

### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế, Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc, 1996. QĐ 371/QĐYT.
2. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà Xuất bản Khoa học và kỹ thuật-Hà Nội, tập I, trang 245-247.
3. Nguyễn Xuân Phách và cs (1995), *Toán thống kê và tin học ứng dụng trong sinh - y - dược*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, trang 146 - 149.
4. Abraham W.B. (1978), *Techniques of animal and clinical toxicology*, Med. Pub. Chicago, pp. 55 - 68.

5. Samuel Irwin (1967), Drug Screening and Evaluation of New Compounds in animal, in "Animal and clinical Pharmacologic techniques in Drug evaluation" - Med.pub. Chicago, pp. 36-55.

6. Turner A. R. (1965), *Screening methods in pharmacology*, Academic press, New York and London, pp. 60 - 68.

7. WHO (2000), Working Group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the Western Pacific of the World Health Organisation.

# Phân lập và xác định cấu trúc của benzoylmesaconitin, gluco- $\beta$ -sitosterol, 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat từ củ cây ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Dexb.) trồng ở tỉnh Hà Giang

Nguyễn Tiến Vững<sup>1\*</sup>, Vũ Đức Lợi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Pháp y Quốc gia

<sup>2</sup>Khoa Y Dược - Trường Đại học Quốc gia Hà Nội

\*E-mail: tienvung@gmail.com

### Summary

*Benzoylmesaconitin, gluco- $\beta$ -sitosterol, 3-hydroxypropane-1,2-diyl dihenicosanoate were isolated from ethanol extracts of the parent roots of *A. carmichaelii* (Dexb.). Their chemical structures were elucidated by spectroscopies (IR, MS, NMR). Of these, 3-hydroxypropane-1,2-diyl dihenicosanoate was isolated from *Aconitum* (L.) for the first time.*

**Keywords:** *A. carmichaelii, benzoylmesaconitin, gluco- $\beta$ -sitosterol, 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat.*

### Đặt vấn đề

Nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, Việt Nam có nguồn thực vật rất phong phú và đa dạng. Trong đó, nhiều cây được dùng làm thuốc và cũng có những cây có độc tính như cá độc được, mã tiền, ô đầu... khi dùng đúng cách, đúng liều lượng để chữa bệnh nhưng nếu không dùng đúng thì chúng lại có thể gây ngộ độc cho người dùng. Cây ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang có tên khoa học là *A. carmichaelii* Dexb. đã được trồng từ đầu những năm 70 của thế kỷ trước. Hiện nay, địa phương sử dụng theo kinh

nghiệm làm thuốc chữa bệnh đau nhức xương khớp<sup>[1-4]</sup> hoặc nấu cháo ăn. Trong củ ô đầu chứa alkaloid có độc tính mạnh dẫn tới ngộ độc cho người sử dụng<sup>[3,4]</sup>. Nhiều vụ ngộ độc do sử dụng nhầm lẫn, đầu độc, tự sát bằng dược liệu, chế phẩm có nguồn gốc từ cây ô đầu. Do đó, cần phải có nghiên cứu về thành phần hoá học để đáp ứng yêu cầu giám định hoá pháp và phục vụ cho công tác cứu chữa nạn nhân ngộ độc ô đầu, đồng thời góp phần minh chứng cho các tác dụng chữa bệnh của cây ô đầu.

## Nguyên liệu và phương pháp

### Nguyên liệu

Mẫu ô đầu (củ mẹ) của cây ô đầu được thu hái vào tháng 08-10 năm 2012 tại huyện Quân Bạ, tỉnh Hà Giang. Tên khoa học của cây là: *A. camichaelii* Dexb. do PGS.TS. Nguyễn Văn Tập, Viện Dược liệu giám định.

### Hóa chất, thiết bị

- Sắc ký lớp mỏng: sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck, độ dày 0,2mm. Sau khi triển khai sắc ký, bản mỏng được kiểm tra bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254, 365nm sau đó hiện màu bằng thuốc thử Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, thuốc thử Dragendorff.

