

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CÂY THANH CAO BẮC BỘ (*ARTEMISIA DUBIA* WALL. EX BESS. VAR. *LONGERACEMOSA* PAMP. FORMA *TONKINENSIS* PAMP., ASTERACEAE)

Trần Thị Thanh Nhân, Phan Tổng Sơn, Phan Minh Giang*

Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Đến Tòa soạn 9-4-2012

Abstract

Calotropeanyl ester, α -myrin, nonacosanoic acid, docosanoic acid, tetracosanoic acid, 1-(*O*-tricosanoyl)glycerol, 1-(*O*-pentacosanoyl)glycerol, and β -sitosterol were isolated from the leaves of *Artemisia dubia* Wall. ex Bess. var. *longeracemosa* Pamp. forma *tonkinensis* Pamp. (Asteraceae). Their structures were determined by using spectroscopic methods.

Keywords. *Artemisia dubia*, Asteraceae, triterpenoid, glycerol monoester, fatty acid.

1. MỞ ĐẦU

Họ Asteraceae là một họ thực vật lớn với khoảng 60 chi; chi *Artemisia* là chi lớn nhất với hơn 300 loài có sự đa dạng sinh học, đa dạng hóa học các hợp chất thành phần và nhiều thành phần có hoạt tính sinh học cao cần thiết cho sự phát triển thành dược phẩm điều trị [1, 2]. Chi *Artemisia* thuộc họ Cúc (Asteraceae) thường là loại cỏ, cây thảo hoặc cây hóa gỗ. Có 15 loài *Artemisia* được ghi nhận trong Thực vật chí Việt Nam [3] trong số đó có một số loài như *A. apiacea*, *A. capillaris* và *A. vulgaris* [4] là các cây thuốc được sử dụng trong Y học cổ truyền Việt Nam. Thanh cao Bắc Bộ (*Artemisia dubia* Wall. var. *longeracemulosa* Pamp. forma *tonkinensis*) là một loại cây thảo sống nhiều năm, cao cỡ 1 m [3]. Cây này chưa được nghiên cứu về hóa học này và đã được lựa chọn thành một đối tượng nghiên cứu trong Chương trình nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hóa học của các loài *Artemisia* của Việt Nam. Bài báo này thông báo về các thành phần hóa học mới được phân lập từ cây Thanh cao Bắc Bộ.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương pháp và thiết bị

Phổ khối lượng phun bụi điện tử ((+)-ESI-MS) được đo trên thiết bị LTQ Orbitrap XL spectrometer (Thermo Scientific). Phổ (+)-ESI-TOF-MS được đo trên thiết bị Applied Biosystem QSTAR XL spectrometer. Các phổ NMR được thu từ hạt nhân ^1H và ^{13}C .

NMR, 125 MHz) được ghi trên thiết bị Bruker Avance 500 với tetrametylsilan (TMS) là chất chuẩn nội zero ($\delta = 0$). Tính bội của các tín hiệu cacbon ^{13}C được xác định bằng các kỹ thuật phổ DEPT. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, CHLB Đức) với lớp silica gel dày 0,2 mm trên nền nhôm. Phát hiện vết chất bằng các thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 đặc 1% và $\text{FeCl}_3/\text{EtOH}$ 5% và đèn tử ngoại ở bước sóng $\lambda = 254$ nm. Sắc ký cột thường (CC) và sắc ký cột tinh chế (Mini-C) được thực hiện trên chất hấp phụ silica gel (Merck, Darmstadt, CHLB Đức) với các cỡ hạt 63-200 μm , 63-100 μm và 40-63 μm . Chiết pha rắn trên pha đảo RP-18 được thực hiện với cột SPE Merck Lichrolut[®] RP-18.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Nguyên liệu thực vật là là cây Thanh cao Bắc Bộ (*Artemisia dubia* Wall ex Bess. var. *longeracemosa* Pamp. forma *tonkinensis* Pamp., Asteraceae) được thu nhập tại Kontum vào tháng 8 năm 2008. Mẫu thực vật đã được nhà thực vật học Nguyễn Quốc Bình (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) thu thập và giám định thực vật.

