

GÓP PHẦN KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA VỎ CÂY MẮM ỒI (*AVICENNIA MARINA*)

Lê Thanh Phước và Lâm Thúy Phương¹

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 14/09/2012

Ngày chấp nhận: 19/06/2013

Title:

Contribution to the study on the chemical components of *Avicennia marina* bark

Từ khóa:

Vỏ cây Mắm ổi *Avicennia marina*, thành phần hóa học, taraxerone, taraxerol, betulin

Keywords:

Avicennia marina bark, chemical components, taraxerone, taraxerol, betulin

ABSTRACT

From the petroleum ether extracts of the bark of *Avicennia Marina*, collected in the coast of Bac Lieu province, three compounds have isolated: taraxerol ($C_{30}H_{50}O$), taraxerone ($C_{30}H_{48}O$), betulin ($C_{30}H_{50}O_2$). The structures of these compounds have been elucidated by modern spectroscopic methods such as: 1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT NMR and by comparison with those of previously reported data.

TÓM TẮT

Từ dịch chiết petroleum ether của vỏ cây Mắm ổi, thu hái tại ven biển tỉnh Bạc Liêu, đã cô lập được ba hợp chất là: taraxerol ($C_{30}H_{50}O$), taraxerone ($C_{30}H_{48}O$), betulin ($C_{30}H_{50}O_2$). Cấu trúc hóa học của các hợp chất này đã được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT NMR và được so sánh với tài liệu đã công bố.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mắm ổi có tên khoa học là *Avicennia marina*, thuộc họ Cỏ roi ngựa (Verbenaceae) (Phạm Hoàng Hộ, 2003). Cây được trồng hoặc mọc hoang ở vùng nước mặn hay nước lợ, gặp ở cả hai miền nước ta. Theo một số tài liệu về y học nhân gian trên thế giới, cây Mắm ổi là nguồn dược liệu có giá trị chữa bệnh. Vỏ cây của loài này đã được sử dụng trong y học cổ truyền ở Ai Cập để điều trị các bệnh về da, thấp khớp, bệnh đậu mùa, loét. (W. M. Bandaranayake, 2002). Ngoài ra, những kết quả nghiên cứu về hoạt tính sinh học của cây *Avicennia marina* đã khẳng định hoạt tính chống sốt rét, độc tế bào, đặc biệt là hoạt tính gây độc tế bào ung thư và chống khối u cũng đã được ghi nhận (M. Sharaf *et al.*, 2000). Mặc

dù, ở nước ta cây Mắm ổi đã được sử dụng rộng rãi ở nhiều nơi với mục đích chữa bệnh nhưng chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài cây này. Đó đó, chúng tôi đã thực hiện đề tài: “Khảo sát thành phần hóa học của vỏ cây Mắm ổi (*Avicennia marina*)”. Trong bài báo này chúng tôi đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất taraxerol, taraxerone và betulin.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Vỏ cây Mắm ổi được thu hái tại xã Định Thành, huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu, sau đó rửa sạch, cắt nhỏ, phơi khô.

Phương pháp: Chiết hoạt chất: Vỏ cây Mắm được ngâm trong cồn ethanol 96°, phần

dịch chiết cô quay loại dung môi thu được cao cồn. Sau đó lấy cao cồn chiết với dung môi petroleum ether (PE) cô quay loại dung môi thu được cao PE.

Phân lập chất từ cao PE: thực hiện quá trình sắc ký cột, chất hấp phụ là silica gel, dung môi giải ly cột bắt đầu từ PE sau đó tăng độ phân cực bằng dung dịch PE với ethyl acetate (EtOAc) theo tỷ lệ thích hợp. Theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Thuốc thử hiện vết là dung dịch sulfuric acid 10% trong methanol và dung dịch KMnO₄ trong NaOH 5% và sấy bản mỏng ở 110 °C. Các phân đoạn thể hiện R_f giống nhau trên TLC được gom lại. Tiến hành sắc ký cột tiếp tục với các phân đoạn giống nhau để phân lập được chất sạch.

Xác định cấu trúc của chất đã phân lập được: sử dụng các phương pháp phổ nghiệm:

¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT NMR và các tài liệu liên quan để xác định cấu trúc các chất phân lập được. Phổ NMR được đo trên máy Bruker Advance 500 MHz (Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội).