- Sắc ký cột: sắc ký cột dùng silica gel cỡ hạt 0,063- 0,1 mm (Merck), sử dụng silica gel cỡ hạt 0,040- 0,063 mm (Merck) với các loại cột sắc ký có kích cỡ khác nhau.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500MHz ở Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ khối ESI-MS đo trên máy Varian Agilent 1100 LC-MSD tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ hồng ngoại được đo dưới dạng viên nén KBr trên máy Impact 410 Nicolet tại Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

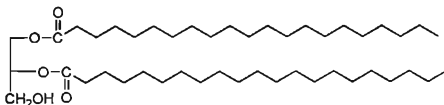
### Chiết xuất và phân lập

Bột ô đầu (củ mẹ) (3,2 kg) đã xay thô, sấy khô ở nhiệt độ 60°C, được ngâm chiết bằng ethanol (6L x 3 lần). Dịch chiết tổng được loại

cặn bằng cách lọc qua giấy lọc sau đó đem cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết ethanol (298,9 g). Cao chiết này được hòa với nước rồi chiết lại 3 lần bằng n-hexan (750 ml x 3 lần), phần dịch chiết n-hexan được tách riêng và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết n-hexan (129,5 g). Cao chiết n-hexan sau khi phân tách bằng phương pháp sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần (n-Hexan: EtOAc với nồng độ EtOAc tăng từ 0-100% theo v/v) thu được 6 phân đoạn lớn hơn có kí hiệu là G đến L. Từ phân đoạn H được phân lập tiếp bằng cột silicagel, rửa giải với hỗn hợp n-Hexan: EtOAc (80:20) thu được hợp chất 1 (16mg). Từ phân đoạn L được tinh chế bằng cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi EtOAc: MeOH (80:20) thu được hợp chất 2 (12mg), rửa giải bằng hệ dung môi dichlormethan:MeOH (90:10) thu được hợp chất 3 (18 mg).

### Hợp chất 1

Tinh thể màu trắng, hình kim, CTPT: C<sub>45</sub>H<sub>88</sub>O<sub>5</sub>, M=708, t<sub>nc</sub>=191°C. R<sub>f</sub> = 0,4 (CHCl<sub>3</sub>: EtOAc, 85:15). IR (Kl, cm<sup>-1</sup>) 3419 (OH), 2944, 2866 (C-H), 1241 (COO). ESI-MS: m/z 709 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 0,86 (t, 7H, J=7Hz, 2CH<sub>3</sub>), 1,23-1,25 (m, 68 H, 34CH<sub>2</sub>), 1,39 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,52-1,99 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>CO), 3,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3,70 (dd, J=5 Hz, 7 Hz, Ha CH<sub>2</sub>OOC), 3,78 (dd, J=5 Hz, 7 Hz, Hb CH<sub>2</sub>OOC), 4,10 (dd, J=4 Hz, 7 Hz, CH<sub>2</sub>OOC).



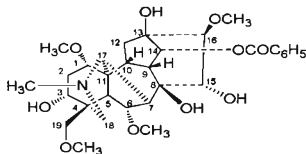
Hình 1: Cấu trúc của hợp chất 1: 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat

### Hợp chất 2

Bột kết tinh màu trắng, CTPT: C<sub>31</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>10</sub>, M=589, t<sub>nc</sub> =379°C, R<sub>f</sub> = 0,2 (Dichlormethyl:MeOH 95:5) hiện màu với thuốc thử Dragendorff. IR (Kl, cm<sup>-1</sup>) 3482, 3334 (OH), 2944, 2824 (C-H), 1707 (C=O), 1627 (C-N), 1486 (C-H), 1450 (C-H), 1284 (C-N), 1101 (C-O-C), 1021 (C-O-C), 717 (C-H benzen thể mono). ESI-MS: m/z 590 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 1,60 ppm (t, J =

16 Hz, 1H, H-2a), 1,86 (dd, J = 5 Hz, J = 16 Hz, 1H, H-12a), 2,30 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-12b ), 2,33 (d, J = 4 Hz, 1H, H-2b), 2,42-2,47 (m, 2H, H-5, H-10), 2,60 (dd, J = 5.5 Hz, J = 7Hz, 1H, H-7), 2,97 (s, 3H, Me- N CH3), 3,24 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-16), 3,32 (s, 1H, H-17), 3,35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,38 (s, 1H, H-18a), 3,39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,43 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,50 (d, J = 4,5 Hz, 1H, H-18b), 3,51 (t, J = 8,5 Hz, 1H, H-19a), 3,58 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-14),

