



## HỢP CHẤT DITERPENOID VÀ FLAVONOID TỪ LÁ BÌNH BÁT NƯỚC *ANNONA GLABRA* L. (ANONACEAE)

Phạm Thị Nhật Trinh<sup>1</sup>, Đặng Thị Cẩm Nhung<sup>1</sup> và Lê Tiến Dũng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Tiền Giang

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Hóa học

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 21/10/2013

Ngày chấp nhận: 30/06/2014

### Title:

*Diterpenoid and flavonoid from the leave of Annona glabra L. (Anonaceae)*

### Từ khóa:

*Annona glabra, diterpenoid, flavonoid*

### Keywords:

*Annona glabra, diterpenoid, flavonoid*

### ABSTRACT

*From the hexane and ethyl acetate fractions of leaves of Annona glabra L., two compounds were isolated by column chromatography. The structures of these compounds were characterized as 8(14),15-pimaradien-18-oic acid (1), and quercetin (2) based on 1D and 2D NMR spectroscopic methods.*

### TÓM TẮT

*Từ phân đoạn hexane và ethyl acetate lá Bình bát nước (Annona glabra L.) hai hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc là 8(14), 15-pimaradien-18-oic (1) acid và quercetin (2). Cấu trúc các hợp chất được xác định dựa trên các phổ 1D và 2D NMR.*

## 1 MỞ ĐẦU

Cây Bình bát nước (*Annona glabra* L.) là một loài cây được phân bố rộng rãi ở nước ta [1], đây là loài cây rất dễ sống và có sự phát tán và sinh sôi nảy nở rất dễ dàng. Chi Annona có nhiều hoạt tính hấp dẫn như chống ung thư, làm cản trở quá trình nhân bản của tế bào HIV, kháng vi sinh vật [2-4],... Ở Việt Nam đã có một vài nghiên cứu về thành phần hóa học của *Annona glabra*. Trong quá trình sàng lọc các chất có hoạt tính diệt ký sinh trùng gây bệnh cho cá da trơn, cho thấy Bình bát nước là một loài thực vật có tiềm năng cao. Công trình này thông báo quá trình phân lập 2 hợp chất từ lá Bình bát nước thu hái tại thành phố Hồ Chí Minh.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên liệu

Mẫu thực vật dùng trong nghiên cứu là lá cây Bình bát được thu hái tại quận 8, Bình Chánh, TP.Hồ Chí Minh vào tháng 8/2011. Mẫu nghiên cứu được giám định tên khoa học tại Bộ môn Tài

nguyên Thực vật, Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp.Hồ Chí Minh. Lá già được rửa sạch, loại bỏ những phần sâu bệnh, sấy và xay thành bột mịn. Đây là nguyên liệu dùng trong nghiên cứu.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC): được thực hiện trên bảng mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F<sub>254</sub> (Merck), RP<sub>18</sub> F<sub>254s</sub> (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/EtOH hay FeCl<sub>3</sub>/EtOH được phun đều lên bảng mỏng, sấy khô rồi hơi nóng trên bếp điện từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (SKC): được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,40-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo Rp18 (30-50 μm). Ngoài ra còn sử dụng gel sephadex LH-20.

Điểm nóng chảy (mp): Điểm nóng chảy được đo trên máy Electrothermal IA seriee, dùng

mao quản không hiệu chỉnh của Viện Công nghệ Hoá học.

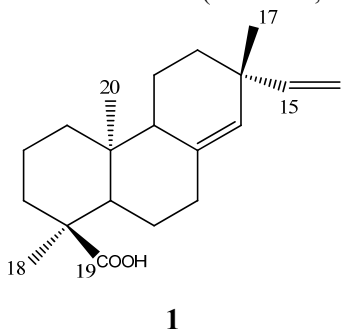
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### 2.3 Phân lập các chất

Lá cây Bình bát được phơi khô, sấy và nghiền nhỏ thành bột mịn (5 kg). Nguyên liệu bột mịn được tận trích với etanol 96% (3 × 25 lít) bằng phương pháp ngâm dầm, lọc và cô quay loại dung môi dưới áp suất thấp thu được cao etanol thô (500 g).

