

Các triterpenoid phân lập từ thân cây giác mộc Bắc Bộ (*Cornus hongkongensis* subsp. *tonkinensis*, họ Cornaceae)

Ngô Thị Thúy¹, Nguyễn Thị Thu², Hoàng Việt Dũng¹

Vũ Thành Duy², Nguyễn Thế Hùng^{3,4}, Đỗ Thị Hà^{2*}

¹ Học viện Quân Y

² Viện Dược liệu

³ Trường Đại học Dược Hà Nội

⁴ Vụ KH và CN các ngành kinh tế kỹ thuật - Bộ Khoa học & Công nghệ

Summary

Five triterpenes (**CH1-CH5**) were isolated from the ethyl acetate extract of *Cornus hongkongensis* subsp. *tonkinensis* (W.P.Fang) Q.Y.Xiang (Cornaceae) collected in Sapa, Lao Cai, including calenduladiol (**CH1**), pseudotaraxasterol (**CH2**), betulin (**CH3**), maniladiol (**CH4**), and 18 α -oleanan-3 β ,19 α -diol (**CH5**). Their structures were elucidated by analyzing extensive NMR and MS, comparing with reported literature data. This is the first report on the presence of all isolates in this plant.

Keywords: *Cornus hongkongensis* subsp. *tonkinensis*, calenduladiol, pseudotaraxasterol, betulin, maniladiol, 18 α -oleanan-3 β ,19 α -diol.

Đặt vấn đề

Chi *Cornus* là một chi thực vật khá rộng với khoảng 50 loài, phân bố từ Châu Âu đến Đông Nam Á ... [1]. Ở Châu Âu, tất cả các bộ phận của loài *Cornus mas* đều được sử dụng trong điều trị các bệnh khác nhau như tiêu chảy, viêm ruột, bệnh tả, sốt rét, sỏi thận, chảy máu ... [2]. Trong y học cổ truyền Trung Quốc, *Cornus officinalis* là một vị thuốc dùng để bổ gan thận, là thành phần chính của hơn 20 đơn thuốc được mô tả trong Dược điển Trung Quốc [3]. Rất nhiều loài khác thuộc chi này cũng đã được nghiên cứu về thành phần hóa học và có nhiều hoạt tính sinh học nổi bật.

Giác mộc Bắc Bộ (Giác mộc Hồng Kông, *Cornus hongkongensis* subsp. *tonkinensis*) là loài thực vật thuộc chi *Cornus*, mọc ở các vùng núi cao Ba Vì, Quảng Ninh, Sa Pa ... [4]. Hiện nay, loài này vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài.

Bài báo này trình bày quy trình phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất triterpen phân lập từ cao ethyl acetat của thân cây giác mộc Bắc Bộ.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là thân cây giác mộc Bắc Bộ được thu hái vào tháng 10 năm 2019 tại đèo Ô Quy Hồ, thị xã Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Dược liệu sau khi thu hái được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô và bảo quản trong túi nilon để nơi khô ráo. Mẫu tiêu bản (HNU-Nth01 và DL-031019) bao gồm thân, lá và hoa được ép tiêu bản và được giám định tên khoa học bởi GS.TS.

Phan Kế Lộc - Bảo tàng Thực vật, Khoa Sinh, Đại học Khoa học Tự nhiên và ThS. Nguyễn Văn Hiếu - Khoa Tài nguyên, Viện Dược với tên khoa học là *Cornus hongkongensis* subsp. *tonkinensis* (W. P. Fang) Q. Y. Xiang, họ Sơn thù (Cornaceae). Mẫu nghiên cứu được lưu tại Bảo tàng Thực vật - Khoa Sinh, Đại học Khoa học Tự nhiên; Khoa Hóa Thực vật và Khoa Tài nguyên - Viện Dược liệu.

