

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC LÁ CÂY SƠN TRÀ POILANE (*ERIOBOTRYA POILANEI* J.E. VID.), HỌ HOA HỒNG (ROSACEAE)

I. TRITECPEN KHUNG URSAN

Dinh Gia Thiện¹, Trần Văn Chiến², Nguyễn Thị Hoàng Anh², Trần Văn Sung²

¹Trường THPT Lê Quý Đôn – TP Tam Kỳ - Tỉnh Quảng Nam

²Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 18-10-2010

Abstract

Three triterpenes with the ursane skeleton were isolated from the *n*-hexane and ethyl acetate extracts of *Eriobotrya poilanei*'s leaves collected in national park Bì Dup, Núi Ba, Lam Dong province. Their structures were elucidated by analysis of MS, NMR spectra and comparison with the published data. They are ursolic acid, ursolic aldehyd and pomolic acid.

1. MỞ ĐẦU

Họ Hoa hồng (Rosaceae) là một họ thực vật lớn với gần 3000 loài thuộc 100 chi khác nhau. Trong đó, *Eriobotrya* là một chi nhỏ với khoảng 10 loài, xuất xứ từ đông và đông nam châu Á. Ở Việt Nam, theo tác giả Phạm Hoàng Hộ, chi Sơn trà (*Eriobotrya*) gồm có 13 loài [1] được phân bố ở nhiều nơi trong cả nước. Trong số đó mới chỉ có một vài loài được nghiên cứu. Đặc biệt là loài *Eriobotrya japonica* Lindl., có tên tiếng Anh là Loquat và tiếng Việt là Tỳ bà diệp hay Sơn trà Nhật bản đã được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và phát hiện nhiều hợp chất có cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học lý thú. Ví dụ như hoạt tính chống oxi hóa của các tritecpen axit hay hoạt tính chống khối u của các hợp chất megastigman glycosit và polyphenol phân lập từ lá cây *E. japonica* [2, 3]. Các kết quả thú vị về hóa học và hoạt tính được lý của cây *E. japonica* thúc đẩy chúng tôi nghiên cứu thành phần hóa học của các loài khác thuộc Chi Sơn trà ở Việt Nam. Cây Sơn trà Poilane (*Eriobotrya poilanei* J. E. Vid.) là cây đại mộc cao 15 m, lá dài 15 18 cm, phân bố nhiều ở Lâm đồng [1]. Kết quả tra cứu tài liệu cho thấy, đến nay chưa có tài liệu nào về thành phần hóa học của cây Sơn trà Poilane. Bài báo này công bố việc phân lập và xác định cấu trúc của ursolic acid (1), ursolic aldehyd (2) và pomolic axit (3) từ dịch chiết *n*-hexan và etyl axetat của lá cây này.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz, phổ khối EI-MS

được đo trên máy HP 5989B-MS tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. FT-IR: Nicolet IMPACT 410. Sắc ký bản mỏng được tiến hành trên bản silica gel Merck 60F₂₅₄. Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 0,04 - 0,063 mm.

2.2. Mẫu thực vật

Mẫu được thu hái tại rừng quốc gia Bì Dúp, Núi Bà thuộc tỉnh Lâm Đồng vào tháng 3 năm 2009 và do TS. Đỗ Tiến Hiệp – Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam xác định tên khoa học.

2.3. Chiết mẫu thực vật và phân lập các chất

Mẫu lá (1800 g) được sấy khô, nghiền nhỏ và ngâm chiết 3 lần trong hỗn hợp metanol:nước (85:15) ở nhiệt độ phòng. Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm, dịch nước còn lại được chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, etyl axetat, *n*-butanol. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn dịch chiết tương ứng với khối lượng là 12, 110 và 130 g.

Dịch chiết *n*-hexan (9,4 g) được tinh chế qua cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc, tỉ lệ EtOAc tăng dần từ 2 100% thu được 12 phân đoạn, kí hiệu EPH1 EPH12. Phân đoạn EPH9 được tiếp tục làm sạch bằng cột silica gel, hệ dung môi gradient *n*-hexan/CH₂Cl₂ (98/2; ... 15/1) thu được 3 phân đoạn. Tinh chế phân đoạn giàu chất 2 qua cột silica gel hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc = 20/1 thu được 20 mg chất 2 dưới dạng bột màu trắng, ESI-MS: 441 [M + H]⁺, IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3421, 2932, 2858, 1718, 1459, 1379, 1039 và 753.

