

Khảo sát sơ bộ qui trình phân lập thành phần hóa học của lá cây Dó Bầu (*Aquilaria crassna* Pierre)

Ngô Thị Châu

Khoa Dược, Đại Học Nguyễn Tất Thành
ntchau@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bài báo trình bày về qui trình phân lập thành phần hóa học của lá cây Dó Bầu được hái ở tỉnh Bình Phước. Qui trình thể hiện rõ từng giai đoạn của quá trình nghiên cứu từ xử lý lá tươi đến khi thành cao. Từ 7 kg lá tươi sau khi phơi khô và sấy thu được 2,5 kg lá khô, trích 3 lần với metanol bằng phương pháp đun hoàn lưu, mỗi lần trích là 2 giờ. Toàn bộ dịch trích được đem cô quay áp suất thấp thu được cao metanol. Cao khô metanol được trích với acetat etyl thu được cao acetat etyl. Từ cao acetat etyl thực hiện sắc kí cột silicagel với nhiều hệ giải li thu được 5 phân đoạn từ C1- C5, sau đó sắc kí cột phân đoạn C2 với nhiều hệ dung li khác nhau qua nhiều phân đoạn kế tiếp thu được chất tinh khiết CC2 (5 mg). Kết quả của thực nghiệm thu được một qui trình phân lập thành phần hóa học của lá cây Dó Bầu qua từng giai đoạn. Dựa vào số liệu phổ ^1H , ^{13}C NMR, phổ 2D-NMR HSQC, HMBC kết hợp với tài liệu, cấu trúc hợp chất được đề nghị là 7-O-metilapigenin 5-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside].

Nhận 16.08.2019

Được duyệt 28.09.2020

Công bố 30.10.2020

Từ khóa

lá cây Dó Bầu, cao từ lá cây Dó Bầu, thành phần hóa học lá cây Dó Bầu, qui trình phân lập thành phần hóa học lá cây Dó Bầu

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Cây Dó Bầu có tên khoa học là *Aquilaria crassna* Pierre thuộc họ Trâm Hương (Thymelacaceae). Trên thế giới chi *Aquilaria* có khoảng 15 loài, phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới từ Ấn Độ đến Đông Nam Á và miền Nam Trung Quốc. Ở nước ta có 4 loài: *A. crassna*, *A. banaensis* Pham, *A. baillonii* Pierre.ex Lecomte và *A. ruginosa*. Cây Dó Bầu mọc ở những vùng núi hướng về phía có gió biển nên ta thường gặp ở vùng phía Đông Trường Sơn hơn là phía Tây, trong rừng rậm nhiệt đới. Dó Bầu là một loại cây gỗ xanh, cao (15 - 30) m, đường kính thân khoảng (1 - 1,5) m, thân thẳng. Lá đơn, mọc cách, có hình bầu dục, cuống lá dài (4 - 6) mm, kích thước (8 - 15) cm x (2,5 - 9) cm. Đối với chi *Aquilaria* người ta tìm thấy 2 loài, một loài với lá tròn là Dó Bầu, loại còn lại nhọn gọi là Dó me. Cả hai loại này đều cho chất lượng trầm như nhau. Cây Dó Bầu có khả năng hình thành một loại sản phẩm đặc biệt là trầm hương và kì nam có giá trị thương mại rất cao. Những nghiên cứu trước đây cho biết không phải bất kì thân cây Dó Bầu nào cũng có trầm và kì nam. Chỉ có một số cây có bệnh mới chứa trầm ở phần lõi của thân cây và quá trình này chỉ xảy ra khi cây còn sống [1]. Các khối trầm thường được tạo thành trong thân cây hoặc trong những cành lớn, chúng là