2.3. Chiết và phân lập các hợp chất 1 - 8

Lá cây Thanh cao Bắc Bộ được hong khô, sấy ở 45°C, sau đó xay thành bột mịn. Bột lá khô (5 kg) được ngâm chiết với metanol ở nhiệt độ phòng (4 lần, mỗi lần 3 ngày). Các dịch lọc metanol được gộp

lại và được cất loại kiệt dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C. Phần chiết metanol được hoà với nước cất và chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, CH₂Cl₂ và etyl axetat để cho các phần chiết *n*-hexan (98,4 g), CH₂Cl₂ (35,5 g) và etyl axetat (5 g). 45 g phần chiết *n*-hexan được phân tách bằng sắc kí cột C trên silica gel, rửa giải gradient với *n*-hexan-axeton 19:1, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1. Các phần đoạn phân tách (150 ml/phần đoạn) được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 11 nhóm phân đoạn. Các nhóm phân đoạn 2 và 4 được rửa bằng metanol cho calotropoleanyl este (1) (1,6 g) và α -amyrin (2) (4,6 g). Nhóm phân đoạn 3 được rửa bằng *n*-hexan cho acid nonacosanoic (3) (759 mg). Các nhóm phân đoạn 5 và 6 được phân tách bằng sắc kí cột CC trên silica gel với gradient *n*-hexan-axeton 15:1, 12:1, 9:1 và 6:1; các chất kết tinh thô nhận được từ dung dịch rửa giải được rửa bằng metanol cho axit docosanoic (4) (50 mg) và axit tetracosanoic (5) (460 mg). β -Sitosterol (6) (2,1 g) cũng nhận được từ nhóm phân đoạn 6 sau khi rửa các phần đoạn chạy cột C bằng *n*-hexan. Nhóm phân đoạn 10 được phân tách bằng CC trên silica gel với gradient *n*-hexan-axeton 4:1 và 3:1 thành 5 phần đoạn; phần đoạn 4 được chiết phần rắn trên cột RP-18 với MeOH:H₂O 7:3, 4:1 và tinh chế tiếp bằng Mini-C trên silica gel với *n*-hexan-axeton 3:1 cho hỗn hợp 2 glycerol monoeste 7 và 8 (40 mg).

Calotropoleanyl este (1): Tinh thể hình kim màu trắng, d.n.c. 208°C. $R_f = 0,87$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 9:1, v/v). ESI-MS: m/z 469,25 ([M+H]⁺), 491,21 ([M+Na]⁺). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,70 (3H, s, CH₃-30), 0,84 (3H, s, CH₃-26), 0,85 (3H, s, CH₃-25), 0,87 (3H, s, CH₃-23), 0,89 (3H, s, CH₃-24), 0,94 (3H, s, CH₃-29), 1,01 (3H, s, CH₃-28), 1,16 (3H, s, CH₃-27), 2,05 (3H, s, 3-OAc), 4,51 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz, 11,0 Hz, H-3). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 16,5 (q, C-25), 16,6 (q, C-26), 17,7 (q, C-23), 18,4 (t, C-6), 21,3 (q, C-27), 21,8 (t, C-11), 23,7 (t, C-2), 23,8 (q, C-29), 24,1 (q, C-28), 25,0 (t, C-15), 26,5 (t, C-12), 28,1 (q, C-24), 32,4 (q, C-30), 33,3 (s, C-20), 34,6 (s, C-17), 34,8 (t, C-7), 35,5 (t, C-21), 36,7 (t, C-16), 37,2 (s, C-10), 37,8 (s, C-4), 38,6 (t, C-22), 38,7 (t, C-1), 39,4 (t, C-19), 41,0 (s, C-8), 44,7 (s, C-14), 50,7 (d, C-9), 55,5 (d, C-5), 81,0 (d, C-3), 133,3 (s, C-18), 134,3 (s, C-13), 171,0 (s, 3-OAc).

