

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC LÁ CÂY SƠN TRÀ POILANE (*ERIOBOTRYA POILANEI* J.E. VID.), HỌ HOA HỒNG (ROSACEAE)

II. TRITERPEN KHUNG URSAN VÀ OLEAN

Đinh Gia Thiện¹, Nguyễn Thị Hoàng Anh², Trần Văn Sung²

¹Trường THPT Lê Quý Đôn – TP Tam Kỳ - Tỉnh Quảng Nam

²Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 18-3-2011

Abstract

Three triterpenes with the ursane and oleanone skeleton were isolated from acetylated fraction of *Eriobotrya poilanei*'s leaves. Their structures were elucidated by analysis of MS, NMR spectra and comparison with the published data as 2 α ,3 β -diacetat-12 oleanen-28-oic acid; 1 β ,2 β ,3 β -triacetat-19 α -hydroxy 12-ursanen-28-oic acid; 1 β ,3 β -diacetat-19 α -hydroxy-2-oxo 12-ursanen-28-oic acid.

1. MỞ ĐẦU

Chi Sơn trà (*Eriobotrya*), họ Hoa hồng (Rosaceae) là một chi nhỏ có xuất xứ từ đông và đông nam châu Á. Ở Việt nam, theo tác giả Phạm Hoàng Hộ, chi Sơn trà gồm có 13 loài được phân bố ở nhiều nơi trong cả nước [1]. Cho đến nay, các công bố khoa học về chi này chủ yếu đề cập đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài Sơn trà Nhật Bản hay Tỳ bà điệp (*Eriobotrya japonica* Lindl., tên tiếng anh là Loquat). Ví dụ như hoạt tính chống oxi hóa của các triterpen axit hay hoạt tính chống khối u của các hợp chất megastigman glycosit và polyphenol phân lập từ lá cây *E. japonica* [2, 3].

Năm 2010, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã công bố kết quả nghiên cứu ban đầu về thành phần hóa học của cây Sơn trà Poilane [4]. Bài báo này công bố việc phân lập và xác định cấu trúc của 3 triterpen acid dưới dạng dẫn xuất axetat từ dịch chiết EtOAc lá cây Sơn trà Poilane. Đó là: 2 α ,3 β -diacetat-12-oleanen-28-oic axit, 1 β ,2 β ,3 β -triacetat-19 α -hydroxy-12-ursanen-28-oic axit và 1 β ,3 β -diacetat-19 α -hydroxy-2-oxo-12-ursanen-28-oic axit.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz, phổ khối ESI-MS được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD Trap tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sắc ký bản mỏng được tiến hành trên bản

silica gel Merck 60F₂₅₄. Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 0,04 - 0,063 mm.

2.2. Mẫu thực vật

Mẫu được thu hái tại rừng quốc gia Bì Dúp, Núi Bà thuộc tỉnh Lâm Đồng vào tháng 3 năm 2009, do TS. Nguyễn Tiến Hiệp – Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam xác định tên khoa học.

2.3. Chiết mẫu thực vật và phân lập các chất

Mẫu lá (1800 g) được sấy khô, nghiền nhỏ và ngâm chiết 3 lần trong hỗn hợp metanol/nước (85/15) ở nhiệt độ phòng. Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm, dịch nước còn lại được chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, etyl axetat, butanol. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn dịch chiết tương ứng với khối lượng là 12, 110 và 130 g.

Qua nghiên cứu sơ bộ dịch chiết EtOAc lá cây Sơn trà Poilane, chúng tôi thấy hàm lượng ursolic axit và pomolic acid trong dịch chiết là khá lớn, gây ảnh hưởng đến việc phân tách những chất còn lại. Do đó, chúng tôi đã tìm cách kết tinh để loại bỏ bớt chúng như sau: hòa tan hoàn toàn 29 g cặn chiết EtOAc trong 120 ml hỗn hợp EtOAc/MeOH = 1/1, sau đó cho thêm 70 ml *n*-hexan thì thấy hỗn hợp bắt đầu đục, để trong tủ lạnh qua đêm, lọc lấy phần kết tủa. Phần dịch lọc tiếp tục tạo tủa bằng *n*-hexan 2 lần nữa. Dịch lọc cuối cùng được loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được 19 g chất. Tinh chế 19 g chất này bằng cột silica gel, hệ dung môi

n-hexan/CH₂Cl₂/MeOH theo các tỉ lệ có độ phân cực tăng dần thu được 17 phân đoạn.