kết quả của cả một quá trình chuyển hóa các bệnh lí ở những nơi cây bị bệnh, bị thương. Có giả thuyết rằng, trước tiên cây bị nấm gây bệnh tại những chỗ bị thương làm cho cây bị suy yếu, tiếp đó nếu nấm thâm nhập vào cây và tạo thành các khối trầm. Tinh dầu trầm có giá trị đặc biệt, được dùng trong công nghệ chế biến hương liệu. Mùi của trầm vừa phảng phất mùi của tinh dầu đỉnh hương, vừa có mùi thơm của hoa hồng. Các hóa mỹ phẩm có chứa tinh dầu rất được ưa chuộng [2]. Trong y học cổ truyền ở nước ta, trầm hương được coi là vị thuốc quý hiếm, có vị cay, tính hơi ôn. Được dùng để chữa các bệnh đau ngực, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy, hen suyễn, lợi tiểu, giảm đau, trấn tĩnh, hạ sốt và khó thở [3]. Dấm gỗ trầm cũng được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau, đặc biệt là chữa bệnh thấp khớp, bệnh đau mùa, bệnh đau bụng và dùng cho phụ nữ sau khi sinh con [3]. Nước sắc từ gỗ trầm có tác dụng kháng khuẩn, đặc biệt là với các loại khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* và *Shigella flexneri* [4,5]. Cây Dó Bầu mà sản phẩm của nó là trầm hương và kì nam có giá trị kinh tế cao đồng thời nó còn có công dụng chữa bệnh rất tốt.

2 Thực nghiệm

Sắc kí bản mỏng trên silicagel pha thường Merk, Kielselgel 60 F254, 250 μm . Thuốc thử hiện hình bản mỏng là: acid



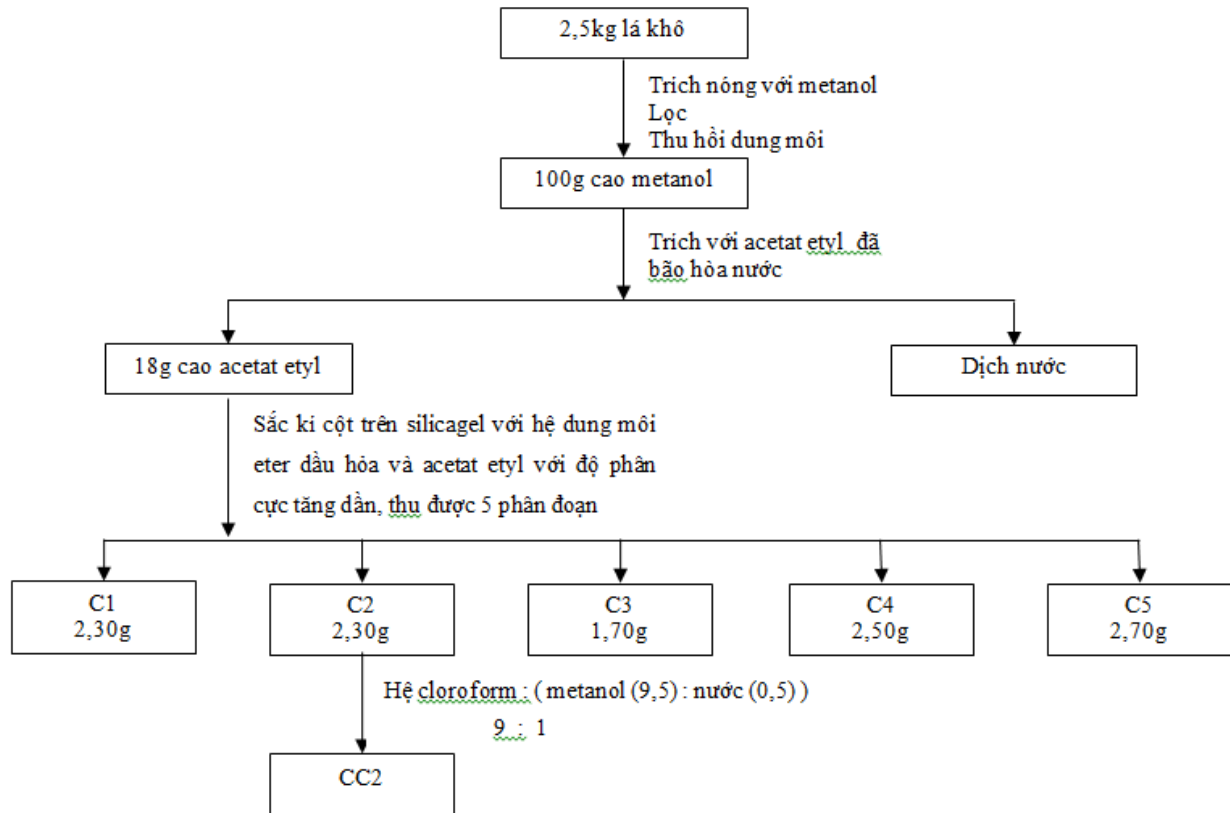
H₂SO₄ đậm đặc. Dung môi thực nghiệm là dung môi đã chưng cất: acetat etyl (78⁰C), eter dầu hỏa 60⁰C - 90⁰C, metanol 64⁰C - 65⁰C, cloroform 61⁰C - 62⁰C. Các hóa chất sử dụng thuộc hãng Xilong Scientific, Trung Quốc.

