

MENISDAURIN VÀ AXIT ROSMARINIC PHÂN LẬP TỪ CÂY CƯỜM RỤNG HOA DÀI (*EHRETIA LONGIFLORA* CHAMP., *BORAGINACEAE*)

Đến Tòa soạn 15-12-2008

HOÀNG QUỲNH HOA¹, PHẠM THANH KỲ¹
PHẠM HẢI YẾN², CHÂU VĂN MINH², PHAN VĂN KIÊM²

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the stem barks of Ehretia longiflora Champ. afforded menisdaurin and rosmarinic acids. Their chemical structures were identified by combination of 1D-, 2D-NMR, and ESI-MS techniques in comparison with the literature. Menisdaurin acid was isolated for the first time from Ehretia species.

I - GIỚI THIỆU CHUNG

Cây Cườm rụng hoa dài có tên khoa học là *Ehretia longiflora* Champ. (Boraginaceae). Đây là một loại cây gỗ nhỏ, mọc hoang ở một số tỉnh ở nước ta. Trong cùng chi *Ehretia*, đã có một số loài được nghiên cứu sử dụng trong dân gian làm thuốc chữa bệnh như *E. asperula* Zoll. et. Mort. với tên địa phương là xạ đen. Qua điều tra được học dân tộc vùng Cúc Phương, Ninh Bình cho thấy cây cườm rụng hoa dài được một số người dân địa phương sử dụng làm thuốc cho phụ nữ sau khi sinh nở, chữa đau nhức xương khớp, v.v....

Cho đến nay, ở cả trong nước và ngoài nước vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây thuốc này. Để góp phần nghiên cứu các cây thuốc trong chi *Ehretia*, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tách chiết, phân lập, và xác định cấu trúc hoá học của những thành phần chính trong vỏ cành cây cườm rụng hoa dài.

II - THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp chung

- *Sắc ký lớp mỏng* (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản máng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715), RP-18 F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

- *Sắc ký cột* (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040 - 0,063 mm (240 - 430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30 - 50 μm, Fujisilisa Chemical Ltd.).

- *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân* (NMR): Được đo trên máy Bruker AVANCE 500 của Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- *Phổ khối lượng* (ESI-MS): Được đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu nghiên cứu

Mẫu cây cườm rụng hoa dài được thu hái ở Cúc Phương, Ninh Bình vào tháng 4 năm 2007. Tên khoa học được xác định là *Ehretia longiflora* Champ. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Phòng tiêu bản trường Đại học Dược Hà Nội, mẫu số HNIP/15359/08.

Phân lập các hợp chất

Vỏ khô và cành nhỏ của cây cườm rụng hoa dài (1kg) được nghiền nhỏ thành bột, sau đó chiết với metanol ở nhiệt độ phòng, chiết nhiều lần đến khi dịch chiết không màu. Gộp các dịch chiết lại và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được 140 g dịch cô metanol. Dịch cô này được hoà tan trong 1 lít nước cất, sau đó chiết lần lượt với các dung môi chloroform và etyl axetat. Các dịch chiết thu được cất loại dung môi dưới áp suất giảm, các phần tương ứng là chloroform (18 g) và etyl axetat (11 g). Dịch nước sau khi chiết với các dung môi trên cũng được cất loại dung môi và thu được cặn là 20 g. Cặn chloroform được phân lập bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo thu được các hợp chất **1** (18 mg) dưới dạng chất rắn không màu và hợp chất **2** (20 mg) dưới dạng chất rắn có màu vàng nhạt.

Menisdaurin (1): Chất rắn không màu, điểm nóng chảy 175-176°C, ESI-MS m/z 313,9 $[M+H]^+$, $C_{14}H_{19}NO_7$, $M=313$.

1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): xem bảng 1.

Rosmarinic axit (2): Chất rắn màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 203-204°C. ESI-MS m/z 383 $[M+Na]^+$, 358,9 $[M-H]^-$, $C_{18}H_{16}O_8$, $M=360$.