Dịch chiết EtOAc (50g) được đưa lên cột silicagel, giải hấp bằng hỗn hợp *n*-hexan: EtOAc với tỉ lệ EtOAc tăng từ 50 đến 100%, sau đó bằng hỗn hợp EtOAc:MeOH với tỉ lệ MeOH tăng từ 0 đến 50% thu được 20 phân đoạn. Phân đoạn 4-6 (3,3 g) được tinh chế tiếp qua cột silica gel, dung môi *n*-hexan:EtOAc với lượng EtOAc tăng dần từ 20 đến 100% thu được 12 phân đoạn. Phân đoạn giàu chất 1 tiếp tục được làm sạch bằng cột flash silica gel, dung môi *n*-hexan:CH₂Cl₂:MeOH = 4:2.5:0.3 thu được 110mg chất 1 ở dạng bột màu trắng, IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3448, 2932, 2869, 1691, 1460, 1383, 1034.

Từ các phân đoạn 1-10 cột đầu tiên của dịch chiết EtOAc có xuất hiện kết tủa bột màu trắng, chúng tôi đã lọc hút, lấy phần chất rắn và rửa nhiều lần với *n*-hexan, thu được 11,7 g bột, ký hiệu là **EPE1**, cho một vết trong bản mỏng phân tích, nhưng là một hỗn hợp chứa 2 chất chính trong phổ ¹H-NMR. Vì vậy để tăng khả năng phân tách của hỗn hợp chúng tôi đã tiến hành phản ứng axetyl hóa **EPE1**.

Phản ứng axetyl hóa hỗn hợp **EPE1**: 2 g **EPE1** được hòa tan trong 15ml pyridin và cho dần dần 3 ml anhydrit axetic vào, lắc đều, đậy nắp bình và để ở nhiệt độ phòng trong khoảng 24 giờ. Hỗn hợp sau khi phản ứng được cho thêm nước để phân hủy anhydrit acetic dư, sau đó chiết 3 lần với CHCl₃. Gộp dịch chiết CHCl₃, rửa với nước đến pH = 7, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 1,9 g sản phẩm. Tinh chế 1.9g sản phẩm axetyl hóa bằng cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc = 92:8 thu được 2 sản phẩm chính là **EPE1-Ac1 (1a)** (1,1 g) và **EPE1-Ac2 (3a)** (300 mg).

Chất **1a**: Chất bột màu trắng, ESI-MS: 497 [M-H]⁻; IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2932, 2868, 1735, 1692, 1459, 1368, 1247 và 1034.

Chất **3a**: Chất bột màu trắng, ESI-MS: 513 [M-H]⁻; IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3458, 2932, 2868, 1733, 1690, 1462, 1370, 1253 và 1037.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất 1 được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ IR của nó cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl tại 3448 cm⁻¹ và nhóm cacboxyl tại 1691 cm⁻¹. Phù hợp với IR, phổ ¹H và ¹³C-NMR cho thấy phân tử chất 1 có chứa một nhóm axit ($\delta_C = 178,23$), một tín hiệu của nhóm hydroxymetin ($\delta_H = 2,98$ m, $\delta_C = 76,85$ d), một nối đôi dạng >C=CH- [$\delta_H = 5,11$ (1H, t, J = 3,4), $\delta_C = 138,17$ s; 124,57 d] và bảy nhóm methyl, bao gồm 5 nhóm methyl bậc 4 thể hiện qua các tín hiệu singlet ở $\delta_H = 0,66, 0,73, 0,85, 0,88, 1,02$ và 2 nhóm bậc 3 thể hiện qua các tín hiệu doublet ở $\delta_H = 0,79$ (3H, d, J = 6,4), 0,89 (3H, d, J = 8,7). Ngoài các tín hiệu kể trên, phổ ¹³C-NMR,

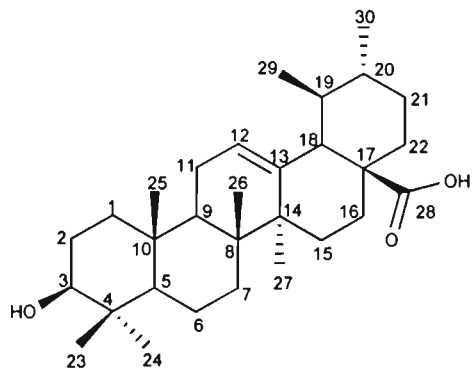
DEPT còn cho thấy sự có mặt của 9 nhóm CH₂, 3 nhóm CH cũng như 6 cacbon bậc 4 trong phân tử. Với các số liệu phổ như đã phân tích có thể đưa ra công thức phân tử của chất 1 là C₃₀H₄₈O₃ và cấu trúc của nó được xác định là ursolic acid nhờ so sánh với số liệu đã công bố [4]. Ursolic axit là chất tồn tại khá phổ biến trong thế giới thực vật và được phát hiện có nhiều hoạt tính sinh học lý thú như kháng viêm, kháng virus, chống oxy hóa, ngăn ngừa khối u và chữa bệnh thấp khớp [4].

