

NGHIÊN CỨU HOÁ THỰC VẬT CÂY Ô RÔ (*ACANTHUS EBRACTEATUS* VAHL), CÂY Ô RÔ NƯỚC (*ACANTHUS ILICIFOLIUS* L.) VÀ CÂY ẮC Ó (*ACANTHUS INTEGRIFOLIUS* T. ANDERS.) (ACANTHACEAE) CỦA VIỆT NAM

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *ACANTHUS EBRACTEATUS* VAHL, *ACANTHUS ILICIFOLIUS* L. AND *ACANTHUS INTEGRIFOLIUS* T. ANDERS. (ACANTHACEAE) OF VIETNAM

Phan Minh Giang,^{a)} Phan Tổng Sơn,^{a)} Lee Jung Joon^{b)}

^{a)} 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, Việt Nam; ^{b)} Anticancer Research Laboratory, KRIBB, Daejeon, Korea

ABSTRACT

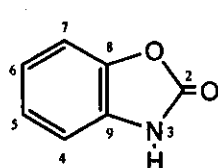
Acanthus ebracteatus Vahl, *Acanthus ilicifolius* L., and *Acanthus integrifolius* T. Anders. are spiny herbs of the family Acanthaceae, which grow up to a height of 1-3 m in brackish water and form dense thickets along tidal shores. The study of chemical constituents of *A. ebracteatus*, *A. ilicifolius*, and *A. integrifolius* of Vietnam was carried out targeting compounds with potential for anti-inflammatory activity. The MeOH extracts of the leaves of *A. ebracteatus*, of the leaves, the flowers and the fruits of *A. ilicifolius*, and of the leaves of *A. integrifolius* were prepared separately and subjected to sequential liquid-liquid partition between H₂O and *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and *n*-BuOH. The organic soluble fractions obtained were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and then separated by repeated open column chromatography, followed by purification by preparative HPLC. β -Sitosterol and stigmasterol were isolated from the *n*-hexane-soluble fractions of the plants and blepharine [(2*R*)-2-*O*- β -D-glucopyranosyl-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one] was isolated and identified from the *n*-BuOH- and H₂O-soluble fractions. In addition, 2-benzoxazolinone was isolated from the CH₂Cl₂-soluble fraction of the MeOH extract from the flowers and the fruits of *A. ilicifolius* and apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside from the EtOAc-soluble fraction of the MeOH extract from the leaves of *A. integrifolius*. The structures of the isolated compounds were determined on the basis of spectroscopic data.

PHẦN MỞ ĐẦU

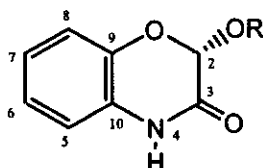
Cây Ô rô (*Acanthus ebracteatus* Vahl.), cây Ô rô nước (*Acanthus ilicifolius* L.) và cây Ắc ó (*Acanthus integrifolius* T. Anders.) là các cây thảo có gai của họ Acanthaceae. Các loài cây này mọc đến chiều cao 1-3 m ở các vùng nước lợ và tạo thành các bụi cây rậm rạp dọc theo các bờ biển chịu tác động của thủy triều. Các lignan glucozit, các benzoxazinoit glucozit và tritecpenoit saponin từ *A. ilicifolius* [2-4], các megastigman glycozit, các ancol glycozit dây béo và các benzoxazinoit glycozit từ *A. ebracteatus* [5] là các thành phần đã được phân lập. Trong các nghiên cứu dược lý phần chiết ancol của *A. ilicifolius* thể hiện hoạt tính giảm khối u [6] và các tác dụng chống oxi hoá và bảo vệ gan [7]. Nghiên cứu thành phần hoá học của cây Ô rô, cây Ô rô nước và cây Ắc ó của Việt Nam lần đầu tiên được thực hiện với mục tiêu tìm hiểu các hợp chất có triển vọng chống viêm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