1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): xem bảng 2.

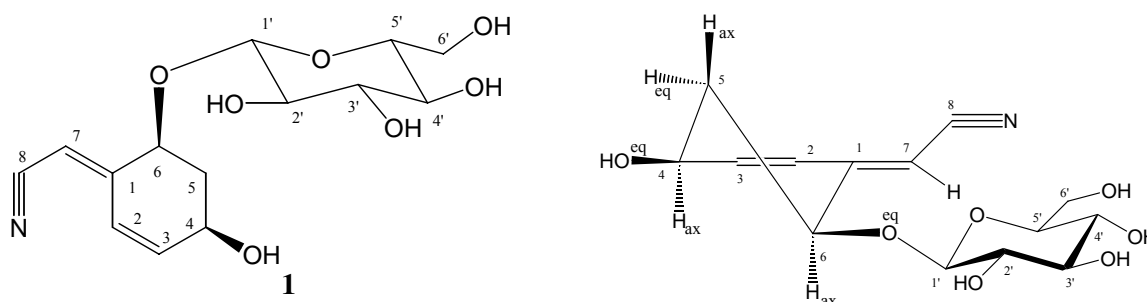
III — KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất rắn

không màu từ dịch chiết metanol của vỏ cây. Phổ 1H -NMR của hợp chất này xuất hiện ba tín hiệu của ba proton olefin tại δ 6,32 (d, $J = 9,5$ Hz, H-2), 6,24 (dd, $J = 9,5, 4,0$ Hz, H-3) và 5,53 (s, H-7) chứng tỏ sự có mặt của hai nối đôi, trong đó có một nối đôi thế ba lần, hai proton của hai nhóm oximetin khác tại δ 4,39 (m, H-4) và 4,95 (m, H-6), tín hiệu của nhóm metylen tại δ 2,28 (m, H_{eq} -5), 2,06 (m, H_{ax} -5), ngoài ra, còn một phân tử đường với sự xuất hiện tín hiệu proton anome tại δ 4,58 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), tín hiệu proton oximetylen tại δ 3,92 (dd, $J = 2,5, 12,0$ Hz, H_a -6'), 3,70 (dd, $J = 6,5, 12,0$ Hz, H_b -6') và 4 proton của 4 nhóm oximetin còn lại tại δ 3,37 (4H, H-2', H-3', H-4', H-5'). Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon, trong đó 6 tín hiệu của một phân tử đường tại δ 101,54 (C-1'), 74,50 (C-2'), 78,00 (C-3'), 71,72 (C-4'), 78,11 (C-5') và 63,13 (C-6'), 5 tín hiệu của các cacbon olefin tại δ 157,07 (C-1), 127,72 (C-2), 140,56 (C-3), 96,88 (C-7) và 118,74 (C-8), hai cacbon metin nối với nguyên tử ôxi tại δ 65,30 (C-4) và 72,52 (C-6), và tín hiệu của một nhóm metylen khác tại δ 36,40 (C-5) được xác định bằng các phổ DEPT 90 và DEPT 135. Các giá trị δ_C của cấu trúc đường cùng với hằng số tương tác $J_{H-2'/H-1'} = 7,5$ Hz cho thấy đây là đường β -D-glucopyranoside. Các giá trị δ_C và δ_H của từng vị trí cacbon được xác định rõ ràng nhờ phổ HSQC. Trên phổ HSQC, các proton tại δ 6,32, 6,24, 4,39, 2,28/2,06, 4,95 và 5,53 lần lượt có tương tác với các cacbon tại δ 127,72, 140,56, 65,30, 36,40, 72,52 và 96,88, đồng thời các proton của phân tử đường tại δ 4,58, 3,92/3,70 lần lượt có tương tác với các cacbon tại δ 101,54 và 63,13. Với các dữ kiện phổ nêu trên, đặc biệt là có 5 tín hiệu cacbon olefin, có thể dự đoán được sự có mặt của một nhóm cyanua và công thức phân tử dự đoán là $C_{14}H_{19}NO_7$ với khối lượng phân tử là 313 đv.c. Dự đoán này được chứng tỏ bằng kết quả thu được trên phổ khối lượng. Trên phổ ESI-MS xuất hiện pic ion tại m/z 313,9 $[M+H]^+$ với cường độ mạnh, hoàn toàn tương ứng với công thức phân tử nêu trên. Các dữ kiện phổ này rất phù hợp với các dữ liệu phổ tương ứng của hợp chất menisdaurin [4] (bảng 1). Hơn nữa trên phổ

