

Một số hợp chất phân lập từ rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) trồng ở huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai

Nguyễn Hữu Tùng¹, Nguyễn Thanh Hải¹, Vũ Đức Lợi¹
Bùi Thanh Tùng¹, Nguyễn Tiến Dũng², Bùi Hồng Cường³

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Pháp y Quốc gia

³Trường Đại học Dược Hà Nội

E-mail: dacloi82@gmail.com

Summary

From the ethanol extracts of the roots of *Salvia miltiorrhiza* (Bunge) collected in Lao Cai province (North Vietnam), 3 compounds (1-3) were isolated by chromatographic methods; and identified by IR, MS and NMR as: dihydrotanshinone I (1), methyl dihydrotanshinolate (2), trijuganone B (3). The compound 2 was isolated from the roots of *S. miltiorrhiza* Bunge for the first time.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, dihydrotanshinone I, methyl dihydrotanshinolate, trijuganone B.

Đặt vấn đề

Cây đan sâm là một dược liệu quý được sử dụng nhiều trong Y học cổ truyền. Từ xưa, các thầy thuốc Đông y đã lưu truyền câu ngạn ngữ “Nhất vị đan sâm, công đồng Tử vật thang”, nghĩa là chỉ một vị thuốc đan sâm cũng có tác dụng ngang với cả bài thuốc Tử vật (gồm 4 vị thực địa, đương quy, bạch thược, xuyên khung, là bài thuốc “bổ huyết hoạt huyết” kinh điển của Đông y). Nghiên cứu y học hiện đại cho thấy đan sâm đặc biệt tốt cho tim mạch, làm giãn mạch và tăng lưu lượng động mạch vành, cải thiện vi tuần hoàn, phòng chống tích cực tình trạng thiếu máu, làm chậm việc hình thành mảng xơ vữa động mạch¹⁾.

Ở Việt Nam, đan sâm đã được di thực từ những năm 1960 từ Trung Quốc, cây được nhập trồng ở các trại thuốc Sa Pa, Tam Đảo và Hà Nội. Tuy nhiên sau một thời gian dài cây không được quan tâm nhiều nên không phát triển trồng rộng, do đó, dược liệu đan sâm được sử dụng trong nước đều phải nhập từ Trung Quốc. Theo các chuyên gia về dược học cổ truyền nhận định, dược liệu đan sâm sử dụng hiện nay ở nước ta có nguồn gốc không rõ ràng, chất lượng không ổn định, thậm chí một số đã bị chiết xuất hoạt chất. Vì vậy, thời gian gần đây, cây đan sâm đang được quan tâm và khôi phục lại việc trồng và phát triển ở một số vùng dược liệu trong nước. Nhóm nghiên cứu tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định một số thành phần hóa học chính từ rễ cây đan sâm trồng ở huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai nhằm góp phần cung cấp dữ liệu

về cây đan sâm, đồng thời làm sáng tỏ công dụng của cây đan sâm.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu cây đan sâm được thu hái vào tháng 10 năm 2014 tại huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai, sau một năm trồng. Mẫu thực vật đã được Viện Dược liệu giám định tên khoa học là: *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

Hóa chất, thiết bị

- **Sắc ký lớp mỏng:** sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60 F₂₅₄ Merck, độ dày 0,2 mm. Sau khi triển khai sắc ký, bản mỏng được kiểm tra bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254, 365 nm sau đó hiện màu bằng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% trong ethanol.

- **Sắc ký cột:** sắc ký cột sử dụng silicagel cỡ hạt 0,063-0,200 mm (Merck) và 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 tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Nhiệt độ nóng chảy đo trên máy SMP10 BioCote.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Góc quay cực riêng đo trên máy PLR-4, MRC scientific instruments.

Phương pháp chiết xuất và phân lập

Mẫu rễ đan sâm (1,0 kg) sau khi rửa sạch, phơi khô, thái nhỏ được ngâm chiết kỹ bằng dung môi ethanol 80% (3 lần, mỗi lần 3 L), sử dụng thiết bị chiết siêu âm ở 40°C trong vòng 5 giờ. Lọc các dịch chiết ethanol thu được qua giấy lọc, gộp dịch lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được 245 g cao chiết tổng ethanol.