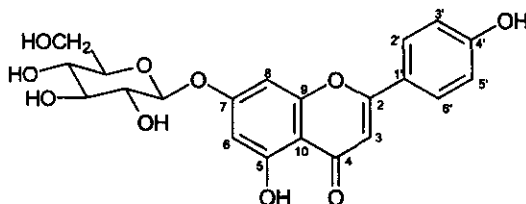
Các phân chiết MeOH từ lá cây Ô rô (*A. ebracteatus*), từ lá và từ hoa/quả cây Ô rô nước (*A. ilicifolius*) và từ lá cây Ấc ó (*A. integrifolius*) đã được điều chế riêng rẽ và được phân tách bằng các phân bố trình tự giữa H₂O với *n*-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc và *n*-BuOH. Phân tách sắc ký cột thường (CC) được thực hiện trên silica gel và/hoặc Sephadex LH-20; tinh chế được thực hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP HPLC) điều chế. Kết quả là β -sitosterol (1) và stigmasterol (2) đã được phân lập và xác định bằng phổ ¹H-NMR trong tất cả các phân chiết *n*-hexan nhận được. 2-Benzoxazolinon (3) đã được phân lập từ phân chiết CH₂Cl₂ từ hoa/quả cây Ô rô nước. Blepharin [(2*R*)-2-*O*- β -D-glucopyranosyl-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on] (4) đã được phân lập và nhận dạng từ các phân chiết *n*-BuOH và H₂O của lá cây Ô rô và của lá và hoa/quả cây Ô rô nước. Apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranozit (6) đã được phân lập từ phân chiết *n*-BuOH của lá cây Ấc ó.



3



4 R=Glc
5 R=H



6

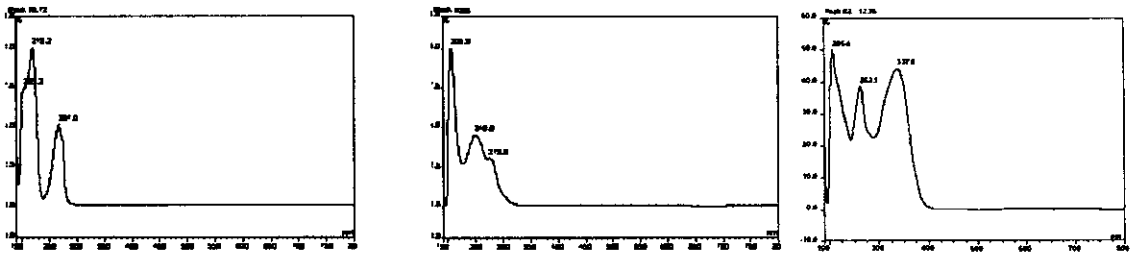
2-Benzoxazolinon (3) (C₇H₅NO₂, M⁺, m/z 135) cho 7 tín hiệu cộng hưởng ¹³C bao gồm các tín hiệu của một vòng benzen thế 2 lần [δ_c 143,9 (s), 129,3 (s), 124,2 (d), 122,8 (d), 110,2 (d) và 110,1 (d)] và một nhóm cacbonyl ở trường cao [δ_c 156,1 (s)]. Kết hợp với các tín hiệu proton của vòng thơm trên phổ ¹H-NMR [δ_H 7,08-7,26 (4H, m)] và một tín hiệu của nhóm -NH- ở δ_H 9,55 (1H, s). Kết hợp với dữ kiện phổ EI-MS cấu trúc 2-benzoxazolinon [8] của 3 đã được thiết lập.

Blepharin (4) được xác định là một hợp chất glucosit bằng các tín hiệu ở δ_H 4,54 (1H, d, *J*=7,8 Hz) và δ_c 102,6 (d). Công thức phân tử C₁₄H₁₇NO₈ của 4 được xác định bằng các phổ ESI-MS (m/z 350,3 [M+Na]⁺ và m/z 326,2 [M-H]⁻), ¹³C-NMR và DEPT. Phổ ¹³C-NMR với 6 tín hiệu cộng hưởng của một vòng benzen thế 2 lần [δ_c 140,3 (s), 126,2 (s), 123,3 (d), 122,9 (d), 117,9 (d), 115,6 (d)], một nhóm xetal [δ_c 94,6 (d)] và một nhóm cacbonyl amit 160,4 (s) phù hợp với một cấu trúc benzoxazinoit. Nhóm N-H xuất hiện ở δ_H 10,9 (1H, s). Do đó cấu trúc của 4 được xác định là 2-*O*- β -D-glucopyranosyl-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on phù hợp với các dữ kiện phổ được công bố [4,9]. Hoá lập thể của 4 ở C-2 được xác định là 2*R* trên cơ sở so sánh giá trị dương [α]_D²⁵ ([α]_D²⁵ +127,3°) của 4 với của tài liệu tham khảo [4]. Thủy phân 4 bằng \square -glucosidaza cho blepharigenin (5) [9] đã khẳng định cho cấu trúc của 4. Glucosit 4 được phân lập từ các phân chiết *n*-BuOH của *A. ilicifolius* và *A. ebracteatus*, và sự có mặt của 4 trong các phân chiết H₂O được nhận dạng bằng RP HPLC phân tích trên cơ sở các so sánh thời gian lưu và phổ HPLC-UV.

Apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranozit (6) được xác định trên cơ sở so sánh các dữ kiện

phổ ^1H - và ^{13}C -NMR với của tài liệu tham khảo [10]. Tương tác trên phổ HMBC giữa proton anomeric Glc-1 (δ_{H} 5,06) và C-7 (δ_{C} 163,0) xác định vị trí của gốc glucopyranosyl. Phổ ESI-MS [m/z 433,4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 455,4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) và 431,4 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)] của 6 phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$.

Các phổ HPLC-UV được ghi on line bằng detector PDA của các hợp chất 3, 4 và 6 được đưa ra ở Hình 1.



Hình 1: Các phổ HPLC-UV của 3, 4 và 6

Một vài benzoxazinoit đã được thông báo là có hoạt tính chống viêm [11]. Blepharin (4) là thành phần benzoxazinoit chính đã được xác định trong *A. ebracteatus* và *A. ilicifolius* của Việt Nam. Tuy nhiên điều cần chú ý là các benzoxazinoit đã được thông báo là các yếu tố hoá học của các thực vật họ Gramineae chống lại các côn trùng, vi nấm, vi khuẩn và virus [12]. Do đó việc nghiên cứu sử dụng các loài *Acanthus* này trong điều trị y học cần được tiếp tục bằng các nghiên cứu về hoá học, dược lý và độc tính. Apigenin 7-glucosid đã được chứng tỏ là có các tính chất quét gốc peroxy và superoxit anion *in vitro* [13]; các tính chất này có thể đóng vai trò vào tác dụng chống viêm của 6.

PHÂN THỰC NGHIỆM

Phương pháp và Thiết bị

Điểm nóng chảy được đo trên thiết bị Electrothermal 9100 và không hiệu chỉnh. Độ quay cực được đo trên thiết bị JASCO DIP-370 Digital Polarimeter. Phổ ^1H -NMR (300MHz) và ^{13}C -NMR (75MHz) với chương trình DEPT được đo trên thiết bị Varian Unity NMR Spectrometer. Phổ ESI-MS được đo trên thiết bị Finigan Navigator Mass Spectrometer. HPLC được thực hiện trên hệ thống Dionex HPLC sử dụng detector Photodiode Array PDA-100, cột YMC ODS-H80. Điều kiện HPLC phân tích gradient 20% MeOH-H₂O (25 phút), 100% MeOH (5 phút), tốc độ dòng 1 ml/phút. Silica gel 60 (40-63 μm , Merck), Sephadex LH-20 (Sigma) được sử dụng cho sắc ký cột (CC). Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) và được hiện màu bằng đèn UV.

Nguyên liệu thực vật

Lá cây *A. ebracteatus*; lá, hoa và quả cây *A. ilicifolius*; và lá cây *A. integrifolius* được thu thập vào tháng 4 dương lịch ở Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh, và được giám định thực vật bởi nhà thực vật học, TS. Võ Văn Chi.

Điều chế các phần chiết và Phân lập các hợp chất 1-6

Acanthus ebracteatus: Lá khô (300 g) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng (3 lần \times 2 ngày). Phần chiết MeOH được phân bố theo độ phân cực giữa H₂O với *n*-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc và *n*-butanol. Các phần chiết nhận được là *n*-hexan (25,8 g; 8,6%), CH₂Cl₂ (4,1 g; 1,37%), EtOAc (1,4 g; 0,47%), *n*-butanol (8,7 g; 2,9%) và H₂O (5,5 g; 1,83%). Phần chiết *n*-hexan được phân tách bằng CC trên silica gel (*n*-hexan-EtOAc) để cho β -sitosterol (1) và stigmasterol (2). Phần chiết *n*-BuOH được phân tách bằng CC trên Sephadex LH-20 (MeOH, 2 lần), silica gel (CHCl₃-MeOH 4:1, 2:1 và 1:1) và RP HPLC (27% MeOH-H₂O) để cho blepharin (4) (56 mg).