Silica gel dùng cho sắc ký cột pha thường cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel KG 60 F₂₅₄. Các hóa chất tinh khiết khác có xuất xứ từ Trung Quốc.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả sắc ký cột cao PE từ vỏ cây Mắm

Kết quả sắc ký cột silica gel từ 6.615 g cao PE cho 9 phân đoạn được trình bày ở Bảng 1 sau đây:

Bảng 1: Kết quả sắc ký cột silica gel của cao petroleum ether

Phân đoạn	Hệ dung môi giải ly	Khối lượng (g)	Kết quả TLC	Ghi chú
1	PE	0,526	Nhiều vết Có hai vết chính	Khảo sát
2	PE:EtOAc = 99:1	2,20	Nhiều vết Có hai vết chính	Khảo sát
3	PE:EtOAc = 95:5	2,098	Có 1 vết chính màu tím và 2 vết mờ	Khảo sát
4	PE:EtOAc = 9:1	0,45	Nhiều vết có 1 vết chính	
5	PE:EtOAc = 8:2	0,195	Nhiều vết	
6	PE:EtOAc = 7:3	0,189	Nhiều vết	
7	PE:EtOAc = 1:1	0,03	Nhiều vết	
8	EtOAc	0,247	Nhiều vết	
9	EtOAc:MeOH = 1:1	0,318	Nhiều vết	

Phân đoạn 1: được tách trên cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi PE 100%, PE:EtOAc = 99:1 thu được chất rắn, tinh thể hình kim màu trắng. Kiểm tra trên TLC với hệ dung môi *n*-hexane:CHCl₃ = 6:4 và phát hiện bằng H₂SO₄ 10% trong MeOH cho vết tròn màu cam sau đó chuyển sang tím có R_f = 0,39. Ký hiệu hợp chất này là PHUOC-PH-02 (khoảng 3.2 mg, không thu gom hết).

Phân đoạn 2: xuất hiện kết tủa màu trắng, tinh chế bằng sắc ký cột thường với các hệ dung môi giải ly cột PE 100%, PE:EtOAc = 99:1, PE:EtOAc = 98:2, thu được tinh thể hình kim màu trắng, hiện vết màu đỏ tím có

R_f = 0,34 (PE:EtOAc = 8:2) trên TLC khi dùng thuốc thử là H₂SO₄ 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là PHUOC-PH-01 (173 mg).

Phân đoạn 3: thấy có kết tủa màu trắng, tách lấy kết tủa tinh chế bằng cách cho rửa phân đoạn bằng petroleum ether và kết tinh lại nhiều lần phần không tan trong CH₂Cl₂ thu được tinh thể hình kim, màu trắng. Kiểm tra bằng TLC với hệ dung môi giải ly PE:EtOAc = 7:3 cho vết màu tím có R_f = 0,32 hiện hình bằng thuốc thử là H₂SO₄ 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là PHUOC-PH-03 (71 mg).

3.2 Kết quả dữ liệu phổ

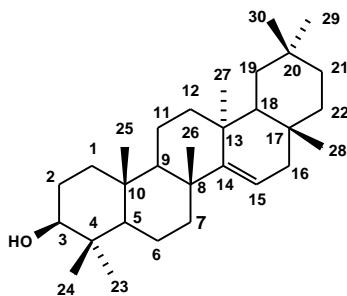
Hợp chất PHUOC-PH-01:

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5,53 (1H, dd, $J = 8$ và 3 Hz, H-15); δ 3,19 (1H, dd, $J = 11$ và 5 Hz, H-3). Ngoài ra, tín hiệu phổ còn cho thấy có 8 mũi đơn ở các vị trí δ : 0,98 (3H, s, H-23); 0,93 (3H, s, H-24); 0,80 (3H, s, H-25); 1,09 (3H, s, H-26); 0,82 (3H, s, H-28); 0,91 (3H, s, H-27); 0,95 (3H, s, H-29); 0,91 (3H, s, H-30).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3), δ (ppm): cho thấy có hai tín hiệu 158,1; 116,9 ppm lần lượt thuộc về liên kết đôi tại các vị trí C_{14} ; C_{15} và tín hiệu cộng hưởng của một nhóm hydroxy methine ở 79,1 ppm. Phổ DEPT NMR cho thấy hợp chất PHUOC-PH-01 có 30 carbon trong đó có: 10 nhóm methylene ($-\text{CH}_2-$), 5 nhóm methine ($-\text{CH}=\text{}$), 8 nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) và 7 carbon tứ cấp.

Các phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy PHUOC-PH-01 là một triterpenoid năm vòng thuộc khung taraxeran cùng với một liên kết đôi và một nhóm hydroxy trong phân tử. Các hằng số tương tác của H-3 ($J = 11$ Hz và 5 Hz) cho thấy nhóm hydroxy ở C-3 có cấu hình β .

Từ các dữ kiện trên nhận danh được PHUOC-PH-01 là taraxerol (Hình 1). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Nguyễn Quyết Chiến *et al.*, 2004.