2.1 Xử lý mẫu

Lá cây Dó Bầu tươi được thu hái ở Lộc Ninh, tỉnh Bình Phước. Sau đó phơi sấy ở khoảng 70⁰C đến khối lượng không đổi. Dem nghiền nhỏ và dùng cho thực nghiệm.

2.2 Tiến hành thực nghiệm

Từ 7 kg lá tươi sau khi phơi khô và sấy thu được 2,5 kg lá khô, trích 3 lần với metanol bằng phương pháp đun hoàn lưu, mỗi lần trích là 2 giờ. Toàn bộ dịch trích được đem cô quay áp suất thấp thu được 100 g cao metanol. Cao khô metanol được trích với acetat etyl thu được 18 g cao acetat etyl.



Sơ đồ 1 Quy trình thực nghiệm phân lập hợp chất CC2

3 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Tham khảo các tài liệu [5,6,7], nhiều dẫn xuất chromon đã được phân lập từ trầm hương từ vùng Kalimantan. Hợp chất chrome 2-(2-4'-methoxyphenyletyl) chromone được phân lập bởi Keiji Hashimoto. Năm 2007 Nguyễn Thị Thùy Trang đã phân lập được ba hợp chất Stigmast-4-en-3-on, acid 3,24-o,o-isopropiliden-24- hydroxioleanolic và 5,7-dihydroxi-3',4'-dimetoxiflavan từ thân cây Dó Bầu. Khảo sát cao trên dung môi etylacetat chưa từng được nghiên cứu, vì vậy cao trên dung môi etyl acetat được chọn để tiến hành khảo sát. Từ cao etyl acetat thực hiện sắc kí cột silicagel với hệ dung môi eter dầu hỏa và aetatetyl với độ phân cực tăng dần thu được năm phân đoạn từ C1- C5, sau đó sắc kí cột phân đoạn C2 (2,30 g) với nhiều hệ dung li khác nhau cloroform, metanol và nước với tỉ lệ cloroform (9): (metanol (9,5): nước (0,5) (1)) qua nhiều phân đoạn kế tiếp thu được chất tinh khiết CC2 (5 mg).

4 Biện luận

Hợp chất CC2 được phân lập dưới dạng tinh thể màu vàng tan ít trong metanol. Sắc kí bản mỏng cho vết hấp thu UV 254, hiện hình bằng H₂SO₄ đậm đặc cho vết tròn màu vàng. Phổ ¹H-NMR của chất CC2 cho mũi cộng hưởng với sự hiện diện của một nhóm -OCH₃ gắn trên vòng benzen ở δ 3,902 ppm (3H, s, 7-OCH₃); Ổ vùng trường thấp 6-8 ppm xuất hiện tín hiệu của hai vòng benzen. Vòng thứ nhất mang 4 nhóm thế ở vị trí 1, 2, 3, 5, hai proton còn lại ghép meta với nhau [δ 6,86 ppm (1H, d, J=2.0, H-6); 7,02 ppm (1H, d, J=2.0, H-8)]. Vòng thứ hai mang 2 nhóm thế ở vị trí 1, 4, bốn proton còn lại chia thành 2 cặp đối xứng ghép orto với nhau [δ 7,93 ppm (2H, d, J =2.0, H-2', 6'); δ 6,92 ppm (2H, d, J=2, H-3', 5')]. Một proton olefin δ 6,70 ppm (s, 1H, H-3), hai proton anomer của hai đơn vị đường: β-glucose δ 4,80 ppm (1H, d, J=7,5), đường β- xylose δ 4,19 ppm (1H, d, J=7.5).