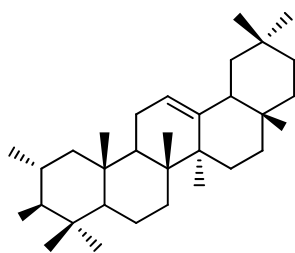
Kiểm tra SKBM phân đoạn 2-5/17 (PĐ2-5,2 g) với các hệ dung môi khác nhau, chúng tôi đã không tìm được hệ dung môi phân tách thích hợp. Vì vậy để tăng khoảng cách phân cực giữa các chất, 2 g này được axetyl hóa bằng Ac₂O/piridin ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ, sau đó chiết lại bằng EtOAc, cất loại dung môi thu được 1,9 g sản phẩm (PĐ2-5Ac). Tinh chế 1,9 g PĐ2-5Ac bằng cột silicagel, dung môi *n*-hexan/EtOAc = 3/1, với lượng hexan giảm dần từ 75% - 0%, thu được 8 phân đoạn. Phân đoạn 2/8 (90 mg) tiếp tục được tinh chế qua cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/CH₂Cl₂/MeOH = 8/2/0,5 thu được 8mg chất **1**, R_f = 0,48 (*n*-hexan/EtOAc = 4/1). Phân đoạn 7/8 (60mg) được tinh chế qua cột sephadex với dung môi MeOH, thu được 17 mg chất **2**, R_f = 0,4 trên bản mỏng RP18, hệ dung môi MeOH/H₂O = 6/1.

Phân đoạn 13/17 (90 mg) được tinh chế bằng cột silica gel, dung môi *n*-hexan/EtOAc/MeOH = 5/2/0,5. Axetyl hóa phân đoạn 3 - 6 (45 mg) của cột trên thu được 60 mg sản phẩm. Tinh chế 60 mg sản phẩm axetyl bằng cột silicagel ta có 20 mg chất **3**, R_f = 0,31 (*n*-hexan/EtOAc/MeOH = 5/1/0,2).

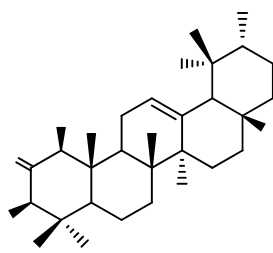
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phổ ¹H- và ¹³C-NMR cho biết chất **1** là một triterpen khung 12-oleanen, thể hiện qua các tín hiệu của 1 nối đôi dạng >C=CH- [$\delta_H = 5,20$ (1H, t, J =

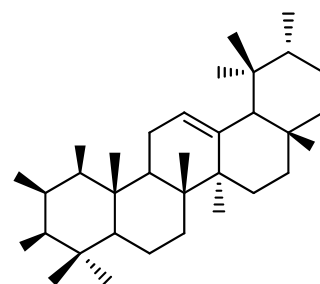
3,4 (H-12); $\delta_C = 122,26$ (C-12), 143,68 (C-13)] và 7 nhóm methyl bậc 4 ở $\delta_H = 0,68; 0,83; 0,84; 0,86; 0,99; 1,06; 1,19$ (mỗi tín hiệu 3H, s). Ngoài ra, các số liệu phổ còn cho thấy phân tử chất **1** có 2 nhóm axetyl ở $\delta_H = 1,91$ s; 2,01 s và $\delta_C = 20,90; 21,15; 170,58; 170,85$ cùng với tín hiệu của 2 axetoxy metin proton ở $\delta_H = 5,02$ (ddd, J = 11; 10,5; 4,3, H-2); 4,70 (d, J = 10,5, H-3) và $\delta_C = 80,64$ (C-3); 70,05 (C-2). Ngoài các tín hiệu kể trên, phổ ¹³C-NMR, DEPT còn cho thấy sự có mặt của 9 nhóm CH₂, 3 nhóm CH cũng như 6 carbon bậc 4 trong phân tử. Cấu hình của hai nhóm axetyl được xác định là 2 α ,3 β nhờ so sánh hằng số tương tác của H-2 và H-3 với các chất tương tự trong tài liệu [6]. Phổ ¹³C-NMR của chất **1** không cho tín hiệu của nhóm cacboxyl, tuy nhiên độ dịch chuyển của carbon bậc 4 ở C-17 về phía vùng trường thấp ($\delta_C = 46,51$) và pic ion phân tử tại *m/z* 557,38424 ứng với công thức phân tử C₃₄H₅₂O₆ trong phổ khối phân giải cao đã chứng tỏ phân tử chất **1** có nhóm COOH ở C-17. Với các số liệu phổ như đã phân tích, cấu trúc của chất **1** được xác định là 2 α , 3 β -diacetat-12-oleanen-28-oic axit nhờ so sánh với số liệu đã công bố [5, 6]. Maslinic axit, 2-O-axetylmaslinic axit, 3-O-axetylmaslinic có thể là chất gốc ở trong cây của chất **1**. Ba chất này đều đã được tách ra từ một số loài thực vật và thể hiện các hoạt tính sinh học khác nhau. Maslinic axit có hoạt tính kháng HIV, còn 2-O-acetyl- và 3-O-acetylmaslinic axit có hoạt tính gây chán ăn với loài ấu trùng *Ctenopsteustis obliquana* [5].



