định theo phương pháp định lượng từ phần chiết *n*-hexan là $3,71\times10^{-2}$%.

PHẦN THỰC NGHIỆM

Phương pháp và Thiết bị

Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên thiết bị Impact 410-Nicolet FT-IR spectrophotometer. Phổ khối lượng (EI-MS) được đo trên thiết bị Varian MAT 44S spectrometer. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) được đo trên thiết bị Bruker AV 500 spectrometer với tetrametylsilan (TMS) là chất chuẩn nội zero. HPLC được thực hiện trên thiết bị HPLC Agilent Technology 1100 DAD, sử dụng cột ODS-C18 (250 mm × 4,6 mm), nhiệt độ cột 50°C, pha động CH_3CN-H_2O 85:15, tốc độ dòng 1 ml/phút. GC-MS được thực hiện trên thiết bị HP 19091 S-433, sử dụng cột HP-5-MS (30 m×0,25 mm×0,25 μm) liên hợp với MSD HP6890. Chương trình nhiệt độ 60-220°C, 220-250°C, 5°C/phút. Nhiệt độ injector 250°C, khí mang He. TLC được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel DC-Alufolien 60 F_{254} (Merck). Phát hiện vệt chất trên lớp mỏng bằng đèn tử ngoại (UVλ 254 nm) và thuốc thử vanilin/H_2SO_4 đặc 1%. MPLC được thực hiện trên thiết bị MPLC Bæckström SEPARO AB sử dụng bơm định lượng trung áp QD-O-SSY (tốc độ dòng 0-100 ml/phút, áp lực nén 0,5-6,0 bar); cột tách thuỷ tinh SEPARO (250 mm×20 mm), được nhồi silica gel Merck 60 (cỡ hạt 15-40 μm). CC được thực hiện dưới trọng lực của dung môi, sử dụng silica gel Merck (cỡ hạt 63-100 mm). FC được thực hiện dưới áp lực không khí nén 0,2-0,3 bar, sử dụng silica gel Merck 60 (cỡ hạt 15-40 μm).

Nguyên liệu thực vật

Vỏ cây Kháo nhậm (*Machilus odoratissma* Ness, Lauraceae) được thu thập tại Đồng Hỷ, Thái Nguyên vào tháng 6 dương lịch. Vỏ cây được phơi khô trong bóng râm rồi sấy ở 50°C, sau đó được nghiền thành bột mịn.

Chiết và Phân lập các hợp chất 1, 2, 3a và 3b

Bột vỏ khô Kháo nhậm (1,8 kg) được ngâm chiết với MeOH khan ở nhiệt độ phòng (5 lần, mỗi lần trong 3 ngày). Các dịch chiết MeOH được gộp lại, sau đó được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C đến thể tích 0,5 l. Hoà loãng dịch chiết MeOH bằng 0,5 l nước cất. Dịch chiết MeOH-H_2O được chiết lần lượt với các dung môi theo độ phân cực tăng dần *n*-hexan, etyl axetat và *n*-butanol để cho các phần chiết tương ứng *n*-hexan (MH1, 27,3 g, 1,51%), EtOAc (MH2, 246,9 g, 13,7%) và *n*-BuOH (MH3, 5,1 g, 0,3%) sau khi đã cất loại hết dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C.

Một phần của phần chiết *n*-hexan (MH1) (10 g) được phân tách gradient bằng MPLC sử dụng hệ dung môi *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ 50:1→1:1 với hệ dung môi chính *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ 5:1 cho 100 phân đoạn (25 ml/phân đoạn). Các phân đoạn này được gộp lại thành 11 nhóm phân đoạn (MH1.1-MH1.11). Nhóm phân đoạn MH1.1 (0,8 g) chứa nhiều hợp chất dễ bay hơi và được phân tích bằng GC-MS. Nhóm phân đoạn MH1.2 (0,1 g) được phân tách sắc ký nối tiếp bằng CC và FC với hệ dung môi *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ gradient để cho các hợp chất 2 (10 mg) và 3a/3b (10 mg). Nhóm phân đoạn MH1.4 (0,3 g) được phân tách 2 lần bằng CC trên silica gel, rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ gradient, để cho hợp chất 1 (0,1 g).

Licarin A (1): Tinh thể hình kim không màu, đ.n.c. 114-115°C. $[\alpha]_D^{25}$ −53,8° (*c* 5,58, $CHCl_3$). R_f 0,42 [silica gel TLC, *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ 4:1, v/v]. Phổ IR, EI-MS, ^{1}H- và ^{13}C-

NMR (CD_3OD) hoàn toàn phù hợp với của mẫu chuẩn.