Acanthus ilicifolius: Lá khô (294 g) và hoa/quả (188 g) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng (3 lần \times 2 ngày). Phần chiết MeOH được phân bố theo độ phân cực giữa H₂O với *n*-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc và *n*-butanol. Các phần chiết nhận được là *n*-hexan [3 g; 1,02% (từ lá) và 1,1 g; 0,59% (từ hoa/quả)], CH₂Cl₂ (5,1 g; 1,73% và 2,4 g; 1,28%), EtOAc (4,7 g; 1,59% và 0,8 g; 0,43%), *n*-butanol (4,6 g; 1,56% và 4,6 g; 2,45%) và H₂O (82,5 g; 28,1% và 9,5 g; 5,05%). Các phần chiết *n*-hexan được phân tách bằng CC trên silica gel (*n*-hexan-EtOAc) để cho β -sitosterol (1) và stigmasterol (2). Phần chiết CH₂Cl₂ từ hoa/quả được phân tách bằng Sephadex LH-20 (MeOH), silica gel (CHCl₃-MeOH 10:1) và RP HPLC (MeOH-H₂O 1:1) để cho 2-benzoxazolinon (3) (35 mg). Các phần chiết *n*-BuOH được phân tách trên Sephadex LH-20 (MeOH, 2 lần) để cho blepharin (4) (0,5 g từ lá và 2 g từ hoa/quả).

A. integrifolius: Lá cây khô được sấy khô ở 40°C, sau đó 812 g lá được xay thành bột mịn. Bột lá cây khô được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng (3 lần, mỗi lần 2 ngày). Phần chiết MeOH được phân bố theo độ phân cực giữa H₂O với *n*-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc và *n*-butanol. Các phần chiết thu được là *n*-hexan (12,7 g; 1,56%), CH₂Cl₂ (2,2 g; 0,27%), EtOAc (2,5 g; 0,31%) và *n*-butanol (20,5 g; 2,52%). Phần chiết EtOAc được phân tách trên Sephadex LH-20 (MeOH, 2 lần) cho apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranozit (6) (20 mg).

β -Sitosterol (1) và Stigmasterol (2): Bột vô định hình màu trắng. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃) của một hỗn hợp 1 và 2 phù hợp với của mẫu chuẩn.

2-Benzoxazolinon (BOA, 3): Bột vô định hình màu trắng. Đ.n.c. 139-140°C. HPLC-UV λ_{\max} nm: 205,2; 219,2; 267. EI-MS: m/z 135 (M⁺, C₇H₅NO₂). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 9,55 (1H, N-H), 7,08-7,26 (4H, m, H-4, H-5, H-6, H-7). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 156,1 (s, C-2), 143,9 (s, C-8), 129,3 (s, C-9), 124,2 (d, C-5), 122,8 (d, C-6), 110,2 (d, C-7), 110,1 (d, C-4).

Blepharin (HBOA-Glc, 4): Bột vô định hình màu trắng. Đ.n.c. 228-229°C. $[\alpha]_D^{25} +127,3^\circ$. HPLC-UV λ_{\max} nm: 205,2; 249,6; 273,6. (+) ESI-MS: m/z 350,3 [M+Na]⁺, C₁₄H₁₇NO₈, (-) ESI-MS: m/z 326,2 [M-H]⁻. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10,9 (1H, s, N-H), 7,07 (1H, dd, *J*=2,1 Hz, 7,8 Hz, H-7), 6,84-7,1 (3H, m, H-5, H-6, H-8), 5,66 (1H, s, H-2), 4,54 (1H, d, *J*=7,8 Hz, Glc-1), 3,66 (1H, dd, *J*=6,6 Hz, 11,7 Hz, Glc-6a), 3,44 (1H, dd, *J*=5,7 Hz, 11,7 Hz, Glc-6b), 3,14 (1H, m, Glc-4), 3,02 (1H, m, Glc-3), 2,9 (1H, m, Glc-2). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ 160,4 (s, C-3), 140,3 (s, C-9), 126,2 (s, C-10), 123,3 (d, C-6),

122,9 (d, C-7), 117,9 (d, C-8), 115,6 (d, C-5), 102,6 (d, Glc-1), 94,6 (d, C-2), 77,4 (d, Glc-3), 76,7 (d, Glc-5), 73,3 (d, Glc-2), 69,7 (d, Glc-4), 61,0 (t, Glc-6).

Thủy phân blepharin (4) bằng enzym β -glucosidaza: Một dung dịch HBOA-Glc (2) (15 mg) trong H₂O (5 ml) được ủ ở 37°C qua đêm với β -glucosidaza (27 mg) được phân lập từ quả hạnh đào (Sigma Chemical Co.). Hỗn hợp phản ứng được lọc và chiết bằng EtOAc. Dịch chiết EtOAc được cất loại dung môi *in vacuo* và tinh chế bằng cột pipet (PC) trên silica gel (CHCl₃-MeOH 7:3) và RP HPLC điều chế (MeOH-H₂O 2:3) để cho HBOA (3) (8 mg). Glucozơ trong pha nước được phân tích bằng TLC (*n*-BuOH-piridin-H₂O 6:4:3).