Trích pha rắn cao etanol lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần hexane, chloroform, ethyl acetate, metanol, thu được các cao tương ứng. Cao hexane (100 g) được SKC silica gel pha thường với dung môi rửa giải là hexane, EtOAc và hỗn hợp của chúng (từ 0–100%) thu được 12 phân đoạn. Sắc ký cột nhiều lần phân đoạn 2, kết hợp với sắc ký silica gel Rp18 và sắc ký lọc gel sephadex LH 20 thu được hợp chất **1** (32 mg). Cao ethyl acetate được sắc ký cột silica gel với hệ dung môi hexane-ethyl acetate (0-100%) thu được 8 phân đoạn. Phân đoạn 3 được sắc ký cột nhiều lần kết hợp với sắc ký lọc gel sephadex LH20 thu được hợp chất **2** (12 mg).

Hợp chất **1**: Chất rắn màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 162-164 °C.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO),  $\delta$



Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 Hz) kết hợp kỹ thuật DEPT cho biết hợp chất **1** có 20 carbon bao gồm ba nhóm ( $-\text{CH}_3$ ), tám nhóm ( $>\text{CH}_2$ ), bốn nhóm ( $>\text{CH}-$ ), năm carbon bậc bốn ( $>\text{C}<$ ). Trong đó có nhóm carbonyl của acid  $\delta_{\text{C}}$  183,8; một nối đôi kiểu ( $>\text{C}=\text{CH}-$ )  $\delta_{\text{C}}$  [137,9 (C-8) và 127,9 (C-14)] và một nhóm vinyl ( $\text{CH}_2=\text{CH}-$ )  $\delta_{\text{C}}$  [147,1 (C-15) và 112,8 (C-16)].

Các dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  cho dự đoán **1** có công thức phân tử là  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ , tương ứng với độ bất bão hòa là sáu. Trừ đi hai nối đôi và

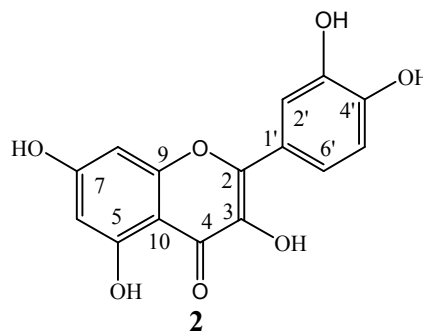
(ppm),  $J$  (Hz): 0,65 (3H; s; H-20); 0,99 (3H; s; H-17); 1,25 (3H; s; H-18); 4,95 (1H; m; H-16a) và 4,93 (1H; m; H-16b); 5,14 (1H; brs; H-14) và 5,73 (1H; dd; 10,5; 17,5 Hz; H-15).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO),  $\delta$  (ppm): 39,1 (C-1); 19,5 (C-2); 19,2 (C-3); 44,0 (C-4); 56,0 (C-5); 24,1 (C-6); 36,4 (C-7); 137,9 (C-8); 50,5 (C-9); 39,2 (C-10); 37,9 (C-11); 35,7 (C-12); 38,5 (C-13); 127,9 (C-14); 147,1 (C-15); 112,8 (C-16); 29,3 (C-17); 29,1 (C-18); 183,8 (C-19) và 13,7 (C-20).

Hợp chất **2**: Chất rắn màu vàng chanh. Điểm chảy 313-315 °C.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, aceton-d<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 6,26 (1H; *d*; 2Hz, H-6); 6,52 (1H; *d*; 2Hz; H-8); 6,98 (1H; *d*; 8,5Hz; H-5'); 7,68 (1H; *dd*; 8,5Hz và 2Hz; H-6'); 7,82 (1H; *d*; 2,5Hz; H-2').  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, aceton d-6)  $\delta$  (ppm): 146,9 (C-2); 136,7 (C-3); 176,5 (C-4); 162,3 (C-5); 99,1 (C-6); 164,9 (C-7); 94,4 (C-8); 157,7 (C-9); 104,1 (C-10); 123,7 (C-1'); 115,7 (C-2'); 145,8 (C-3'); 148,3 (C-4'); 116,2 (C-5'); 121,4 (C-6').

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** cho phản ứng dương tính với  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ .

