

THÀNH PHẦN HÓA HỌC TỪ DỊCH CHIẾT ETYL AXETAT CỦA ĐỔ TRỌNG *EUCOMMIA ULMOIDES* OLIVER

Trần Hữu Giáp¹, Hà Thị Thoa¹, Lê Nguyễn Thành¹, Nguyễn Anh Dũng¹, Giang Lộc Thăng²,
Luong Triệu Vững³, Nguyễn Đức Vinh³, Nguyễn Thị Minh Hằng¹, Nguyễn Tiến Đạt¹,
Nguyễn Văn Hùng¹, Nguyễn Văn Hiếu¹, Châu Văn Minh¹,

¹Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
²Trung tâm Giống cây trồng và Gia súc Phó Bảng, Đông Văn, Hà Giang
³Sở nông nghiệp và phát triển nông thôn Hà Giang

Abstract

Eucommia ulmoides Oliv. (Family Eucommiaceae) also known as Du-Zhong (Vietnamese: Đỗ trọng, Japanese: Tsuchong), is the sole species of the genus *Eucommia*. The leaf, stem, and bark of *E. ulmoides* have been traditionally used to cure many diseases impotence, hypertension, hyperlipemia, diabetes, obesity, osteoporosis, Alzheimer's disease (AD), aging, and lupus-like syndrome. Phytochemical investigation of the ethyl acetate extract of the *Eucommia ulmoides*, which collected in Hà Giang province, led to the isolation of three iridoids genipin (1), geniposide (2), geniposidic acid (3) together with one lignan pinoresinol (4). Their chemical structures were elucidated by spectroscopic methods including NMR and ESI-MS, and by comparison with the literature data.

Keywords. *Eucommia ulmoides*, Genipin, Pinoresinol, Geniposide, Axit geniposidic.

1. MỞ ĐẦU

Đỗ trọng (*Eucommia ulmoides*) là loài duy nhất của chi *Eucommia*, họ Eucommiaceae. Đỗ trọng là một trong 50 loại dược liệu cơ bản trong được điển Trung Quốc. Lá, chồi và đặc biệt là vỏ cây *E. ulmoides* đã được sử dụng để chữa nhiều bệnh như cao huyết áp, mỡ máu, béo phì, tiểu đường, bất lực, bệnh Alzheimer. Các nhà khoa học Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc đã có nhiều nghiên cứu về Đỗ trọng [1, 2] tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa thấy nghiên cứu nào về loài Đỗ trọng trong nước. Với mục tiêu nghiên cứu thành phần hóa học của mẫu Đỗ trọng ở Việt Nam, qua đó có thể phát triển nguồn dược liệu quý này ở tỉnh Hà Giang, trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả phân lập và xác định cấu trúc của 3 hợp chất iridoid và 1 hợp chất lignan từ dịch chiết etyl axetat của đỗ trọng thu hái tại Hà Giang. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định lần lượt là genipin (1), geniposide (2), axit geniposidic (3) và pinoresinol (4) bằng các phương pháp phổ khối lượng ESI-MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh với các tài liệu tham khảo.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương pháp và thiết bị

Điểm nóng chảy được đo trên máy EZ-Melt 3.0. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên

hệ thống sắc kí lỏng ghép khối phổ LC/MS Agilent 1260, sử dụng mode ESI. Sắc ký cột thường được thực hiện trên silica gel (Merck) cỡ hạt 40-63 μm hay Sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn (Merck 60 F₂₅₄). Phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 nm hay thuốc thử Ce-Mo.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Mẫu đỗ trọng được ThS. Đào Đình Cường thu hái tại Phó Bảng, Đông Văn, Hà Giang. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Mẫu vỏ cây đỗ trọng sau khi thu hái được sấy khô và xay nhỏ (4,6 kg) rồi đem ngâm chiết với dung môi MeOH 5 lần ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau khi cặn dung môi dưới áp suất giảm thu được 650 g cặn MeOH. Hòa tan cặn chiết MeOH bằng 500 ml nước cất, rồi chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, etyl axetat để cho các phần chiết *n*-hexan (85,5 g) và etyl axetat (117 g).

