

Thành phần hóa học của cây Ngọc cầu (*Balanophora laxiflora* Hemsl.) thu tại Tuyên Quang

Phần 1. Thành phần hóa học của các cận chiết ít phân cực

Trần Đức Đại¹, Nguyễn Quyết Tiến^{1*}, Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Nguyễn Quảng An¹,
Trương Thị Thanh Nga¹, Trịnh Thị Thủy¹, Nguyễn Thị Tuyết², Đặng Ngọc Quang³

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Tân Trào Tuyên Quang

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Đến Tòa soạn 03-11-2016; Chấp nhận đăng 6-02-2017

Abstract

Balanophora laxiflora Hemsley has been used in Vietnamese folk medicine for clearing away heat and toxic, neutralizing the effect of alcoholic drinks, and as a tonic for the treatment of hemorrhoids, stomachache and hemoptysis. Phytochemical investigation of the nonpolar solvent extracts of *Balanophora laxiflora* led to the isolation of fatty substance 1-hexacosanoylglycerol (1), daucosterol (2), methyl gallate (3), three cinnamic acid analogues: 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (4), methyl 4-hydroxy cinnamate (5), and methyl caffeate (6). Their chemical structures were confirmed by spectroscopic methods including IR, MS, 1D, 2D NMR and compared to previous reported spectral data values.

Keywords. *Balanophora laxiflora*, derivatives of cinnamic acid, lignan, methyl gallate, daucosterol.

1. MỞ ĐẦU

Cây ngọc cầu (*Balanophora laxiflora* Hemsley) hay còn được gọi là nấm tủa dương, cây cu chó, cây dó đất, hoa tuyết sơn, pì lìn. Trong y học dân gian, ngọc cầu được sử dụng để tăng cường sinh lý, bổ thận tráng dương, ích tinh huyết, mạnh tình dục, bổ tỳ vị, nhuận tràng, thông tiểu. Chủ trị yếu sinh lý, liệt dương, lãnh cảm, đau lưng, mỏi gối, biếng ăn [1-3]. Về thành phần hóa học trong cây Ngọc cầu người ta phát hiện các chất béo, dẫn xuất axit cinnamic, tannin, lignan, glycosid,... [4-6].

Theo những nghiên cứu hiện đại, ngọc cầu chứa một số hợp chất có khả năng chống oxi hóa, ức chế HIV, hạ đường huyết, khả năng gây độc tế bào một số dòng ung thư [7-9]. Bài này sẽ thông báo việc phân lập, xác định thành phần hóa học từ cận chiết *n*-hexan, etyl axetat của cây Ngọc cầu thu tại Tuyên Quang.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

- Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên

bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck-Đức). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 368 nm, thuốc thử axit sunfuric (H₂SO₄ + metanol + vanilin) hoặc dung dịch Ce₂SO₄, sấy ở nhiệt độ > 100 °C cho đến khi hiện màu.

- Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ pha thường (Silica gel 60-160 và 240-430 mesh, Merck).

Phổ IR (KBr) được ghi trên máy IMPACT 410.

- Điểm chảy được đo trên máy Electrothermal IA-9200 (Anh).

- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS đo trên máy phổ khối FT-ICR/MS.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer.

Phổ MS, NMR đo tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Mẫu thực vật

Ngọc cầu (17 kg toàn cây tươi) được thu hái tháng 12/2014 tại vùng núi Na Hang – Tuyên Quang. Tên khoa học là *Balanophora laxiflora* Hemsley được PGS.TS. Đỗ Hữu Thư, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật xác định. Tiêu bản

(BL-VH14) được giữ tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Chiết và phân lập các chất