Chất 2 cho pic ion phân tử tại $m/z = 441$ [M + H]⁺. Phổ IR cho thấy các đỉnh hấp thụ ở 3421 (OH), 1718 cm⁻¹ (CHO). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của nó tương tự như chất 1 chỉ có sự khác biệt duy nhất là nhóm acid trong chất 1 được thay bằng nhóm aldehyd ở chất 2. Điều này được thể hiện qua các tín hiệu ở $\delta_H = 9,32$ (1H, s) và $\delta_C = 207,4$ d. Cấu trúc của chất 2 được kết luận là ursolic andehit nhờ kết hợp so sánh với số liệu phổ khối và phổ ¹H-NMR trong tài liệu [5]. Chúng tôi đã không tìm được tài liệu công bố số liệu phổ ¹³C-NMR của ursolic aldehyd, vì vậy các số liệu ¹³C được gán dựa vào việc so sánh với số liệu mô phỏng theo chương trình phần mềm của ChemBioDraw Ultra.

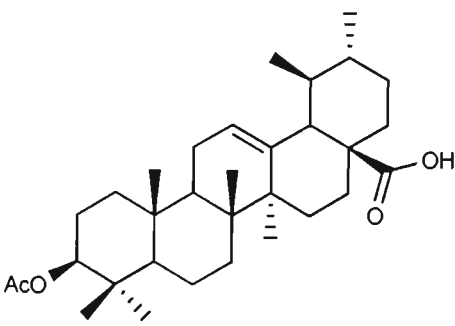
Tinh chế sản phẩm axetyl hóa hỗn hợp **EPE1** (xem phần thực nghiệm) thu được 2 chất là **EPE1-Ac1 (1a)** và **EPE1-Ac2 (3a)**.

Chất **1a** cho pic ion phân tử ở $m/z = 497$ [M-H]⁻ trong phổ khối ESI-MS. Phổ ¹H và ¹³C-NMR cho thấy **1a** chính là sản phẩm axetyl hóa của ursolic acid, được thể hiện qua các tín hiệu của một nhóm acid ($\delta_C = 183,97$), một nhóm metin có gắn với oxi ($\delta_H = 4,50$ m, $\delta_C = 80,97$ d), một nối đôi dạng >C=CH- [$\delta_H = 5,23$ (1H, t, J = 3,5), $\delta_C = 137,99$ s; 125,75 d], một nhóm axetyl [$\delta_H = 2,04$ (3H, s), $\delta_C = 171,02, 21,18$] và bảy nhóm methyl.

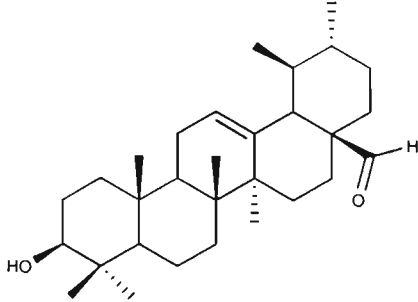
Phổ ¹H và ¹³C-NMR của chất **3a** cho thấy nó cũng có khung urs-12-en-28-oic axit, nhưng trong phân tử xuất hiện thêm một nhóm hydroxy gắn với C-19, điều này thể hiện qua tín hiệu cacbon bậc bốn tại $\delta_C = 73,09$. Các số liệu phổ cho thấy trong phân tử chỉ chứa một nhóm axetyl [$\delta_H = 2,05$, $\delta_C = 21,30, 171,03$]. Như vậy là phản ứng axetyl hóa chỉ thực hiện với nhóm hydroxy bậc 2 ở vị trí C-3. Các số liệu phổ của **3a** hoàn toàn phù hợp với số liệu của pomolic axit 3- β -axetat trong tài liệu [6]. Như vậy, chất gốc của **3a** có trong dịch chiết etyl axetat lá cây Sơn trà poilane chính là pomolic axit. Tóm lại, hỗn hợp **EPE1** bao gồm 2 thành phần chính là ursolic axit và pomolic axit với tỉ lệ tương ứng là 50,3 và 13,8%. Pomolic axit đã được phân lập trước đây từ vỏ quả táo, *Micromeria benthami*, *Euscaphis japonica* và một số loài khác. Nó thể hiện một số hoạt tính sinh học như ức chế men DNA polymeraza và kháng HIV [7].



