

TỔNG HỢP MỘT SỐ DẪN XUẤT CỦA AXIT MADECASSIC PHÂN LẬP TỪ CÂY RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA* (L.) URBAN) CỦA VIỆT NAM

Trần Văn Lộc*, Võ Quỳnh Như, Lê Thị Thu Hà, Nguyễn Minh Thư, Trần Văn Sung

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

Đến Tòa soạn 15-7-2014

Abstract

From the MeOH extract of the *Centella asiatica* (L.) Urban. was collected in Hanoi, madecassic acid was isolated with 0.37%.w/w. Starting from the madecassic acid 7 new amide derivatives at the 28-COOH group have been synthesized. Their structures were determined by IR, MS and NMR spectroscopic methods.

Keywords: Madecassic acid, amide derivative.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây rau má (*Centella asiatica*) thuộc họ Hoa tán (Apiaceae) là một loài thực vật rất quen thuộc với người Việt Nam. Ngoài việc làm rau ăn, nước sinh tố,... rau má còn là một vị thuốc có các tác dụng sinh học đáng chú ý như: kháng viêm, chống oxy hóa, chống khối u, chữa bệnh ngoài da và bảo vệ gan [1-3]. Từ cây rau má thu hái tại Hà Nội, hai tritecpen là axit asiatic và axit madecassic với hàm lượng tương ứng là 0,37 và 0,43 % đã được phân lập [4]. Trong bằng độc quyền sáng chế US 2004/0097463A1 năm 2004 các tác giả đã sử dụng axit asiatic, axit madecassic hoặc asiaticosid để điều trị các bệnh như: ung thư biểu mô, ung thư vú, ung thư túi mật, ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư cổ, ung thư rau, ung thư dạ dày, ung thư màng tử cung, ung thư thực quản, ung thư tủy xương. Ngoài ra, các hợp chất này còn được sử dụng điều trị bệnh tăng sinh, ví dụ như bệnh vẩy nến, u mỡ, u tuyến (polyp nội kết), bệnh đa u nang thận [5]. Gần đây các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm đến việc tổng hợp các dẫn xuất của axit asiatic và axit madecassic. Trong bằng độc quyền sáng chế số 6,071,898 đăng ký tại Mỹ, nhóm tác giả Hàn Quốc đã tổng hợp một số dẫn xuất của axit asiatic và nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư và bảo vệ gan của chúng. Hai dẫn xuất có hoạt tính gây độc tế bào mạnh với tế bào ung thư P388D1 là: methyl A (1)-norursa-2,12-diene-23-succinyloxy-2-formyl-28-oate và methyl(A1)-norursa-2-hydroxymethyl-2,12-diene-23-hydroxy-28-oate bảo vệ được 23-41 % tế bào gan bị gây độc bởi CCl_4 và 40-72 % tế bào gan bị gây độc bởi galactosamine [3]. Bài báo này chúng tôi thông báo các kết quả về tổng hợp 7 dẫn xuất

amide mới của axit madecassic, tách từ cây rau má Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị phân tích

Sắc ký lớp mỏng (SKLM): Sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60 GF₂₅₄, độ dày 0,2 mm. Phân lập các chất bằng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel cỡ hạt 0,40-0,63 mm Merck. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H, ¹³C-NMR đo trên máy Bruker Avance-500 tại Viện Hóa học, chất nội chuẩn là TMS cho ¹H- và tín hiệu dung môi cho ¹³C-NMR. Phổ hồng ngoại (FTIR) đo dưới dạng viên nén KBr trên máy quang phổ IMPACT 410 của hãng Nicolet, Hoa Kỳ. Phổ MS được ghi trên máy Agilent 6310 Ion Trap tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

Các chất tổng hợp được trình bày ở sơ đồ 1.

2.2. Quy trình tổng hợp

2.2.1. Tổng hợp chất 2 (2 α ,3 β ,6 β ,23-teraacetoxyurs-12-en-28-oic axit)

502 mg (0,996 mmol) axit madecassic (1) được hòa trong 10 ml pyridin và 300 mg (2,921 mmol) anhydric acetic, hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, cho thêm 20 ml etyl axetat và trung hòa với HCl (1 N) đến pH = 6. Sau đó được rửa với dung dịch NaHCO_3 (10 %), cuối cùng dung dịch được rửa với nước muối bão hòa và được làm khan bằng Na_2SO_4 , cất loại dung môi. Chạy cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/ethylaxetat = 2:1

thu được chất **2** (533,4 mg, hiệu suất 85 %).

Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm CH₂, CH₃ ở 2939,92 và nhóm carbonyl ở 1740,49 (C=O).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃), 500 MHz, δ (ppm): 0,85 (3H, d = 6,5 Hz, CH₃); 0,91 (3H, d, *J* = 7,5 Hz, CH₃); 0,96 (3H, s, CH₃); 1,04 (3H, s, CH₃); 1,05 (3H, s, CH₃); 1,27 (3H, s, CH₃); 1,96, 2,04, 2,05, 2,07 (mỗi đỉnh 3H, CH₃CO); 3,71 (d, *J* = 12,0 Hz, H-23a); 3,94 (d, *J* = 12,0 Hz, H-23b); 4,3 (m, H-6); 5,01 (d, *J* = 10,5 Hz, H-3); 5,22 (m, H-2); 5,21 (br, H-12).

Phổ khối ESI-MS, ion dương; *m/z* = 672,4 [M]⁺ (ứng với công thức phân tử: C₃₈H₅₆NO₁₀).

2.2.2. Tổng hợp chất **3** (2α,3β,6β,23-tetraacetoxyurs-12-en-28-N-[*n*-propan-1-ol]-amit)

500 mg (0,794 mmol) chất **2** hòa tan trong 20 ml CH₂Cl₂ khan, cho vào 0,5 ml (6 mmol) oxalylchlorit. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 24 giờ. Sau đó cất loại CH₂Cl₂ và oxalylchlorit dư dưới áp suất giảm. Chất rắn còn lại được hòa tan trong 20 ml CH₂Cl₂, thêm vào 6 mmol triethylamin và 6 mmol 3-aminopropan-1-ol. Tiếp tục khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được rửa với H₂O, HCl loãng và cuối cùng với H₂O. Làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được chất rắn. Tách chất rắn thu được trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc, thu được chất **3** (570 mg, hiệu suất 86 %).

Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxy ở 3432,2 (OH), CH₂, CH₃ 2930,19 cm⁻¹ và nhóm cacbonyl ở 1735,40 cm⁻¹ (C=O).

Phổ ¹H-NMR (CD₃OD), 500 MHz, δ (ppm): 0,94 (3H, d = 7,0 Hz, CH₃); 0,98 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃); 1,10 (3H, s, CH₃); 1,26 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃); 1,31 (3H, s, CH₃); 1,27 (3H, s, CH₃); 1,99, 2,03, 2,04, 2,05 (mỗi đỉnh 3H, CH₃CO); 3,17- 3,21 (m, 1H); 3,27-3,35 (m, 1H); 3,59-3,63 (m, 2H); 3,77 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-23a) 3,92 (d, *J* = 12,0 Hz, H-23b); 4,10-4,15 (m, 2H); 4,3 (br.s, H-6); 4,96 (d, *J* = 10,0 Hz, H-3); 5,26-5,27 (m, H-2); 5,4 (m, H-12).

Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm): 41,1 (C-1), 71,1 (C-2), 76,6 (C-3), 42,6 (C-4), 48,9 (C-5), 67,9 (C-6), 32,7 (C-7), 40,1 (C-8), 48,8 (C-9), 38,8 (C-10), 24,4 (C-11), 127,0 (C-12), 139,4 (C-13), 43,4 (C-14), 28,9 (C-15), 25,2 (C-16), 47,0 (C-17), 54,3 (C-18), 41,2 (C-19), 40,1 (C-20), 31,9 (C-21), 38,1 (C-22), 66,3 (C-23), 14,4 (C-24), 15,7 (C-25), 17,7 (C-26), 24,0 (C-27), 180,0 (C-28), 18,8 (C-29), 21,5 (C-30); 172,2, 172,3, 172,6, 172,9 (4 x C=O); 21,0, 20,8, 20,7 (4 x COCH₃); 38,7 (C-1'); 32,8 (C-2'); 61,5 (C-3').

Phổ khối ESI-MS, ion dương; *m/z* = 729,1 [M]⁺ (ứng với công thức phân tử: C₄₁H₆₃NO₁₀).

