

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM α -GLUCOSIDASE CỦA LÁ VỎI VIỆT NAM (*CLEISTOCALYX OPERCULATUS* ROXB. MERR. et PERRY)

Trương Thị Tố Chinh^{1*}, Phan Minh Giang²

¹Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Đến Tòa soạn 3-5-2015; Chấp nhận đăng 10-6-2016

Abstract

Three flavones: 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (**2**), kaempferol (**8**), quercetin (**9**); five terpenoids: betulin (**4**), betulinic acid (**5**), oleanolic acid (**6**), maslinic acid (**7**), Axit arjunolic (**10**), together with 1-tetatriacontanol (**1**) and β -sitosterol (**3**) were isolated from the leaves of *Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry. Their structures were determined by means of spectroscopic methods. The extract of its leaves showed α -glucosidase inhibition activity.

Keywords. *Cleistocalyx operculatus*; Myrtaceae; flavone; terpenoid; α -glucosidase inhibition, NMR.

1. MỞ ĐẦU

Cây vối có tên khoa học là *Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry, thuộc họ Sim (Myrtaceae). Cây được phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Trung Quốc và một số nước nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây thường mọc hoang hoặc được trồng ở khắp các vùng quê thuộc đồng bằng Bắc và Trung Bộ để lấy lá, nụ hoa làm trà uống và làm thuốc [1]. Theo đông y, vối có vị hơi chát, tính mát, không độc, tác dụng thanh nhiệt, tiêu trệ, sát khuẩn. Các bộ phận của cây vối giàu dược tính nên được dùng làm thuốc chữa trị nhiều bệnh rất hiệu quả. Một số bài báo đã công bố thành phần hóa học gồm flavonoid, terpenoid, ... của cây vối [2-4]. Bài báo này thông báo tiếp về cấu trúc các chất flavonoid, terpenoid, ancol mạch dài và steroid từ lá cây vối (*Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương pháp và thiết bị

Điểm nóng chảy được đo trên thiết bị Boetius (Đức) và Thermo Scientific Mel-Temp 3.0 (Mỹ). Phổ khối lượng (ESI-MS) đo trên hệ thiết bị LC/MSD Trap Agilent Series 1100. Các phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT được ghi trên thiết bị Bruker Avance 500 NMR spectrometer. Silica gel Merck được sử dụng cho sắc ký cột (CC, FC và Mini-C). Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện

trên bản mỏng silica gel Merck 60 F₂₅₄ tráng sẵn trên nền nhôm.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Nguyên liệu thực vật là lá cây vối (*Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry) được thu thập tại huyện Văn Lâm, tỉnh Hưng Yên vào tháng 5 năm 2013.

2.3. Chiết và phân lập các hợp chất 1-10

Lá khô cây Vối (1 kg) được ngâm chiết với EtOH ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết EtOH được cất loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn chiết được hòa với nước cất và chiết lần lượt với *n*-hexan, CH₂Cl₂ và EtOAc cho các phần chiết tương ứng.

Phần chiết *n*-hexan **EH** (25 g) được phân tách bằng CC trên silica gel (cỡ hạt 0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethylacetat 29:1, 19:1, 9:1, 4:1, 2:1, 1:1 (v/v) thu được 9 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **EH3** (1,9 g) được phân tách bằng CC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-ethyl acetat 29:1, tinh chế bằng cách rửa, kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi *n*-hexan-axeton thu được **1** (25 mg). Nhóm phân đoạn **EH5** (6,2 g) được phân tách bằng FC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-ethyl acetat 29:1, 19:1 và 9:1 thu được 4 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **EH5.2** được tinh chế bằng cách rửa *n*-hexan sau đó kết tinh lại trong

axeton thu được **2** (407 mg). Nhóm phân đoạn **EH5.3** (1,1 g) được phân tách 2 lần bằng FC trên silica gel (0,015-0,040 mm), rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-etyl axetat 29:1, 19:1 và 9:1, rửa *n*-hexan và kết tinh lại trong axeton thu được **2** (214,5 mg) và **3** (40 mg). Nhóm phân đoạn **EH5.4** (0,8 g) được rửa bằng metanol cho **3** (30 mg). Nhóm phân đoạn **EH7** (0,6 g) được phân tách bằng FC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-etyl axetat 9:1, rửa bằng axeton và kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi diclometan-axeton thu được **4** (20 mg). Nhóm phân đoạn **EH8** (4,0 g) được phân tách bằng FC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-etyl axetat 9:1 và 6:1 thu được 4 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn 1 được phân tách bằng sắc ký cột và kết tinh lại thu được **4** (15 mg) và hỗn hợp **4** và **5** (20 mg). Nhóm phân đoạn 4 được tinh chế bằng mini-C trên silica gel (0,015-0,040 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-etyl axetat 29:1, kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi diclometan-axeton thu được **6** (36 mg). Phần chiết diclometan **ED** (48 g) được phân tách bằng CC, rửa giải với hệ dung môi diclometan-etyl axetat gradient 9:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 thu được 7 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **ED4** (4,4 g) được phân tách bằng FC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-etyl axetat 9:1, 6:1, 4:1 thu được 5 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **ED4.1** (0,2 g) được phân tách bằng FC trên silica gel (0,015-0,040 mm) với hệ dung môi diclometan-etyl axetat 35:1 cho **4** (12 mg) và **5** (19 mg). Nhóm phân đoạn **ED4.4** (1,35 g) được phân tách bằng mini FC trên silica gel (0,015-0,040 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-etyl axetat 29:1, 19:1 và kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi diclometan-axeton cho **5** (150 mg) và **6** (70 mg). Nhóm phân đoạn **ED5** (5,8 g) được phân tách 2 lần bằng FC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-etyl axetat 9:1, 6:1, 4:1 và diclometan-axeton 29:1, 19:1 và 9:1 sau đó rửa và kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi diclometan-axeton thu được **7** (46,2 mg). Phần chiết etyl axetat (5,5 g) được phân tách bằng CC, rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton 19:1, 9:1, 4:1 thu được 4 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn 2 được tinh chế bằng FC trên silica gel (0,015-0,040 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton 19:1 thu được **8** (22,7 mg). Nhóm phân đoạn 4 được phân tách bằng FC trên silica gel (0,015-0,040 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan-metanol 29:1 thu được **9** (25,7 mg).