Hình 1: Công thức cấu tạo của taraxerol

Taraxerol là một triterpen có hoạt tính kháng vi sinh vật, chống viêm và chống khối u. Trong đó hoạt tính kháng khuẩn với các nồng độ ức chế nhỏ nhất (MIC: Minimum

Inhibitory Concentration) 0,04; 0,016; 0,63 và 0,31 mg/mL tương ứng với các loại vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*. Ngoài ra nó có khả năng ức chế đáng kể sự tăng trưởng của dòng tế bào ung thư phổi ở người H157 (J. O. Famakin, 2002).

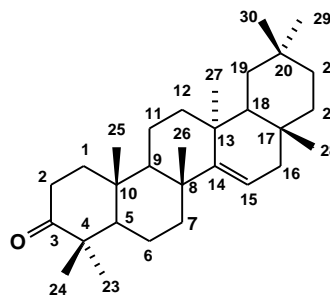
Hợp chất PHUOC-PH-02:

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): có 8 tín hiệu của 8 nhóm methyl: 0,83 (s, 3H, H-26); 0,91 (s, 3H, H-30); 0,92 (s, 3H, H-28); 0,96 (s, 3H, H-29); 1,07 (s, 3H, H-24); 1,08 (s, 3H, H-25); 1,09 (s, 3H, H-23); 1,14 (s, 3H, H-27). Độ dịch chuyển hóa học ở 5,56 (1H, dd, $J = 8$ và 3,5 Hz) là của proton liên kết tại carbon ở liên kết đôi (nhóm $=\text{CH}$ tại C_{15}).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3), δ (ppm): cho thấy nguyên tử carbon ở trạng thái lai hóa sp^2 thuộc nhóm $=\text{CH}$ có độ dịch chuyển hóa học ở 117,2 ppm. Nguyên tử carbon bậc 4 cũng ở trạng thái lai hóa sp^2 tham gia vào liên kết đôi với nguyên tử này có độ dịch chuyển hóa học ở 157,6 ppm. Ngoài ra, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn cho một tín hiệu ở trường rất yếu tương ứng với độ dịch chuyển hóa học 217,5 ppm đặc trưng cho carbon trong nhóm carbonyl tại vị trí C-3.

Phổ DEPT NMR cho thấy có 10 nhóm $-\text{CH}_2-$, 4 nhóm $-\text{CH}=\text{}$, 8 nhóm $-\text{CH}_3$, 8 carbon tứ cấp. Như vậy có thể kết luận rằng hợp chất này là một triterpen thuộc khung olean.

Từ những dữ kiện trên PHUOC-PH-02 được nhận danh là taraxerone (Hình 2). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của A.K. Jamal *et al.* 2009.



Hình 2: Công thức cấu tạo hóa học taraxerone

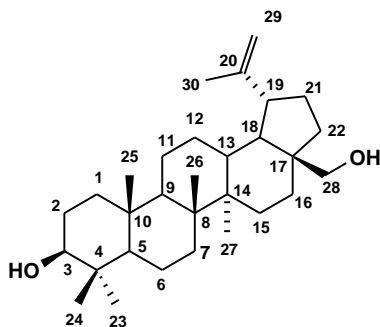
Taraxerone là một triterpen, hợp chất này đã được nghiên cứu *in vitro* cho thấy hoạt tính chống bệnh sốt đen do ký sinh trùng *Leishmania donovani* (AG 83) gây bệnh và hoạt tính chống khối u đối với dòng tế bào bạch cầu K562. (Biswas Moulisha *et al.*, 2009). Ngoài ra, taraxerone còn có hoạt tính chống lại thể hoạt động của ký sinh trùng *Giardia lamblia* cao hơn so với taraxerol và scopoletin ($IC_{50} = 11.33 \mu\text{g/mL}$). (Ignacio Hernandez-Chavez *et al.*, 2012)

Hợp chất PHUOC-PH-03:

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,79 (3H, s, H-24); 0,84 (3H, s, H-26); 0,98 (3H, s, H-23); 0,99 (3H, s, H-27), 1,05 (3H, s, H-25); 1,68 (3H, s, H-30); 2,39 (1H, dt, $J = 11$ và 5,5 Hz, H-19); 3,19 (1H, dd, $J = 11$ và 4,5 Hz, H-3); 3,33 (1H, dd, $J = 11$ và 5 Hz, H-28); 3,81 (1H, dd, $J = 11,5$ và 3,5 Hz, H-28); 4,58 (1H, br s, H-29); 4,68 (1H, br s, H-29).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cũng dễ dàng nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của một liên kết đôi ở 109,7 và 150,5 ppm tương ứng với carbon ở các vị trí C_{29} và C_{20} , một nhóm hydroxymethine ($\delta_{\text{C}} 79$; C_3) và một nhóm hydroxymethylene ($\delta_{\text{C}} 60,6$; C_{28}). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với DEPT cho thấy PHUOC-PH-03 là một triterpen thuộc khung lupan, có 30 tín hiệu carbon, trong đó có 6 nhóm methyl, 12 nhóm methylene, 6 nhóm methine, 6 carbon tứ cấp.