HMBC, các tương tác giữa H-1' (δ 4,58) với carbon C-6 (δ 72,52) khẳng định phân tử đường nối với C-6. Proton H-2 (δ 6,32) tương tác HMBC với C-1 (δ 157,07), C-3 (δ 140,56), C-4 (δ 65,30), C-6 (δ 72,52), C-7 (δ 96,88), proton H-5 (δ 2,28/2,06) tương tác HMBC với C-1 (δ 157,07), C-3 (δ 140,56), C-6 (δ 72,52), cũng như tương tác HMBC của H-7 với C-2 và C-6 chứng tỏ hợp chất **1** có cấu trúc như được chỉ ra trên hình 1. Về hoá học lập thể, hai proton H-4

và H-6 đều được xác định là chiếm các vị trí *axial* bởi sự phù hợp hoàn toàn về giá trị độ dịch chuyển hoá học cũng như hằng số tương tác tương ứng của **1** với hợp chất menisdaurin [4]. Từ những kết quả nêu trên, hợp chất **1** được khẳng định là axit menisdaurin, một hợp chất đã được biết đến từ cây *Ilex warburgii* và *Menispermum dauricum*. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Ehretia* [6, 7].



Hình 1: Cấu trúc hoá học và cấu trúc không gian của hợp chất **1** [4]

Bảng 1: Dữ kiện phổ NMR của **1**

C	$\delta_c^{\#}$	$\delta_c^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$	HMBC (H—C)
1	157,77	157,07	C	-	
2	128,43	127,72	CH	6,32 d ($J = 9,5$ Hz)	1, 3, 4, 6, 7
3	141,27	140,56	CH	6,24 dd ($J = 9,5, 4,0$ Hz)	1, 5
4	66,00	65,30	CH	4,39 m	2, 6
5	36,74	36,40	CH ₂	2,28 m 2,06 m	1, 3, 6 1, 3, 6
6	73,22	72,52	CH	4,95 m	2, 4, 7, 1'
7	97,61	96,88	CH	5,53 s	2, 6
8	118,74	118,74	C	-	
1'	102,25	101,54	CH	4,58 d ($J = 7,5$ Hz)	6
2'	75,21	74,50	CH	3,37 m*	
3'	78,72	78,00	CH	3,37 m*	
4'	72,44	71,72	CH	3,37 m*	
5'	78,82	78,11	CH	3,37 m*	
6'	63,84	63,13	CH ₂	3,92 dd ($J = 2,5, 12,0$ Hz) 3,70 dd ($J = 6,5, 12,0$ Hz)	4, 5 4, 5

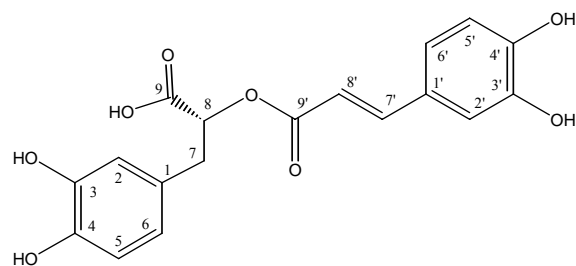
^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#] δ_c của Menisdaurin [4].