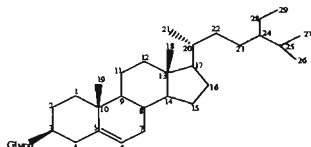
3,60 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H, H-19b), 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,20 (m, 1H, H-6), 4,25 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H, H-1), 4,61 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H, H-3), 5,02 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H, H-15), 7,49 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H-phenyl), 7,63 (m, 1H, H-phenyl), 8,12 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, H-phenyl). <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 30,3 ppm (C-2), 36,9 (C-12), 41,5 (C-9), 41,9 (C-10), 43,4 (C-4), 44,5 (C-5), 45,1 (C-7), 51,7 (C-11), 52,8 (C-18), 55,5 (CH<sub>3</sub>), 58,5 (OCH<sub>3</sub>), 59,4 (OCH<sub>3</sub>), 62,2 (OCH<sub>3</sub>), 68,0 (C-17), 70,4 (OCH<sub>3</sub>), 75,9 (C-19), 78,0 (C-13), 79,0 (C-3), 79,2 (C-8), 80,4 (C-14), 81,1 (C-15), 81,6 (C-6), 82,8 (C-1), 93,2 (C-16), 129,3 (2CH-phenyl), 130,8 (2CH-phenyl), 131,2 (C-phenyl), 134,1 (1CH-phenyl), 167,5 (C=O).



Hình 2: Cấu trúc của chất hợp 2: benzoylmesaconitin

**Hợp chất 3**

Tinh thể có màu trắng đục, CTPT: C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>, M = 576,  $t_{mc} = 285^{\circ}\text{C}$ ,  $R_f = 0,5$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 9:1). IR (Kl, cm<sup>-1</sup>) 3430 (OH), 2938 (C-H), 1635 (=CH), 1077 (C-O-C), 1021 (C-O-C). ESI-MS: m/z 599 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): Hợp phần β-D-glucosid: δ 3,24-3,31 (m, 2H, H-3'; H-4'), 3,39 (s, OH), 3,45-3,47 (m, 2H, H-2', H-5'), 3,76 (dd, 2H,  $J = 12$  Hz, H-6'), 4,13 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H-1'). Hợp phần β-sitosterol: δ 0,69 (s, 3H, H-13), 0,79-0,87 (m, 9H, Me-28, 2Me-25), 0,93 (d, 3H,  $J = 6,5$  Hz, Me-20), 1,01 (s, 3H, Me-13), 3,56 (sextet,  $J = 7,0$  Hz, 1H, H-3), 5,36 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H, H-6).