Lấy 100 g cao chiết phân tán trong nước cất (700 ml) và chiết phân bố bằng n-hexan và ethyl acetat (mỗi dung môi 3 lần, mỗi lần 700 ml). Các phân đoạn n-hexan, ethyl acetat được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được các phân đoạn tương ứng n-hexan (5,2 g) và ethyl acetat (33,8 g).

Tiến hành phân lập cần chiết ETOAc (33,0 g) trên cột sắc ký silicagel (Φ 85 mm × 90 mm) rửa giải với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần bao gồm n-hexan ETOAc (5:1 → 1:1, v/v, mỗi phân đoạn 600 mL) và tiếp sau là CHCl₃ - MeOH (10:1 → 1:1, v/v, mỗi phân đoạn 500 mL) thu được 7 phân đoạn ký hiệu là F1~F7.

Từ phân đoạn F5 (8,3 g), chạy sắc ký cột silicagel (Φ 45 mm × 350 mm) với hệ pha động CHCl₃ - MeOH (15:1, v/v, 2,5 L) thu được 6 phân đoạn nhỏ hơn là F5.1~F5.6. Tinh chế phân đoạn nhỏ F5.1 (250 mg) bằng sắc ký cột pha đảo YMC C-18 sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH- H₂O (3:1, v/v, 1,5 L) thu được 3 hợp chất sạch là hợp chất 1 (21 mg), hợp chất 2 (13 mg) và một phân đoạn nhỏ F5.1.4 (38 mg). Phân đoạn F5.1.4 được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế (pTLC) pha thường silicagel sử dụng pha động là n-hexan- ethyl acetat (3:1, v/v) thu được hợp chất 3 (9 mg).

Kết quả và bàn luận

Kết quả phân lập và phân tích cấu trúc các chất

Hợp chất 1

Chất bột màu đỏ.

Nhiệt độ nóng chảy: **Mp** = 224-225°C.

Phổ khối (**ESI- MS**): *m/z* = 279.

Phổ **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) và **¹³C-NMR** (100 Hz, CD₃OD): xem bảng 1.

Bảng 1: Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất 1 và dihydrotanshinon I [2,3]

Vị trí	δ_H (số H, độ bội, J = Hz)		δ_C	
	Hợp chất 1	Dihydrotanshinon I ^[2]	Hợp chất 1	Dihydro tanshinon I ^[3]
1	9,31 (1H, d, J = 8,4)	9,32 (d, J = 8,8)	125,1	125,08
2	7,59 (1H, dd, J = 9,2)	7,57 (dd, J = 8,8 và 6,9)	130,5	130,36
3	7,41 (1H, d, J = 6,8)	7,41 (d, J = 6,9)	128,3	128,85
4			135,0	134,98
5			134,8	132,16
6	8,32 (1H, d, J = 8,4)	8,32 (d, J = 8,6)	132,2	131,82
7	7,77 (1H, d, J = 8,4)	7,79 (d, J = 8,6)	118,4	120,31
8			128,9	128,27
9			126,2	126,15
10			132,0	134,79
11			184,3	184,26
12			175,8	175,72
13			120,4	118,41
14			170,6	170,45
15	3,67 (1H, m)	3,66 (m)	34,8	34,83
16	16a: 4,98 (1H, t, J=9,6); 16b: 4,44 (1H, dd, J = 9,6 và 6,4)	4,44 (dd, J = 9,4 và 6,3, H ₉); 4,97 (t, J = 9,4)	81,7	81,68
17	1,42 (3H, d, J = 6,8)	1,42 (d, J = 6,8)	18,9	18,80
18	2,71 (3H, s)	2,70 (s)	29,7	19,80

Đơn vị của δ_H và δ_C là ppm; J là hằng số tương tác spin- spin giữa các proton và có đơn vị là Hz

Hợp chất 2

Chất bột màu da cam.

Góc quay cực riêng: $[\alpha]_D^{25} - 42^\circ$ (c 0,3, CHCl₃).

Phổ khối **HR- ESI- MS**: *m/z* = 341,11396 [M + H]⁺ (tính toán lý thuyết cho C₂₀H₂₁O₅, 341,1389).

