

PHÂN LẬP MỘT SỐ THÀNH PHẦN DIPEPTID VÀ GLUCOSID CỦA CÂY CỎ SỮA LÁ NHỎ (*EUPHORBIA THYMIFOLIA* BURM., EUPHORBIACEAE)

Vũ Minh Trang^{1,2}, Phan Minh Giang^{1*}, Lê Thu Hương¹, Nguyễn Thị Hoài Thanh¹, Phan Tổng Sơn¹

¹Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

^{1,2}Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội

Đến Tòa soạn 14-2-2012

Abstract

In addition to phenolic constituents such as apigenin, quercetin, methyl gallate, gallic acid, and apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, the leaves of *Euphorbia thymifolia* Burm. (Euphorbiaceae) were found to contain asperglaucoic (1), aurantiamide (2), β -sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (3), and luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (4) in the present study. Their structures were determined by using MS, 1D and 2D NMR techniques.

Keywords: *Euphorbia thymifolia*; Euphorbiaceae; dipeptide; flavone glucoside.

1. MỞ ĐẦU

Cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia* Burm., Euphorbiaceae) là một cây thuốc cổ truyền của Việt Nam [1, 2] còn chưa được nghiên cứu nhiều về các thành phần hóa học. Trong một bài báo trước chúng tôi đã thông báo về việc phân lập các thành phần phenolic chính có trong phần chiết EtOAc của cây Cỏ sữa lá nhỏ của Việt Nam bao gồm apigenin, methyl gallat, quercetin, axit gallic và apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranosid cùng với acid palmitic và β -sitosterol [3]. Tiếp tục nghiên cứu các thành phần khác từ lá của cây thuốc này chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc được các dipeptid, asperglaucoic (1) và aurantiamid (2) cùng với hai hợp chất glucosid, β -sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranosid (3) và luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranosid (4).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương pháp và Thiết bị

Phổ EI-MS được đo trên thiết bị Hewlett Packard 5989-MS Engine. Phổ ESI-MS được đo trên thiết bị Agilent 6310. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (¹H-NMR, 500 MHz) và cacbon 13 (¹³C-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 được xác định bằng các kỹ thuật phổ DEPT. Các kỹ 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/H₂SO₄

đặc 1%. FeCl₃ 5% và đèn tử ngoại ở bước sóng λ 254 nm. Sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột nhanh (FC) 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, 63-100 và 40-63 μ m.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Nguyên liệu thực vật là lá cây Cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia* Burm., Euphorbiaceae) dùng làm thuốc được thu thập tại Hà Nội vào tháng 8 năm 2007.

2.3. Chiết và Phân lập các hợp chất 1 - 4

Lá cây Cỏ sữa lá nhỏ (3 kg) được chiết và phân bổ thành các phần đoạn tan *n*-hexan, CH₂Cl₂ và etyl axetat như đã được nêu trong bài báo trước [3]. Phần chiết *n*-hexan (29,3 g) được phân tách bằng CC trên silica gel, rửa giải gradient với *n*-hexan-axeton 19:1 \rightarrow 1:1 cho 20 nhóm phân đoạn [3]; nhóm phân đoạn 12 (0,68 g) được rửa bằng axeton cho asperglaucoic (1) (11,4 mg); nhóm phân đoạn 13 (0,68 g) được chiết pha rắn với RP-SPE (Merck, C-18) với 70% và 80% MeOH/H₂O và phần đoạn 80% MeOH/H₂O được tinh chế 2 lần bằng Mini-C trên silica gel với *n*-hexan-axeton 19:1, 15:1, 12:1 và 9:1 cho aurantiamid (2) (3 mg); nhóm phân đoạn 17 (0,82 g) được tinh chế bằng RP-SPE (Merck, C-18) với 70% MeOH/H₂O và Mini-C trên silica gel với *n*-hexan - axeton 4:1 và 2:1 cho apigenin (15 mg) [3]. Phần chiết CH₂Cl₂ (17,4 g) được phân tách bằng CC trên silica gel, rửa giải gradient với *n*-hexan-axeton,