α -Amyrin (2) Tinh thể hình kim màu trắng, d.n.c. 185-186°C. $R_f = 0,5$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 9:1, v/v). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,79 (3H, s, CH₃-28), 0,80 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, CH₃-29), 0,86 (6H, s, CH₃-23, CH₃-24), 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, CH₃-30), 0,99 (3H, s, CH₃-25), 1,0 (3H, s, CH₃-26), 1,08 (3H, s, CH₃-27), 3,23 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz, 11,0 Hz, H-3), 5,13 (1H, br s, H-12). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 15,5 (q, C-25), 15,6 (q, C-24), 16,4 (q, C-26), 17,5 (q, C-29), 18,5 (t, C-6), 21,4 (q, C-

30), 23,3 (q, C-27), 23,4 (t, C-11), 26,5 (t, C-16), 27,3 (t, C-2), 28,1 (q, C-23), 28,1 (t, C-15), 31,3 (t, C-21), 33,8 (s, C-17), 36,9 (s, C-10), 38,7 (s, C-4), 38,8 (t, C-1), 39,6 (d, C-20), 39,7 (d, C-19), 40,1 (s, C-8), 41,6 (t, C-22), 42,1 (s, C-14), 47,8 (d, C-9), 55,2 (d, C-5), 59,1 (d, C-18), 79,1 (d, C-3), 124,5 (d, C-12), 139,6 (s, C-13).

Axit nonacosanoic (3): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,33$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 20:1, v/v). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,89 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH₃-29), 1,27 (50H, br s, CH₂-4 \rightarrow CH₂-28), 1,64 (2H, quintet, $J = 7,5$ Hz, CH₁-3), 2,36 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂-2).

Axit docosanoic (4): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,4$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-EtOAc 9:1, v/v). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,88 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH₃-22), 1,26 (36H, br s, CH₂-4 \rightarrow CH₂-21), 1,64 (2H, quintet, $J = 7,5$ Hz, CH₂-3), 2,34 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂-2).

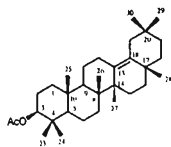
Axit tetracosanoic (5): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,15$ (TLC, silica gel, *n*-hexan - EtOAc 9:1, v/v). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,88 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH₃-24), 1,26 (40H, br s, CH₂-4 \rightarrow CH₂-23), 1,62 (2H, quintet, $J = 7,5$ Hz, CH₂-3), 2,34 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂-2). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14,1 (q, C-24), 22,7, 24,7, 29,1, 29,3, 29,4, 29,6, 29,7, 31,9, 33,9 (tất cả t, C-3 \rightarrow C-23), 178,9 (s, C-1).

β -Sitosterol (6): Tinh thể hình kim màu trắng. $R_f = 0,67$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 6:1, v/v). β -Sitosterol đã được xác định qua phân tích TLC và co-TLC với chất chuẩn.

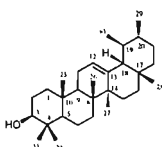
Hỗn hợp của 1-O-(tricosanoil)glycerol (7) và 1-O-(pentacosanoil)glycerol (8): Bột vô định hình màu trắng. $[\alpha]_D^{23} -1,9$ (c 0,1, pyridin). ESI-TOF-MS: m/z 354 (C₂₃H₄₆O₂⁺, [M+H]⁺), 382 (C₂₅H₄₈O₂⁺, [M+H]⁺). ¹H-NMR (CD₂OD + CDCl₃): δ (ppm) 0,88 (t, $J = 7,0$ Hz, nhóm CH₃ cuối mạch), 1,26 (br s) (n x CH₂), 1,61 (quintet, $J = 7,0$ Hz, CH₂-3'), 2,34 (t, $J = 7,0$ Hz, CH₂-2'), 3,55 (dd, $J = 11,5$ Hz, 6,0 Hz), 3,63 (dd, $J = 11,5$ Hz, 4,0 Hz) (CH₂-3), 3,87 (quintet, $J = 5,0$ Hz, H-2), 4,12 (dd, $J = 5,0$ Hz, 4,0 Hz, CH₂-1). ¹³C-NMR (CD₂OD + CDCl₃): δ (ppm) 13,9 (q, nhóm CH₃ cuối mạch), 22,5 (t), 24,7 (t), 28,9 (t), 29,1 (t), 29,2 (t), 29,3 (t), 29,4 (t), 29,5 (t) (n x CH₂), 31,8 (t, C-3'), 34,0 (t, C-2'), 63,1 (t, C-3), 65,0 (t, C-1), 69,9 (d, C-2), 174,4 (s, C-1').