Phổ **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) và **¹³C-NMR** (100 Hz, CD₃OD): xem bảng 2.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Bảng 2: Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất 2 và cryptotanshinon[®]

Vị trí	δ_H (số H; độ bội; J = Hz)		δ_C	
	Hợp chất 2	Cryptotanshinon [®]	Hợp chất 2	Cryptotanshinon [®]
1	1a: 3,40 (1H, m); 1b: 3,13 (1H, m)	3,19 (2H, dd, J = 12,8 và 12,8)	27,9	29,7
2	2a: 1,76 (1H, m); 2b: 1,68 (1H, m)	1,79 (2H, m)	20,1	19,0
3	3a: 2,16 (1H, m); 3b: 1,74 (1H, m)	1,65 (2H, m)	35,3	37,8
4			48,6	34,8
5			146,8	152,3
6	7,51 (1H, d, J = 8,0)	7,63 (1H, d, J = 8,1)	136,7	132,5
7	7,48 (1H, d, J = 7,6)	7,47	123,8	122,5
8			129,5	126,2
9			128,6	128,4
10			144,7	143,7
11			185,1	184,6
12			178,4	175,7
13			119,8	118,3
14			173,1	170,7
15	3,49 (1H, dd, J = 9,6 và 6,4)	3,59 (1H, m)	35,8	34,6
16	16a: 4,89 (1H, J = 9,6); 16b: 4,36 (1H, dd, J = 9,2 và 6,4)	4,90 (1H, dd, J = 9,3 và 9,5) 4,37 (3H, d, J = 9,3 và 6,1)	83,2	81,4
17	1,25 (3H, d, J = 6,8)	1,37 (3H, d, J = 7,1)	18,7	18,8
18	1,50 (3H, s)	1,31 (3H, s)	30,0	31,9
19		1,31 (3H, s)	176,8	31,9
-OCH ₃	3,57 (3H, s)		52,9	

Đơn vị của δ_H và δ_C là ppm; J là hằng số tương tác spin-spin giữa các proton và có đơn vị là Hz

Hợp chất 3

Chất bột màu đỏ.

Nhiệt độ nóng chảy: **Mp** = 142°C

Góc quay cực riêng: $[\alpha]_D^{25}$ = 68°(c 0,8, CHCl₃).

Phổ khối **ESI-MS**: m/z = 281.

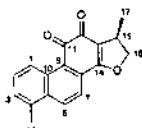
Phổ **UV** (MeOH) λ_{max} : 225, 288, 465 nm.

Phổ **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) và **¹³C-NMR** (100 Hz, CD₃OD): xem bảng 3.

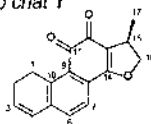
Bảng 3: Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất 3 và trjunganon B[®]

Vị trí	δ_H (số H, độ bội, J = Hz)		δ_C	
	Hợp chất 3	Trjunganon B [®]	Hợp chất 3	Trjunganon B [®]
1	1a: 3,38 (1H, m); 1b: 2,72 (1H, m)	3,36 (2H, t, J = 7,8)	24,7	24,6
2	2,25 (1H, m)	2,25 (2H, m)	22,5	22,5
3	6,10 (1H, m)	6,10 (m)	123,3	123,2
4			140,9	140,8
5			118,7	118,7
6	7,42 (1H, d, J = 7,6)	7,42 (1H, d, J = 7,8)	129,8	129,7
7	7,53 (1H, d, J = 7,6)	7,51 (1H, d, J = 7,8)	128,0	127,2
8			131,1	131,0
9			127,3	126,1
10			143,5	143,4
11			184,9	184,7
12			176,2	176,0
13			111,2	111,2
14			170,7	170,6
15	3,62 (1H, m)	3,62 (1H, m)	34,7	34,6
16	16a: 4,91 (1H, t, J = 9,2); 16b: 4,38 (1H, m)	16a: 4,90 (1H, t, J = 9,5) 16b: 4,37 (1H, dd, J = 6 và 9,5)	81,5	81,4
17	1,38 (3H, d, J = 6,4)	1,37 (3H, d, J = 7,0)	19,8	19,7
18	2,07 (3H, brs)	2,07 (3H, d, J = 1,8)	18,8	18,5

Đơn vị của δ_H và δ_C là ppm; J là hằng số tương tác spin-spin giữa các proton và có đơn vị là Hz