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 Hz) xuất hiện các tín hiệu của proton nối đôi  $\delta_{\text{H}}$  [5,14 (1H; brs; H-14); 5,73 (1H; dd; 10,5; 17,5; H-15); 4,95 (1H; m; H-16a); 4,93 (1H; m; H-16b)]; ba nhóm methyl  $\delta_{\text{H}}$  [0,99 (3H; s; H-17); 1,25 (3H; s; H-18); 0,65 (3H; s; H-20)].



một nhóm chức acid ( $-\text{COOH}$ ), hợp chất **1** phải là một diterpenoid ba vòng. Ngoài ra, cấu trúc của **1** có mang ba nhóm methyl bậc bốn [ $\delta_{\text{C}}$  13,7 (C-20);  $\delta_{\text{C}}$  29,1 (C-18);  $\delta_{\text{C}}$  29,3 (C-17)] nên đây là một diterpenoid với khung sườn pimarane (cũng là khung sườn các diterpen được tìm thấy trong nhiều loài khác cùng chi *Annona*).

Phổ HMBC cho thấy sự tương quan giữa proton nhóm methyl bậc bốn  $\delta_{\text{H}}$  [1,25 (3H; s; H-18)] với nhóm carbonyl của acid  $\delta_{\text{C}}$  183,8; một nhóm carbon metylen  $\delta_{\text{C}}$  19,2; một nhóm carbon metin  $\delta_{\text{C}}$

56,0 và một nhóm carbon tứ cấp  $\delta_C$  44,0 khẳng định nhóm methyl  $\delta_H$  [1,25 (3H; s; H-18)] và nhóm carboxylic phải gắn vào C-4 của khung pimarane. Bốn carbon trên tương ứng lần lượt là C-19, C-3, C-5, C-4. Tương quan HMBC giữa proton H-5 [ $\delta_H$  0,65 (3H; s)] với hai nhóm methylene  $\delta_C$  24,1;  $\delta_C$  39,1; một nhóm methin  $\delta_C$  50,5; một nhóm methyl  $\delta_C$  13,7 và một carbon carbonyl của nhóm acid  $\delta_C$  183,8. Suy ra, 5 carbon trên là C-6 [ $\delta_C$  24,1]; C-1 [ $\delta_C$  39,1]; C-9 [ $\delta_C$  50,5]; C-20 [ $\delta_C$  13,7] và C-19 [ $\delta_C$  183,8]. Vị trí nối đôi tại carbon 8 và 14 được xác nhận dựa vào tương quan trên phổ HMBC giữa proton H-14 [ $\delta_H$  5,14] với một nhóm carbon bậc bốn  $\delta_C$  38,5 (C-13); hai nhóm carbon methylene  $\delta_C$  [36,4 (C-7); 35,7 (C-12)]; một nhóm carbon methin  $\delta_C$  [50,5 (C-9)] và một nhóm carbon methyl tứ cấp  $\delta_C$  [29,3 (C-17)].

Tương quan giữa hai proton methylene nhóm vinyl  $\delta_H$  [(4,95; m; H<sub>a</sub>-16); (4,93; m; H<sub>b</sub>-16)] với một carbon bậc bốn  $\delta_C$  38,5 hẳn là C-13 và một carbon sp<sup>2</sup>  $\delta_C$  147,1 ắt hẳn là C-15. Proton H-15 lại cho tương quan HMBC với một carbon methin sp<sup>2</sup>  $\delta_C$  [127,9 (C-14)]. Vậy nhóm vinyl phải gắn vào carbon C-13. Phổ ESI-MS cho đỉnh ion giả phân tử tại 303,3 [M + H]<sup>+</sup> tái khẳng định công thức phân tử của **1** là C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>.

Từ những phân tích phổ nghiệm trên kết hợp với tài liệu tham khảo[5], chúng tôi nhận danh hợp chất **1** là 8(14),15-pimaradien-18-oic acid.

Hợp chất **2** cho phản ứng dương tính với thuốc thử FeCl<sub>3</sub>/EtOH, như vậy **2** là một hợp chất phenolic. Phổ <sup>1</sup>H NMR xuất hiện năm proton vòng thơm [ $\delta_H$  6,26 (1H, *d*, 2Hz); 6,52 (1H, *d*, 2Hz); 6,98 (1H, *d*, 8,5Hz); 7,68 (1H, *dd*; 8,5Hz và 2 Hz) và 7,82 (1H, *d*, 2,5Hz)], một nhóm -OH kiềm nổi  $\delta_H$  12,13 (1H, *s*). Phổ <sup>13</sup>C NMR kết hợp với DEPT cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 15 cacbon, gồm mười carbon bậc bốn, năm carbon bậc ba. Trong mười carbon bậc bốn có bảy carbon mang oxi và một nhóm carbonyl.