2.2.3. Tổng hợp chất **4** (2α,3β,6β,23-tetraacetoxyurs-12-en-28-N-[*n*-propyl-1-acetoxy]-amit)

336 mg (0,5 mmol) chất **3** được hòa trong 20 ml CH₂Cl₂ và 0,01 mmol DMAP, nhỏ giọt 1 mmol axetyl clorua vào, hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Sau đó được rửa với dung dịch NaHCO₃ (10 %), cuối cùng với nước muối bão hòa và làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi. Chạy cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat, thu được chất **4** (292 mg, hiệu suất 82 %).

Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm CH₂, CH₃ ở 2956,38, 2862,30 cm⁻¹ và nhóm cacbonyl ở 1736,42 cm⁻¹ (C=O).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 0,78 (3H, s, CH₃), 0,85 (3H, d, *J* = 10,0 Hz, CH₃), 0,89 (3H, s, CH₃), 0,96 (3H, s, CH₃), 1,10 (3H, s, CH₃), 1,11 (6H, s, 2 x CH₃), 1,94, 1,96, 1,98; 2,02, 2,06, (mỗi đỉnh 3H, CH₃CO); 3,07-3,11 (m, 1H), 3,37-3,40 (m, 3H), 3,58 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-23a), 3,84 (d, *J* = 11,5 Hz, H-23b), 4,10 (t, *J* = 6,0), 5,08 (d, *J* = 10,5 Hz, H-3), 5,13-5,17 (m, H-2), 5,31 (br.s, H-12), 6,04 (t, *J* = 6,0 Hz, NH).

Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 43,8 (C-1), 69,9 (C-2), 74,8 (C-3), 41,9 (C-4), 47,5 (C-5), 17,8 (C-6), 32,4 (C-7), 39,7 (C-8), 47,5 (C-9), 37,7 (C-10), 23,4 (C-11), 125,1 (C-12), 139,8 (C-13), 42,4 (C-14), 27,7 (C-15), 24,7 (C-16), 47,7 (C-17), 53,8 (C-18), 39,6 (C-19), 39,1 (C-20), 30,8(C-21), 36,2 (C-22), 65,2 (C-23), 13,9 (C-24), 16,9 (C-25), 17,1 (C-26), 23,1 (C-27), 177,9 (C-28), 17,0 (C-29), 21,1 (C-30); 171,1, 170,7, 170,4, 170,3 (4 x C=O); 21,0, 20,9, 20,8, 20,7 (4 x COCH₃), 37,3 (C-1'), 28,6 (C-2'), 62,0 (C-3').

2.2.4. Tổng hợp chất **5** (2α,3β,6β,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-N-[*n*-propan-1-acetoxy]-amit)

500 mg (0,686 mmol) chất **4** được hòa tan trong 40 ml MeOH, cho 2 ml NaOH 4 N vào hỗn hợp phản ứng và khuấy ở nhiệt độ phòng 16 giờ. Sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn còn lại được hòa tan trong 15 ml nước cất và trung hoà bằng HCl 5% đến pH = 7, chiết bằng CH₂Cl₂ ba lần, dịch chiết được rửa với nước, làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là CH₂Cl₂:MeOH = 95:5, nhận được chất **5** (288 mg, hiệu suất 75 %).

Phổ ¹H-NMR (CD₃OD), 500 MHz), δ (ppm): 0,94 (3H, d = 7,0 Hz, CH₃), 0,97 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃), 1,10 (3H, s, CH₃), 1,11 (6H, s, 2 x CH₃); 1,12

(3H, s, CH₃), 1,18 (3H, s, CH₃), 1,4 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH₃), 3,16-3,22 (m, 1H), 3,27-3,35 (m, 1H), 3,40 (br.s, 2H), 3,45 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-23a), 3,6 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b), 3,60-3,62 (m, 2H), 3,71-3,82 (m, 1H), 4,4 (br.s, H-6), 5,40-5,43 (m, H-12).

Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm): 42,5 (C-1), 69,8 (C-2), 74,7 (C-3), 42,6 (C-4), 48,4 (C-5), 68,9 (C-6), 31,9 (C-7), 38,5 (C-8), 48,7 (C-9), 37,5 (C-10), 23,3 (C-11), 125,8 (C-12), 139,1 (C-13), 43,2 (C-14), 27,7 (C-15), 24,6 (C-16), 47,9 (C-17), 54,4 (C-18), 39,7 (C-19), 40,6 (C-20), 29,0 (C-21), 38,3 (C-22), 65,9 (C-23), 15,4 (C-24), 17,6 (C-25), 19,1 (C-26), 23,9 (C-27), 178,6 (C-28), 19,1 (C-29), 21,6 (C-30); 38,7 (C-1'); 32,8 (C-2'); 61,5 (C-3').

Phổ khối ESI-MS, ion dương; $m/z = 561$ [M]⁺ (ứng với công thức phân tử: C₃₃H₅₅NO₆).

2.2.5. Tổng hợp chất 6 (2 α ,3 β ,6 β ,23-tetra-acetoxyurs-12-en-28-N-[isopropyl]-amit)

672 mg (1 mmol) chất 2 hòa tan trong 20 ml CH₂Cl₂ khan, cho vào 0,5 ml (6 mmol) oxalylchlorit. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 24 giờ. Sau đó cất loại CH₂Cl₂ và oxalylchlorit dư dưới áp suất giảm. Chất rắn còn lại được hòa tan trong 20 ml CH₂Cl₂, thêm vào 6 mmol triethylamin và 1,5 mmol isopropyl amin. Khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được rửa với H₂O, HCl loãng và cuối cùng với H₂O. Làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được chất rắn. Tách chất rắn thu được trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc, thu được chất 6 (513 mg, hiệu suất 72 %).

Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ ở 3428,99 (NH), 2936,49 cm⁻¹ (CH₂, CH₃) và 1735,15 cm⁻¹ (C=O).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 0,82 (3H, d = 6,5 Hz, CH₃); 0,87 (3H, s, CH₃); 0,99-1,07 (15H, 5 x CH₃); 1,25 (3H, s, CH₃); 1,94, 1,97, 1,99, 2,02, 2,04 (mỗi đỉnh 3H, CH₃CO); 3,77 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-23a), 3,91 (d, $J = 12,0$ Hz, H-23b); 3,84-3,88 (m, 1H); 4,3 (br.s, H-6); 4,96 (d, $J = 10,5$ Hz, H-3); 5,17-5,22 (m, H-2); 5,3 (m, H-12); 5,6 (1H, d, $J = 7$ Hz, NH).

Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 40,6 (C-1), 69,9 (C-2), 74,9 (C-3), 42,3 (C-4), 47,9 (C-5), 67,2 (C-6), 30,6 (C-7), 42,2 (C-8), 47,5 (C-9), 38,6 (C-10), 24,4 (C-11), 127,0 (C-12), 139,4 (C-13), 43,4 (C-14), 28,9 (C-15), 24,5 (C-16), 47,4 (C-17), 54,1 (C-18), 41,2 (C-19), 39,7 (C-20), 30,8 (C-21), 37,3 (C-22), 65,3 (C-23), 15,2 (C-24), 17,0 (C-25), 18,4 (C-26), 23,0 (C-27), 176,8 (C-28), 18,6 (C-29), 21,1 (C-30); 170,3, 170,8 (4 x COCH₃); 21,0, 20,8,

20,7 (4 x COCH₃); 43,0 (C-1'); 22,1 (C-2'); 22,6 (C-3').

Phổ khối ESI-MS, $m/z = 712$ [M-H], M = 713 (ứng với công thức phân tử: C₄₁H₆₀NO₉).

2.2.6. Tổng hợp chất 7 (2 α ,3 β ,6 β ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-N-isopropyl-amit)

365 mg (0,5 mmol) chất 6 được hòa tan trong 40 ml MeOH, cho 2 ml NaOH 4 N vào hỗn hợp phản ứng và khuấy ở nhiệt độ phòng 16 giờ. Sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn còn lại được hòa tan trong 15 ml nước cất và trung hoà bằng HCl 5% đến pH = 7, chiết bằng CH₂Cl₂ ba lần, dịch chiết được rửa với nước, làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂:MeOH = 95:5, thu được chất 7 (228 mg, hiệu suất 71 %).