Cấu trúc hóa học của hợp chất 1



Cấu trúc hóa học của hợp chất 3

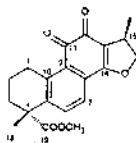
Bàn luận và xác định hợp chất

Hợp chất 1: Dạng bột màu đỏ. Phổ ¹H-NMR của 1 có dạng đặc trưng của một hợp chất diterpen khung abietan tanshinon. Trong đó, 05 tín hiệu proton olefin và 02 proton của nhóm oxymethylen được xác định lần lượt bởi các tín hiệu cộng hưởng tại δ 9,31 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-1), 8,32 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-6), 7,77 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-7), 7,59 (1H, dd, J = 9,2, 6,8 Hz, H-2), 7,41 (1H, d, J = 6,8 Hz, H-3), 4,98 (1H, t, J = 9,6 Hz, H-16a) và 4,44 (1H, dd, J = 9,6, 6,4 Hz, H-16b). Các tín hiệu cộng hưởng tại δ 2,71 (3H, s, H-18) và 1,42 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-17) khẳng định sự tồn tại của 1 nhóm methyl bậc 3 và 1 nhóm vinyl methyl.

Phổ ¹³C-NMR của 1 xuất hiện các tín hiệu của 18 carbon. Trong đó, một nhóm oxymethylen và 2 nhóm oxo (C=O) được khẳng định bởi các tín hiệu cộng hưởng tại δ 81,7 (C-16), 184,3 (C-11) và 175,8 (C-12). Bên cạnh đó, trên phổ ¹³C-NMR chỉ ra 12 tín hiệu cộng hưởng của các olefin carbon và đặc biệt 2 nhóm methyl được đặc trưng bởi tín hiệu cộng hưởng tại δ 18,9 (C-17) và 29,7 (C-18). Phổ khối lượng **ESI-MS** của 1 xuất hiện tín hiệu tại m/z 279 phù hợp với ion phân tử [M+H]⁺ của C₂₀H₂₄O₃ (M = 278).

Từ tất cả các phân tích nêu trên, cùng với sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ **NMR** của 1 so với các số liệu tương ứng đã được công bố [2,4] cho phép xác định cấu trúc hóa học của 1 là dihydrotanshinon I.

Hợp chất 2: Dạng chất bột màu da cam, có giá trị quay cực riêng [α]_D²⁰ = 42° (c 0,3, CHCl₃). Công thức phân tử của nó được xác định là C₂₀H₂₀O₅ (M = 340) bằng phổ khối lượng phân giải cao (**HR-ESI-MS** tại m/z 341,11396 [M + H]⁺), tính toán lý thuyết cho C₂₀H₂₀O₅, 341,1389). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của chất 2 có dạng tương tự như của chất 1. Điều này cho thấy hai hợp chất có cấu trúc tương tự, cùng nhóm diterpen tanshinon. Phân tích cụ thể thấy rằng sự khác biệt thuộc vòng A với sự xuất hiện các tín hiệu của 3 nhóm methylen (CH₂) và một carbon bậc 4 tương ứng với các tín hiệu



Cấu trúc hóa học của hợp chất 2

cộng hưởng trên ¹³C-NMR và **DEPT** là δ 27,9 (C-1), 20,1 (C-2), 35,3 (C-3) và 48,6 (C-4) và các tín hiệu của 6 proton có độ dịch chuyển hóa học δ 1,6-3,4 ở chất 2 thay vì các tín hiệu của nối đôi ở chất 1. Thêm nữa là sự xuất hiện một tín hiệu carbon ở δ 176,8 (C-19) đặc trưng cho nhóm carbonyl ester (COOR) và tín hiệu của nhóm methoxy (-OCH₃) qua tín hiệu δ_C 52,9 và δ_H 3,57 gợi ý sự có mặt 1 nhóm COOCH₃ trong chất 2.

Mặt khác, Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của chất 2 có dạng tương tự như của chất 1. Điều này cho thấy hai hợp chất có cấu trúc tương tự. Phân tích cho thấy chỉ có sự khác biệt đáng kể ở tín hiệu carbon ở δ 176,8 (C-19) so với cryptotanshinon là δ 31,9 (C-19) và tín hiệu carbon ở δ 48,6 (C-4) so với cryptotanshinon là δ 34,8 (C-4). Nguyên nhân là do nhóm -CH₃ ở vị trí C₁₉ của cryptotanshinon đã được thay thế bởi nhóm -COOCH₃ ở hợp chất này. Và cũng do đó mà hợp chất 2 có sự xuất hiện của tín hiệu δ_C 52,9 và δ_H 3,57 ở vị trí nhóm -OCH₃.