1-Tetratriacontanol (1): Bột vô định hình, màu trắng, $R_f = 0,3$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-etyl axetat 9:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 493 ($[M-H]^-$), $C_{34}H_{70}O$. ^1H-NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 0,88 (3H, t, 34- CH_3), 1,26

(62H, s br, 3- $CH_2 \rightarrow$ 33- CH_2), 1,57 (2H, m, 2- CH_2), 3,61 (2H, t, 1- CH_2).

2',4'-Dihydroxy-6'-metoxy-3',5'-dimethylchalcon (2): Tinh thể hình kim màu cam, đ.n.c. 125-126 °C. $R_f = 0,4$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-etyl axetat 7:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 299 ($[M+H]^+$), 297 ($[M-H]^-$), $C_{18}H_{18}O_4$. ^1H-NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 2,07 (3H, s, 3- CH_3), 2,12 (3H, s, 5- CH_3), 3,65 (3H, s, 6-O CH_3), 7,39 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 7,63 (2H, dd, H-2, H-6), 7,83 (1H, d, H_a), 7,97 (1H, d, H_b), 13,613 (1H, s, 2'-OH).

β -Sitosterol (3): Tinh thể hình que màu trắng, đ.n.c. 134-135 °C. $R_f = 0,34$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-etyl axetat 4:1, v/v).

Betulin (4): Bột vô định hình màu trắng, đ.n.c. 251-252 °C. $R_f = 0,32$ (TLC, silica gel, *n*-hexan-etyl axetat 4:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 443 ($[M+H]^+$), $C_{30}H_{50}O_2$. ^1H-NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 0,76 (3H, s, 4- CH_3), 0,83 (3H, s, 10- CH_3), 0,97 (3H, s, 14- CH_3), 0,98 (3H, s, 4- CH_3), 1,02 (3H, s, 8- CH_3), 1,68 (3H, s, 20- CH_3), 2,38 (1H, dt, H-19), 3,18 (1H, dd, H-3), 3,33 (1H, d, H-28a), 3,79 (1H, d, H-28b), 4,58 (1H, d, H-29a), 4,68 (1H, s br, H-29b).

Axit betulinic (5): Tinh thể hình que màu trắng, đ.n.c. 270-272 °C. $R_f = 0,43$ (TLC, silica gel, diclometan-etyl axetat 15:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 457 ($[M+H]^+$), 455 ($[M-H]^-$), $C_{30}H_{48}O_3$. ^1H-NMR ($CDCl_3+CD_3OD$, δ , ppm): 0,75 (3H, s, 4- CH_3), 0,83 (3H, s, 10- CH_3), 0,95 (3H, s, 14- CH_3), 0,96 (3H, s, 4- CH_3), 0,98 (3H, s, 8- CH_3), 1,71 (3H, s, 20- CH_3), 3,01 (1H, m, H-19), 3,16 (1H, dd, H-3), 4,59 (1H, s, H-29a), 4,72 (1H, s, H-29b).

Axit oleanolic (6): Tinh thể hình que màu trắng, đ.n.c. 264-265 °C. $R_f = 0,35$ (TLC, silica gel, diclometan-etyl axetat 9:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 457 ($[M+H]^+$), 455 ($[M-H]^-$), $C_{30}H_{48}O_3$. ^1H-NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 0,77 (3H, s, 26- CH_3), 0,78 (3H, s, 23- CH_3), 0,90 (3H, s, 25- CH_3), 0,91 (3H, s, 29- CH_3), 0,93 (3H, s, 30- CH_3), 0,98 (3H, s, 24- CH_3), 1,14 (3H, s, 27- CH_3), 2,83 (1H, dd, H-18), 3,20 (1H, dd, H-3), 5,27 (1H, t, H-12). $^{13}C-NMR/DEPT$ ($CDCl_3$, δ , ppm): 15,2 (C-24), 15,4 (C-25), 16,8 (C-26), 18,2 (C-6), 22,9 (C-11), 23,3 (C-16), 23,4 (C-30), 25,7 (C-27), 26,8 (C-2), 27,6 (C-15), 27,9 (C-23), 30,6 (C-20), 32,4 (C-22), 32,6 (C-7), 32,9 (C-29), 33,8 (C-21), 36,9 (C-10), 38,4 (C-1), 38,6 (C-4), 39,2 (C-8), 41,1 (C-18), 41,6 (C-14), 45,9 (C-19), 46,3 (C-17), 47,5 (C-9), 55,1 (C-5), 78,8 (C-3), 122,2 (C-12), 143,7 (C-13), 181,3 (C-28).