Phổ ¹H-NMR (CD₃OD), 500 MHz), δ (ppm): 0,93 (3H, d = 7,0 Hz, CH₃); 0,98 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH₃); 1,10 (3H, s, CH₃); 1,13 (3H, s, CH₃); 1,16 (3H, s, CH₃); 1,40 (3H, s, CH₃); 3,31-3,32 (m, H-3); 3,47 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,52 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,71-3,77 (m, H-2); 4,42 (br.s, H-6); 5,42-5,37 (m, H-12).

Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm): 42,4 (C-1), 69,8 (C-2), 74,9 (C-3), 42,5 (C-4), 48,3 (C-5), 68,6 (C-6), 31,9 (C-7), 38,5 (C-8), 48,8 (C-9), 37,3 (C-10), 23,4 (C-11), 125,7 (C-12), 139,0 (C-13), 43,0 (C-14), 27,8 (C-15), 24,7 (C-16), 47,9 (C-17), 54,5 (C-18), 39,9 (C-19), 40,5 (C-20), 29,0 (C-21), 38,5 (C-22), 65,9 (C-23), 15,2 (C-24), 17,8 (C-25), 19,0 (C-26), 23,8 (C-27), 179,6 (C-28), 19,1 (C-29), 21,6 (C-30); 43,1 (C-1'); 22,1 (C-2'); 22,4 (C-3').

Phổ khối ESI-MS, $m/z = 544$ [M-H], M = 545 (ứng với công thức phân tử: C₃₃H₅₅NO₅).

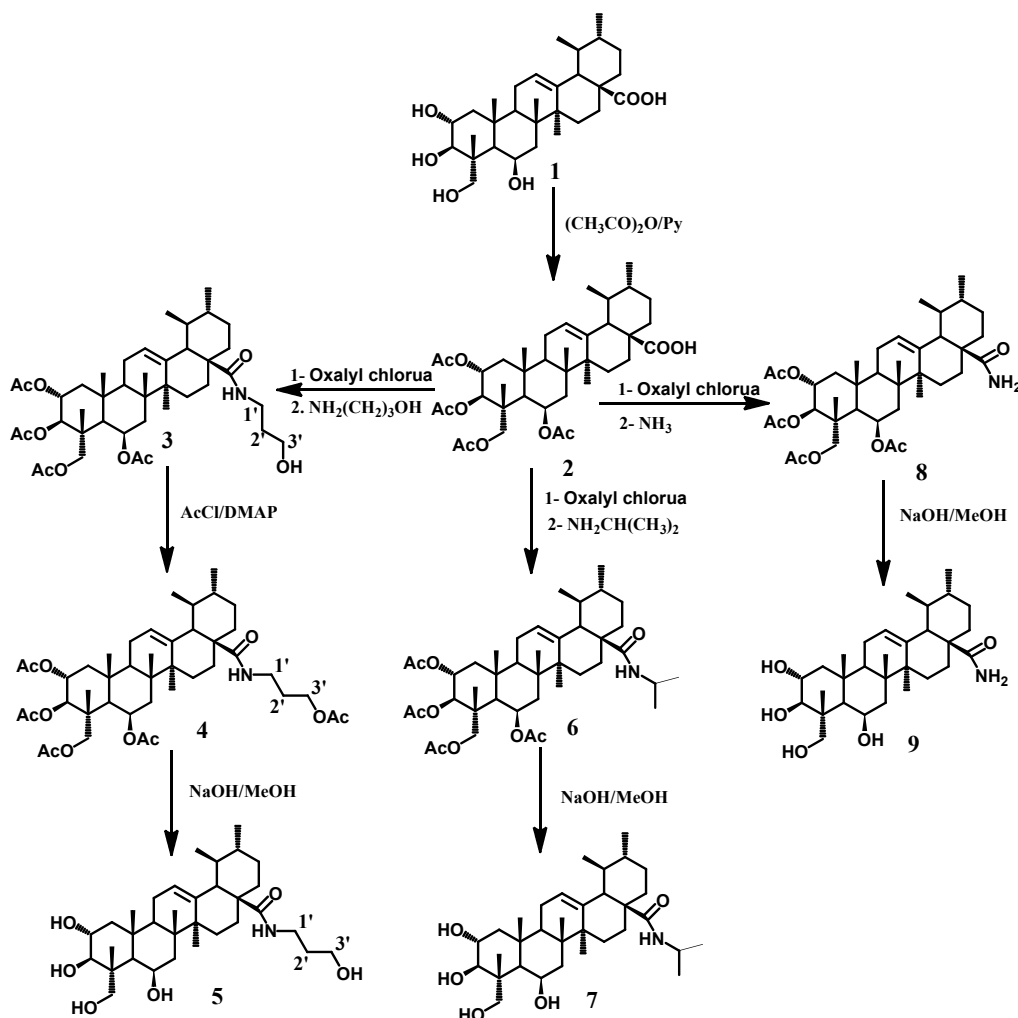
2.2.7. Tổng hợp chất 8 (2 α ,3 β ,6 β ,23-tetra-acetoxyurs-12-en-28-amit)