Phương tiện nghiên cứu

Hóa chất, dung môi: Các dung môi dùng trong chiết xuất và phân lập là các dung môi công nghiệp được cất lại trước khi dùng như: Ethanol (EtOH), *n*-hexan, ethyl acetat (EtOAc), methanol (MeOH), dichloromethan (DCM), aceton (Ace) và *n*-butanol (BuOH). Dung dịch H₂SO₄ 10% trong EtOH 96%.

Thiết bị: Các loại cột sắc ký; đèn tử ngoại; sắc ký lớp mỏng DC-Alufolien 60G F₂₅₄ (Merck) (silica gel, 0,25 mm) và bản mỏng pha đảo RP-18 F₂₅₄ (Merck, 0,25 mm); silica gel pha thường (0,040 - 0,063 mm, Merck); máy đo phổ khối lượng Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) của Khoa Độc học và Dị nguyên, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia; máy đo phổ cộng hưởng hạt nhân (NMR): Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer (Billerica, Massachusetts, Hoa Kỳ) của Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Dược liệu được chiết nóng bằng EtOH 80% sau đó chiết phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần (*n*-hexan, EtOAc và BuOH). Phân lập

các hợp chất bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường và pha đảo. Theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng pha thường và pha đảo. Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại hoặc dùng thuốc thử, sấy khô rồi hơ nóng đến khi hiện màu. Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được dựa trên các tính chất lý hóa (cảm quan, nhiệt độ nóng chảy) và các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối và kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo.

Kết quả nghiên cứu

Chiết xuất và phân lập

Dược liệu thân cây giác mộc Bắc Bộ (1,8 kg) được chiết nóng bằng dung môi EtOH 80% 3 lần, mỗi lần 3 giờ ở 80°C với tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/8 (kg/l). Lọc loại bã dược liệu, gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 248,28 g cao tổng EtOH 80%. Phân tán cao tổng (240,0 g) trong nước và chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, EtOAc và BuOH. Gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao tương ứng là *n*-hexan (15,88 g), EtOAc (30,63 g), BuOH (60,43 g) và cặn nước (135,06 g).

Phân tách cao EtOAc (29,0 g) bằng sắc ký cột silica gel với dung môi rửa giải 100% DCM, DCM-MeOH (9:1, v/v) và 100% MeOH thu được 10 phân đoạn (1A-1K). Phân đoạn 1G (2,0 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl acetat (8:2, 7:3, v/v) và hệ DCM-MeOH (9:1, v/v) thu được 8 phân đoạn (2A - 2H) và hợp chất **CH1** (22,0 mg). Phân tách phân đoạn CK-1C (230,0 mg) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan-aceton (9:1, v/v) thu được 2 phân đoạn (3A - 3B). Phân đoạn 3A (165,0 mg) được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-C₁₈ với hệ dung môi rửa giải là aceton-nước (9:1, v/v) thu được hợp chất **CH2** (50,0 mg). Phân đoạn 2F (616,0 mg) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl acetat (7:3, v/v) thu được 3 phân đoạn (6A - 6C). Phân lập phân đoạn 6A và 2D (271 mg) bằng sắc ký cột pha đảo RP-C₁₈ với hệ dung môi rửa giải là aceton-nước (8:2, v/v) thu được 3 hợp chất **CH3** (10,0 mg), **CH4** (70,0 mg) và **CH5** (8,0 mg).

Dữ liệu phổ của các chất

Hợp chất **CH1**: Dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 3,18 (1H, dd, *J* = 11,5; 5,0 Hz, H-3), 3,60 (1H, dd, *J* = 11,0; 5,0 Hz, H-16); 0,97 (3H, s, H-23), 0,76 (3H, s, H-24), 0,83 (3H, s, H-25), 1,04 (3H, s, H-26), 0,99 (3H, s, H-27), 0,80 (3H, s, H-28), 4,71 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-29), 4,59 (1H, dd, *J* = 2,5;

1,0 Hz, H-29), 1,68 (3H, s, H-30). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 1. Phổ **ESI-MS**: *m/z* = 425,6 [M-H₂O+H]⁺.