Hợp chất **2** cũng thu được từ dịch chiết metanol của vỏ cây cườm rụng hoa dài dưới

dạng chất rắn có màu vàng nhạt sau khi tiến hành tách chiết và phân lập bằng các phương

b pháp sắc ký kết hợp. Phổ ¹H-NMR xuất hiện các tín hiệu của hai vòng thơm thế 1,3,4 với hệ tương tác ABX tại δ 6,78 (d, *J* = 2,0 Hz, H-2), 6,70 (d, *J* = 8,0 Hz, H-5), 6,64 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6), 7,05 (d, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,78 (d, *J* = 8,0 Hz, H-5') và 6,94 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6'), cùng với sự có mặt của một nối đôi cấu hình *trans* tại δ 7,56 (d, *J* = 16,0 Hz, H-7') và 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, H-8'). Ngoài ra trên phổ này còn xuất hiện tín hiệu của một nhóm metylen tại δ 3,14 (dd, *J* = 14,0, 3,5 Hz, H_a-7), 3,01 (dd, *J* = 14,0, 9,5 Hz, H-7), và một nhóm oximetin tại δ 5,17 (dd, *J* = 9,5, 3,5 Hz, H-8). Phổ ¹³C-NMR xuất hiện các tín hiệu của 18 cacbon, trong đó có 1CH₂, 9 CH, và 8 C được xác định bằng các phổ DEPT 90 và DPET 135. Sự có mặt của hai vòng thơm được nhận biết tại 12 tín hiệu tại δ 130,47 (C-1), 116,48 (C-2), 146,00 (C-3), 144,96 (C-4), 121,78 (C-5), 130,47 (C-6),

127,89 (C-1'), 115,20 (C-2'), 146,72 (C-3'), 149,46 (C-4'), 117,54 (C-5') và 122,95 (C-6'), nối đôi ngoại vòng tại δ 147,01 (C-7') và 115,23 (C-8'), cacbon metylen tại δ 38,45 (C-7), cacbon oximetin tại δ 76,42 (C-8), cacbon cacboxyl tại δ 177,20 (C-9), và cacbon cacboxylat tại δ 168,84 (C-9'). Như vậy có thể dự đoán được cấu trúc của của **2** có một phần là 3,4-dihydroxy-*E*-cinnamoyl.



Hình 2: Cấu trúc hoá học của **2**

Bảng 2: Dữ kiện phổ NMR của **2**

C	δ _C [#]	δ _C ^{a,b}	DEPT	δ _H ^{a,c}	HMBC (H—C)
1	130,49	130,47	C	-	
2	117,63	116,48	CH	6,78 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	4, 6, 7
3	146,08	146,00	C	-	
4	144,93	144,96	C	-	
5	121,89	121,78	CH	6,70 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	1, 3
6	131,29	130,47	CH	6,64 dd (<i>J</i> = 8,0, 2,0 Hz)	2, 4, 7
7	38,93	38,45	CH	3,14 dd (<i>J</i> = 14,0, 3,5 Hz) 3,01 dd (<i>J</i> = 14,0, 9,5 Hz)	2, 6, 8
8	77,79	76,42	CH	5,17 dd (<i>J</i> = 9,5, 3,5 Hz)	1, 9'
9	177,64	177,20	C	-	
1'	128,12	127,89	C	-	
2'	115,27	115,20	CH	7,05 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	4', 6', 7'
3'	146,85	146,72	C	-	
4'	149,50	149,46	C	-	
5'	116,60	117,54	CH	6,78 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	3', 1'
6'	123,04	122,95	CH	6,94 dd (<i>J</i> = 8,0, 2,0 Hz)	2', 4', 7'
7'	146,79	147,01	CH	7,56 d (<i>J</i> = 16,0 Hz)	2', 6', 9'
8'	115,77	115,23	CH	6,29 d (<i>J</i> = 16,0 Hz)	1', 9'
9'	169,24	168,84	C	-	

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#]δ_C của rosmarinic axit [5].