Từ những dữ kiện trên PHUOC-PH-03 được nhận danh là betulin (Hình 3). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Seyed Abdolmajid Ayatollahi *et al.* 2009.



Hình 3: Công thức cấu tạo hóa học betulin

Betulin là một triterpen có mặt trong nhiều loài thực vật thuộc các họ khác nhau. Betulin được ly trích từ cây *Betula utilis* chứa betulin lên đến 12% trọng lượng của nó. Do đó, betulin được dùng làm nguyên liệu ban đầu để chuyển hóa thành axit betulinic có hoạt tính sinh học cao. (K. M. Nadakarni, 1976). Ngoài ra, betulin còn thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng HeLa và Hep-2 với cùng giá trị IC_{50} là $40 \mu\text{g/mL}$. Betulin cũng thể hiện hoạt tính chống HIV với giá trị IC_{50} là $6,1 \mu\text{g/mL}$. (K. S. El Deeb *et al.*, 2003). Các nghiên cứu của Miura còn cho thấy betulin có tác dụng bảo vệ gan và làm giảm khả năng gây độc của CdCl_2 ở nồng độ thấp $0,1 \mu\text{g/mL}$. Cơ chế có thể là do betulin thúc đẩy sự tổng hợp các protein có tác dụng bảo vệ các tế bào khỏi ảnh hưởng của CdCl_2 . (N. Miura *et al.*, 1999)

4 KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phổ hiện đại đã phân lập và nhận dạng được 3 hợp chất triterpen từ cao petroleum ether của vỏ cây Mắm ôi là: taraxerol, taraxerone và betulin. Đây là lần đầu tiên 3 triterpenoid được phân lập từ bộ phận vỏ của cây Mắm ôi và những hợp chất này đều có hoạt tính sinh học cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A.K. Janal, W.A. Yaacob and Laily B. Din, 2009. Triterpenes from the Root Bark of *Phyllanthus Columnaris*, Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3(2): 1428-1431.
2. Biswas Moulisha, Mandal Nirup Bikash, Palit Partha, Ghosh Ashoke Kumar, Bannerjee Sukdeb and Halder Pallab.Kanti, 2009. *In vitro* Anti-Leishmanial and Anti-Tumour Activities of a Pentacyclic Triterpenoid Compound Isolated from the Fruits of *Dregea volubilis* Benth Asclepiadaceae, Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8 (2): 127-131.
3. J. O. Famakin, 2002. Investigation of antibacterial compounds present in *Combretum woodii duemmer*. MSc Thesis. University of Pretoria, South Africa (unpublished).
4. Seyed Abdolmajid Ayatollahi, Asie Shojaii, Farzard Kobarfard, MitraNori, Mohammad

- Fathi and Mohammad Iqbal Choudhari, 2009. Terpens from aerial parts of *Euphorbia splendida*, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(9), pp. 660-665.
5. Ignacio Hernandez-Chavez, Luis W. Torres-Tapia, Paulino Sima-Polanco, Roberto Cedillo-Rivera, Rosa Moo-Puc and Sergio R. Peraza-Sanchez, 2012. Antigiardial Activity of *Cupania dentata* Bark and its Constituents, *J. Mex. Chem. Soc.*, 56(2), 105-108.
 6. K.M. Nadakarni, 1976. *Betula utilis* D.Don, *Indian Mater. Med.*, 1, 198-1296.
 7. K. S. El Deed, R. A. Al-Haidari, J. S. Mossa and A. Abdel Monem, 2003. Phytochemical and Pharmacological studies of *Maytenus Forsskaoliana*, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11(4), 184-191.
 8. M. Sharaf, M. A. El-AnSari and N. A. Saleh, 2000. New flavonoids from *Avicennia marina*, *Fitoterapia*, 71(3), 271-277.
 9. N. Muira, Y. Matsumoto, S. Miyairi, S. Nishiyama and A. Naganuma, 1999. Protective Effects of Triterpene Compounds. Against the Cytotoxicity of Cadmium in HepG2 Cells, *Molecular Pharmacology*, 56, 1324-1328.
 10. Nguyễn Quyết Chiến, Nguyễn Văn Hùng, Trần Văn Sung, 2004. Nghiên cứu thành phần hóa học cây *Kydia Glabrescens*, *Tạp chí Hóa học*, T. 42(1), tr. 71-75.
 11. Phạm Hoàng Hộ, 2003. *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển II, NXB Trẻ, TP Hồ Chí Minh, 844 - 845.
 12. W.M. Bandaranayake, 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants, *Wetlands Ecology and Management* 10: 421-452.