Mẫu Ngọc cẩu sậy khô (6,0 kg), nghiền nhỏ ngâm chiết với MeOH (5 lần) trong thiết bị siêu âm, ở nhiệt độ phòng, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 1,8 kg cặn thô MeOH. Cặn này được hòa vào 1 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexan, diclometan, etyl axetat sau đó cô khô dịch cái và hòa tan lại bằng metanol thu được các cặn chiết tương ứng: cặn *n*-hexan (ký hiệu là BLH, 800g), cặn diclometan (BLD, 41 g), cặn etyl axetat (BLE, 194 g) và cặn metanol (BLM, 665 g). Các cặn *n*-hexan, diclometan, etyl axetat được phân tách trên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải như sau: cặn BLH với hệ *n*-hexan-etyl axetat có độ phân cực tăng dần, cặn BLD là (CHCl₃:MeOH) có độ phân cực tăng dần (100:0→1:1); cặn BLE sử dụng hệ dung môi rửa giải (EtOAc:MeOH:H₂O) = (80:20:2), (75:20:2), (70:20:2), ... (40:20:2) để thu các phân đoạn. Sau khi tinh chế bằng chạy lại cột silica gel pha thường lập lại hoặc kết tinh lại từ các phân đoạn thu được các hợp chất sạch, ký hiệu là: BLH-74 (115 mg); BLE-7 (89 mg); BLE-9 (63 mg); BLD-20 (40 mg); BLD-34 (53 mg); BLD-56 (210 mg).

Hợp chất 1 (BLH-74): 1-Hexacosanoylglycerol

Chất bột trắng (115 mg), nhiệt độ nóng chảy 98-101 °C. FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3391 (rộng, OH); 2935; 1714; 1695 (C=O); 1282-1078 (C-O-C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ δ ppm): 0,88 (3H; *t*; 7,0 Hz; H-26'), 1,26-1,30 (br, các CH₂ phân axit béo); 1,62 (*m*, CH₂); 2,35 (2H, *t*, 7,5 Hz, H-2'); 3,95/4,04 (2H, *dd*, 6,5 Hz/4,5 Hz; H-3); 4,11/4,14 (2H, *dd*, 6,5 Hz/5,0 Hz, H-1); 4,31 (1H, *m*, H-2). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 14,1 (C-26'); 25,2 (C-25); 28,1-28,8 (các CH₂); 32,3 (C-24'); 33,4 (C-2'); 65,1 (C-3); 70,3 (C-2); 65,3 (C-1); 173,8 (C-1').

Hợp chất 2 (BLE-7): Daucosterol

Chất bột trắng (89 mg), điểm nóng chảy 287-289 °C. FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3390 (rộng, OH); 2934; 1644; 1461; 1373; 1073; 1026. EI-MS (*m/z*): 396 [M-C₆H₁₂O₆]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆); δ (ppm): 3,50 (1H; *m*; H-3); 5,26 (1H, *dd*, 5,0 và 2,0 Hz, H-6); 1,01 (3H; *s*; H-18); 0,91 (3H; *d*; 6,6 Hz, H-21); 0,83 (3H; *d*; 7,1 Hz; H-26); 0,80 (3H; *d*; 6,6 Hz; H-27); 0,81 (3H; *t*; 7,0 Hz, H-29); 0,67 (3H; *s*; H-19). Phần đường: 4,23 (1H; *d*; 8,0 Hz; H-1'); 3,40 (1H, *m*, H-2); 3,70 (1H, *m*, H-3); 3,19 (1H, *m*, H-4); 3,67 (1H, *m*, H-5); 3,90 (1H, *dd*, 12,5; 1,5 Hz; H-6'a); 3,87 (1H, *dd*, 12,5; 5 Hz; H-6'b). ¹³C-NMR

(125MHz, DMSO-*d*₆); δ (ppm): Phần genin: 36,3 (C-1); 27,9 (C-2); 76,8 (C-3); 38,4 (C-4); 140,6 (C-5); 121,3 (C-6); 31,7 (C-7); 31,5 (C-8); 50,7 (C-9); 35,6 (C-10); 21,0 (C-11); 36,9 (C-12); 45,2 (C-13); 56,3 (C-14); 23,9 (C-15); 29,4 (C-16); 55,5 (C-17); 11, 9 (C-18); 19,8 (C-19); 33,4 (C-20); 19,6 (C-21); 31,5 (C-22); 28,8 (C-23); 49,7 (C-24); 25,5 (C-25); 19,0 (C-26); 20,7 (C-27); 22,7 (C-28); 12,2 (C-29); Phần đường: 100,9 (C-1'); 77,1 (C-3'); 76,8 (C-5'); 73,6 (C-2'); 70,2 (C-4'); 61,2 (C-6').

