

NGHIÊN CỨU DỊCH NƯỚC RỄ CÂY ĐƯƠNG QUI *ANGELICA ACUTILOBA* HÀ GIANG

Nguyễn Quốc Vương¹, Vũ Văn Chiến¹, Phạm Thị Hằng¹, Nguyễn Thị Huệ¹, Phạm Văn Cường¹,
Châu Văn Minh¹, Nguyễn Tiến Đạt¹, Nguyễn Văn Hùng¹, Nguyễn Văn Hiệu²,
Giang Lộc Thăng³ và Lương Triệu Vững⁴.

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn Lâm KH&CN Việt Nam, 18 - Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 - Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

³Trung tâm giống cây trồng và gia súc Phó Bảng, Đông Văn, Hà Giang

⁴Sở Nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Hà Giang

Abstract

Angelica acutiloba is a traditional Japanese medicine used as the substitutes of *Angelica sinensis* (a well-known Chinese medicine) for women's health care in Southeast Asia. In this paper, we report the beginning research result on ingredients of roots of *Angelica acutiloba* grown in Hà Giang. From the aqua-fraction of its methanol extract, two nucleosides (adenosine and uridine), an acid amine (phenylalanine) and two compounds 4-hydroxybenzaldehyde, (5-hydroxymethyl)furfura, were isolated. Their structures were confirmed by NMR and ESI-MS spectroscopic analysis.

Keywords. *Angelica acutiloba*, Apiaceae, adenosine, uridine, acid amine, nucleoside.

1. GIỚI THIỆU CHUNG

Cây đương qui *Angelica acutiloba* là cây thuốc truyền thống ở Nhật Bản, thường được dùng thay thế cho loài đương qui *Angelica sinensis* nổi tiếng của Trung Quốc ở các nước Đông Nam Á. Trong y học, cũng như các loài đương qui khác, rễ của *Angelica acutiloba* (*A. acutiloba*) được sử dụng điều trị các bệnh trong hệ thống sinh sản nữ và cải thiện các bệnh thiếu máu, suy nhược cơ thể... [1-5]. *A. acutiloba* được di thực vào Việt Nam từ những năm 1990 [6], được trồng ở nhiều nơi và đã được sử dụng rất rộng rãi như là một cây thuốc phổ biến nhưng những nghiên cứu về thành phần hóa học trong rễ của cây vẫn chưa được công bố. Trong Chương trình phát triển cây thuốc ở tỉnh Hà Giang, cây đương qui đã được quan tâm nghiên cứu. Để có cơ sở đánh giá chất lượng và làm sáng tỏ tác dụng điều trị bệnh, thành phần hóa học trong rễ cây *A. acutiloba* trồng ở Hà Giang cần phải được xác định. Trong các công trình đã công bố trên thế giới, những nghiên cứu về các loài đương qui khác nhau và cùng một loài được trồng ở nhiều nơi cho thấy chúng rất khác nhau về thành phần hóa học cũng như hàm lượng của mỗi cấu tử trong chúng [7-8]. Trong báo cáo này chúng tôi được đầu công bố một số các hợp chất phân lập được từ phần đoạn nước của dịch chiết metanol từ rễ cây đương qui *A. acutiloba* đã được thu hoạch ở Hà Giang.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị

Phổ Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruke Avance AM 500 MHz với tetrametylsilane làm chất nội chuẩn. Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) đo trên máy HP 1100 LC/MS ion Trap.

2.2. Vật chất và phương pháp

2.2.1. Điều chế phần đoạn nước từ dịch chiết methanol;

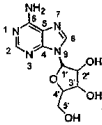
Rễ cây Đương qui *A. acutiloba* thu hoạch ở Hà Giang được sấy khô, nghiền nhỏ rồi được ngâm chiết với metanol nhiều lần đến kiệt hoạt chất (Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng). Dịch chiết được kết hợp lại và quay cất loại dung môi đến dịch sánh. Dịch sánh được chiết phần đoạn với n-hexan rồi với etyl axetat, phần còn lại là phần đoạn nước chứa các chất tan tốt trong nước.