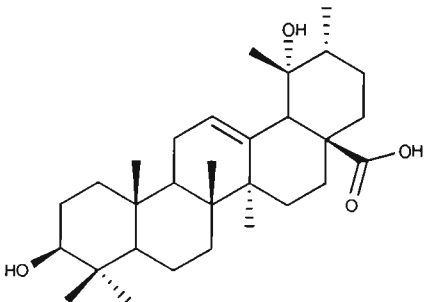
1: Ursolic axit



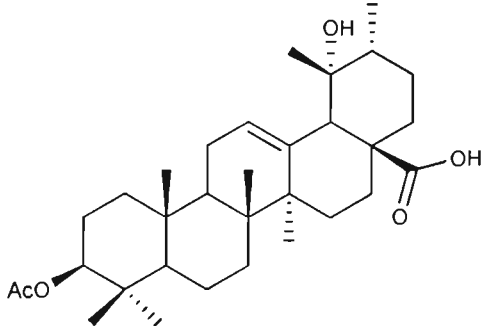
1a: Ursolic axit 3β-axetat



2: Ursolic andehyt



3: Pomolic axit



3a: Pomolic axit 3β-axetat

Bảng 1: Số liệu phổ ¹H-NMR của các chất 1-3 (500 MHz) và số liệu dẫn trong tài liệu

H	1 (DMSO-d ₆)	Ursolic axit (DMSO-d ₆) [4]	2 (CDCl ₃)	Ursolic aldehyt (CDCl ₃) [5]	3a (CDCl ₃)	Pomolic 3β- axetat (CDCl ₃) [6]
H-12	5,11 (1H, m)	5,14 (1H, m)	5,31 (1H, t, J = 3,7)	5,34 (1H, t)	5,34 (1H, t, J = 3,6)	5,34 (1H, t, J = 3,6)
OH	4,25 (1H, brs)	4,31 (1H, brs)	4,7 (1H, brs)			
H-3	2,98 (1H, m)	3,01 (1H, dd, J = 5,2, 9,5)	3,21 (1H, dd, J = 5, 12)	3,4 (1H, dd)	4,50 (1H, dd, J = 10, 6)	4,50 (1H, dd, J = 10, 6)
H-18	2,09 (1H, d, J = 11,3)	2,12 (1H, d, J = 11,1)	1,98 (1H, d, J = 12)	1,98 (1H, d, J = 10)	2,53 (1H, s)	2,53 (1H, s)
Me-23	0,88 (3H, s)	0,90 (3H, s)	0,98 (3H, s)	0,93 (3H, s)	0,87 (3H, s)	0,88 (3H, s)
Me-24	0,66 (3H, s)	0,68 (3H, s)	0,77 (3H, s)	0,74 (3H, s)	0,86 (3H, s)	0,85 (3H, s)
Me-25	0,85 (3H, s)	0,87 (3H, s)	0,92 (3H, s)	0,84 (3H, s)	0,95 (3H, s)	0,94 (3H, s)
Me-26	0,73 (3H, s)	0,69 (3H, s)	0,78 (3H, s)	0,81 (3H, s)	0,72 (3H, s)	0,73 (3H, s)
Me-27	1,02 (3H, s)	1,05 (3H, s)	1,09 (3H, s)	1,13 (3H, s)	1,25 (3H, s)	1,25 (3H, s)
Me-29	0,79 (3H, d, J = 6,4)	0,82 (3H, d, J = 5,9)	0,87 (3H, d, J = 6,5)	0,85 (3H, d, J = 6)	1,21 (3H, s)	1,21 (3H, s)
Me-30	0,89 (3H, d, J = 8,7)	0,92 (3H, d, J = 6,8)	0,96 (3H, d, J = 5,0)	0,95 (3H, d, J = 6)	0,95 (3H, d, J = 6,5)	0,95 (3H, d, J = 6,5)
OAc		-	-		2,04 (3H, s)	2,04 (3H, s)