Blepharigenin (HBOA, 5): Bột vô định hình màu vàng. Đ.n.c. 198°C. HPLC-UV λ_{\max} nm: 202,8; 243,7; 273,2. ¹H-NMR (CD₃OD): δ 6,9-7,0 (4H, s, H-5, H-6, H-7, H-8), 5,51 (1H, s, H-2).

Apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranozit (6): Bột vô định hình màu vàng. Đ.n.c. 204-205°C. HPLC R_t 12,86 phút (HPLC phân tích). HPLC-UV λ_{\max} nm: 205,4; 262,1; 337,6. UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 224,6 (4,1); 230,8 (4,1); 253,4 (3,9); 343 (4,1). (+) ESI-MS: m/z 433,4 ([M+H]⁺), 455,4 ([M+Na]⁺); (-) ESI-MS m/z 431,4 ([M-H]⁻). ¹H-NMR (DMSO-d₆): \square 12,96 (1H, s, 5-OH), 10,41 (1H, s, 4'-OH), 7,96 (2H, d, *J*=9 Hz, H-2', H-6'), 6,94 (2H, d, *J*=9 Hz, H-3', H-5'), 6,87 (1H, s, H-3), 6,84 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H-8), 6,45 (1H, d, *J*=2,2 Hz), 5,41 (1H, d, *J*=3,6 Hz, OH), 5,14 (1H, d, *J*=3 Hz, OH), 5,06 (1H, d, *J*=7 Hz, Glc-1), 5,06 (1H, m, OH), 4,62 (1H, m, OH), 3,71 (1H, dd, *J*=4,8 Hz, 9,6 Hz, Glc-6b), 3,1-3,52 (5H, m, Glc-2, Glc-3, Glc-4, Glc-5, Glc-6a). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): \square 182,0 (s, C-4), 164,3 (s, C-2), 163,0 (s, C-7), 161,4 (s, C-4'), 161,1 (s, C-5), 157,0 (s, C-9), 128,6 (2d, C-2', C-6'), 121,0 (s, C-1'), 116,0 (2d, C-3', C-5'), 105,4 (s, C-10), 103,1 (d, C-3), 99,9 (d, Glc-1), 99,5 (d, C-6), 94,9 (d, C-8), 77,2 (d, Glc-5), 76,4 (d, Glc-3), 73,1 (d, Glc-2), 69,0 (d, Glc-4), 60,6 (t, Glc-6).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Thành phố Hồ Chí Minh (1997).
2. Minocha P. K. and Tiwari K. P., *Phytochemistry*, 20, 135-137 (1981).
3. Kanchanapoom T., Kamel M. S., Kasai R., Yamasaki K., Picheansoonthon C., Hiraga Y., *Phytochemistry*, 56, 369-372 (2001).
4. Kanchanapoom T., Kamel M. S., Kasai R., Picheansoonthon C., Hiraga Y., Yamasaki K., *Phytochemistry*, 58, 637-640 (2001).
5. Kanchanapoom T., Kasai R., Picheansoonthon C., Yamasaki K., *Phytochemistry*, 58, 811-817 (2001).
6. Babu B. H., Sylesh B. S., Padikkala J., *J. Ethnopharmacol.*, 79, 27-33 (2002).
7. Babu B. H., Sylesh B. S., Padikkala J., *Fitoterapia*, 72, 272-277 (2001).
8. Kapil A., Sharma S., Wahidulla S., *Planta Med.*, 60, 187-188 (1994).
9. Baumeler A., Hesse M., Werner C., *Phytochemistry*, 53, 213-222 (2000).
10. *The Flavonoids: Advances in Research*, ed. Harborne J. B., Mabry T. J., Chapman and Hall, London (1982)..
11. Otsuka H., Hirai Y., Nagao T., Yamasaki K., *J. Nat. Prod.*, 51, 74-79 (1988).
12. Niemeyer H. M., *Phytochemistry*, 27, 3349-3358 (1988).
13. Lu J., Feng X., Sun Q., Lu H., Manabe M., Sugahara K., Ma D., Sagara Y., Kodama H., *Clin. Chim. Acta.*, 316, 95-99 (2002).