2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất từ phần đoạn nước dịch chiết metanol:

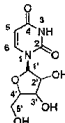
Phần đoạn nước được quay cất dưới chân không thấp loại nước đến nồng độ vừa đủ để tiến hành sắc ký cột trên diaion HP 20 với các hệ dung môi rửa giải metanol/nước lần lượt ở các tỉ lệ giảm dần độ phân cực (0/100, 50/50, 100/0, v/v). Phần đoạn metanol/nước (50/50, v/v) được cô quay loại dung môi, phần cặn được tiếp tục phân lập qua silica gel pha đảo hệ metanol/nước ở các tỉ

lệ khác nhau thu được các phân đoạn MF1-F20. Các phân đoạn lại được tiến hành sắc ký cột trên silica gel pha đảo nhiều lần để tinh chế thu được

các hợp chất adenosine (1), uridine (2), phenylalanine (3), 4-hydroxybenzoic acid (4) và 5-(hydroxymethyl)furfural (5).



1: Adenosine



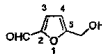
2: Uridine



3: Phenylalanine



4: 4-hydroxybenzaldehyde



5: (5-hydroxymethyl)furfural

Chất 1: Adenosine là chất bột màu trắng. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 8,34 (1H, s, H-8), 8,13 (1H, s, H-2), 7,32 (2H, s, NH₂), 5,87 (1H, d, J = 6 Hz, H-1'), 5,43 (1H, J = 6 Hz, OH-5'), 5,41 (1H, dd, J = 5, 7,5 Hz, OH-2'), 5,17 (1H, J = 4,5 Hz, OH-3'), 4,62 (1H, dd, J = 6, 11 Hz, H-2'), 4,14 (1H, dd, J = 4,5, 7,5 Hz, H-3'), 3,96 (1H, q, J = 3,5 Hz, H-4'), 3,67 (1H, dt, J = 4,5, 12,5 Hz, Ha-5'), 3,55 (1H, ddd, J = 4, 7,5, 12 Hz, Hb-5'); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) 156,2 (C-6), 152,4 (C-2), 149,1 (C-4), 139,9 (C-8), 119,3 (C-5), 87,9 (C-1'), 85,9 (C-4'), 73,4 (C-2'), 70,6 (C-3'), 61,7 (C-5'). ESI-MS, m/z 268 [M+H]⁺

Chất 2: Uridine là chất bột màu trắng. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 8,02 (1H, d, J = 8 Hz, H-5), 5,92 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-1'), 5,72 (1H, d, J = 8 Hz, H-6), 4,21 (1H, dd, J = 5, 8,5 Hz, H-2'), 4,17 (1H, dd, J = 5, 9,5 Hz, H-3'), 4,0 (1H, d, J = 4 Hz, 3,86 (dd, J = 2,5, 12,5 Hz, H-5/a), 3,75 (1H, dd, J = 3,5, 12 Hz, H-5'b). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) 163,5 (C-4), 151,0 (C-2), 140,6 (C-6), 101,7 (C-5), 87,8 (C-1'), 84,8 (C-4'), 73,6 (C-2'); 69,7 (C-3'), 60,8 (C-5'). ESI-MS, m/z 245 [M+H]⁺

Chất 3: Phenylalanine là chất bột màu trắng. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 1,42 (2H, t, J = 7,5 Hz, H-3, H-5), 7,37 (1H, t, J = 7,5 Hz, H-4), 7,32 (2H, d, J = 7,5 Hz, H-2, H-6), 3,99 (1H, J = 5, 8 Hz, H-2'), 3,28 (1H, dd, J = 5, 14,5 Hz, Ha-3'), 3,12 (1H, dd, J = 8, 14,5 Hz, Hb-3'). ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) 174,0 (COOH), 135,2 (C-1), 129,5 (C-3, C-5), 129,3 (C-2, C-6), 127,9 (C-4), 56,1 (C-2'), 36,5 (C-3'). ESI-MS, m/z 166,7 [M+H]⁺

Chất 4: 4-hydroxybenzoic acid là chất bột màu trắng. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) 7,89 (2H, d, J

= 8,5 Hz, H-2, H-6), 6,83 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3, H-5). ESI-MS, m/z 137 [M-H]⁻

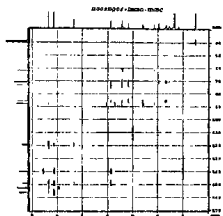
Chất 5: (5-hydroxymethyl)furfural là chất lỏng dạng dầu. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) 9,56 (1H, s, CHO), 7,40 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-3), 6,60 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-4), 4,53 (2H, s, CH₂-OH). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) 179,4 (CHO), 163,2 (C-5), 153,9 (C-2), 124,8 (C-3), 110,9 (C-4), 57,6 (CH₂).