Axit maslinic (7): Tinh thể hình que màu trắng. $R_f = 0,48$ (TLC, silica gel, diclometan-axeton 4:1, v/v). **ESI-MS**: m/z 473 ($[M+H]^+$), 471 ($[M-H]^-$), $C_{30}H_{48}O_4$. ^1H-NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 0,79 (3H, s, 26- CH_3), 0,81 (3H, s, 24- CH_3), 0,91 (3H, s, 29- CH_3), 0,93 (3H, s, 30- CH_3), 0,98 (3H, s, 25- CH_3), 1,02 (3H, s, 23- CH_3), 1,15

(3H, s, 27-CH₃), 2,83 (1H, dd, H-18), 2,95 (1H, d), 3,65 (1H, ddd, H-3), 5,28 (1H, s br, H-12).

Kaempferol (8): Tinh thể hình que màu vàng, đ.n.c. 276-278 °C. R_f = 0,67 (TLC, silica gel, diclometan-axeton 4:1, v/v). **ESI-MS:** *m/z* 287 ([M + H]⁺), 285 ([M - H]⁻), C₁₅H₁₀O₆. **¹H-NMR** (CD₃OD, δ, ppm): 6,19 (1H, d, H-6), 6,41 (1H, s br, H-8), 6,92 (2H, d, H-2', H-6'), 8,1 (2H, d, H-3', H-5'). **¹³C-NMR/DEPT** (CD₃OD, δ, ppm): 94,5 (C-8), 99,3 (C-6), 104,6 (C-10), 116,3 (C-3', C-5'), 123,7 (C-1'), 130,7 (C-2', C-6'), 137,1 (C-3), 148,1 (C-2), 158,3 (C-9), 160,5 (C-4'), 162,5 (C-5), 165,6 (C-7), 177,4 (C-4).

Quercetin (9): Tinh thể hình que màu vàng, đ.n.c. 295-297 °C. R_f = 0,4 (TLC, silica gel, diclometan-axeton 4:1, v/v). **ESI-MS:** *m/z* 303 ([M + H]⁺), 301 ([M - H]⁻), C₁₅H₁₀O₇. **¹H-NMR** (CD₃OD, δ, ppm): 6,21 (1H, d, H-6), 6,41 (1H, d, H-8), 6,9 (1H, d, H-5'), 7,65 (1H, dd, H-6'), 7,75 (1H, d, H-2').

Lá cây Vôi khô (160 g) được ngâm chiết với hỗn hợp etanol/nước 60%. Dịch chiết EtOH/nước được cất loại dung môi dưới áp suất giảm, cạn chiết được hòa với nước cất và chiết lần lượt với *n*-hexan, CH₂Cl₂ và EtOAc cho các phần chiết tương ứng.

Phần chiết etylaxetat **ENE** (2,6 g) được phân tách bằng CC trên silica gel (cỡ hạt 0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi gradient diclometan/metanol 29:1, 19:1, 9:1, 4:1 (v/v) thu được 5 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **ENE3** được phân tách bằng CC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol 15:1, 9:1 (v/v) thu được 3 nhóm phân đoạn. Nhóm phân đoạn **ENE3.2** được tinh chế bằng mini-CC trên silica gel (0,040-0,063 mm), rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol 15:1 thu được **10** (8 mg).

Axit arjunolic (10): Tinh thể hình que màu trắng. R_f = 0,5 (TLC, silica gel, diclometan-metanol 9:1, v/v). **¹H-NMR** (CDCl₃, δ, ppm): δ 0,72 (3H, s, 26-CH₃), 0,86 (3H, s, 24-CH₃), 0,95 (3H, s, 29-CH₃), 0,98 (3H, s, 30-CH₃), 1,10 (3H, s, 25-CH₃), 1,22 (3H, s, 27-CH₃), 2,87 (1H, dd, *J* = 12,0 Hz, 4,0 Hz, H-18), 3,29 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-23a), 3,54 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-23b), 3,37 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-3), 3,71 (1H, ddd, *J* = 11,5 Hz, 9,5 Hz, 4,5 Hz, H-2), 5,28 (1H, t, *J* = 3,5 Hz, H-12).

¹³C-NMR (CDCl₃, δ, ppm): δ 13,9 (q, 24-CH₃), 17,5 (q, 26-CH₃), 17,8 (q, 25-CH₃), 19,1 (t, C-6), 23,9 (t, C-16), 24,0 (t, C-30), 24,6 (t, C-11), 26,5 (q, C-27), 28,8 (t, C-15), 31,6 (s, C-20), 33,3 (t, C-22), 33,4 (s, C-29), 33,8 (t, C-7), 34,8 (t, C-21), 39,0 (s, C-8, C-10), 42,7 (d, C-18), 43,0 (s, C-14), 44,1 (s, C-4), 47,2 (t, C-19), 47,6 (s, C-17), 47,8 (t, C-1),

48,1 (d, C-9), 48,9 (d, C-5), 66,2 (t, C-23), 69,9 (d, C-2), 78,1 (d, C-3), 123,4 (d, C-12), 145,4 (s, C-13), 181,8 (s, C-28).