1: 2 α ,3 β -diacetat-12-oleanen-28-oic axit



2: 2-oxo-1 β ,3 β -diacetat-19 α -hydroxy12-ursanen-28oic axit



3: 1 β ,2 β ,3 β -triaxetat-19 α -hydroxy 12-ursanen-28oic axit

Phổ khối ESI-MS của chất **2** cho pic ion phân tử ở *m/z* = 587 [M+H]⁺. Phổ ¹H-, ¹³C-NMR, DEPT của chất **2** cho thấy phân tử là một tritecpen axit khung 12-ursanen, được thể hiện qua các tín hiệu đặc trưng sau: nhóm COOH ($\delta_C = 184,20$), một nối đôi dạng >C=CH- [$\delta_H = 5,28$ (1H, t, J = 3,7Hz, H-12), $\delta_C = 128,90$ (C-12); 137,60 (C-13)] và 7 nhóm methyl, gồm 6 nhóm methyl bậc 4 [0,72; 0,79; 0,99; 1,10; 1,20; 1,28 (mỗi tín hiệu s, 3H)] và 1 nhóm methyl bậc 3 ở $\delta_H = 0,95$ (d, J = 6,7). Ngoài ra, các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân còn cho biết trong phân tử

có mặt nhóm C=O ($\delta_C = 198,39$); 2 nhóm axetoxy metin ở $\delta_H = 4,37$ s; 4,33 s và $\delta_C = 85,44; 81,98$; 2 nhóm axetyl ($\delta_H = 2,15$ s, 6H; $\delta_C = 20,47; 20,99$ và 169,77; 169,90) và 1 carbon bậc bốn gắn với oxi ($\delta_C = 73,04$). Độ bội (singlet) của hai tín hiệu axetoxy metin cho phép dự đoán hai nhóm axetyl được gắn vào C-1 và C-3, còn nhóm xeton ở C-2. Sự vắng mặt một nhóm methyl bậc 3 của khung ursan có thể do nhóm hydroxy đã gắn vào C-19. Các dự đoán trên được khẳng định khi so sánh số liệu phổ của chất **2** với số liệu đã công bố trong tài liệu [7] và do đó cấu

trúc của nó được xác định là 2-oxo-1 β ,3 β -diacetat-19 α -hydroxy 12-ursanen-28oic axit. Vậy chất gốc có trong cây có thể là 1 β -hydroxy-2-oxopomolic acid, chất này đã được phân lập lần đầu tiên từ lá *Rosa woodsii* [7].

Chất **3** được tách ra ở dạng chất bột màu trắng, cho pic ion phân tử ở $m/z = 631 [M+H]^+$ trong phổ ESI-MS. Phổ 1H và ^{13}C -NMR của chất **3** rất tương tự như chất **2**, chỉ khác nhau nhóm thế ở C-2. Thay vì nhóm xeton trong chất **2**, ở chất **3** là nhóm axetyl, điều này thể hiện qua sự mất tín hiệu ở vùng trường thấp của nhóm xeton và xuất hiện thêm tín hiệu của một acetoxymethin proton và một nhóm axetyl. Nhóm acetyl thứ ba được gắn ở C-2 cũng được

khẳng định qua độ bội của các tín hiệu acetoxymethin proton: tín hiệu triplet ở $\delta_H = 5,45$ ($J = 3,7$ Hz) được gán cho H-2; hai tín hiệu doublet ở δ_H 4,70 và 4,77 ($J = 3,7$) là của H-1 và H-3. Hằng số tương tác 3,7 Hz của các proton này thể hiện mối tương quan axial-equatorial-axial của chúng [9]. Số liệu phổ của chất **3** hoàn toàn đồng nhất với số liệu của chất 1 β ,2 β ,3 β -triacetat-19 α -hydroxy 12-ursanen-28oic axit trong tài liệu [8, 9]. Chất **3** là sản phẩm axetyl hóa, vì vậy chất gốc trong cây có thể là 1 β ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxy-12-ursanen-28-oic acid, chất này đã được phân lập lần đầu tiên từ lá cây *Agrimonia pilosa* họ Hoa hồng (Rosaceae) [9].