(Rel 7R,8R,7'S,8'R)-3,4:3',4'-bis(methylenedioxy)-7,7'-epoxylignan (2): Tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c. 104-105°C. R_f 0,69 [silica gel TLC, *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ 8:1, v/v]. EI-MS: m/z (%) 340 (17, $M^{+\cdot}$, $C_{20}H_{20}O_5$), 190 (100), 178 (6), 175 (51), 162 (15), 149 (19), 145 (64), 135 (14), 117 (21), 91 (12), 77 (7). IR (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3072, 1607, 1491, 1444, 1251, 1101, 1032. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 7,0 (1H, d, *J*=1,6 Hz, H-6'), 6,78-6,92 (5H, m, H-2, H-5, H-6, H-5', H-6'), 5,95 (1H, d, *J*=1,3 Hz, -OCH_2O-), 5,95 (1H, d, *J*=1,3 Hz, -OCH_2O-), 5,07 (1H, d, *J*=9,5 Hz, H-7'), 4,32 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-7), 2,18 (1H, m, H-8'), 1,7 (1H, m, H-8), 1,02 (3H, d, *J*=6,5 Hz, H_3-9), 0,65 (3H, d, *J*=7,0 Hz, H_3-9'). ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 147,8 (s, C-3'), 147,5 (s, C-3), 147,1 (s, C-4'), 146,6 (s, C-4), 135,0 (s, C-1'), 134,6 (s, C-1), 120,2 (d, C-2'), 120,1 (d, C-2), 108,1 (d, C-5'), 107,8 (d, C-5), 107,6 (d, C-6'), 106,9 (d, C-6), 100,98 (t, -OCH_2O-), 100,9 (t, -OCH_2O-), 87,4 (d, C-7), 82,9 (d, C-7'), 48,7 (d, C-8), 45,9 (d, C-8'), 15,3 (q, C-9'), 14,9 (q, C-9).

β-Sitosterol (3a) và Stigmasterol (3b): Tinh thể hình kim màu trắng, đ.n.c. 135-136°C. R_f 0,5 [silica gel TLC, *n*-hexan-$(CH_3)_2CO$ 8:1, v/v]. Phổ IR, EI-MS, ^{1}H- và ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) hoàn toàn phù hợp với của mẫu chuẩn.

Phân tích định lượng licarin A trong vỏ cây Kháo nhậm từ phần chiết *n*-hexan (MH1) bằng HPLC-DAD

Dung dịch mẫu gốc của phần chiết *n*-hexan (MH1) được chuẩn bị từ 27,2 mg MH1 trong 2 ml axetonitril. 50 µl dung dịch gốc được định mức thành 1 ml bằng axetonitril ứng với nồng độ 0,68 mg/ml. Mẫu phân tích được lọc qua bộ lọc Millipore và mỗi dung dịch được phân tích bằng HPLC 3 lần để lấy giá trị trung bình. Licarin A được định lượng dựa vào đường ngoại chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích pic và nồng độ của mẫu chuẩn trong khoảng nồng độ 3,5-28,0 µg/ml.

Lời cảm ơn. Công trình nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ của Chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học tự nhiên (Việt Nam) và International Foundation for Science (IFS) (Thụy Điển).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Minh, *Thuốc chữa bệnh nhiễm khuẩn từ cây cỏ trong nước*, 105-109, Nhà xuất bản Y học, Thành phố Hồ Chí Minh (1995).
2. Phan Tống Sơn, Phan Minh Giang, Trần Thị Quỳnh Hoa, Đỗ Thị Việt Hương, *Tuyển tập các công trình Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hoá hữu cơ toàn quốc lần thứ III*, 417-421, Hà Nội, 11/2005.
3. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Matsunami K., Otsuka H., *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 380-383 (2006).
4. McRae W. D., Towers G. H. N., *Phytochemistry*, 23, 1207-1220 (1984).
5. Nascimento I. R., Lopes L. M. X., Davin L. B., Lewis N. G., *Tetrahedron*, 56, 9181-9193 (2000).
6. González-Coloma A., Escoubas P., Mizutani J., Lajide L., *Phytochemistry*, 35, 607-610 (1994).
7. Abe F., Nagafuji S., Yamauchi T., Okabe H., Maki J., Higo H., Akahane H., Aguilar A., Jimenez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1188-1191 (2002).
8. Fonseca S. F., Barata L. E. S., Ruveda E. A., Baker P. M., *Can. J. Chem.*, 57, 441 (1979).
9. Hattori M., Hada S., Kawata Y., Tezuka Y., Kikuchi T., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 3315-3322 (1987).
10. Kraft C., Jenett-Siems K., Köhler I., Tofern-Reblin B., Siems K., Bienzle U., Eich E., *Phytochemistry*, 60, 167-173 (2002).