2.4. Điều chế và thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết lá cây vôi

Mẫu bột lá vôi khô (mỗi mẫu 160 g) được ngâm chiết với các dung môi là etanol 96°, etanol/nước 60% và nước nóng thu được các cao thô tương ứng là **ET**, **ENT** và **NT**. Các phần chiết thô (**ET**, **ENT** và **NT**) được chiết phân đoạn với *n*-hexan, diclometan và etyl axetat thu các phần chiết tương ứng (**EH**, **ED**, **EE**; **ENH**, **END**, **ENE**; **NH**, **ND**, **NE**). Phần dịch nước được cô quay thu các phần chiết **EN**, **ENN** và **NN**. Phần cao nước **NN** được đưa lên cột diaion HP-20 để loại bỏ các muối vô cơ và đường thu được phần chiết metanol (**NM2**). Các mẫu cao thô chiết bằng etanol 96°, etanol/nước 60% và nước nóng 60-70 °C (**ET**, **ENT**, **NT**) cùng với các mẫu cao chiết phân đoạn của cao chiết còn 96° (**EH**, **ED**, **EE**) và phân đoạn tan trong metanol của cao chiết nước nóng (**NM2**) được thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase theo phương pháp của Fahimeh M. A. và cộng sự [5] với chất đối chứng là acarbose.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc của các hợp chất từ lá cây vôi

Lá khô của cây vôi (*Cleistocalyx operculatus*) được ngâm chiết với EtOH, dịch chiết EtOH được phân bố hai pha lỏng giữa nước cất và các dung môi hữu cơ theo độ phân cực tăng dần. Các phần chiết *n*-hexan, CH₂Cl₂ và EtOAc được phân tách sắc ký trên silica gel cho các chất **1-9**. Trong đó **1** (1-tetratriacontanol) và **4** (betulin) lần đầu tiên được phân lập từ cây vôi, **7** (axit maslinic) lần đầu tiên được phân lập từ lá cây vôi. Tương tự, lá khô của cây vôi (*Cleistocalyx operculatus*) được ngâm chiết với EtOH/nước 60%, dịch chiết EtOH/nước được phân bố hai pha lỏng giữa nước cất và các dung môi hữu cơ theo độ phân cực tăng dần. Phần chiết EtOAc được phân tách sắc ký trên silica gel cho chất **10** (axit arjunolic) là chất chưa được phân lập từ nụ cây vôi của Việt Nam.

Chất **1** được phân lập từ phần chiết *n*-hexan dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ¹H-NMR của **1** cho thấy các tín hiệu cộng hưởng từ proton của một nhóm ankylic mạch dài bao gồm 32 nhóm metylen *sp*³ ở δ_H 1,26 (62H, s br) và 1,56 (2H, m), một nhóm metyl cuối mạch ở δ_H 0,88 (3H, t, *J* = 7,0 Hz), và một nhóm oxymetylen ở δ_H 3,61 (2H, t, *J* = 7,0 Hz). Dữ kiện phổ ¹H-NMR kết hợp với kết quả so sánh TLC và co-TLC với chất chuẩn đã xác định cấu trúc

của **1** là 1-tetratriacontanol ($C_{34}H_{70}O$). Công thức phân tử này phù hợp với phổ ESI-MS ở m/z 493 ($[M-H]^-$) ($C_{34}H_{70}O$). Chất này chưa được phân lập từ nụ cây vôi của Việt Nam.

Công thức phân tử $C_{18}H_{18}O_4$ của **2** được giả thiết từ phổ ESI-MS ở m/z 299 ($[M+H]^+$), 297 ($[M-H]^-$). Phổ 1H -NMR của **2** thấy xuất hiện cụm các tín hiệu của hai nhóm methyl liên kết với vòng thơm ở δ_H 2,07 (3H, s) và 2,12 (3H, s) và một nhóm metoxy ở δ_H 3,65 (3H, s). Các nhóm này được liên kết vào một vòng benzen bị thế sáu lần. Một vòng benzen thế một lần khác được nhận dạng qua cụm các tín hiệu đặc trưng ở δ_H 7,39 (3H, m), 7,63 (2H, dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz). Hai vòng benzen này được liên kết với nhau bằng một cầu etylen [δ_H 7,83 (1H, d, $J = 15,5$ Hz) và 7,97 (1H, d, $J = 15,5$ Hz)] có cấu hình *trans* được xác định bằng hằng số tương tác H_a-H_b lớn ($J = 15,0$ Hz). Sự chuyển dịch độ chuyển dịch hóa học của các proton nối đôi về phía trường thấp cho thấy nó phải được liên hợp với một nhóm cacbonyl, từ đó một cấu trúc chalcon đã được giả thiết cho **2**. Việc xác định vị trí các nhóm thế (2 nhóm methyl, một nhóm hydroxy và một nhóm metoxy) trên vòng A của cấu trúc chalcon này được dựa trên sự tham khảo tài liệu phổ của các chất tương tự. Tín hiệu của nhóm OH ở δ_H 13,6 (1H, s) cho thấy có sự tạo cầu hydro của nhóm này với nhóm cacbonyl chalcon. Từ các phân tích phổ 1H -NMR trên, cấu trúc của **2** đã được xác định là 2',4'-dihydroxy-6'-metoxy-3',5'-dimethylchalcon [6].

Chất **3** được xác định là β -sitosterol dựa vào kết quả đo nhiệt độ nóng chảy, kết quả phân tích so sánh TLC và co-TLC với chất chuẩn.