Hợp chất 3 (BLE-9): Metyl gallat

Dạng bột màu trắng vô định hình. FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3396 (rộng, OH); 2935 (C-H no); 1713 (C=O); 1281-1076 (C-O-C). ESI-MS: *m/z*: 185,15 [M + H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ δ ppm): ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD δ ppm): 7,06 (2H; *s*; H-2,6); 3,83 (3H; *s*; OCH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD); δ (ppm): 121,5 (C-1); 110,1 (C-2,6); 146,5 (C-3,5); 139,8 (C-4); 169,0 (C-7).

Hợp chất 4 (BLD-20): 4-Hydroxy-3-methoxycinnamandehid

Dạng tinh thể hình kim từ dịch diclometan (30 mg). FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3397 (rộng, OH); 2937-2878; 1708; (C=O); ESI-MS: *m/z*: 179,15 [M+H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ δ ppm): 7,07 (1H; *d*; 2,0 Hz; H-2); 6,96 (1H; *d*; 8 Hz; H-5); 7,12 (1H; *dd*, 8,0; 2,0 Hz; H-6); 6,60 (1H; *dd*; 7,5; 16,0 Hz; H-8); 7,40 (1H; *d*; 16 Hz; H-7); 9,67 (1H; *d*; 7,5 Hz; H-9); 3,94 (1H; *s*; 3-OCH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 56,0 (OCH₃); 126,6 (C-1); 109,5 (C-2); 149,0 (C-3); 147,0 (C-4); 115,0 (C-5); 124,0 (C-6), 153,2 (C-7); 126,3 (C-8); 193,7 (C-9).

Hợp chất 5 (BLD-34): Metyl 4-hydroxy cinnamate

Dạng tinh thể hình lập phương từ dịch diclometan (41 mg). FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3401 (rộng, OH); 2933; 1704; (C=O); 1284-1072 (C-O-C). ESI-MS: *m/z*: 179,21 [M+H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ δ ppm): 7,43 (2H; *d*; 8,5 Hz; H-2/H-6); 6,85 (2H; *d*; 8,5 Hz; H-3/H-5); 7,64(1H; *d*; 16,0 Hz; H-7); 6,30 (1H, *d*, 16,0 Hz, H-8); 3,80 (3H; *s*; OCH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 51,60 (OCH₃); 126,7 (C-1); 130,0 (C-2/C-6); 116,0 (C-3/C-5); 158,5 (C-4), 144,8 (C-7); 114,8 (C-8); 168,0 (C-9).

Hợp chất 6 (BLD-56): Metyl caffeate

Dạng tinh thể hình lục giác từ diclometan (203 mg). FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3398-2531 (rộng, OH); 2931; 1718 (C=O). ESI-MS: *m/z*: 195,20 [M + H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ δ ppm): 7,06 (1H; *d*; 2,0 Hz; H-2); 6,83 (1H; *d*; 8,0 Hz; H-5); 6,94 (1H; *dd*;

2,0; 8,0 Hz; H-6); 7,57 (1H; *d*; 16,0 Hz; H-7); 6,23 (1H; *d*; 16,0 Hz; H-8); 3,80 (3H; *s*; OCH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 51,56 (OCH₃); 126,8 (C-1); 113,9 (C-2); 145,4 (C-3); 147,2 (C-4); 115,1 (C-5); 122,0 (C-6); 144,6 (C-7); 114,4 (C-8); 168,3 (C-9).