Phổ ^{13}C –DEPT NMR của chất CC2 cho các mũi cộng hưởng ứng với sự hiện diện của 27 carbon trong đó có 7 carbon thứ cấp, 1 carbon $-\text{CH}_3$, 2 carbon $-\text{CH}_2$, 16 carbon $-\text{CH}$. Ở vùng trường thấp có tín hiệu của một nhóm carbonyl liên hợp ở δ 177 ppm (s, C-4); 5 carbon hương phượng liên kết với oxi ở δ 155-165 ppm. Ở vùng từ δ 60- 80 ppm thấy xuất hiện nhóm tín hiệu hiện diện của 2 đơn vị đường glucose và xylose và tín hiệu của carbon anomer của đường glucose ở 103,5 ppm và đường xylose ở 104,4 ppm.

Từ các dữ kiện trên cho thấy hợp chất CC2 là một flavonoid có khung apigenin mang nhóm thế metil và 2 đơn vị đường β -glucose và β -xylose.

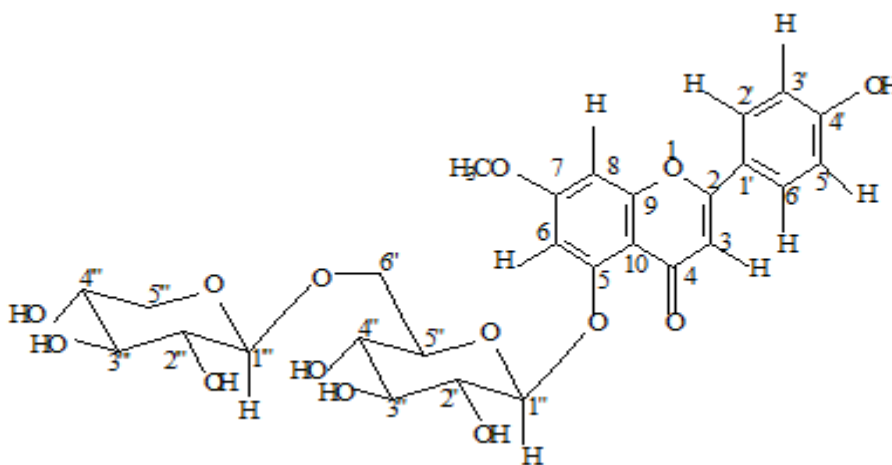
Phổ HMBC của CC2 cho các tín hiệu tương tác giữa H-3 với C-2, C-4, C-10, C-1'; giữa H-6 với C-5, C-7, C-8, C-10; H-8 với C-6, C-7, C-9, C-10; H-2',6' và H-3',5' cùng tương tác với C-4. Ngoài ra còn có tương tác giữa proton nhóm $\text{CH}_3\text{O}-$ và C-7, proton anomer của đường glucose H-1'' và C-5, proton anomer đường xylose và C-6''. Từ đó có thể xác định được tất cả các tín hiệu carbon, proton và cách liên kết của khung apigenin và phần đường.

Bảng 1 Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của CC2 trong dung môi DMSO

Vị trí	δ_{H} (ppm)	δ_{C}	Tương quan HMBC
2		161,4	
3	6,70 (s, 1H)	105,8	C-4, C-10, C-1', C-2
4		177,0	
5		158,1	
6	6,86 (d, 1H, J=2.0).	102,8	C-7, C-8, C-10,

7		163,6	
8	7,02 (d, 1H, J=2)	96,5	C-6, C-7, C-9, C-10
9		158,5	
10		109,1	
1'		121,1	
2'	7,93 (d, 1H, J= 2)	128,2	C-4', C-6'
3'	6,92 (d, 2 H, J= 2)	116,0	C-1', C-5'
4'		160,9	
5'	6,92 (d, 2 H, J= 2)	116,0	C-1', C-3'
6'	7,93(d, J= 2)	128,2	C-2', C-4'
7-OCH ₃	3,90 (s, 3H)	56,18	C-7
1''	4,80 (1H, d, J=7,5)	103,5	C-5
2''	2,97	73,4	
3''	3,11 (t, J= 9.0)	76,6	
4''	3,27 (t, J = 9.0)	69,5	
5''	3,30 m	75,6	
6''	3,65(dd, J= 11,0, J= 5,6)	68,7	
1'''	4,19 (1H, d, J= 7,5)	104,4	C-6'''
2'''	3,56 (t, J = 9)	73,4	
3'''	3,23 m	75,9	
4'''	3,02 m	69,8	
5'''	3,68 m	65,6	