Phổ 1H -NMR của **4** xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của một nhóm oxymetin ở δ_H 3,18 (1H, dd, $J = 11,0$ Hz, 5,0 Hz), một nhóm hydroxymetyl ở δ_H 3,79 (1H, d, $J = 11,0$ Hz) và 3,33 (1H, d, $J = 11,0$ Hz), một nhóm isopropenyl ở δ_H 4,58 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), 4,68 (1H, s br) và 1,68 (3H, s), và 5 nhóm methyl bậc ba ở δ_H 0,76 (3H, s), 0,83 (3H, s), 0,97 (3H, s), 0,98 (3H, s) và 1,02 (3H, s). Trên cơ sở các dữ kiện phổ NMR, một cấu trúc khung lupan đã được giả thiết cho **4**. Sự xuất hiện của một nhóm hydroxymetyl và một nhóm isopropenyl cho thấy có sự biến đổi của một nhóm methyl (hydroxyl hóa thành hydroxymetyl) và một nhóm isopropyl (thành nhóm isopropenyl) của khung lupan thành khung lup-20(29)-en. Nhóm hydroxy được giả thiết là liên kết vào vị trí C-3 dựa trên sự phát sinh sinh học của các tritecpenoit dãy lupan. Hóa lập thể của nhóm hydroxy ở C-3 đã được xác định là 3β dựa trên hằng số tương tác $J_{ax-ax} = 11,0$ Hz. Các dữ kiện phổ 1H -NMR của **4** hoàn toàn phù hợp với phổ của betulin trong tài liệu tham khảo [7] và mẫu chuẩn.

Phổ ESI-MS của **4** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 443 ($[M+H]^+$) của công thức phân tử $C_{30}H_{50}O_2$. Chất này chưa được công bố từ nụ cây vôi của Việt Nam.

Phổ 1H -NMR của **5** xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng từ đặc trưng cho một nhóm oxymetin ở δ_H 3,16 (1H, dd, $J = 11,0$ Hz, 8,5 Hz), 5 nhóm methyl bậc ba ở δ_H 0,75 (3H, s), 0,83 (3H, s), 0,95 (3H, s), 0,96 (3H, s) và 0,98 (3H, s), và một nhóm isopropenyl ở δ_H 4,59 (1H, s), 4,72 (1H, s) và 1,71 (3H, s). So với phổ 1H -NMR của **4** có thể có sự thay thế nhóm hydroxymetyl ở C-28 bằng một nhóm cacboxyl trong **5**. Trên cơ sở các dữ kiện phổ NMR một cấu trúc khung lup-20 (29)-en-3-ol đã được giả thiết cho **5**. Nhóm hydroxy được giả thiết ở C-3 xuất phát từ sự sinh tổng hợp các lupan tritecpenoit từ squalen 2,3-epoxit. Cũng như ở betulin hóa lập thể 3β H của nhóm này đã được xác định dựa trên các hằng số tương tác của H-3. Các dữ kiện phổ 1H -NMR của **5** đã được so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy các độ chuyển dịch hóa học phù hợp với sự tồn tại của nhóm cacboxyl ở C-28. Do đó, cấu trúc của **5** đã được xác định là axit betulinic [8]. Phổ ESI-MS của **5** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 457 ($[M+H]^+$), 455 ($[M-H]^-$) của công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$.

Phổ 1H -NMR của **6** chỉ ra sự có mặt của 7 nhóm methyl bậc 3 ở dạng singlet ở δ_H 0,77 (3H), 0,78 (3H), 0,86 (3H), 0,90 (3H), 0,91 (3H), 0,93 (3H), 0,98 (3H) và 1,14 (3H), một nhóm oxymetin ở δ_H 3,20 (1H, m) và một proton olefinic ở δ_H 5,27 (1H, t, $J = 3,5$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR, tín hiệu của nhóm cacboxyl ở C-28 xuất hiện ở δ_C 181,3 (s). Các tín hiệu cacbon-13 khác bao gồm một nhóm oxymetin ở δ_C 78,8 (d) và một nối đôi thế ba lần ở δ_C 122,2 (d) và 143,7 (s) phù hợp với tín hiệu proton olefinic ở δ_H 5,24, 7 nhóm methyl (7q), 10 nhóm metylen (10 t), 3 nhóm metin (3d) và 6 cacbon (6s). Như vậy, các tín hiệu này phù hợp với một chất oleanan trong đó một nhóm methyl đã được oxi hóa thành nhóm axit cacboxylic. Độ chuyển dịch hóa học của các cacbon của nối đôi cho thấy vị trí C-12/C-13 của nối đôi này. Nhóm hydroxy được giả thiết liên kết vào C-3 từ sự phát sinh sinh học của các chất này từ squalen qua squalen oxit bằng một phản ứng đóng vòng. Trong trường hợp này nhóm này được định hướng $3b$ do hằng số tương tác $J = 11,0$ Hz của hai proton diaxial. So sánh phổ của **6** với các dữ kiện phổ của các chất oleanen-12-en trong các tài liệu tham khảo đã xác định được cấu trúc của **6** là axit oleanolic [9]. Phổ ESI-MS của **6** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 457 ($[M+H]^+$) và 455 ($[M-H]^-$) của công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$. Axit oleanolic đã được chứng minh có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với giá trị IC_{50} là $6,1 \pm 0,3$ $\mu g/ml$ [4].