Hình 3: Cấu trúc của hợp chất 3: gluco-β-sitosterin

**Kết quả và thảo luận**

Cấu trúc của 3 hợp chất được xác định thông qua dữ liệu phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR). Với chất 1: Phổ IR xuất hiện đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\nu_{max}$  3419 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho nhóm O-H; đỉnh ở  $\nu_{max}$  2944, 2866 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H; đỉnh ở  $\nu_{max}$  1241 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết COO và phổ ESI-MS của hợp chất cho pic ion phân tử ở m/z 709 [M+H]<sup>+</sup> tương ứng với khối lượng phân tử M = 708 amu phù hợp với khối lượng phân tử của hợp chất 1. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho thấy sự có mặt của 88 proton phù hợp với công thức phân tử C<sub>45</sub>H<sub>86</sub>O<sub>6</sub>, đồng thời phổ <sup>1</sup>H-NMR cho các pic điển hình như: δ 1,52-1,99 (m, 2H) đặc trưng cho nhóm CH<sub>2</sub>CO, 3,53 (m, 2H) đặc trưng cho nhóm CH<sub>2</sub>OH, 3,70 (dd,  $J = 5$  Hz, 7 Hz, Ha) đặc trưng cho nhóm CH<sub>2</sub>OOC, 4,10 (dd,  $J = 4$  Hz, 7 Hz) đặc trưng cho nhóm CH<sub>2</sub>OOC. Các dữ liệu trên trùng khớp với dữ liệu đã công bố của 3-hydroxypropan-1,2-diyli dihenicosanoat<sup>[3]</sup>. Với chất 2: hiện màu với thuốc thử Dragendorff nên dự kiến chất thuộc nhóm alkaloid. Phổ IR xuất hiện đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\nu_{max}$  3482, 3334 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho nhóm O-H; đỉnh ở  $\nu_{max}$  2944, 2824 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H; đỉnh ở  $\nu_{max}$  1627, 1450 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho liên kết C-N; đỉnh ở  $\nu_{max}$  1101, 1021 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho liên kết C-O-C. Phổ khối ESI-MS của hợp chất cho pic ion phân tử ở m/z 590 [M+H]<sup>+</sup> tương ứng với khối lượng phân tử M = 589amu phù hợp với khối lượng phân tử của hợp chất 2. Phổ <sup>13</sup>C-NMR cho thấy hợp chất có xuất hiện 31 tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho 31 nguyên tử carbon trong đó có 5 nhóm CH<sub>3</sub>, 1 nhóm C=O, 6 C trong vòng benzen thế, 3 nhóm CH<sub>2</sub>, 11 CH bão hòa, 3 carbon bậc 4 và 2 carbon C-OH. Mặt khác phổ <sup>1</sup>H-NMR xuất hiện tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho hợp chất 43 nguyên tử hydro, với các tín hiệu đặc trưng như: 1,80 ppm (tt, <sup>3</sup>J = 16 Hz, 1H, H-2a), 2,97 (s, 3H, Me-N CH<sub>3</sub>), 3,32 (s, 1H, H-17), 3,35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 8,12 (t, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 2H, H-phenyl). Tín hiệu cộng hưởng được quy kết chính xác nhờ hỗ trợ của phân mềm dự đoán phổ và phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (DEP, HMBC và HSQC). Từ các kết quả trên đối chiếu với dữ liệu đã công bố<sup>[3, 5, 7]</sup>, hợp chất 2 được xác định là: benzoylmesaconitin. Với chất 3: Phổ IR xuất hiện đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\nu_{max}$  3430 cm<sup>-1</sup> đặc

trung cho nhóm O-H; đỉnh ở  $\nu_{\max}$  2938  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H; đỉnh ở  $\nu_{\max}$  1635 đặc trưng cho liên kết  $>C=C<$ ; đỉnh ở  $\nu_{\max}$  1077, 1021  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho liên kết C-O-C. Phổ khối *ESI-MS* của hợp chất cho pic ion phân tử ở  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  = 599 tương ứng với khối lượng phân tử  $M=576$  amu. Điều này phù hợp với khối lượng và công thức phân tử của hợp chất 3. Mặt khác phổ  $^1\text{H-NMR}$  có các tín hiệu đặc trưng cho hợp phần  $\beta$ -D-glucosid như: gồm 8 tín hiệu đặc trưng cho 8 nguyên tử hydro, trong đó tín hiệu ở 3,24-3,31ppm (m, 2H) đặc trưng cho H-3', 3,45-3,47 (m, 2H) đặc trưng cho H-2', H-5'. Đối với hợp phần  $\beta$ -sitosterol: gồm 20 tín hiệu đặc trưng cho 20 nguyên tử hydro, trong đó tín hiệu ở 0,69 (s, 3H) đặc trưng cho H-13, tín hiệu ở 0,79-0,87 (m, 9H) đặc trưng cho 3 nhóm  $\text{CH}_3$  tại vị trí 25 và 28. Từ các kết quả nêu trên đối chiếu với dữ liệu phổ đã công bố<sup>[3,5,7]</sup>, hợp chất 3 được xác định là: gluco- $\beta$ -sitosterol.