533 mg (0,794 mmol) chất 2 hoà tan trong 20 ml CH₂Cl₂ khan, cho vào 0,5 ml (6 mmol) oxalylchlorit. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 24 giờ. Sau đó cất loại CH₂Cl₂ và oxalylchlorit dư dưới áp suất giảm. Chất rắn còn lại được hoà tan trong 20 ml CH₂Cl₂, thêm vào 6 mmol triethylamin và 1,5 mmol ammoniac 30 %. Tiếp tục khuấy 20 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được rửa với H₂O, HCl loãng và cuối cùng với H₂O. Làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được chất rắn, tách trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc. Thu được chất 8 (469 mg, hiệu suất 88 %).

Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ ở 3478,38 (NH₂), 2935,52 cm⁻¹ (CH₂, CH₃), 1736,74 cm⁻¹ (C=O).

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃), 500 MHz), δ (ppm): 0,87 (3H, d, *J* = 6,0 Hz, CH₃); 0,90 (3H, s, CH₃); 0,92 (3H, s, CH₃); ; 1,10 (3H, s, CH₃); 1,11 (3H, d, *J* = 7,0 Hz,

CH₃); 1,30 (3H, s, CH₃); 1,99, 2,03, 2,06, 2,07 (mỗi đỉnh 3H, CH₃CO); 3,73 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, H-23a) 3,92 (d, *J* = 12,0 Hz, H-23b); 4,36 (br.s, H-6); 5,03 (d, *J* = 10,0 Hz, H-3); 5,21-5,26 (m, H-2); 5,39 (m, H-12); 5,48, 5,83 (2H, br.s, NH₂).



Sơ đồ 1: Sơ đồ tổng hợp một số dẫn xuất của axit madecassic

Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 42,5 (C-1), 69,9 (C-2), 74,9 (C-3), 42,4 (C-4), 47,5 (C-5), 67,5 (C-6), 30,9 (C-7), 38,6 (C-8), 48,1 (C-9), 37,3(C-10), 23,4 (C-11), 125,6 (C-12), 139,0 (C-13), 43,0 (C-14), 27,8 (C-15), 24,7 (C-16), 47,9 (C-17), 54,4 (C-18), 39,8 (C-19), 38,7 (C-20), 30,7 (C-21), 37,1 (C-22), 65,3 (C-23), 15,3 (C-24), 17,1 (C-25), 18,5 (C-26), 23,1 (C-27), 181,3 (C-28), 18,6 (C-29), 19,7 (C-30); 170,8, 170,4 (4 x OCOCH₃); 21,2, 21,1, 20,7, 20,8 (4 x OCOCH₃).

Phổ khối ESI-MS, m/z = 672 [M + H]⁺, M = 671 (ứng với công thức phân tử: C₃₈H₅₇NO₉).