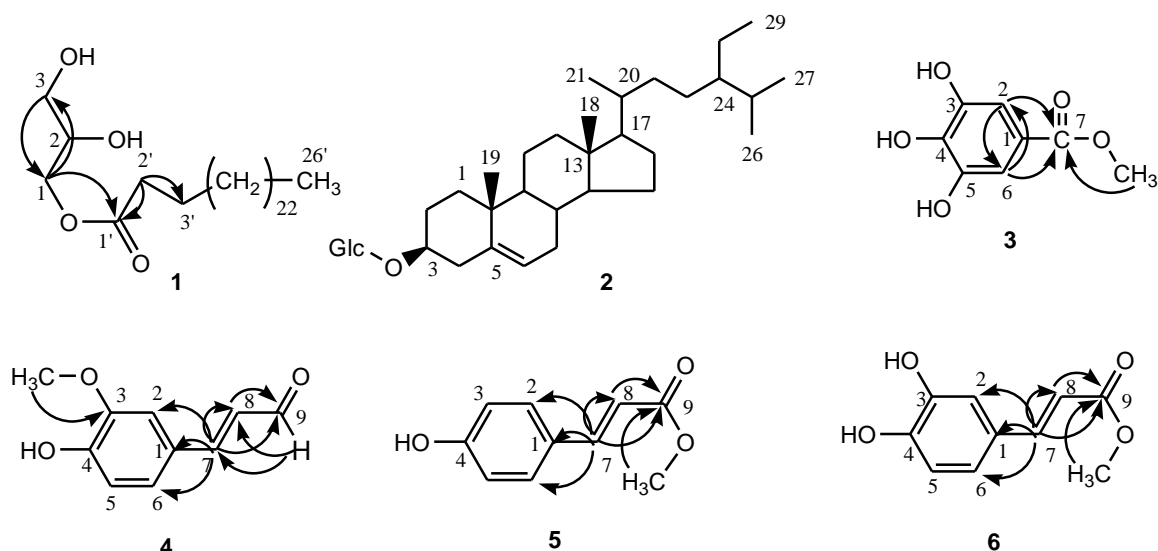
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** thu được từ dịch *n*-hexan. Công thức phân tử của **1** là C₂₉H₅₈O₄ được xác định qua pic ion tại *m/z* 471,76 [M+H]⁺ ở phổ khối ESI-MS kết hợp với dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-DEPT. Quan sát và phân tích tổng thể các phổ 1D và 2D NMR của chất **1** có thể khẳng định nó là 1 dẫn xuất glycerol với một nhóm thế ở vị trí C-1. Các tín hiệu carbinol ở δ_H/δ_C : 3,58/3,68 (2H, *dd*, 5,5 Hz/4,0 Hz; H₂-3)/65,1 (C-3); 4,13/4,22 (2H, *dd*, 6,5 Hz/5,5 Hz; H₂-1)/65,3 (C-1); 3,93 (1H, *m*, 1H-2)/70,3 (C-2), gợi ý cho thấy đây là một dẫn xuất glycerol. Nhóm thế ở C-1 của glycerol là gốc axit gồm 1 axit béo. Phân tích các phổ ¹H-, ¹³C, DEPT, HSQC và HMBC NMR của **1** có thể khẳng định phần axit được xác định là axit

Thành phần hóa học của cây Ngọc cẩu. Phần 1.

hexacosanoic trên cơ sở công thức phân tử của **1** được loại đi phần glycerol và kết hợp phân tích phổ 1D, 2D-NMR. Theo đó, nhóm cacbonyl xuất hiện ở δ_C 173,6; tín hiệu triplet ở δ_H 0,88 (3H, *t*, *J* = 7 Hz, δ_C 14,1) cho thấy mạch nhánh có nhóm methyl ở đầu mạch; các nhóm metylen CH₂ còn lại nằm trong khoảng δ_C 30,1-32,2. Để xác định vị trí liên kết của axit với glycerol dựa trên các tương tác xa HMBC của các proton H-1 với nhóm cacbonyl của axit. Các tương tác xa chính quan sát được trong chất **1** xem hình 1. Trên cơ sở các phân tích số liệu phổ của **1** như trên và so sánh với phổ dẫn xuất của hexacosanoyl [9], có thể khẳng định cấu trúc chất **1** là 1-hexacosanoylglycerol (glycerol 1-hexacosanoat).