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **7** chỉ ra sự có mặt của 7 nhóm methyl bậc 3 ở dạng singlet ở δ_{H} 0,79 (3H), 0,81 (3H), 0,91 (3H), 0,93 (3H), 0,98 (3H), 1,02 (3H) và 1,14 (3H), hai nhóm oxymetin ở δ_{H} 2,95 (1H, d, $J = 10,5$ Hz) và 3,65 (1H, ddd, $J = 11,0$ Hz, 10,5 Hz, 4,5 Hz) và một proton olefinic ở δ_{H} 5,28 (1H, s br). Độ chuyển dịch hóa học proton của nối đôi cho thấy vị trí C-12/C-13 của nối đôi này. Do sự không khác biệt nhiều của các tín hiệu proton của các vòng B, C, D và E của **7** khi được so với axit oleanolic (**6**) các nhóm hydroxy được giả thiết liên kết vào các vị trí C-1, C-2 và C-3 của vòng A. Khi giữ nguyên một nhóm hydroxy ở C-3 và phân tích các hằng số tương tác giữa các proton cacbinol quan sát thấy sự dịch chuyển về phía trường thấp của H-3 từ δ_{H} 3,20 về δ_{H} 2,95; điều này cho giả thiết là nhóm hydroxy còn lại được liên kết vào C-2. Trong trường hợp này các nhóm hydroxy được định hướng *2a* và *3b* do các hằng số tương tác $J = 10,5$ Hz giữa H-3_{axial} và H-2_{axial} và 11,0 Hz giữa H-2_{axial} và H-1_{axial} và 10,5 Hz giữa H-2_{axial} và H-3_{axial}. So sánh phổ $^1\text{H-NMR}$ của **7** với các dữ kiện phổ của các chất oleanen-12-en trong các tài liệu tham khảo được đo trong cùng một dung môi đã xác định chính xác được cấu trúc của **7** là axit maslinic [10]. Phổ ESI-MS của **7** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 473 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 471 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) của công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$. Chất này đã được phân lập từ nụ cây vối của Việt Nam. Axit maslinic đã được chứng minh có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase khá tốt [11].

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **8** cho thấy sự có mặt của 4 nhóm tín hiệu cộng hưởng từ proton ở δ_{H} 6,19 (1H, d, $J = 1,0$ Hz), 6,41 (1H, s br), 6,92 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) và 8,1 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) của 6 proton vòng thơm. Các dữ kiện phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy cấu trúc đặc trưng của một flavonol thế 5,7-dihydroxy ở vòng A và 4'-hydroxy ở vòng B. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của **8** chỉ ra sự có mặt của một nhóm cacbonyl liên hợp α,β không no ở δ_{C} 177,4 (s); 8 cacbon sp^2 trong đó có 4 cacbon liên kết với oxi ở δ_{C} 165,6 (s), 162,5 (s), 160,5 (s), 158,3 (s), 148,1 (s), 137,1 (s), 123,7 (s) và 104,6 (s); và 6 nhóm metin của vòng thơm ở δ_{C} 130,7 (2d), 116,3 (2d), 99,3 (d) và 94,5 (d). Các dữ kiện phổ NMR cho thấy cấu trúc của **8** là kaempferol phù hợp hoàn toàn với phổ của tài liệu tham khảo được đo trong cùng một dung môi [12]. Phổ ESI-MS của **8** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 287 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 285 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) của công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Kaempferol đã được chứng minh có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 55 ± 5 mM [11].

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) của **9** cho thấy sự có mặt của 5 nhóm tín hiệu cộng hưởng từ proton ở δ_{H} 6,21

(1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,9 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,65 (1H, dd, $J = 9,0$ Hz) và 7,75 (1H, d, $J = 2,0$ Hz). Các tín hiệu này đặc trưng cho một cấu trúc khung flavonol với vòng A bị thế 5,7-dihydroxy và vòng B có phần cấu trúc catechol (3',4'-dihydroxy). Các dữ kiện phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy cấu trúc của **9** là quercetin, chồng khít với phổ của tài liệu tham khảo được đo trong cùng một dung môi [13]. Phổ ESI-MS của **9** cho các pic giả ion phân tử ở m/z 303 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) và 301 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) của công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. Chất này đã được phân lập từ nụ cây vối của Việt Nam. Quercetin đã được chứng minh có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase khá tốt với giá trị IC_{50} là 29,4 mM [14].