2.2.8. Tổng hợp chất 9 (2α,3β,6β,23-tera hydroxyurs-12-en-28-amit)

429 mg (0,64 mmol) chất 8 được hòa tan trong 40 ml MeOH, cho 2 ml NaOH 4 N vào hỗn hợp phản ứng và khuấy ở nhiệt độ phòng 16 giờ. Sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn còn lại được hoà tan trong 15 ml nước cất và trung hoà bằng HCl 5 % đến pH = 7, chiết bằng CH₂Cl₂ ba lần, dịch chiết được rửa với nước, làm khan bằng Na₂SO₄, cất loại dung môi thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂:MeOH = 95:5, thu được chất 9 (190 mg, hiệu suất 70 %).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz), δ (ppm): 0,93 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, CH_3); 0,98 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, CH_3); 1,10 (3H, s, CH_3); 1,13 (3H, s, CH_3); 1,15 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, CH_3); 1,40 (3H, s, CH_3); 3,30-3,33 (m, H-3); 3,45 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,53 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,73-3,78 (m, H-2); 4,40 (br.s, H-6); 5,43-5,39 (m, H-12).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): 42,5 (C-1), 69,9 (C-2), 74,9 (C-3), 42,4 (C-4), 48,5 (C-5), 68,4 (C-6), 31,9 (C-7), 38,6 (C-8), 48,8 (C-9), 37,3 (C-10), 23,4 (C-11), 125,6 (C-12), 139,0 (C-13), 43,0 (C-14), 27,8 (C-15), 24,7 (C-16), 47,9 (C-17), 54,4 (C-18), 39,9 (C-19), 40,3 (C-20), 29,0 (C-21), 38,5 (C-22), 65,9 (C-23), 15,2 (C-24), 17,7 (C-25), 19,1 (C-26), 23,9 (C-27), 183,6 (C-28), 19,2 (C-29), 21,5 (C-30).

- Phổ khối ESI-MS, $m/z = 539$ $[\text{M}+\text{HCl}]^+$, $M = 503$ (ứng với công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_5$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Axit mandecassic (**1**) được phân lập và tinh chế từ lá cây rau má theo quy trình ở tài liệu [4].

Chất **1** có 5 trung tâm phản ứng gồm bốn nhóm hydroxy và một nhóm axit carboxylic có khả năng tham gia phản ứng với các amin. Để thu được sản phẩm amit chỉ ở nhóm cacboxylic ta phải axetyl hóa bốn nhóm hydroxy của **1** với anhydrit axetic trong pyridine, thu được sản phẩm **2**. Chất **2** được hoạt hóa dưới dạng clorua axit nhờ phản ứng với oxalylclorit trong diclometan ở nhiệt độ phòng. Cát loại oxalylchlorit dư, sau đó cho thêm các amin tương ứng và khuấy ở nhiệt độ phòng 24 giờ sẽ thu được các sản phẩm **3**, **6** và **8** với hiệu suất phản ứng khá cao sau khi tinh chế qua sắc ký cột trên silica gel.

Chất **2**: Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có 6 nhóm methyl trong đó có 2 nhóm methyl gắn với cacbon bậc hai với các tín hiệu dublet tại $\delta_{\text{H}} = 0,85$ (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,91 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, CH_3) và 4 nhóm methyl gắn với cacbon bậc 4 với các tín hiệu singlet tại $\delta_{\text{H}} = 0,96$ (3H, s, CH_3); 1,04 (3H, s, CH_3); 1,05 (3H, s, CH_3); 1,27 (3H, s, CH_3). Đặc biệt xuất hiện 4 nhóm acetyl với các tín hiệu singlet tại $\delta_{\text{H}} = 1,96$ (3H, s, OCOCH_3); 2,04 (3H, s, OCOCH_3); 2,05 (3H, s, OCOCH_3); 2,07 (3H, s, OCOCH_3) và có sự dịch chuyển của H-2, H-3, H-23 về phía trường thấp: 3,71 (d, $J = 12,0$ Hz, H-23a); 3,94 (d, $J = 12,0$ Hz, H-23b); 5,01 (d, $J = 10,5$ Hz, H-3); 5,22 (m, H-2). Độ chuyển dịch hóa học của H-6 trong trường hợp này thay đổi không đáng kể. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có đủ các tín hiệu cacbon của axit madecassic (**1**) và xuất hiện thêm 4 nhóm OAc có độ dịch chuyển là: 172,2, 172,3, 172,6, 172,9 (4 x COCH_3), như vậy cả 4 nhóm hydroxyl đã được axetyl hóa.

Cấu trúc hóa học của các chất chứa nhóm axetyl là **3**, **4**, **6**, **8** thu được từ sơ đồ tổng hợp 1 đã được khẳng định qua các dữ liệu phổ IR, MS và NMR.

Thủy phân chất **4**, **6** và **8** bằng NaOH (4 N) trong MeOH thu được các hợp chất tương ứng **5**, **7** và **9**.

Cấu trúc hóa học của các chất này được chứng minh dưới đây.