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Từ phân đoạn nước dịch chiết metanol của rễ Dương qui Nhật B. (*A. acutiloba*) thu hoạch ở Hà Giang, sử dụng các phương pháp sắc ký cột trên diaion và silica gel pha đảo đã phân lập được 5 hợp chất adenosine (1), uridine (2), phenylalanine (3), 4-hydroxybenzoic acid (4) và 5-(hydroxymethyl)furfural (5). Cấu trúc của các hợp chất trên được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ NMR 1 chiều, 2 chiều, phổ khối lượng và đối chiếu với các tài liệu đã được công bố.

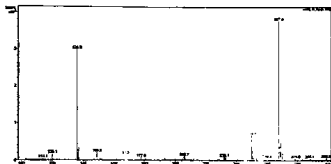
Chất 1 (adenosine) là một chất bột màu trắng. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR của hợp chất 1 (adenosine) cho thấy ở vùng trường thơm có 2 singlet rất mạnh là tín hiệu của 2 proton thuộc vòng pyrimidine 5 cạnh ở δ_H 8,34 và vòng pyrimidine 6 cạnh ở δ_H 8,13. Tiếp theo là tín hiệu singlet cũng rất mạnh của 2 proton amine NH₂ ở δ_H 7,32. Ở trường cao hơn là tín hiệu doublet của proton anomer của mạch đường ở δ_H 5,87 (d, J = 6 Hz, H-1'), các tín hiệu proton hydroxy của đường cũng xuất hiện ở δ_H 5,43 (d, OH-5'), δ_H 5,41 (dd, OH-2') và δ_H 5,17 (d, OH-3'). Các proton metin (CH) cho các tín hiệu ở δ_H 4,62 (dd, H-2'), δ_H 4,14 (dd, H-3'), δ_H 3,96 (q, H-4'),

δ_H 3,67 (dt, H α -5'), và δ_H 3,55 (ddd, H β -5'). Phổ ^{13}C -NMR cho tín hiệu của 10 cac bon gồm 5 cac bon của 2 vòng pyrimidine 5 và 6 cạnh ở vùng trường thom ở δ_c 156,2 (C-6), 152,4 (C-4), 149,91(C-4), 139,9 (C-8) 119,3 (C-5). Ở vùng trường cao hơn là 5 cac bon của mạch đường ở δ_c 87,9 (C-1'), 85,9 (C-4'), 73,4 (C-2'), 70,6 (C-3'), và 61,7 (C-5'). Phổ DEPT cũng cho tín hiệu của 6 cac bon metin (CH) quay lên trên của C-2, C-4, C-1', C-2', C-3', C-4') và 1 cac bon metylen quay xuống C-5'. Phổ HSQC và HMBC (Hình 1) cho các tương tác ngang giữa H-



Hình 1: Phổ HMBC của chất 1 adenosine

8/C-4, 5 và H-2/C-4, 6. H-1'/C-8, 4, 2', H-OH-5'/ C-5', 4', OH-2'/C-1', 2', 3', OH-3'/C-3', 2', 4'. Các proton khác của mạch đường cũng cho các tương tác ngang H-2'/C-1', 3', H-3'/C-2', H-4'/C-5', 3', H α -5'/ C-4', 3', H β -5'/C-4'. Phổ khối ESI-MS positive (Hình 2) cho pic ion phân tử phù hợp với công thức cấu tạo với $m/z = 268[M+H]^+$. Các số liệu phổ của chất 2 hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ của adenosine và được xác định là β -adenosine dựa vào giá trị hằng số tương tác H1' với H-2' $J = 6$ Hz như đã được công bố trong các tài liệu [11, 12].