Cặn etyl axetat của đỗ trọng (115 g) được phân tách bằng sắc ký cột trên silica gel, rửa giải gradient với *n*-hexan-etyl axetat từ 0-100% để thu được 8 phần đoạn ký hiệu từ ĐTE1 đến ĐTE8.

Phần đoạn ĐTE4 (9,9 g) được phân tách bằng sắc ký cột trên silica gel, rửa giải với dung môi *n*-hexan-etyl axetat 19:1, 9:1, 2:1 để thu được 3 phần

loạn từ ĐTE4.1 đến ĐTE4.3. Phân đoạn ĐTE4.2 (3 g) tiếp tục phân tách bằng sắc ký cột trên silica gel với dung môi diclometan-etyl axetat 50:1, 19:1, 5:1 để thu được 2 phân đoạn ĐTE4.2.1 và ĐTE4.2.2. Phân đoạn ĐTE4.2.2 (1,8 g) được tinh chế qua cột Sephadex và silica gel để thu được chất sạch 1 (16 mg). Phân đoạn ĐTE4.2.1 (0,2 g) được tinh chế qua cột Sephadex với dung môi MeOH-diclometan t lệ 9/1 thu được chất sạch 4 (130 mg).

Phân đoạn ĐTE7 (20,4 g) được phân tách bằng sắc ký cột trên silica gel, rửa giải với dung môi diclometan-MeOH 100:1, 50:1, 19:1 để thu được 6 phân đoạn từ ĐTE7.1 đến ĐTE7.6. Phân đoạn ĐTE7.6 (13 g) được phân tách qua cột Sephadex, rửa giải với dung môi MeOH 100% để thu được 2 phân đoạn ĐTE7.6.1 và ĐTE7.6.2. Phân đoạn ĐTE7.6.2 (8 g) được phân tách qua cột silica gel, rửa giải với dung môi diclometan-MeOH 100:1, 50:1, 19:1 để thu được 5 phân đoạn từ ĐTE7.6.2.1 đến ĐTE7.6.2.5. Phân đoạn ĐTE7.6.2.2 (0,8 g) được tinh chế qua cột silica gel với dung môi etyl axetat-MeOH 19:1 thu được chất sạch 2 (20 mg). Phân đoạn ĐTE7.6.2.5 (1,3 g) được tinh chế qua cột Sephadex với dung môi MeOH 100% thu được chất sạch 3 (30 mg).

Genipin (1): Chất rắn màu trắng. T_m : 120-121 °C. ESI-MS: m/z 227 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{11}H_{14}O_5$ ($M = 226$). Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR: bảng 1.

Geniposide (2): Tinh thể màu trắng. T_m : 163-164 °C. ESI-MS: m/z 423,1 $[M+Cl]^-$, công thức phân tử $C_{17}H_{24}O_{10}$ ($M = 388$). Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR: bảng 1.

Axit geniposidic (3): Chất rắn màu trắng. T_m : 138-140 °C. ESI-MS: m/z 375 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{15}H_{22}O_{10}$ ($M = 374$). Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR: bảng 1.

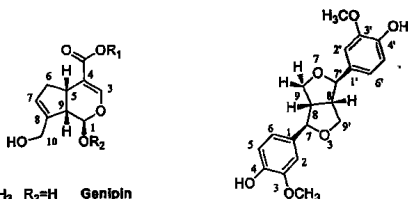
Pinoresinol (4): Chất rắn màu trắng. T_m : 110-112 °C. ESI-MS: m/z 359 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{20}H_{22}O_6$ ($M = 358$). Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6,89 (2H, s, H-2, H-2'), 6,88 (2H, s, J = 8,0 Hz, H-5, H-5'), 6,83 (2H, dd, J = 1,5 Hz, J = 8,0 Hz, H-6, H-6'), 5,62 (2H, s, OH), 4,74 (2H, d, J = 4,0 Hz, H-7, H-7'), 4,26 (2H, q, J = 6,5 Hz, J = 8,5 Hz, H-9 β , H-9' β), 3,90 (6H, s, OCH_3), 3,89 (2H, t, J = 4,0 Hz, J = 9,5 Hz, H-9 α , H-9' α), 3,11 (2H, t, H-8, H-8'). ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 146,7 (C-4, C-4'), 145,2 (C-3, C-3'), 132,9 (C-1, C-1'), 118,9 (C-6, C-6'), 114,2 (C-5, C-5'), 108,6 (C-2, C-2'), 85,8 (C-7, C-7'), 71,6 (C-9, C-9'), 5,9 (OCH_3), 54,1 (C-8, C-8').