Hợp chất **CH2**: Dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 3,21 (1H, m, H-3), 5,26 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-21), 0,98 (3H, s, H-23), 0,77 (3H, s, H-24), 0,86 (3H, s, H-25), 1,05 (3H, s, H-26), 0,95 (3H, s, H-27), 0,74 (3H, s, H-28), 0,99 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H-29), 1,63 (3H, s, H-30). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 1. Phổ **ESI-MS**: *m/z* = 409,5 [M-H₂O+H]⁺.

Hợp chất **CH3**: Dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 3,18 (1H, dd, *J* = 11,5; 5,0 Hz, H-3), 0,97 (3H, s, H-23), 0,76 (3H, s, H-24), 0,83 (3H, s, H-25), 0,98 (3H, s, H-26), 1,03 (3H, s, H-27), 3,80 (1H, dd, *J* = 11,0; 2,0 Hz, H-28), 3,33 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-28), 4,68 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-29), 4,58 (1H, dd, *J* = 2,0; 1,5 Hz, H-29), 1,68 (3H, s, H-30). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 1. Phổ **ESI-MS**: *m/z* = 425,4 [M-H₂O+H]⁺.

Hợp chất **CH4**: Dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 3,22 (1H, dd, *J* = 11,5; 4,5 Hz, H-3), 5,25 (1H, t, *J* = 3,5 Hz, H-12), 4,19 (1H, dd, *J* = 11,5; 5,0 Hz, H-16), 1,00 (3H, s, H-23), 0,79 (3H, s, H-24), 0,94 (3H, s, H-25), 0,99 (3H, s, H-26), 1,22 (3H, s, H-27), 0,80 (3H, s, H-28), 0,89 (3H, s, H-29), 0,91 (3H, s, H-30). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 1. Phổ **ESI-MS**: *m/z* = 425,6 [M-H₂O+H]⁺.

Hợp chất **CH5**: Dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 3,20 (1H, dd, *J* = 11,5; 4,5 Hz, H-3), 3,29 (1H, d, *J* = 10,5 Hz, H-19), 0,97 (3H, s, H-23), 0,76 (3H, s, H-24), 0,84 (3H, s, H-25), 1,05 (3H, s, H-26), 0,96 (3H, s, H-27), 0,85 (3H, s, H-28), 0,98 (3H, s, H-29), 0,89 (3H, s, H-30). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Bảng 1. Phổ **ESI-MS**: *m/z* = 427,3 [M-H₂O+H]⁺.

Bảng 1. Dữ liệu phổ ¹³C-NMR của hợp các hợp chất **CH1-CH5**

Vị trí C	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5
1	38,9	38,8	38,9	38,6	38,7
2	27,4	27,4	27,4	27,2	27,4
3	79,0	79,0	79,0	79,0	79,1
4	38,8	38,9	38,8	38,8	38,9
5	55,4	55,3	55,4	55,2	55,2
6	18,3	18,3	18,3	18,4	18,4
7	34,3	34,3	34,3	32,7	34,2
8	41,0	41,1	41,0	39,9	41,2

9	50,1	50,5	50,5	46,9	49,8
10	37,2	37,1	37,4	37,4	37,0
11	20,9	21,6	20,9	23,6	21,4
12	24,8	27,7	25,3	122,3	28,2
13	37,3	39,3	37,2	143,6	38,0
14	44,1	42,4	42,8	43,8	42,9
15	37,0	27,1	27,1	35,6	26,6
16	77,1	36,7	29,2	66,0	38,3
17	48,6	34,4	47,8	36,9	36,7
18	47,8	48,8	47,8	49,1	46,0
19	47,6	36,3	48,8	46,6	78,2
20	150,0	139,9	150,5	30,9	37,5
21	30,0	118,9	29,8	34,2	34,9
22	37,7	42,2	34,0	30,6	37,9
23	28,0	28,0	28,0	28,1	28,0
24	15,4	15,4	15,4	15,6	15,4
25	16,2	16,3	16,1	15,5	16,1
26	16,0	16,1	16,0	16,9	16,0
27	16,1	14,7	14,8	27,1	14,6
28	11,7	17,7	60,6	21,5	18,2
29	109,8	22,5	109,7	33,3	30,1
30	19,4	21,6	19,1	24,0	19,9