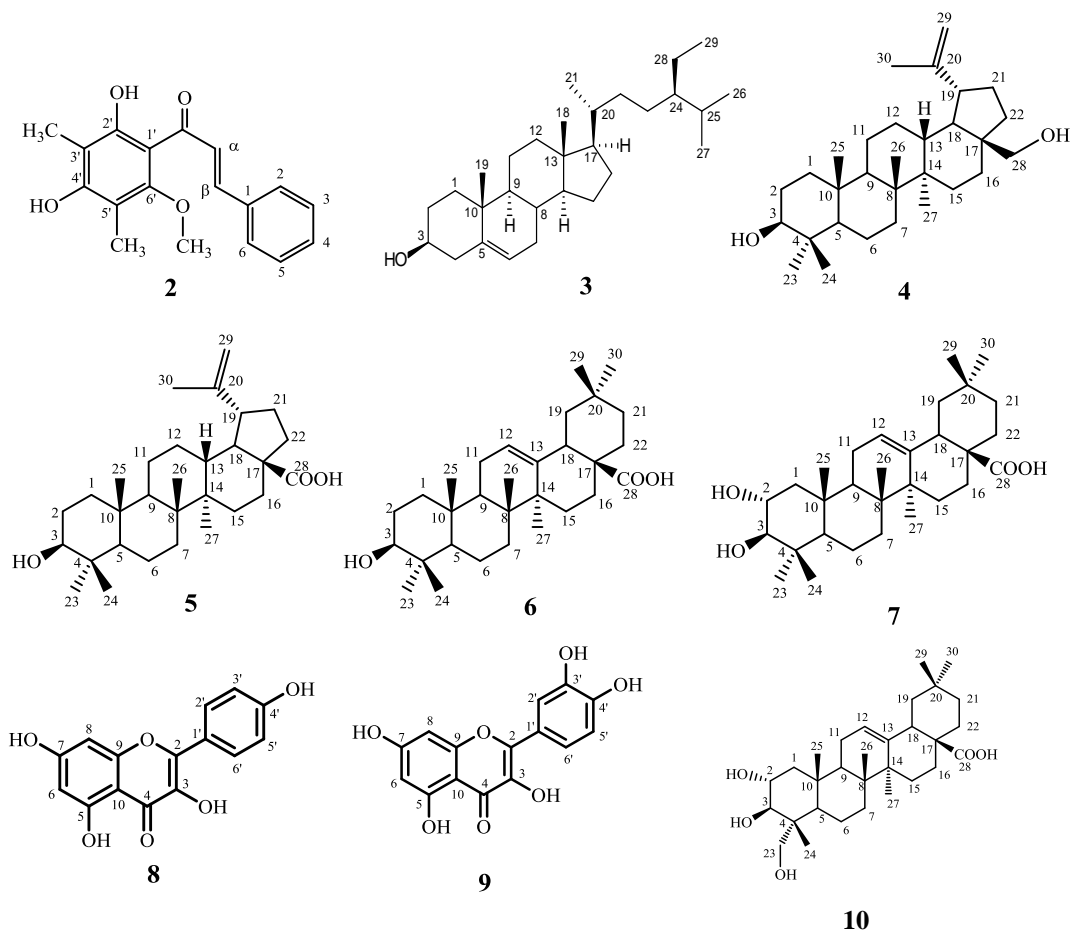
Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) của **10** chỉ ra sự có mặt của 6 nhóm methyl bậc 3 ở dạng singlet ở δ_{H} 0,72 (3H, s), 0,86 (3H, s), 0,95 (3H, s), 0,98 (3H, s), 1,10 (3H, s), 1,22 (3H, s), hai nhóm oxymetin ở δ_{H} 3,37 (1H, d, $J = 9,5$ Hz), 3,71 (1H, m) và một proton olefinic ở δ_{H} 5,28 (1H, t, $J = 3,5$ Hz). Độ chuyển dịch hóa học proton của nối đôi cho thấy vị trí C-12/C-13 của nối đôi này. Do không có sự khác biệt nhiều của các tín hiệu proton và cacbon-13 ở các vòng B, C, D và E của **10** khi được so sánh với axit maslinic (**7**), các nhóm hydroxy được giả thiết liên kết vào các vị trí C-2 và C-3 của vòng A. Khi giữ nguyên một nhóm hydroxy ở C-3 và phân tích các hằng số tương tác giữa các proton cacbinol quan sát thấy sự dịch chuyển về phía trường thấp của H-3 từ δ_{H} 3,2 về δ_{H} 2,95; điều này cho giả thiết là nhóm hydroxy còn lại được liên kết vào C-2. Trong trường hợp này các nhóm hydroxy được định hướng *2a* và *3b* do các hằng số tương tác $J = 9,5$ Hz giữa H-3_{axial} và H-2_{axial} và 11,5 Hz giữa H-2_{axial} và H-1_{axial} và 9,5 Hz giữa H-2_{axial} và H-3_{axial}. Sự thiếu hụt một nhóm methyl được giải thích bằng các tín hiệu của một hệ AB với hằng số tương tác $J = 11,0$ Hz của nhóm hydroxymetyl ở C-23. Một cách tương ứng tín hiệu cộng hưởng cacbon-13 của C-24 được chuyển dịch về trường cao từ δ_{C} 17,6 của axit maslinic về δ_{C} 13,9 của axit arjunolic. Các tín hiệu cacbon-13 còn lại cũng hoàn toàn phù hợp với phổ được công bố của chất này với 30 tín hiệu cacbon-13 bao gồm 6 nhóm methyl CH_3 , 10 nhóm metylen CH_2 , 3 nhóm metin CH , 2 nhóm oxymetin ở δ_{C} 69,9 (d) và 78,1 (d), một nhóm oxymetylen ở δ_{C} 66,2 (t), một nối đôi thế ba lần ở δ_{C} 123,4 (t) và 145,4 (s) và một nhóm cacboxyl ở δ_{C} 181,8 (s).

So sánh phổ $^1\text{H-NMR}$ của **10** với các dữ kiện phổ của các chất oleanen-12-en trong các tài liệu tham khảo được đo trong cùng một dung môi đã xác định chính xác được cấu trúc của **10** là axit arjunolic [15]. Chất này chưa được phân lập từ nụ cây vối của Việt Nam.