19:1→1:1 cho 10 nhóm phân đoạn; nhóm phân đoạn 5 (2,12 g) được phân tách bằng CC trên silica gel với *n*-hexan-axeton 5:1, 4:1 và 2:1 cho β -sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranosid (3) (5 mg). Phần chiết nước được phân tách bằng CC trên Diaion HP-20, rửa giải gradient với H₂O, 20%, 40%, 60% MeOH/H₂O và MeOH; nhóm phân đoạn 40% MeOH/H₂O (11,6 g) được phân tách bằng CC trên silica gel với hệ dung môi gradient CH₂Cl₂-MeOH 15:1→1:1 và tinh chế bằng FC với CH₂Cl₂-MeOH 9:1 cho luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranosid (4) (0,24 g). Chất 4 cũng được phân lập từ nhóm phân đoạn 60% MeOH/H₂O (4,9 g) bằng CC trên silica gel với hệ dung môi gradient CH₂Cl₂-MeOH 15:1→1:1.

Asperglaucid (1): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,3$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 3:1, v/v), hiện màu tím với vanillin/H₂SO₄ đặc 1%. EIMS: *m/z* (%) 444 (M⁺, C₂₇H₃₈O₈N₂). IR (KBr): ν_{max} (cm⁻¹) 3314, 3029, 1724, 1662, 1631, 1530, 1262, 1050. ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): δ 2,02 (3H, s, 1-OAc), 2,75 (2H, m, 2H-3), 3,06 (1H, dd, *J* = 13,5 Hz, 8,5 Hz, H-3'a), 3,21 (1H, dd, *J* = 13,5 Hz, 6 Hz, H-3'b), 3,82 (1H, dd, *J* = 10 Hz, 5 Hz, H-1a), 3,93 (1H, dd, *J* = 10 Hz, 5 Hz, H-1b), 4,34 (1H, m, H-2), 4,76 (1H, m, H-2), 5,93 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, NH-1'a), 6,7 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, NH-1'a), 7,07 (2H, d br, *J* = 7,5 Hz, H-5, H-9), 7,14 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H-7), 7,15 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, H-6, H-8), 7,24 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H-7), 7,25 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, H-5', H-9'), 7,27 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H-6', H-8'), 7,43 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H-4", H-6"), 7,52 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H-5"), 7,7 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, H-3", H-7"). ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): δ 20,7 (q, 1-OAc), 37,5 (t, C-3), 38,4 (t, C-3'), 49,6 (d, C-2), 55,0 (d, C-2'), 64,6 (t, C-1), 126,8 (d, C-7), 127,1 (2 × d, C-3", C-7"), 127,2 (d, C-7'), 128,6 (2 × d, C-6, C-8), 128,7 (2 × d, C-4", C-6"), 128,8 (2 × d, C-6', C-8'), 129,2 (2 × d, C-5', C-9'), 129,3 (2 × d, C-5, C-9), 131,9 (d, C-5"), 133,8 (s, C-2"), 136,7 (s, C-4'), 136,8 (s, C-4), 167,1 (s, C-1"), 170,3 (s, C-1'), 170,8 (s, 1-OAc).

Aurantiamid (2): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,21$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-axeton 3:1, v/v), hiện màu tím với vanillin/H₂SO₄ đặc 1%. ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD, ppm): δ 2,72 (1H, dd, *J* = 14 Hz, 7 Hz, H-3a), 2,83 (1H, dd, *J* = 14 Hz, 7 Hz, H-3b), 3,09 (2H, m, 2H-3'), 3,40 (2H, m, 2H-1'), 4,04 (1H, septet, *J* = 7,5 Hz, H-2), 4,76 (1H, t, *J* = 7 Hz, H-2'), 7,09-7,18 (5H, m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 7,23 (3H, m, H-5', H-7', H-9'), 7,29 (2H, t, *J* = 7 Hz, H-6', H-8'), 7,44 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H-4", H-6"), 7,53 (1H, t, *J* = 7 Hz, H-5"), 7,72 (2H, d, *J* = 7 Hz, H-3", H-7"). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD, ppm): δ 36,6 (t, C-3), 38,1 (t, C-3'), 52,8 (d, C-2), 54,8 (d, C-2'), 62,8 (t, C-1), 126,2 (d, C-7), 126,9 (2 × d, C-3", C-7"), 127,0 (d, C-7'), 128,2 (2 × d, C-6, C-8), 128,5 (4 × d, C-4", C-6", C-8", C-8'), 128,6 (2 × d, C-5', C-9'),

129,2 (2 × d, C-5, C-9), 131,8 (d, C-5"), 133,3 (s, C-2"), 136,5 (s, C-4'), 137,6 (s, C-4), 167,7 (s, C-1"), 171,1 (s, C-1').