Bàn luận

Hợp chất CH1

Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy tín hiệu của 1 nối đôi tại δ_{H} 4,71 (1H, d, $J = 2,5$ Hz) và 4,59 (1H, dd, $J = 1,0$; 2,5 Hz); 2 nhóm hydroxymethin tại δ_{H} 3,60 (1H, dd, $J = 5,0$; 11,0 Hz) và 3,18 (1H, dd, $J = 5,0$; 11,5 Hz); 7 nhóm methyl tại δ_{H} 1,68 (3H, s), 1,04 (3H, s), 0,99 (3H, s), 0,97 (3H, s), 0,83 (3H, s), 0,80 (3H, s) và 0,76 (3H, s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và **DEPT** xuất hiện tín hiệu của 30 carbon trong đó có 2 carbon của nối đôi tại δ_{C} 150,0 và 109,8; 2 carbon hydroxymethin tại δ_{C} 79,0 và 77,1; 7 carbon methin tại δ_{C} 28,0; 19,4; 16,2; 16,1; 16,0; 15,4 và 11,7; 9 carbon methylen; 5 carbon methin và 5 carbon bậc 4. Phổ **ESI-MS** xuất hiện pic ion giả phân tử tại $m/z = 425,6$ $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($M = 442,4$). Từ những dữ liệu trên, so sánh với tài liệu tham khảo [5], có thể kết luận **CH1** là calenduladiol (hình 1).

Hợp chất CH2

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **CH2** cũng cho thấy hợp chất này là một triterpen pentacyclic với 30 carbon trong

đó có 27 carbon nằm trong vùng trường cao từ 14,7 - 55,3 ppm. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy tín hiệu của 1 proton olefinic tại δ_{H} 5,26 (1H, d, $J = 7,0$ Hz); 1 proton hydroxymethin tại δ_{H} 3,21 (1H, m); 7 nhóm methin singlet tại δ_{H} 1,63; 1,05; 0,98; 0,95; 0,86; 0,77; 0,74; và 1 nhóm methyl doublet tại δ_{H} 0,99 (3H, d, $J = 6,5$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và **DEPT** cũng cho thấy sự xuất hiện của 2 carbon olefin tại δ_{C} 139,9 và 118,9; 1 carbon hydroxymethin tại δ_{C} 79,0; 8 carbon methin tại δ_{C} 28,0; 22,5; 21,6; 17,7; 16,3; 16,1; 15,4 và 14,7; 9 carbon methylen; 5 carbon methin và 5 carbon bậc 4. Phổ **ESI-MS** xuất hiện pic ion giả phân tử tại $m/z = 409,5$ $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ($M = 426,4$). Các dữ liệu phổ trên kết hợp so sánh tài liệu [6], có thể khẳng định **CH2** là pseudotaraxasterol (hình 1).

Hợp chất CH3

Tương tự như hợp chất **CH1** và **CH2**, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **CH3** cũng cho thấy đây là 1 hợp chất triterpen pentacyclic. So sánh dữ liệu phổ của **CH3** và **CH1** cho thấy có điểm tương đồng. Tuy nhiên, **CH3** xuất hiện các tín hiệu của nhóm hydroxymethylen tại δ_{H} 3,80 (1H, dd, $J = 11,0$; 2,0 Hz), 3,33 (1H, d, $J = 11,0$ Hz) và δ_{C} 60,6 thay vì nhóm hydroxymethin như trong cấu trúc của **CH1**. Ngoài ra, **CH3** chỉ xuất hiện 6 tín hiệu của nhóm methyl và thêm 1 nhóm methylen. Điều đó cho thấy, 1 nhóm methyl đã bị hydroxyl hóa. Phổ **ESI-MS** xuất hiện pic ion giả phân tử tại $m/z = 425,4$ $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($M = 442,4$). So sánh các dữ liệu phổ trên kết hợp với tài liệu [7], có thể khẳng định **CH3** là betulin (hình 1).