Từ phổ NMR một chiều và hai chiều, kết hợp với tài liệu đề nghị chất CC2 là 7-O-metilapigenin 5-O-glucopyranoside có cấu trúc như sau:



Hình 1 Cấu trúc hóa học và các tương tác hóa học trong CC2

5 Kết luận

Như vậy, đề tài “Khảo sát sơ bộ qui trình phân lập thành phần hóa học của lá cây Dó Bầu” thu được qui trình phân lập thành phần hóa học từ lá cây Dó Bầu.

Một hợp chất CC2 được phân lập dưới dạng tinh thể màu vàng tan ít trong metanol. Cấu trúc của hợp chất CC2 được xác định dựa vào số liệu phổ ^1H , ^{13}C NMR, phổ 2D-NMR HSQC, HMBC kết hợp với tài liệu thì cấu trúc đề nghị của hợp chất này là 7-O-metilapigenin 5-O-glucopyranoside.

Đề tài sẽ tiếp tục tiến hành phân lập các hợp chất tinh khiết từ các phân đoạn khác và thử hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2017.01.24/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 556- 558 (1995).
2. Quan Le Tran, Qui Kim Tran, Kyoji Kouda, Nhan Trung Nguyen, Yuikiko Maruyama, Ikuo Saika và Shigetodhi Kadota, *J. Nat.Med.* 20, 162-169 (2003).
3. Lê Đình Mỗi, *Tài nguyên thực vật cây tinh dầu ở Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, Tập 1, 286-293 (2001).
4. Jianghong Jang, Weiping Wang, Feng Luan, Xingguochen, *Int. J. Biol.Macromo* 37, 85-91 (2005).
5. Yasuo Shimada, Takae Tominaga, Tenji Konishi and shiu Kiyosawa, *Chem.Pharm. Bull.*, 30, 3791-3795 (1982).
6. Tsumotu Nakanishi, Etsuko Yamagata, Kaisuke Yoneda, Tsukasa Nagashima, Ichiro Kawasaki, Toshi Yoshida, Hideo Mori and Iwao Miura, *Phytochemistry*, 23, 2066-2067 (1984).
7. Keiji Hashimoto, Sachiko Nakahara, Takehisa Inoue, Yoshio Sumida, Musuko Takahashi and Yoshiro Masada, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 5088-5091 (1985).
8. Nguyễn Thị Kim Phụng, *Hoạt tính sinh học của những hợp chất hữu cơ tự nhiên*, Học phần cao học chuyên ngành Hóa hữu cơ, Đại học Khoa học Tự nhiên, 2000-2001
9. Võ Văn Chí, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà Xuất Bản Y học, 1997.

Procedure for Isolation of Chemical Composition from Do Bau Leaves (*Aquilaria crassna* Pierre leaves)

Ngo Thi Chau

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
ntchau@ntt.edu.vn

Abstract The paper presents the chemical compound isolation procedure from Do Bau leaves that were picked in Binh Duong province. 2,5kg of dried leaves was collected from 7kg fresh leaves. Next, the dried leaves were extracted three times with methanol via reflux method in two hour and then all extracted solution went through low pressure evaporation to get methanol gel. This methanol gel was then extracted using ethyl acetate to get the ethyl acetate gel that was then studied using column chromatography (on silica gel) with different polarization solutions. Finally, C1-C5 segments were obtained. C2 segment was selected for study by column chromatography to get the compound CC2. The compound structure was determined through analysis of their NMR-spectroscopic data with ^1H , ^{13}C NMR, 2D-NMR HSQC and HMBC. The compound was named 7-O-metilapigenin 5-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside]

Keywords Do bau, Do bau leaf, chemical composition of Do Bau, chemical compound isolation procedure from Do Bau leaves