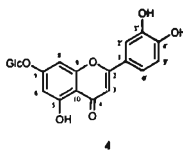
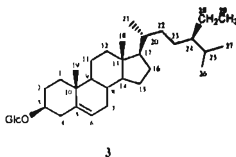
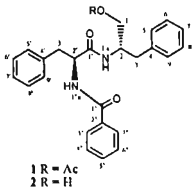
β -Sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranosid (3): Bột vô định hình màu trắng. $R_f = 0,44$ (TLC, silica gel, CH₂Cl₂-MeOH 9:1, v/v), hiện màu tím với vanillin/H₂SO₄ đặc 1%. ¹H-NMR (CD₃OD, ppm): δ 0,71 (3H, s, 19-CH₃), 0,82 (3H, d, *J* = 8 Hz, 27-CH₃), 0,85 (3H, d, *J* = 7 Hz, 26-CH₃), 0,87 (3H, t, *J* = 8 Hz, 29-CH₃), 0,95 (3H, d br, *J* = 5 Hz, 21-CH₃), 1,03 (3H, s, 18-CH₃), 3,14-3,69 (6H, m, Glc-2, Glc-3, Glc-4, Glc-5, 2Glc-6), 3,85 (1H, d br, *J* = 11,5 Hz, H-3), 4,38 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, Glc-1), 5,37 (1H, s br, H-6).

Luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranosid (4): Bột vô định hình màu vàng. $R_f = 0,59$ (TLC, silica gel, EtOAc-H₂O-HCOOH 10:3:2, v/v), hiện màu xanh thẫm với FeCl₃ 5%. ESI-MS: *m/z* 447,3 (C₂₁H₁₉O₁₁, [M - H]⁻). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, ppm): δ 3,17 - 3,50 (5H, m, Glc-2, Glc-3, Glc-4, Glc-5, Glc-6a), 3,71 (1H, d br, *J* = 10,5 Hz, Glc-6b), 5,07 (1H, d, *J* = 7 Hz, Glc-1), 6,44 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-8), 6,74 (1H, s, H-3), 6,78 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-6), 6,9 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 7,41 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-2), 7,44 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, 2,5 Hz, H-6'), 12,9 (1H, s, 5-OH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, ppm): δ 60,6 (t, Glc-6), 69,6 (d, Glc-4), 73,1 (d, Glc-2), 76,4 (d, Glc-5), 77,1 (d, Glc-3), 94,7 (d, C-8), 99,5 (d, C-6), 99,9 (d, Glc-1), 103,2 (d, C-3), 105,3 (s, C-10), 113,5 (d, C-2'), 115,9 (d, C-5'), 119,1 (d, C-6'), 121,4 (s, C-1'), 145,8 (s, C-3'), 149,9 (s, C-4'), 156,9 (s, C-9), 161,1 (s, C-5), 162,9 (s, C-7), 164,5 (s, C-2), 181,9 (s, C-4).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phần chiết metanol phần trên mặt đất cây cỏ sữa là nhỏ được phân bổ lần lượt giữa H₂O và *n*-hexan, CH₂Cl₂ và etyl axetat để cho các phần chiết tương ứng. Các phần chiết *n*-hexan và CH₂Cl₂ được phân tách bằng sắc kí cột gradient cho asperglaucid (1), aurantiamid (2) và β -sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranosid (3). Phần chiết nước chứa các hợp chất phân cực được phân tách bằng đầu bằng sắc ký cột với Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemicals), sau đó các phân đoạn được rửa giải với 40% và 60% MeOH/H₂O được phân tách tiếp bằng CC trên silica gel và tinh chế bằng FC trên silica gel cho thành phần chính luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranosid (4).

Hợp chất 1 đã được xác định cấu trúc dựa trên các dữ kiện phổ EI-MS, 1D NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT) và 2D NMR (HMBC, HSQC và ¹H-¹H COSY) trùng lặp với phổ của chất chuẩn được chúng tôi phân lập từ cây Lầu (Psychotria reevesii Wall., Rubiaceae) [4]. Hợp chất 3 cũng đã được nhận dạng dựa trên so sánh phổ ¹H-NMR với phổ của mẫu chuẩn được chúng tôi phân lập từ cây *Alpinia maclurei* Merr. (Zingiberaceae) [5].