Bảng 1: Số liệu phổ 1H -NMR của các chất **1 - 3** (500 MHz) và số liệu dẫn trong tài liệu

H	1 (CDCl ₃)	2-O-axetyl maslinic axit (CDCl ₃) [5]	2 (CDCl ₃)	1 β -hydroxy- 2-oxopomolic axit (Py-d ₅) [7]	3 (CDCl ₃)	Metyl 1 β ,2 β ,3 β - triacetat, 19 α - hydroxy-12- ursanen-28-oat (CDCl ₃) [9]
H-12	5,20 (1H, t, J = 3,4)	5,25 (1H, br s)	5,28 (1H, t, J = 3,7)	5,70 (1H, t- like)	5,26 (1H, t, J = 3,7)	5,26 (1H, t, J = 3,6)
H-1	-	-	5,08 (1H, s)	4,37 (1H, s)	4,70 (1H, d, J = 3,7)	4,70 (1H, d, J = 3,7)
H-2	5,02 (1H, ddd, J = 11, 10,5; 4,3)	4,93 (1H, ddd, J = 10,2; 10,2; 4,3)	-	-	5,45 (1H, t, J = 3,7)	5,44 (1H, t, J = 3,7)
H-3	4,70 (1H, d, J = 10,5)	3,18 (1H, d, J = 10,2)	5,04 (1H, s)	4,33 (1H, s)	4,77 (1H, d, J = 3,7)	4,75 (1H, d, J = 3,7)
H-18	2,76 (1H, dd, J = 13,8; 4,1)	2,82 (1H, dd, J = 13,3; 3,4)	2,52 (1H, s)	3,07 (1H, s)	2,50 (1H, s)	2,55 (1H, br s)
Me-23	1,06 (3H, s)	1,03 (3H, s)	1,10 (3H, s)	1,35 (3H, s)	1,19 (3H, s)	-
Me-24	0,83(3H, s)	0,83 (3H, s)	0,72 (3H, s)	0,90 (3H, s)	1,07 (3H, s)	-
Me-25	0,99 (3H, s)	1,01 (3H, s)	0,79 (3H, s)	0,96 (3H, s)	1,34 (3H, s)	-
Me-26	0,68 (3H, s)	0,72 (3H, s)	0,99 (3H, s)	1,14 (3H, s)	0,73 (3H, s)	-
Me-27	1,19 (3H, s)	1,11 (3H, s)	1,28 (3H, s)	1,80 (3H, s)	1,22 (3H, s)	-
Me-29	0,84 (3H, s)	0,89 (3H, s)	1,20 (3H, s)	1,45 (3H, s)	0,90 (3H, s)	-
Me-30	0,86 (3H, s)	0,91 (3H, s)	0,95 (3H, d, J = 6,6)	0,95 (3H, d, J = 7,0)	0,94 (3H, d, J = 6,6)	-
OAc-1	-	-	2,15 (3H, s)	-	2,00 (3H, s)	1,99 (3H, s)
OAc-2	1,91 (3H, s)	2,06 (3H, s)	-	-	2,08 (3H, s)	2,08 (3H, s)
OAc-3	2,01 (3H, s)	-	2,15 (3H, s)	-	2,02 (3H, s)	2,02 (3H, s)

Bảng 2: Số liệu phổ ^{13}C -NMR của các chất 1 - 3 và các số liệu dẫn trong tài liệu