Bảng 2: Số liệu phổ ¹³C-NMR của các chất 1-3 và các số liệu dẫn trong tài liệu

C	1 (DMSO-d ₆)	Ursolic acid (DMSO-d ₆) [4]	2 (CDCl ₃)	Ursolic aldehyt (mô phỏng)	3a	Pomolic axit 3β-axetat (CDCl ₃) [6]
1	38,24 t	38,22 t	38,78 t	38,9 t	38,07 t	38,1 t
2	26,96 t	26,79 t	27,26 t	27,4 t	23,52 t	23,6 t
3	76,85 d	76,82 d	79,04 d	78,63 d	80,96 d	80,9 d
4	38,36 s	38,35 s	39,87 s	39,07 s	37,54 s	37,7 s
5	54,79 d	54,77 d	55,27 d	55,43 d	55,21 d	55,2 d
6	17,99 t	17,97 t	18,31 t	18,5 t	18,28 t	18,2 t
7	30,18 t	30,77 t	33,15 t	34,5 t	32,57 t	32,6 t
8	39,09 s	39,09 s	42,01 s	41,01 s	39,97 s	39,9 s
9	47,02 d	47,00 d	47,62 d	47,7 d	47,97 d	47,1 d
10	36,51 s	36,51 s	36,98 s	37,9 s	36,94 s	36,9 s
11	23,80 t	23,80 t	23,34 t	23,8 t	23,65 t	23,5 t
12	124,57 d	124,54 d	126,24 d	123,0 d	129,30 d	129,3 d
13	138,17 s	138,18 s	137,84 s	138,2 s	137,93 s	137,9 s
14	41,63 s	41,62 s	42,01 s	42,4 s	41,04 s	41,0 s
15	32,70 t	32,69 t	29,70 t	29,1 t	28,19 t	28,2 t
16	22,83 t	22,82 t	26,92 t	24,7 t	25,31 t	25,3 t
17	46,82 s	46,81 s	50,16 s	52,6 s	47,76 s	47,8 s
18	52,38 d	52,37 d	52,68 d	50,2 d	52,79 d	52,8 d
19	38,49 d	38,42 d	39,02 d	39,1 d	73,09 s	73,1 s
20	38,44 d	38,48 d	38,86 d	38,9 d	41,08 d	41,0 d
21	27,53 t	27,52 t	31,91 t	30,7 t	25,98 t	25,9 t
22	36,30 t	36,29 t	30,21 t	29,9 t	37,68 t	37,1 t
23	28,24 q	28,23 q	28,17 q	23,4 q	27,43 q	27,4 q
24	16,90 q	16,90 q	16,67 q	23,4 q	16,67 q	16,6 q
25	16,03 q	16,03 q	15,63 q	16,2 q	15,32 q	15,3 q
26	15,19 q	15,18 q	15,53 q	17,3 q	17,04 q	16,9 q
27	23,25 q	23,24 q	23,25 q	26,0 q	24,48 q	24,4 q
28	178,23	178,23 s	207,40 d	206,4 d	184,45 s	183,6 s
29	16,97	16,97 q	17,25 q	16,7 q	28,03 q	28,0 q
30	21,04 q	21,10 q	21,07 q	21,2 q	16,15 q	16,1 q
OCOCH ₃					171,03 s	
OCOCH ₃			-		21,29 q	

Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia cho Đề tài nghiên cứu cơ bản, mã số 104.01.128.09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam. Nxb. Trẻ, quyển I, 776 (1999).

2. Nunziatina De Tommasi, Francesco De Simone, Cosimo Pizza. Journal of Natural Products, 55 (8), 1067 - 1073 (1992).

3. Yan Huang, Jun Li, Qi cao, Shi-Chun Yu, Xiong-Wen Lv, Yong Jin. Life Sciences 78 (23), 2749 - 2757 (2005).

4. M. Goretti V. Silva, Icaro G. P. Vieira, Francisca N. P. Mendes, Irineu. L. Albuquerque, Rogerio N. dos Santos, Fabio O. Silva, Selene M. Morais. Molecules 13, 2482 - 2487 (2008).

5. Raj K. Hota, Maringanti Bapuji. Phytochemistry, 35 (4), 1073 - 1074 (1994).

6. Braulio M. Fraga, Carmen E. Dia, Nayra Quintana. Journal of Natural Products 69, 1092 - 1094 (2006).

7. CD-Rom of Dictionary of Natural Products (2007).

Liên hệ: Nguyễn Hoàng Anh
Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Email: hoanganhvhh@gmail.com.