Hợp chất CH4

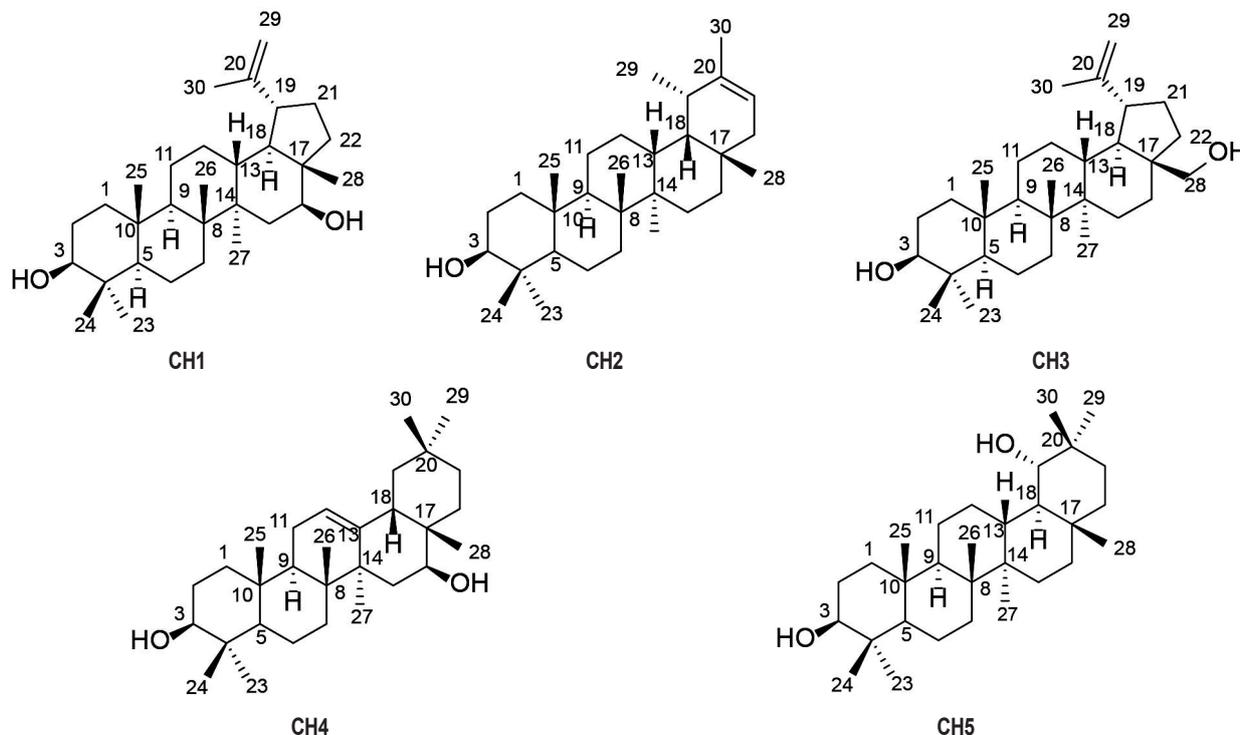
Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy, **CH4** cũng có cấu trúc của khung triterpen pentacyclic và có sự tương đồng với hợp chất **CH2**. Tuy nhiên, 8 tín hiệu methyl của **CH2** đều ở dạng singlet, điều đó cho thấy vị trí của nối đôi, hay nhóm 29- CH_3 đã thay đổi. Ngoài ra, **CH2** còn xuất hiện thêm tín hiệu của nhóm hydroxymethin tại δ_{H} 4,19 (1H, dd, $J = 11,5$; 5,0 Hz) và δ_{C} 66,0. Phổ **ESI-MS** xuất hiện pic ion giả phân tử tại $m/z = 425,6$ $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($M = 442,4$). Từ các dữ liệu phổ trên kết hợp với tài liệu [8], có thể khẳng định **CH4** là maniladiol (hình 1).