Tất cả các số liệu độ dịch chuyển hóa học của carbon được gán với các số liệu proton tương ứng thông qua phổ 2 chiều **HMQC**. Phân tích chi tiết phổ **NMR 2** chiều **H-H COSY** và **HMBC** cho phép khẳng định vị trí, cấu trúc từng phần cũng như toàn phần và đặc biệt vị trí của nhóm ester COOCH₃ gắn vào C-4.

Qua phân tích và so sánh dữ liệu phổ nêu trên, hợp chất 2 được xác định là methyl dihydrotanshinon. Đây là hợp chất lần đầu tiên được phân lập được từ thiên nhiên.

Hợp chất 3: Dạng chất bột màu đỏ, có giá trị quay cực riêng [α]_D²⁰ = 68° (c 0,8, CHCl₃). Tương tự chất 1 và 2, phổ **NMR** của 3 mang đặc trưng của một diterpen tanshinon với 2 tín hiệu cộng hưởng carbonyl tại δ_C 184,9 (C-11) và 176,2 (C-12) và 2 nhóm methyl δ_C 19,8 (C-17)/δ_H 1,38 (3H, d, J = 6,4 Hz, H-17) và δ_C 18,8 (C-18)/δ_H 2,07 (3H, br s, H-18). Phân tích cụ thể hơn phổ **NMR** thấy sự khác biệt của 3 so với 2 là ở vòng A với sự xuất hiện của duy nhất 1 nối đôi ở vị trí C-3/C-4

phù hợp với tín hiệu methyl vinyl ở δ 2,07 (3H, br s). Phổ khối **ESI-MS** của **3** thể hiện ion phân tử tại m/z 281 $[M + H]^+$ phù hợp với công thức $C_{12}H_{15}O_3$ ($M = 280$). Trên cơ sở các phân tích trên và sự phù hợp về số liệu đã công bố^[6, 7] cho phép xác định chất **3** là trijuganon B.

Kết luận

Đã sử dụng phương pháp ngâm chiết với dung môi EtOH 80% và bằng phương pháp sắc ký cột phân lập được 3 hợp chất từ rễ cây đan sâm trồng ở huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được thông qua kết quả đo nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, phổ tử ngoại- khả kiến, phổ khối, phổ cộng hưởng hạt nhân và so sánh với các dữ liệu công bố của các hợp chất liên qua đã xác định được cấu trúc 3 hợp chất phân lập đó là: dihydrotanshinon I, methyl dihydrotanshinon, trijuganon B. Trong đó hợp chất methyl dihydrotanshinon lần đầu tiên phân lập được từ thiên nhiên.

Lời cảm ơn: Đề tài được tài trợ bởi Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Bắc, Đại học QGHN, mã số đề tài: KHCN-TB.05C/13-18.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội, pp. 818-820.
2. Dai Hui, Xiao Chaoni, Liu Hongbing, Tang Huiru

(Ngày nhận bài: 08/01/2016 - Ngày duyệt đăng: 04/04/2016)

Tổng hợp và thử hoạt tính gây độc tế bào của 5-(4'-bromobenzyliden)hydantoin và dẫn chất base Mannich

Vũ Trần Anh*, Nguyễn Tiến Hiệp

Bộ môn Hóa hữu cơ - Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail: anhchly@gmail.com

Summary

A new series of 5-benzylidenhydantoin derivatives were synthesized. The compound 5-(4'-bromobenzyliden)hydantoin (**1**) was obtained from 4-bromobenzaldehyde and hydantoin. The 5-(4'-bromobenzyliden)hydantoin (**1**) underwent Mannich reaction to give 6 Mannich base derivatives (**2-7**). The structures of the synthesized compounds were confirmed by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS. The cytotoxic effect of the obtained hydantoin derivatives was evaluated on human hepatocellular carcinoma cell (Hep-G2), breast adenocarcinoma cell line (MCF-7) and prostate cancer cell (PC3). 5 compounds (**1-5**) showed significant anti-proliferative activities against Hep-G2 (IC₅₀ = 1.59-4.54 μ g/ml). Meanwhile, no cytotoxicity was observed on other two cancer cell lines.

Keywords: Hydantoin, 5-(4'-bromobenzyliden)hydantoin, Mannich bases, cytotoxicity.