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 được phân lập là chất rắn màu trắng. Trên phổ 1H -NMR của 1 xuất hiện tín hiệu của 2 nối đôi với 2 tín hiệu ở vị trí δ 7,53 (d, J = 0,5 Hz, 1H) và 5,88 (brs, 1H), có 1 tín hiệu H của nhóm acetal δ 4,83 (d, J = 8,5 Hz). Ngoài ra còn có tín hiệu nhóm ester OMe ở vị trí δ 3,74 (s, OCH_3), tín hiệu nhóm CH_2OH ở vị trí 4,36-4,28 ppm. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT xuất hiện tín hiệu 11 carbon (5 nhóm CH, 2 nhóm CH_2 , 1 nhóm CH_3 và 3 carbon bậc 4) trong đó tín hiệu của 2 nối đôi xuất hiện ở các vị trí δ 152,4 (CH), 142,1 (C), 130,9 (CH) và 110,8 (CH). Tín hiệu carbon nhóm acetal xuất hiện ở vị trí 96,3 ppm, nhóm methyl ester ở vị trí 51,3 và tín hiệu nhóm CH_2OH ở δ 61,3. Kết hợp với phổ khối lượng (ESI-MS) cho thấy xuất hiện pic ion m/z $[M+H]^+$ là 227 cho biết công thức phân tử là $C_{11}H_{14}O_5$ ($M = 226$). Số liệu phổ của 1 tương thích với các số liệu đã công bố hợp chất genipin (Bảng 1) [3]. Như vậy hợp chất 1 được xác định là iridoid genipin.

Hợp chất 2 thu được ở dạng tinh thể hình kim, màu trắng. Phổ 1H -NMR của 2 xuất hiện tín hiệu các tín hiệu tương tự như hợp chất 1 (genipin) với các tín hiệu δ 7,46 (1H, d, J = 1,0), 5,67 (1H, brs), 5,11 (1H, d, J = 7,0 Hz), 4,12 (1H, d, J = 15,0 Hz), 3,95 (1H, d, J = 15,0 Hz), 3,63 (3H, s, OCH_3), 2,69 (2H, m), 2,03 (1H, m). Ngoài ra trên phổ thấy xuất hiện một peak từ đường với tín hiệu proton anomeric δ 4,52 (1H, d, J = 7,5 Hz), các tín hiệu nhóm methin hydroxyl và methylen hydroxyl ở δ 3,64-2,99 (m, 6H). Tín hiệu các nhóm OH xuất hiện ở 4,95 (d, J = 5,0 Hz), 4,92 (d, J = 5,5 Hz) và 4,45 (t, J = 6 Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT, bên cạnh các tín hiệu tương tự của hợp chất 1 thấy xuất hiện thêm các tín hiệu của phân tử đường ở δ 98,5 (C-Glc1), 77,2 (CH), 76,6 (CH), 73,2 (CH), 69,9 (CH), và 60,9 (CH_2). Phổ khối lượng (ESI-MS) có pic ion giả phân tử là m/z $[M+Cl]^-$ là 423,1 cho biết khối lượng phân tử của 2 là 388, tương ứng với công thức phân tử là $C_{17}H_{24}O_{10}$. Từ số liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR, ESI-MS của 2 cho phép xác định hợp chất này là geniposide. So sánh số liệu phổ với tài liệu tham khảo [3] của hợp chất geniposide thấy có sự trùng khớp (bảng 1).