Dữ liệu phổ <sup>1</sup>H NMR và <sup>13</sup>C NMR cho dự đoán đây là một flavonol. Trừ ba carbon đã mang oxi của khung flavonol, **2** còn thêm bốn nhóm hydroxi nữa. Các giá trị phổ <sup>1</sup>H NMR xác nhận sự hiện diện của một vòng benzen 1,2,3,5- thể [ $\delta_H$  6,26 (1H, *d*, 2Hz); 6,52 (1H, *d*, 2Hz)] và một vòng benzen 1,3,4- thể [ $\delta_H$  6,98 (1H, *d*, 8,5Hz); 7,68 (1H, *dd*; 8,5Hz và 2 Hz) và 7,82 (1H, *d*, 2,5Hz)].

Tín hiệu của nhóm hydroxi kiềm nổi trên phổ <sup>1</sup>H NMR khẳng định nhóm OH gắn vào C-5. Phổ HMBC cho tương quan yếu giữa tín hiệu  $\delta_H$  6,52

(1H, *d*, 2Hz) với tín hiệu  $\delta_C$  176,56 của C=O chứng tỏ proton  $\delta_H$  6,52 cùng với proton ghép meta với nó [ $\delta_H$  6,26 (1H, *d*, 2Hz)] thuộc vòng A của flavonol, suy ra cacbon C-7 trên vòng A phải mang một nhóm hydroxi.

Vòng B là một vòng benzen 1,3,4- thể do sự xuất hiện của ba proton [ $\delta_H$  6,98 (1H, *d*, 8,5Hz); 7,68 (1H, *dd*; 8,5Hz và 2 Hz) và 7,82 (1H, *d*, 2,5Hz)], điều này khẳng định vòng B mang hai nhóm hydroxi tại vị trí C-3' và C-4'. Phổ HMBC cho thấy proton ghép meta  $\delta_H$  7,82 (1H, *d*, 2,5Hz) tương quan với ba cacbon mang oxi [C-2, C-3' và C-4'] hẳn phải là H-2'. Proton ghép cặp meta với H-2' là H-6' [ $\delta_H$  7,68 (1H, *dd*; 8,5Hz và 2 Hz)], như vậy tín hiệu xuất hiện ở  $\delta_H$  6,98 (1H, *d*, 8,5Hz) là H-5'.

Từ các nhận định phổ nghiệm nêu trên, hợp chất **2** được nhận danh là 3,5,7,3',4'-pentahydroxiflavon (quercetin).

#### 4 KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật sắc ký cột silica gel pha thường, pha đảo, sephadex LH-20 kết hợp với sắc ký lớp mỏng từ cao hexane và cao ethyl acetate của lá Bình bát nước chúng tôi đã phân lập được 2 hợp chất 8(14),15-pimaradien-18-oic acid (**1**), quercetin (**2**) và. Đây là lần đầu tiên hợp chất quercetin (**2**) được phân lập trong chi Annona.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, (2004). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, nhà xuất bản Y học.
2. Padmaja V., Thankamany V., Hara N., Fujimoto Y., Hisham A. (1995), Biological activities of *Annona glabra* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 21-24.
3. Fang-Rong Chang, Pey-Yuh Yang, Jung-Yaw Lin, Kuo-Hsiung Lee, and Yang-Chang Wu (1998), Bioactive Kaurane Diterpenoids from *Annona glabra*. *J. Nat. Prod* 61(4), 437-439.
4. J.R. Zgoda-Pols, A.J. Freyer, L.B. Killmer, J.R. Porter (2002). Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. *Fitoterapia* 73(5), 434-438.
5. Nian-Yun Yang, Li Liu, Wei-Wei Tao, Jin-Ao Duan, Li-Juan Tian (2010). Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells. *Phytochemistry* 71, 1528-1533.