3.2. Thử hoạt tính các cao chiết từ lá vôi

Kết quả thử hoạt tính (bảng 1) cho thấy các mẫu ET, ENT, EE, NT và NM2 đều có hoạt tính tốt với

giá trị IC_{50} từ 13,83-64,67 $\mu\text{g/ml}$. So sánh 3 mẫu cao thô thì thấy cao chiết nước và cao chiết etanol 96° có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase tốt nhất với giá trị IC_{50} là 13,83 và 24,87 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 1: Cấu trúc của các hợp chất 1-10

Bảng 1: Kết quả thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các cao chiết

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	% Ức chế							
	ED	ET	EH	ENT	EE	NT	NM2	Acarbose
1000	28,49	90,44	48,78	95,12	91,12	92,68	91,71	89,76
200	7,56	88,29	34,15	90,24	75,61	90,44	88,04	32,82
40	2,44	56,59	19,76	34,15	29,51	68,29	59,66	8,07
8	1,95	27,12	9,02	14,88	14,63	36,59	22,95	3,19
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	>1000	24,87	>1000	46,67	64,67	13,83	26,27	135,70

Acarbose được thử nghiệm ở các nồng độ 500, 100, 20 và 4 $\mu\text{g/ml}$.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lần đầu tiên phân lập được 1-tetra-29,30-dihydroxy-29,30-dimethyltriacontanol, betulin từ cây vôi và axit maslinic từ lá cây vôi (*Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry) trong tổng số ba flavon: 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (2), kaempferol (8), quercetin (9); năm terpenoit: betulin (4), axit betulinic (5), axit oleanolic (6), axit maslinic (7), axit arjunolic (10) cùng với 1-tetra-

triacontanol (1) và β -sitosterol (3) đã phân lập. Kết quả thử hoạt tính cho thấy các cao chiết thô đều có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase tương đối tốt, trong đó cao chiết nước và cao chiết etanol có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase tốt nhất với giá trị IC_{50} là 13,83 và 24,87 $\mu\text{g/ml}$.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được tài trợ bởi kinh phí NSNN trong đề tài cấp Bộ Công Thương năm 2013-2014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, trang 423 (2000).
- Hà Thị Bích Ngọc. *Điều tra nghiên cứu một số thực vật Việt Nam có tác dụng hỗ trợ điều hòa lượng đường trong máu để ứng dụng cho bệnh nhân đái tháo đường type 2*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (2011).
- Min B. S., Cuong T. D., Lee J. S., Shin B. S., Woo M. H., Hung T. M. *Cholinesterase inhibitor from Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry Bubs*, Arch. Pharm. Res., **33(10)**, 1665-1670 (2010).
- Nguyễn Thị Kim Tuyền, Nguyễn Văn Thanh, Hoàng Văn Lữ, Chu Đình Kính. *Tách và xác định cấu trúc một số hợp chất từ nụ và hoa cây với Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr.et Perry*, Tạp chí Dược học, **(405)**, 44-46 (2010).
- Fahimeh M. A., Behavar Asghari, Soodabeh Saeidnia, Yusef Ajani, Mobina Mirjani, Maryam Malmir, Reza Dolatabadi Bazaz, Abbas Hadjiakhoondi, Peyman Salehi, Mattias Hamberge. *In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of Polygonum hyrcanicum*. DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences, 20-37 (2012).
- E. C. Amor, I. M. Villasenor, A. Yasin, M. I. Choudhary. *Prolyl endopeptidase inhibitors from Syzygium samarangense (Blume) Merr. & L. M. Perry*, Z. Naturforsch., **59c**, 86-92 (2004).
- A. Tijjani, I. G. Ndukwe, R. G. Ayo. *Isolation and characterization of lup-20(29)-ene-3,28-diol (betulin) from the stem-bark of Adenium obesum (Apocynaceae)*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, **11**, 159-262 (2012).
- A. M. Ayatollahi, M. Ghanadian, S. Afsharypour, O. M. Abdella, M. Mirzai, G. Askari. *Pentacyclic triterpenes in Euphorbia microsciadia with their T-cell proliferation activity*, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, **10**, 287-294 (2011).
- Z. Guvenalp, H. Ozbek, A. Kuruuzum-Uz, C. Kazaz, L. O. Demirezer. *Secondary metabolites from Nepeta heliotropifolia*, Turk. J. Chem., **33**, 667-675 (2009).
- J. C. A. Tanaka, G. J. Vidotti, C. C. da Silva. *A new tormentic acid derivative from Luchea divaricata Mart. (Tuliaceae)*, J. Braz. Chem. Soc., **14**, 475-478 (2003).
- Benalla W., Bellahcen S., Bnouham M. *Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors*, Current Diabetes Reviews, **6(4)**, 247-254 (2010).
- F. M. Soliman, A. H. Shehata, A. E. Khalael, S. M. Ezzat. *An acylated kaempferol glycoside from flowers of Foeniculum vulgare and F. Dulce*, Molecules, **7**, 245-251 (2002).
- V. S. Naidu, P. M. M. S. Kinthada, P. Kalyani, P. Muralidhar. *Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anticancer drugs*, Int. J. Pharm. Biomed. Sci., **3**, 24-27 (2012).
- Kumar S., Narwal S., Kumar V., Prakash O. *α -glucosidase inhibitor from plants: A natural approach to treat diabetes*, Pharmacognosy Review, **5(9)**, 19-29 (2011).
- Use of arjunolic acid in preparing glucosidase inhibitor*, Patent CN101416970A, Apr. 29, 2009.

Liên hệ: Trương Thị Tố Chinh

Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

Số 2, Phạm Ngũ Lão, Hoàn Kiếm, Hà Nội

E-mail: truongthitochinh@gmail.com; Điện thoại: 0914523885.