Hợp chất 3 thu được ở dạng bột màu trắng. Phổ 1H -NMR của 3 xuất hiện các tín hiệu tương tự như hợp chất 2 (geniposide) ngoại trừ việc mất đi tín hiệu nhóm methyl ester. Trên phổ ^{13}C -NMR tín hiệu của nhóm carbonyl dịch chuyển tới δ 171,3 ppm. Phổ khối lượng (ESI-MS) có pic ion giả phân tử là m/z $[M+H]^+$ là 375,1 cho biết khối



- 1: R₁=CH₃ R₂=H Genipin
 2: R₁=CH₃ R₂=Glc Geniposide
 3: R₁=H R₂=Glc Geniposidic acid

4: Pinoselinol

Hình 1. Cấu trúc hóa học các hợp chất 1-4

Bảng 1. Số liệu phổ của các hợp chất 1, 2 và 3

Vị trí	1		2				3		
	¹ δ _c	^{1,2} δ _c	^a δ _H (mult., J = Hz)	^a δ _c	^{a,6} δ _c	^a δ _H (mult., J = Hz)	^a δ _c	^{a,a} δ _c	^a δ _H (mult., J = Hz)
1	96,3	96,3	4,83 (d, 8,5)	95,7	95,7	5,11 (d, 7,0)	98,3	98,1	5,14 (d, 7,5)
3	152,4	152,4	7,53 (d, 0,5)	151,6	151,5	7,46 (d, 1)	153,1	152	7,45 (s)
4	110,8	110,8	-	110,9	110,9	-	113,1	114,1	-
5	36,7	36,7	3,24 (ddd, 9,5, 8,5, 8,5)	34,4	34,4	3,07 (m)	36,7	36,9	3,20 (1H, m)
6	39,0	39,0	2,10 (ddt, 16,5, 9,5, 1,5); 2,92 (ddt, 17, 9, 1,5)	38,0	37,9	2,69 (m) 2,03 (m)	39,8	39,8	2,86 (1H, dd, 16, 8,5); 2,20 (1H, m)
7	130,9	130,9	5,88 (br,s)	125,5	125,4	5,67 (br,s)	128,5	128,4	5,81 (1H, brs)
8	142,1	142,1	-	144,1	144	-	144,8	144,8	-
9	48,2	48,2	2,57 (ddd, 9, 8,5, 1,5)	45,9	45,8	2,69 (m)	47,1	47,1	2,72 (1H, t, 7,5)
10	61,3	61,3	4,36 (d, 13,5); 4,30 (d, 13,5)	59,3	59,3	3,95 (br, d, 15,0); 4,12 (br, d, 15,0); OH 4,72 (t, 5,5)	61,5	61,5	4,32 (1H, d, 14,0); 4,20 (1H, d, 14,0)
C=O	167,9	167,9	-	166,9	166,8	-	171,3	171,3	-
CH ₃	51,3	51,3	3,74 (s)	51,0	50,9	3,63 (s)	-	-	-
Glc-1	-	-	-	98,6	98,5	4,52 (d, 7,5)	100,4	100,2	4,73 (1H, d, 8,0)
Glc-2				73,3	73,2	2,99 (m); OH 5,02 (d, 5,0)		74,8	
Glc-3				76,6	76,6	3,18 (m); OH 4,95 (d, 5,0)		77,8	
Glc-4				70,0	69,9	4,92 (d, 5,5); 3,07 (m)		71,5	
Glc-5	-	-	-	77,2	77,2	3,18 (m)	-	78,3	
Glc-6				61,0	60,9	3,64 (m); 3,39 (m); OH 4,45 (t, 6,0)		62,6	3,43-3,25 (m, 6H, đường)

¹125 MHz, ²Đo trong CDCl₃, ³500 MHz, ⁴Đo trong DMSO, ⁵Đo trong MeOD,
^aδ_c: genipin [3], ^aδ_c: geniposide [3] ^aδ_c: axit geniposidic [4]

ượng phân tử của 3 là 374, tương ứng với công thức nhân tử là $C_{16}H_{22}O_{10}$. Từ số liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR, ESI-MS của 3 cho phép xác định hợp chất này là axit geniposidic. Số liệu phổ của 3 là phù hợp với số liệu công bố trước đây (Bảng 1) [4].