Hình 2: Phổ ESI-MS của chất 1 adenosine

Chất 2 (uridine) là chất bột màu trắng. Phổ 1H -NMR của chất 2 cho tín hiệu của proton H-5 ở δ_H 8,02 (d) và H-6 ở δ_H 5,72 với $J_{meta} = 8$ Hz. Proton H-1' cho tín hiệu ở δ_H 5,92 (d, $J = 4,5$ Hz). Các proton của đường cho các tín hiệu ở δ_H 4,21 (dd, H-2'), δ_H 4,17(dd, H-3') δ_H 4,0(dd, H-4') và các tín hiệu doublet ở 3,86ppm, 3,75 ppm là của proton H α -5', H β -5'. Phổ ^{13}C -NMR của chất 2 cho 9 tín hiệu 9 cac bon bao gồm các tín hiệu của các cac bon nhóm CO ở δ_c 163,5 (C-4) và ở δ_c 151,0 (C-2), các cac bon metin (CH) quay lên trên phổ DEPT ở δ_c 140,6 (C-6), 101,7(C-5), 87,8 (C-1'), 84,8 (C-4'), 73,6 (C-2'), 69,7 (C-3') và 1 cac bon methylene (CH $_2$) quay xuống ở 60,8(C-5'). Phổ HSQC và HMBC cho các tương tác ngang giữa H-5/C-6, 4-CO; H-6/C-5, C-2, C-5; 3-NH/4-CO, 2-CO, C-5. Ngoài ra là các tương tác ngang giữa các proton của đường với các cac bon khác như trong phần đường của adenosine, đặc biệt là tương tác ngang giữa H-1'/4-CO, C-6, C-2. Phổ khối ESI-MS positive cũng cho pic ion phân tử phù hợp với công thức cấu tạo với $m/z = 245[M+H]^+$. Các số liệu phổ của chất 3 hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ của uridine như trong tài liệu [13].

Chất 3: 5-(hydroxymethyl)furfural dạng dầu màu vàng nhạt. Trên phổ 1H -NMR của chất 3, ở vùng trường thấp cho tín hiệu của proton CHO ở δ_H 9,56. Vùng trường thom cho 2 tín hiệu doublet của 2

proton metin (CH) ở δ_H 7,40 và δ_H 6,60 với hằng số tương tác $J = 3,5$ Hz, ở vùng trường cao hơn là tín hiệu singlet của 2 proton metylen (CH $_2$) ở δ_H 4,63. Phổ ^{13}C -NMR của chất 3 cho 5 tín hiệu của 5 cac bon bao gồm 1 tín hiệu ở δ_c 179,4 (CO), Ở vùng trường thom có 2 tín hiệu của cac bon thom liên kết với oxy ở δ_c 163,2 (C-2), và δ_c 153,9 (C-5), tiếp đó là các tín hiệu của 2 cac bon metin thom(CH) ở δ_c 124,8 (C-3) và 110,9 (C-4). Ở trường cao hơn là tín hiệu ở nhóm cac bon metylen ở δ_c 57,6. Phổ HSQC và HMBC của chất 3 cho các tương tác ngang giữa H-CHO/C 2; H-3/C-4, C-2, C-5; H-4/C-3, C-2, C-5; H-CH $_2$ /C-4, C-5. Phổ khối ESI-MS positive cũng cho pic ion phân tử phù hợp với công thức cấu tạo với $m/z = 127[M+H]^+$.

Chất 4: 4-hydroxybenzoic acid là chất rắn màu trắng. Phổ 1H -NMR của chất 4 cho duy nhất 2 cặp tín hiệu doublet của 4 proton thom ở δ_H 7,89 và δ_H 6,33 với hằng số tương tác $J_{ortho} = 8,5$ Hz. Phổ khối ESI-MS negative cho pic ion phân tử phù hợp với công thức cấu tạo với $m/z = 137[M-H]^-$.

Chất 5: Phenylalanine là chất bột màu trắng. Phổ 1H -NMR của chất 5 cho tín hiệu của 5 proton vùng trường thom gồm 2 proton ở δ_H 7,42(2H, t, H-3, H-5), 1 proton ở δ_H 7,37(1H, t, H-4) và 2 proton ở δ_H 7,32(2H, d, H-2, H-6). Ở trường cao hơn là tín hiệu của proton metin liên kết với các cac bon nhóm C-

N ở δ_H 3,99, ở trường cao hơn nữa là tín hiệu của 2 proton methylen ở δ_H 3,28 (dd, Ha-3') và δ_H 3,12 (dd, Hb-3'). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất 5 cho tín hiệu của 9 các bon bao gồm tín hiệu của nhóm COOH ở δ_C 173, ở vùng trường thơm là tín hiệu của 5 các bon thơm ở 135,2 (C-1), 129,5 (C-3, C-5), 129,3 (C-2, C-6), 127,9 (C-4); ở trường cao hơn là tín hiệu của nhóm các bon metin liên kết với ni tơ (C-N) ở 56,1 (C-2') và một các bon methylen (CH_2) ở 36,5 (C-3'). Phổ khối ESI-MS (negative) cho pic ion phân tử phù hợp với công thức cấu tạo với $m/z = 209[\text{M-H}]^-$.