Chất **5**: Phổ $^1\text{H-NMR}$ không còn xuất hiện 5 nhóm axetyl ở $\delta = 1,94-2,06$ và có sự dịch chuyển của H-2, H-3, H-23 và H-3' về phía trường cao: 3,16-3,22 (m, H-3); 3,40 (br.s, 2H-3') gắn với nhóm hydroxy; 3,45 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,60 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,71-3,82 (m, H-2). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ DEPT 90, DEPT 135 có mặt của 33 cacbon trong đó có 6 nhóm CH_3 ; 12 nhóm (CH_2); 8 nhóm (CH) và 7 nhóm bậc 4. Đặc biệt xuất hiện thêm ba tín hiệu cacbon bậc 2 ở $\delta_{\text{C}} = 39,1$ (C-1'); 32,1 (C-2'); 59,5 (C-3') của mạch nhánh propanol, như vậy cả 5 nhóm axetyl đã được thủy phân thành các nhóm hydroxyl. Kết hợp phổ ESI-MS, phổ IR, phổ ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ chúng tôi xác định được cấu trúc của chất **5**.

Chất **7**: Phổ $^1\text{H-NMR}$ ở vùng trường cao chỉ còn tín hiệu của 8 nhóm methyl $\delta_{\text{H}} = 0,93-1,40$ trong đó có 2 nhóm methyl của mạch nhánh isopropyl, không còn xuất hiện 4 nhóm axetyl và có sự dịch chuyển của H-2, H-3, H-23 về phía trường cao: 3,31-3,32 (m, H-3); 3,47 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,52 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,71-3,77 (m, H-2). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ DEPT 90, DEPT 135 cho thấy sự có mặt của 33 cacbon trong đó có 8 nhóm (CH_3); 8 nhóm (CH_2); 10 nhóm (CH) và 7 nhóm bậc 4. Ngoài ra phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **7** là giống với phổ của chất **1**, còn xuất hiện thêm 2 tín hiệu của nhóm methyl tại $\delta = 22,1$, 22,4 ppm và tín hiệu cacbon bậc 3 tại $\delta = 43,1$ ppm.

Từ các số liệu phổ ESI-MS, phổ ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ chúng tôi xác định được cấu trúc của chất **7**.

Chất **9**: Phổ $^1\text{H-NMR}$ ở vùng trường cao chỉ còn tín hiệu của 6 nhóm methyl $\delta_{\text{H}} = 0,72-1,02$, không còn xuất hiện 4 nhóm axetyl và có sự dịch chuyển của H-2, H-3, H-23 về phía trường cao: 3,33-3,30 (m, H-3); 3,45 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,53 (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,78-3,73 (m, H-2). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ DEPT 90, DEPT 135 cho thấy sự có mặt của 30 cacbon trong đó có 6 nhóm (CH_3); 8 nhóm (CH_2); 9 nhóm (CH) và 7 nhóm bậc 4. Ngoài ra phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **9** là giống với phổ của chất **1**, ngoại trừ tín hiệu của nhóm CONH_2 tại $\delta = 183,6$ ppm thay cho nhóm COOH tại $\delta = 180$ ppm ở chất **1**.

Như vậy các nhóm axetyl đã bị thủy phân thành các nhóm hydroxyl. Kết hợp phổ ESI-MS, phổ hồng

ngoại, phổ ^1H -, ^{13}C -NMR chúng tôi xác định được cấu trúc của chất **9**.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học Công nghệ Quốc gia NAFOSTED đã tài trợ kinh phí thông qua đề tài, mã số 104.01-2012.33.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yoshinari Ohnishi et al. *Inhibitory effects of asiatic*

acid and CPT-11 on growth of HT-29 cells, the Journal of Medical investigation, **52**, 65-72 (2005).

2. Mei Liu et al. *Madecassoides isolated from Centella asiatica Herbs Facilitates Burn Wound Healing in Mice*, Planta Medica, **74**, 809-815 (2008).

3. Sang Sup Jew et al. US patent 6,071,898, Jun. 6 (2000).

4. Trần Văn Lộc, Trần Văn Sung, Phạm Đức Thắng. *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây rau má*, Tạp chí Hóa học, **50(5B)**, 18-22 (2012).

5. USP 0097463A1, May 20 (2004).

Liên hệ: Trần Văn Lộc

Viện Hóa học

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội

Email: tvloc@ich.vast.vn.