Hợp chất **2** (BLE-7) thu được từ dịch etyl axetat, điểm chảy của hỗn hợp BLE-7 với daucosterol chuẩn cho điểm chảy không thay đổi và so sánh các dữ liệu phổ của nó với phổ ¹H-, ¹³C-NMR của hợp chất β -sitosteryl 3-*O*- β -D-glucopyranosid (daucosterol) cho độ trùng khớp phù hợp [10]. Do vậy, hợp chất **2** được xác định là daucosterol (hình 1).



Hình 1: Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của các hợp chất **1**, **3-6**

Hợp chất **3** (BLE-9) thu được từ dịch etyl axetat. Phổ FT-IR cho biết thêm các dao động đặc trưng của nhóm OH ở ν_{\max} 3396 cm⁻¹ (rộng, tù), và nhóm cacbonyl ν_{\max} 1713 cm⁻¹ (C=O) và 2935 (C-H no); 1281-1076 (C-O-C). Kết hợp số liệu phổ ¹H-, ¹³C-DEPT và pic giả phân tử *m/z* 185,15 [M+H]⁺ ở phổ ESI-MS, đã xác định được công thức phân tử của **3** là C₈H₈O₅. Phổ ¹H-NMR của **3** (đo trong CD₃OD) khá đơn giản, chỉ có một tín hiệu singlet của proton thơm ở δ_H 7,06 (2H; *s*; H-2/6) và tín hiệu còn lại là của nhóm metoxy (δ_H 3,83, 3H, *s*, OCH₃). Phổ ¹³C-NMR cho 4 tín hiệu của carbon thơm ở δ_C 121,5

(C-1); 110,1 (C-2/C-6); 146,5 (C-3/C-5); 139,8 (C-4) và 1 tín hiệu của carbon cacbonyl ở 169,0 (C-7). Kết hợp số liệu phổ có thể dự đoán chất **3** là một dẫn xuất của axit gallic. Phổ HMBC cho tương tác của nhóm methoxy với với nhóm cacbonyl (δ_H 3,83 → δ_C 169,0) (hình 1), cho phép xác định được cấu trúc của **3** là methyl este của axit gallic (methyl gallat).

Các hợp chất **4**, **5** và **6** được tách ra từ cặn chiết diclometan. Phổ ¹H-NMR của ba hợp chất này có điểm chung là đều có một cặp *doublet* với hằng số tương tác *J* = 16 Hz, cho thấy phân tử có một nối đôi

có cấu hình *trans*. Phổ ^{13}C -NMR đều có tín hiệu của 10 cacbon trong đó có một nhóm cacbonyl và một nhóm metoxy, gợi ý rằng chúng là các dẫn xuất của axit *trans*-cinnamic.

Phổ ESI-MS của **4** cho pic ion giả phân tử ở m/z 179,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết hợp với số liệu phổ ^1H -, ^{13}C -NMR và DEPT, xác định được công thức phân tử là $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$. Phân tích số liệu phổ ^1H -, ^{13}C -NMR và HSQC cho thấy trong phân tử **4** có 8 tín hiệu cacbon olefin ở $\delta_{\text{C/H}}$: 126,6 (C-1); 109,5/7,07 (C-2); 149,0 (C-3); 147,0 (C-4); 115,0/6,96 (C-5); 124,0/7,12 (C-6); 153,2/7,40 (C-7); 126,3/6,60 (C-8) và một nhóm cacbonyl thuộc nhóm andehid xuất hiện ở $\delta_{\text{C/H}}$ 193,7/9,67 (C-9). Phổ FT-IR ν_{max} (cm^{-1}) khẳng định thêm các nhóm chức qua các đỉnh hấp thụ ở ν_{max}^* 3397 (rộng, OH); 2937-2878 (C-H); 1708; (C=O). Trên cơ sở các phân tích trên kết hợp với so sánh các dữ liệu của 4-hydroxy-3-metoxycinnamandehid, đã xác định được hợp chất **4** chính là 4-hydroxy-3-metoxycinnamandehid (coniferaldehyde) [8].