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

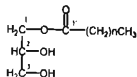
Phần chiết metanol từ lá cây Thanh cao Bắc Bộ được phân bố lần lượt giữa H₂O và *n*-hexan, CH₂Cl và etyl axetat để cho các phần chiết tương ứng. Phần chiết *n*-hexan được phân tách bằng sắc kí cột gradient (silica gel) sau đó tinh chế bằng RP-SPE và Mini-C (silica gel) để cho các hợp chất 1-8.



1



2



7 n = 21

8 n = 23

Hợp chất 1 được phân lập dưới dạng tinh thể kính kim màu trắng, d.n.c. 208°C. Phổ khối lượng (+)-ESI-MS của 1 cho các pic ion giả phân tử ở m/z 469,25 ($[M+H]^+$) và 491,21 ($[M+Na]^+$) cho giả thiết về công thức phân tử $C_{52}H_{84}O_2$. Các phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của 1 xác định một triterpenoid với 32 C bao gồm 8 nhóm methyl ở dạng singlet. 11 nhóm methylen, 3 nhóm methin trong đó có 1 nhóm oxymethin (δ_H 4,51), 8 carbon trong đó có một nối đôi thế 4 lần [δ_C 133,3 (s) và 134,3 (s)] và một nhóm acetoxy [δ_H 2,05 (s); δ_C 21,3 (q) và 171,0 (s)]. Các độ chuyển dịch hóa học của nối đôi rất đặc trưng cho vị trí của chúng trong khung carbon oleanan; trong trường hợp chất 1 vị trí của nối đôi đã được xác định là C-13/C-14. Nhóm acetoxyl phải được liên kết với C-3 như thường thấy trong các triterpenoid xuất phát từ các con đường sinh tổng hợp các chất này qua sự đóng vòng của 2,3-oxidosqualen. Hóa lập thể 3β của nhóm acetoxyl đã được xác định dựa trên tương tác diaxial H-3/ α H-2_{ax}. Các dữ kiện phổ ESI-MS, 1H -NMR và ^{13}C -NMR của 1 phù hợp với của calotropeanoyl este mới được phân lập cho đến nay từ vỏ rễ cây *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) [5].

Hợp chất 2 đã được xác định là một triterpenoid dãy ursan là α -amyrin (urs-12-en-3 β -ol) bằng các dữ kiện phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR. Trong trường hợp chất 2 vị trí nối đôi C-12/C-13 (δ_C 124,5 và 139,3) và nhóm 3β -OH (δ_C 79,1) dựa trên các độ chuyển dịch carbon [6]. Khung triterpenoid ursan đã được giả thiết từ sự xuất hiện của 2 nhóm methyl dưới dạng doublet (d, J = 6,0 Hz) trên phổ 1H -NMR ở δ_H 0,80 và 0,92). α -Amyrin là một triterpenoid có trong nhiều thực vật và có hoạt tính kháng viêm và ức chế một số enzym [7].

Các chất 3-5 đều cho các tín hiệu cộng hưởng từ proton của nhóm methyl cuối mạch ở δ_H khoảng 0,88 (3H) và nhóm methylen ở δ_H khoảng 1,26 ($n \times CH_2$) của một nhóm alkyl mạch dài. Các chất này được xác định là các axit béo dựa trên tín hiệu đặc trưng của nhóm methylen liên kề với nhóm axit cacboxylic ở δ_H khoảng 2,34 (2H). Trong trường hợp chất 5 phổ ^{13}C -NMR xác định nhóm axit cacboxylic này cộng hưởng ở δ_C 178,9 (s). Chiều dài các mạch alkyl của 3-5 đã được xác định dựa trên chiều cao đường

con tích phân của các nhóm methylen. Do đó, 3 - 5 đã được xác định là các axit nonacosanoic, docosanoic và tetracosanoic.