Hợp chất 2 được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy chất 2 là một dẫn xuất deacetyl của chất 1. Sự deacetyl này làm độ chuyển dịch hóa học của nhóm metylen ở C-1 chuyển dịch về trường cao từ δ_{C} 64,6 (chất 1) về 62,8 (chất 2) và tương ứng từ δ_{H} 3,82/3,93 về 3,4. Các dữ kiện phổ NMR này xác định cấu trúc của 2 là aurantiamid [6, 7].

Hợp chất 4 được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ ESI-MS của 4 (chức độ âm) cho một pic ion giả phân tử ở m/z 447,3 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) giả thiết về một công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ của 4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của 4 cho thấy các tín hiệu của một flavon và một nhóm glucopyranosyl [δ_{H} 3,17 - 3,71 (6H, m) và 5,07 (1H, d, $J = 7$ Hz, Glc-1); δ_{C} 60,6 (t), 69,6 (d), 73,1 (d), 76,4 (d), 77,1 (d) và 99,9 (d)]. Hằng số tương tác $J = 7$ Hz xác định cấu hình β của nhóm glucopyranosyl. Các tín hiệu cộng hưởng từ proton của vòng A thế 5,7-dioxy [δ_{H} 6,44 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-8) và 6,78 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6)], vòng B thế 3',4'-dihydroxy [δ_{H} 6,9 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,41 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2') và 7,44 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, 2,5 Hz, H-6')] và tín hiệu singlet của H-3 ở δ_{H} 6,74 (1H, s) phù hợp với một cấu trúc của một dẫn xuất của luteolin [6]. Tín hiệu của C-4 ở δ_{C} 181,9 (s) và H-5 ở δ_{H} 12,9 (s) cho phép khẳng định vị trí của nhóm hydroxy ở C-5. Nhóm glucopyranosyl do đó được gắn vào vị trí C-7 phù hợp với các dữ kiện phổ của luteolin 7-O- β -D-glucopyranosid [8].

4. KẾT LUẬN

Các hợp chất dipeptit, asperglaucid (1) và aurantiamid (2) và glucosid, β -sitossterol 3-O- β -D-glucopyranosid (3) và luteolin-7-O- β -D-glucopyranosid (4) là các thành phần hóa học mới được phát hiện trong cây cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia* Burm., Euphorbiaceae). Luteolin-7-O- β -

D-glucopyranosid là hợp chất chính có trong phần chiết nước và được phân lập bằng một qui trình sắc ký bao gồm các sự phân tách lần lượt trên nhựa polyme Diaion HP-20 và silica gel.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Thành phố Hồ Chí Minh (1997).
2. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội (2001).
3. Vũ Minh Trang, Phan Thị Thủy Dung, Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn. *Các hợp chất phenolic từ cây Cỏ sữa lá nhỏ (Euphorbia thymifolia Burm., Euphorbiaceae)*, Tạp chí Dược học, 51(9), 45-48 (2011).
4. Phan Minh Giang, Ha Viet Son, Phan Tong Son. *Study on the chemistry and antimicrobial activity of Psychotria reevesii Wall (Rubiaceae)*, Tạp chí Hóa học, 45(5), 628-633 (2007).
5. Trương Thị Tố Chinh, Phan Minh Giang, Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Thon, Dương Thị Hải Yến, Phan Tổng Sơn. *Các thành phần hoá học của một số loài Alpina của Việt Nam (Zingiberaceae)*, Tạp chí Hóa học, 48(4B), 501-505 (2010).
6. K. Zan, X.-Q. Chen, Q. Fu, S.-X. Zhou, M.-T. Xiao, J. Wen, P.-F. Tu. *Chemical ingredients isolated from the aerial parts of Artemisia anomala*, Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2010(2), 95-99 (2010).
7. A. Banerji, R. Ray. *Aurantiamides: A new class of modified dipeptides from Piper aurantiacum*, Phytochemistry, 20(9), 2217-2220 (1981).
8. *The flavonoids: Advances in Research*, ed. Harborne J. B., Mabry T. J., Chapman and Hall, London (1982).

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