Bằng cách phân tích số liệu phổ tương tự như đối với chất **4** và so sánh với số liệu phổ đã công bố, chất **5** (BLD-34) và **6** (BLD-56) được xác định lần lượt là metyl 4-hydroxy cinnamat và metyl caffeat [7-9].

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký cột lặp lại đã phân lập được 6 hợp chất từ các phân đoạn *n*-hexan, etyl acetat và diclometan của cây Ngọc cầu (*Balanophora laxiflora*). Kết hợp các phương pháp phổ hồng ngoại, phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều, hai chiều, và so sánh dữ liệu phổ của chúng với tài liệu đã được công bố, đã xác định được cấu trúc hóa học của chúng là 1-hexacosanoylglycerol (**1**), daucosterol (**2**); metyl gallate (**3**), 4-hydroxy-3-metoxycinnamaldehyd (**4**), metyl 4-hydroxy cinnamat (**5**) và metyl caffeate (**6**). Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài Ngọc cầu ở Việt Nam [11].

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cơ sở Viện Hóa học, mã số VHH.2016.2.7.

Liên hệ: Nguyễn Quyết Tiên

Viện Hóa học

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

E-mail: nqtienvhh@gmail.com; Điện thoại: 01676473616.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích và cộng sự, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, T1, Tr. 555 (2006).
2. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Tr. 914 (2000).
3. Cẩm Thị Ính, Nguyễn Thị Hồng Vân, Trần Thị Quỳnh Trang, Phan Anh Tuấn, Nguyễn Thanh Hương, Phạm Quốc Long. *Nghiên cứu thành phần hóa học dịch chiết etyl acetat của cây tóa dương (Balanophora laxiflora Hemsl.) ở Việt Nam*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, **52(5A)**, 96-100 (2014).
4. Gai-Mei She, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang. *Phenolic Constituents from Balanophora laxiflora with DPPH Radical-Scavenging Activity*, Chemistry Biodiversity, **6(6)**, 875-880 (2009).
5. Xiaohong Wang, Zizhen Liu, Wenlin Qiao, Ruiyang Cheng, Bin Liu and Gaimei She. *Phytochemicals and biological studies of plants from the genus Balanophora*, Chemistry Central Journal, **10**, 1186-1752 (2012).
6. Jiang ZH., Wen XY., Tanaka T., Wu SY., Liu Z., Iwata H., Hirose Y., Wu S., Kouno I. *Cytotoxic Hydrolyzable Tannins from Balanophora japonica*, J. Nat. Prod., **71(4)**, 719-723 (2008).
7. Wen-Fei Chiou, Chien-Chang Shen and Lie-Chwen Lin. *Anti-Inflammatory Principles from Balanophora laxiflora*, Journal of Food and Drug Analysis, **19(4)**, 502-508 (2011).
8. Shang-Tse Ho, Yu-Tang Tung, Chi-Chang Huang, Chao-Lin Kuo, Chi-Chen Lin, Suh-Ching Yang, and Jyh-Horng Wu. *The Hypouricemic Effect of Balanophora laxiflora Extracts and Derived Phytochemicals in Hyperuricemic Mice*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2012**, 1-7 (2012).
9. Babady-Byla, Werner Herz. *Triterpenes and 1-(ω -hydroxyceranyl)glycerols from Pentaclethra eetveldeana root bark*, Phytochemistry, **42(2)**, 501-504 (1996).
10. Klimek B., Modnicki D. *Terpenoids and sterols from Nepeta cataria L. var. citriodora (Lamiaceae)*, Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, **62(3)**, 231-235 (2005).
11. *Từ điển Hóa hợp chất thiên nhiên* (Dictionary of Natural Products on DVD) (2012).