C	1 (CDCl_3)	2-O-axetyl maslinic axit (CDCl_3) [5]	2 (CDCl_3)	1 β -hydroxy- 2-oxo pomolic axit (Py- d_5) [7]	3 (CDCl_3)	Metyl 1 α ,2 α ,3 β ,19 α - tetrahydroxy 12- ursanen-28-oat (CDCl_3) [8]
1	43,87 t	44,8 t	85,44 d	85,3 d	75,07 d	71,2 d
2	70,05 d	73,4 d	198,39 s	212,2 s	75,07 d	78,9 d
3	80,64 d	81,5 d	81,98 d	81,9 d	75,07 d	80,7 d
4	40,96 s	40,1 s	43,05 s	45,8 s	40,50 s	40,6 s
5	54,90 d	55,5 d	52,47 d	51,9 d	52,53 d	53,1 d
6	18,20 t	18,6 t	17,83 t	18,7 t	25,16 t	18,3 t
7	32,43 t	32,8 t	32,19 t	33,4 t	32,28 t	32,6 t
8	39,37 s	39,7 s	40,73 s	41,2 s	41,94 s	42,9 s
9	47,55 d	48,0 d	47,69 d	48,7 d	48,24 d	47,8 d
10	38,21 s	38,7 s	47,79 s	49,6 s	37,59 s	37,7 s
11	22,86 t	23,2 t	25,92 t	27,3 t	25,92 t	25,5 t
12	122,26 d	123,0 d	128,90 d	129,1 d	129,19 d	129,8 d
13	143,68 s	144,0 s	137,60 s	138,9 s	137,73 s	137,3 s
14	41,63 s	42,0 s	40,73 s	42,2 s	41,05 s	41,1 s
15	27,63 t	28,0 t	28,32 t	29,5 t	28,27 t	28,2 t
16	23,47 t	23,3 t	25,13 t	26,4 t	25,92 t	26,0 t
17	46,51 s	46,9 s	46,79 s	48,3 s	47,63 s	47,9 s
18	40,96 d	41,3 d	52,64 d	54,6 d	52,53 d	53,1 d
19	45,82 t	46,2 t	73,04 s	72,7 s	73,04 s	73,2 s
20	30,68 s	31,0 s	41,09 d	42,4 d	41,05 d	41,1 d
21	33,80 t	34,2 t	25,92 t	27,0 t	28,27 t	27,3 t
22	32,43 t	30,0 t	37,45 t	38,5 t	37,59 t	37,4 t
23	28,42 q	28,9 q	28,63 q	29,4 q	27,49 q	28,2 q
24	17,13 q	17,0 q	17,15 q	17,1 q	17,55 q	16,1 q
25	16,43 q	16,7 q	12,77 q	12,5 q	12,03 q	12,0 q
26	17,63 q	17,4 q	16,84 q	17,1 q	17,55 q	16,6 q
27	25,88 q	26,3 q	24,19 q	24,7 q	24,36 q	24,6 q
28	-	185,0 s	184,20 s	180,7 s	184,12 s	178,4 s
29	33,06 q	33,5 q	27,44 q	27,1 q	29,10 q	27,4 q
30	23,57 q	24,0 q	16,07 q	16,8 q	16,12 q	17,1 q
Ac-C1	-	-	169,77 s – 20,47 q	-	170,05 s – 20,71 q	-
Ac-C2	170,58 s – 20,90 q	170,4 s – 21,8 q	-	-	170,05 s – 21,37 q	-
Ac-C3	170,85 s – 21,15 q	-	169,90 s – 20,99 q	-	170,05 s – 20,89 q	-

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua Đề tài Nghiên cứu cơ bản 2010 - 2011.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, Nxb. Trẻ, quyển 1, 776 (1999).
2. Nunziatina De Tommasi, Francesco De Simone. Journal of Natural Products, 55(8), 1067 - 1073 (1992).
3. Yan Huang, Jun Li, Qi Cao, Shi-Chun Yu, Xiong-Wen Lv, Yong Jin. Life Sciences, 78(23), 2749 - 2757 (2005).
4. Đinh Gia Thiện, Trần Văn Chiến, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Trần Văn Sung. Tạp chí Hóa học, T. 49(2), 223 - 226 (2011).
5. Odile Thoison, Thierry Sevenet, Hermann M. Niemeyer, Graeme B. Russell. Phytochemistry, 65, 2173 - 2176 (2004).
6. Hisashi Kojima, Haruo Ogura. Phytochemistry, 28(6), 1703 - 1710 (1989).
7. Yoshiki Kashiwada, Hui-Kang Wang, Tsuneatsu Nagao, Susumu Kitanaka, Ichiro Yasuda, Toshihiro Fujioka. J. Nat. Prod., 61, 1090 - 1095 (1998).
8. Bao-Zhi Li, Bin-Gui Wang, Zhong-Jian Jia. Phytochemistry, 49(8), 2477 - 2481 (1998).
9. Isao Kouno, Naosuke Baba, Yumiko Ohni, Nobusuke Kawano. Phytochemistry, 27(1), 297 - 299 (1988).

Liên hệ: **Nguyễn Hoàng Anh**

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

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Email: hoanganhvh@gmail.com.