Một hỗn hợp các chất 7 và 8 đã được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hỗn hợp này có các tín hiệu đặc trưng của một phân axit béo [δ_H 1,26 ($n \times CH_2$, br s), 1,61 (quintet, J = 7,0 Hz), 1,62 (2H, quintet, J = 7,0 Hz), 2,34 (t, J = 7,0 Hz); δ_C 13,9 (q), 22,5 (t) \rightarrow 34,0 (t) và 174,4 (s)]. Các tín hiệu NMR còn lại thuộc về phần glycerol bao gồm 2 nhóm oxymethylen [δ_H 3,55 (dd, J = 11,5 Hz, 6,0 Hz)/3,63 (dd, J = 11,5 Hz, 4,0 Hz) và 4,12 (dd, J = 5,0 Hz, 4,0 Hz); δ_C 63,1 (t) và 65,0 (t)] và một nhóm oxymethin [δ_H 3,87 (quintet, J = 5,0 Hz); δ_C 69,9 (d)]. Các dữ kiện phổ này cho thấy cấu trúc 1-O-glycerol monoeste của các chất 7 và 8; độ chuyển dịch hóa học của carbon của glycerol liên kết với nhóm carbonyl chuyển dịch về phía trường thấp ở δ_H 4,12 [8]. Các axit béo đã được xác định là axit tricosanoic ($C_{23}H_{46}O_2$) và acid pentacosanoic ($C_{25}H_{50}O_2$) dựa trên các pic phân mảnh $RCOO^+$ ở m/z 354 ($C_{23}H_{45}O_2^+$) và 382 ($C_{25}H_{49}O_2^+$) trên phổ (+)-ESI-TOF-MS. Do đó cấu trúc của 7 và 8 đã được xác định là 1-(O-tricosanoyl)glycerol và 1-(O-pentacosanoyl)glycerol. Các chất này chưa được tìm thấy trong các loài *Artemisia*.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được lá cây Thanh cao Bắc Bộ (*Artemisia dubia* Wall. ex Bess. var. *longeracemosa* Pamp. forma *tonkinensis* Pamp., Asteraceae) là một nguồn cung cấp 2 hợp chất triterpenoid thành phần chính, calotropeanoyl este và α -amyrin, cùng với các axit béo, các glycerol monoeste và β -sitosterol. Cấu trúc của các chất được phân lập đã được xác định chủ yếu bằng các nghiên cứu phổ NMR.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này được hoàn thành với sự tài trợ của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), Hà Nội, Việt Nam

1. E. Rodríguez, G. H. N. Towers, J. C. Mitchell. *Biological activities of sesquiterpene lactones*, *Phytochemistry*, **15**(11), 1573-1580 (1976).
2. R. X. Tan, W. F. Zheng, H. Q. Tang, *Biologically active substances from the genus Artemisia*, *Planta Med.*, **64**(4), 295-302 (1998).
3. *Trung tâm Dữ liệu thực vật Việt Nam* (<http://www.botanyvn.com>) (2012).
4. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội (2001).
5. S. H. Ansari, M. Ali. *New oleanene triterpenes from root bark of Calotropis procera (Ait.) R.Br.*, *Indian J. Chem.*, **39B**, 287-290 (2000).
6. L. J. Goad, T. Akihisha. *Analysis of sterols*. Chapman & Hall, London (1997).
7. M. F. Otuki, J. Ferreira, F. V. Lima, C. Meyre-Silva, A. Malheiros, L. A. Muller, G. S. Cani, A. R. S. Santos, R. A. Yunes, J. B. Calixto. *Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways*, *JPET*, **313**(1), 310-318 (2005).
8. S. H. Qi, S. Zhang, J. S. Huang, Z. H. Xiao, J. Wu, L. J. Long. *Glycerol derivatives and sterols from Sargassum parvivesiculosum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**(8), 986-988 (2004).

Liên hệ: **Phan Minh Giang**

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
Đại học Quốc gia Hà Nội
19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam
Email: phanminhgiang@yahoo.com