Hợp chất CH5

Tương tự như hợp chất **CH4**, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **CH5** cũng cho thấy đây là 1 hợp chất triterpen pentacyclic. So sánh dữ liệu phổ của **CH4** và **CH5** cho thấy có sự tương đồng. Tuy nhiên, **CH5** không xuất hiện các tín hiệu của nối đôi như trong cấu trúc của **CH4**. Ngoài ra, tín hiệu của nhóm hydroxymethin

thứ 2 (δ_c 78,2) của **CH4** chuyển dịch về phía trường thấp hơn so với **CH4** (δ_c 66,0). Điều đó cho thấy, vị trí của nhóm này đã thay đổi. Phổ **ESI-MS** xuất hiện pic ion giả phân tử tại $m/z = 427,3$ [$M-H_2O+H$]⁺

phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{52}O_2$ ($M = 444,4$). So sánh các dữ liệu phổ trên kết hợp với tài liệu [9], có thể khẳng định **CH5** là 18α -oleanan- $3\beta,19\alpha$ -diol (hình 1).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất (**CH1-CH5**) phân lập từ thân giác mộc Bắc bộ

Kết luận

Bằng các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng và các phương pháp phổ hiện đại như **NMR** và **MS** đã xác định được 5 hợp chất triterpen lần đầu tiên phân lập từ phần thân của cây giác mộc Bắc Bộ: Calenduladiol (**CH1**), pseudotaraxasterol (**CH2**), betulin (**CH3**), maniladiol (**CH4**) và 18α -oleanan- $3\beta,19\alpha$ -diol (**CH5**).

Tài liệu tham khảo

1. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=108042.
2. Hosseinpour-Jaghdani F., Shomali T., Gholipour-Shahraki S., Rahimi-Madiseh M., Rafieian-Kopaei M. (2017), "Cornus mas: A review on traditional uses and pharmacological properties", *J. of Complementary and Integrative Med.*, 14 (3), doi: 10.1515/jcim-2016-0137.
3. Huang J., Zhang Y., Dong L., Gao Q., Yin L., Quan H., Chen R., Fu X., Lin D. (2018), "Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc", *J. of Ethnopharmacology*, 213, pp. 280-301.
4. Phạm Hoàng Hộ (2002), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2, NXB Trẻ, tr. 118.

5. Wenkert E., Baddeley G. V., Burfitt I. R., Moreno L. N. (1978), "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances-LVII Triterpenes related to lupane and hopane", *Organic Magnetic Resonance*, 11 (7), pp. 337-343.

6. Jassbi A. R., Firuzi O., Miri R., Salhei S., Zare S., Zare M., Masroorbabanari M., Chandran J. N., Schneider B., Baldwin I. T. (2016), "Cytotoxic activity and chemical constituents of *Anthemis mirheydari*", *Pharmaceutical Biology*, 54 (10), pp. 2044-2049.

7. Tijjani A., Ndukwe I. G., Ayo R. G. (2012), "Isolation and characterization of lup-20(29)-ene-3,28-diol (Betulin) from the stem-bark of *Adenium obesum* (Apocynaceae)", *Tropical J. of Pharm. Res.*, 11 (2), pp. 259-262.

8. Quijano L., Rios T., Fronczek F. R., Fischer N. H. (1998), "The molecular structure of maniladiol from *Baccharis salicina*", *Phytochemistry*, 49 (7), pp. 2065-2068.

9. Kim D. Y., Kim S. H., Ahn K. S., Oh S. R., Lee S. K., Lee J. W., Lee J. K., Lee H. K., Chae H. B., Choi S. Y. (2009), *Pharmaceutical compositions for prevention and treatment of cancer containing Astilbe chinensis extracts, fractions, the isolated triterpene compound therefrom or the pharmaceutically acceptable salts as an active ingredient*, KR20090130538A.

(Ngày nhận bài: 01/7/2020 - Ngày phản biện: 07/8/2020 - Ngày duyệt đăng: 23/9/2020)