Hợp chất 4 thu được là một chất rắn màu trắng. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hệ ABX vòng thơm [δ_H 6,89 (1H, s), δ_H 6,88 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 6,83 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 8,0$ Hz)], và nhóm methoxy ở δ_H 3,90 ppm. Ngoài ra xuất hiện tín hiệu đặc trưng của vòng bis-lignan với các tín hiệu δ_H 4,74 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 4,26 (1H, q, $J = 6,5$ Hz, $J = 8,5$ Hz), 3,89 (1H, q, $J = 4,0$ Hz, $J = 9,5$ Hz), và 3,11 (1H, m). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho phép nhận biết sự có mặt của 10 carbon, trong đó các tín hiệu vòng thơm tại các vị trí δ_C 146,7 (C), 145,2 (C), 132,9 (C), 118,9 (CH), 114,2 (CH), 108,6 (CH). Các tín hiệu của vòng bis-lignan xuất hiện tại δ_C 85,8 (CH), 71,6 (CH₂), và 54,1 (CH). Phổ khối lượng (ESI-MS) cho pic ion giả phân tử là m/z [M+H]⁺ là 359,1 cho biết khối lượng phân tử của 4 là 358, tương ứng với công thức phân tử là $C_{20}H_{22}O_6$. Điều này cho thấy hợp chất 4 là đối xứng và mỗi tín hiệu trong phổ NMR là các pic chập đôi. Từ các dữ liệu phổ cho phép xác định hợp chất 4 là pinoresinol, một hợp chất lignan phổ biến trong tự nhiên được tìm thấy ở *Đỗ trọng* và các loài thực vật khác. So sánh số liệu phổ với tài liệu tham khảo của hợp chất pinoresinol thấy có sự trùng khớp [5].

4. KẾT LUẬN

Từ dịch chiết etyl axetat của mẫu *Đỗ trọng* *Eucommia ulmoides* Oliver thu hái tại Hà Giang, bằng các phương pháp sắc ký kết hợp chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của 3 hợp chất iridoid là genipin (1), geniposide (2), axit geniposidic (3) và 1 hợp chất lignan pinoresinol (4). Các hợp chất

này thuộc hai lớp chất chính có trong *Đỗ trọng*, đóng vai trò quan trọng trong tác dụng hạ huyết áp, chống tiểu đường. Các kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của mẫu *Đỗ trọng* từ dịch *n-hexan*, dịch nước sẽ được chúng tôi công bố trong các bài báo tiếp theo.

Lời cảm ơn. Công trình nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam "Xác định thành phần hóa học của một số cây thuốc tại Hà Giang làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng vùng được liệu tinh", mã số VAST.UDCN.05/14-16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. He X., Wang J., Li M., Hao D., Yang Y., Zhang C., He R., Tao R., *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine., *J. Ethnopharmacol.*, 151(1): 78-92 (2014).
2. Deyama T., Nishibe S., Nakazawa Y., *Constituents and pharmacological effects of Eucommia and Siberian ginseng*, *Acta Pharmacol Sin.*, 22 (12), 1057-1070 (2001).
3. Paik Y.-S., Lee C.-M., Cho M.-H., Hahn T.-R., *Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of pH, temperature, and light*, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (1): 430-432 (2001).
4. El Bitar H., Nguyen V. H., Gramain A., Sevenet T., Bodo B. *Daphnicalyosinoidines A and B, new iridoid-alkaloids from Daphniphyllum calycinum*, *Tetrahedron Lett.*, 45 (3), 515 - 518 (2004).
5. Carpinella M., Giorda L., Ferrayoli C. G, Palacios S. M., *Antifungal effects of different organic extracts from melia azedarach L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components*, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2506-2511 (2003).

Liên hệ:

Nguyễn Văn Hùng

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nhà B1, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: nguyen-van.hung@usth.edu.vn, hungnvd8@yahoo.com

Điện thoại: 01236460999.