Các giá trị độ dịch chuyển hoá học của **2** được xác định nhờ các phổ HSQC và HMBC. Các kết quả phân tích được chỉ ra trên bảng 2. Với công thức phân tử tính toán dựa trên các phổ NMR là C₁₈H₁₆O₈, tương ứng với khối lượng phân tử 360 đvc, thì kết quả thu được trên phổ khối lượng ESI-MS với các pic ion tại *m/z* 383 [M+Na]⁺ và 358,9 [M-H]⁻ là hoàn toàn phù hợp. Trên phổ HMBC, tương tác của H-7' và H-8' với C-1' và C-9' khẳng định thêm sự có mặt của nhánh 3,4-dihydroxy-*E*-cinnamoyl, đồng thời tương tác HMBC của H-7 (δ 3,14/3,01) với C-2 (δ 116,48)/C-6 (δ 121,78) cũng như tương tác của H-8 (δ 5,17) với C-1 (δ 130,47) chứng tỏ phân cấu trúc hoá học còn lại của của **2** sẽ phải là 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid. Tương tác HMBC của H-8 (δ 5,17) với cacbon cacboxylat tại δ 168,84 chứng tỏ nhánh 3,4-dihydroxy-*E*-cinnamoyl nối vào C-8. Với sự phù hợp hoàn toàn về các giá trị phổ của hợp chất **2** với các giá trị tương ứng của axit rosmarinic [5] (bảng 2) có thể kết luận rằng hợp chất **2** là axit rosmarinic. Hợp chất này đã được biết đến từ các loài *Rosmarinus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Momordica balsamina*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Teucrium scorodonia*, *Sanicula europaea*, *Coleus blumei*, *Thymus* spp., *Hyptis verticillata*, *Lithospermum erythrorhizon* và có nhiều hoạt tính lý thú như tác dụng kháng sinh, ngăn ngừa sự phát triển một số dòng tế bào ung thư, kháng HIV, chống ôxi hoá cao và một số hoạt tính khác [6, 7]. Hợp chất này cũng đã được biết đến từ cây *Ehretia dentata* [8].

IV — KẾT LUẬN

Từ dịch chiết metanol của vỏ cành cây cườm

rung hoa dài, hai hợp chất menisdaurin và axit rosmarinic đã được phân lập. Cấu trúc hoá học của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ 1D-, 2D-NMR, phổ khối lượng và so sánh với các dữ kiện phổ đã được công bố. Hợp chất axit menisdaurin được phân lập lần đầu tiên từ chi *Ehretia*. Đặc biệt, axit rosmarinic đã được rất nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm với những hoạt tính lý thú như hoạt tính chống ung thư và hoạt tính kháng HIV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi. Từ điển thực vật thông dụng, tập 1. Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 1040 - 1042 (2002).
2. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, quyển II, Nxb. Trẻ, 804 - 806 (2003).
3. Flora of China. Editorial Committee, Flora of China, Vol. 16. 329 - 336 (1995).
4. Tsutomu Nakanishi, Masatoshi Nishi, Midori Somekawa, Hiroko Murata, Mizuo Mizuno, Munekazu Iinuma, Toshiyuki Tanaka, Jin Murata, Frank A Lang, and Akira Inada. Chem. Pharm. Bull., Vol. 42(11), 2251 - 2255 (1994).
5. Eun-Rhan Woo and Mei Shan Piao. Arch. Pharm. Res., Vol. 27(2), 173 - 176 (2004).
6. Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 15:1, Copyright © 1982-2007 Chapman & Hall/CRC.
7. SciFinder:
<http://www.cas.org/products/sfacad/index.html>
8. Trinh Thi Thuy, Nguyen Huy Cuong, Tran Van Sung. Vietnamese Journal of Chemistry, Vol. 45(2), 228 - 232 (2007).