4. KẾT LUẬN

Từ phần đoạn nước của dịch chiết metanol rễ cây Đương qui *A. acutiloba* thu hoạch tại Hà Giang đã phân lập được 5 hợp chất bằng các phương pháp sắc ký cột trên diaion, silica gel pha đảo. Trong đó hai hợp chất adenosine và uricine đã được phân lập là 2 nucleoside trong 5 loại nucleoside chuẩn (Uridine, Adenosine, Thymidine, Cytidine và Guanosine) tạo nên các axit nucleic đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp protein. Hợp chất thứ ba là một axit aminic, hai hợp chất còn lại là 4-hydroxybenzoic acid và 5-(hydroxymethyl)furfural. Cấu trúc phân tử của chúng được xác định dựa trên sự phân tích phổ và đối chiếu với các tài liệu đã được công bố.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài mã số VAST/GCN.05/14-16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chí, Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học (2012), tập 1 trang 988.
2. Wen-Long Wei and Lin-Fang Huang, Simultaneous Determination of Ferulic Acid and Phthalides of *Angelica Sinensis* Based on UPLC-Q-TOF/MS, *Molecules* (2015), 20, 4681-4694.
3. Pui Hei Chan, Wendy L. Zaang, Chung-Ho Lau, Chi Yuen Cheung, Hector C. Keun 3, Karl W. K. Tsim and Henry Lam, Metabonomic Analysis of Water Extracts from Different *Angelica* Roots by $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy}$, *Molecules* (2014), 19, 3460-3470.
4. Sukaonda Tianniam, Takeshi Bamba, and Eiichiro Fukusaki, Pyrolysis GC-MS-based metabolite

- fingerprinting for quality evaluation of commercial *Angelica acutiloba* roots, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2010), 109(1), 89-93.
5. S.C. Lao, S.P. Li, Kelvin K.W. Kan, P. Li, J.B. Wan, Y.T. Wang, Tin T.X. Dong, Karl W.K. Tsim, Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction, *Analytica Chimica Acta* 526 (2004), 131-137.
6. Ange Bighelli, Dominique Lesueur and Joseph Casanova, Bui Thi Bang and Pham Van Y, Combined Analysis of *Angelica acutiloba* Kitagawa Seed Oil by GC(RI), GC/MS and $^{13}\text{C-NMR}$, *Journal of Essential Oil Research* (2010), 22(3) 217-219.
7. Lucksanaporn Tarachiwana,b, Akiro Katoh, Koichi Utec, Eiichiro Fukusaki, Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by $^1\text{H NMR}$ -based metabolic fingerprinting, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2008), 48, 42-48.
8. Guang-Hua Lu, Kelvin Chan, Yi-Zeng Liang, Kelvin Leung, Chi-Leung Chan, Zhi-Hong Jiang, Zhong-Zhen Zhao, Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs, *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 383-392
9. Nguyen Thi Hong Van, Nguyen Thi Hoang Anh, Nghiên cứu thành phần hóa học rễ cây Đương qui, *Tạp chí Hóa học-VAST* (2005), 43(4), 494-498.
10. Mitsuo Miyazawa, Toshihiko Tsukamoto, Jun Anzai, and Yukio Ishikawa Insecticidal Effect of Phthalides and Furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*, *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52, 4401-4405.
11. P. Ciuffreda, S. Casati and A. Manzocchi, Complete ^1H and ^{13}C NMR spectra; assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry, Magnetic Resonance in Chemistry* (2007), 45(9), 781-784.
12. Denisa L. Domondona, Weidong Heb, Norbert De Kimpeb, Monica Höllera, Joseph Poppea, β -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production, *Phytochemistry* (2004), 65(2), 181-187
13. J. Kitajima, T. Ishikawa, Y. Tanaka and Y. Ida, *Chem.Pharm.Bull.* (1999), 47(7), 988-992.

Liên hệ: Nguyễn Quốc Vương

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
E-mail: nguyenvuong@imbc.vast.vn