Qua tham khảo các tài liệu, được biết cho đến nay, chưa có công bố nào về hợp chất 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat từ chi *Aconitum* L. ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Hai hợp chất benzoylmesaconitin và gluco- $\beta$ -sitosterol phân lập được từ *A. carmichaelii* Dexb. trồng ở Sapa, Lào Cai, Việt Nam<sup>[3]</sup>. Trên thế giới hai hợp chất này được phân lập từ một số loài như: *A. jaluense* ở Hàn Quốc<sup>[7]</sup>, *A. carmichaelii* Dexb. ở Trung Quốc<sup>[8]</sup>.

## Xác định... (Tiếp theo trang 68)

**Nhận xét:** Kết quả bảng 4 cho thấy, trên mô hình gây đau bởi lực ép cơ học, CKT ở mức liều tương đương 8 g DLK/kg TLCT theo đường uống có tác dụng làm tăng ngưỡng đau của chuột lên 37,72% so với ngưỡng đau của lô chứng, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với  $p<0,05$ . Tuy nhiên, tác dụng làm tăng ngưỡng đau của CKT (mức độ tăng là 37,72%) yếu hơn so với tác dụng này của thuốc đối chiếu (mức độ tăng là 50,87%) ở mức liều nghiên cứu, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p<0,05$ .

### Kết luận

- Đã xác định được CKT ít độc với  $\text{LD}_{50}$  theo đường uống tương đương 255,0 g DLK/kg TLCT.

- Ở mức liều tương đương 8 g DLK/kg TLCT, CKT dùng theo đường uống có tác dụng giảm đau trên hai mô hình gây quận đau và mô hình gây đau

### Kết luận

Từ ô đầu (củ mẹ) của cây ô đầu (*A. carmichaelii* Dexb) trồng ở tỉnh Hà Giang, chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký để phân lập được 3 hợp chất và dựa vào số liệu các phổ IR, MS, NMR đã xác định 3 chất là: benzoylmesaconitin, gluco- $\beta$ -sitosterol, 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat. Trong đó 3-hydroxypropan-1,2-diyl dihenicosanoat lần đầu tiên phân lập được từ chi *Aconitum* L.

### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học, tr. 856-858, 860-862.
2. Võ Văn Chi (2004). *Từ điển Thực vật thông dụng, tập 1*, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, trang 173-174.
3. Bùi Hồng Cường, Phùng Hòa Bình, Nguyễn Trọng Thông (2010). *Phụ tử- vị thuốc quý và phương pháp chế biến an toàn hiệu quả*, NXB Khoa học và kỹ thuật, trang 109-112.
4. Phạm Thanh Kỳ (2007), *Dược liệu học, tập II*, NXB Y học, trang 163-170.
5. Atta-ur-rahman (2007), *Studies in Natural products chemistry*, NXB Elsevier.
6. Feng-Peng Wang, Qiao-Hong Chen (2010), *The C<sub>19</sub>-Diterpenoid Alkaloids, The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 69, pp. 571-577.
7. Sang Hee Shim, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang, Kun Ho Son, Kilwan Bae (2003), *Alkaloidal constituents from Aconitum jaluense*, *Archives of Pharmacol Research*, 26, pp. 709-715.

bởi lực ép cơ học. Tuy nhiên, trên mô hình gây đau bởi mẫn nóng, CKT lại không thể hiện tác dụng này. Tác dụng giảm đau của CKT trên các mô hình đánh giá đều yếu hơn so với tác dụng của thuốc đối chiếu ibuprofen ở liều nghiên cứu.

### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2002), *Dược điển Việt Nam 3*, Nxb. Y học, Hà Nội, Phụ lục 1.1.
2. Abraham W. B. (1978), *Techniques of animal and clinical toxicology*, *Med. Pub. Chicago*, pp. 55 – 68.
3. Anderson K. W. (1964), *Arch. Internat. Pharmacodyn.* 152, pp. 379 – 389.
4. Chen Y. F., Tsai H. Y., Wu T. (1995), *Anti-inflammatory and analgesic activities from root of Angelica pubescens*, *Planta Med.* 61 (1), pp. 2 – 8.
5. Wolfe G., Mc Donald A. D. (1944), *The evaluation of the analgesic action of pethidin hydrochlorid*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80, pp 300 – 307.