

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA RỄ CÂY MẮM (*AVICENNIA MARINA*)

Phạm Thị Thùy Trang¹ và Lê Thanh Phước¹

ABSTRACT

*Isolation of the chemical components from the root of Vietnamese mangrove plant *Avicennia marina* (Verbenaceae) cultivated in the coast of Bac Lieu province found the mixture of lupeol (C₃₀H₅₀O) and stigmasterol (C₂₉H₄₈O) from petroleum ether extracts, kaempferol (C₁₅H₁₀O₆) and esculetin (C₉H₆O₄) from ethyl acetate extracts. Structures of these compounds have been elucidated by modern spectroscopic methods: MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, COSY and HMBC.*

Keywords: *Avicennia marina, stigmasterol, lupeol, kaempferol, esculetin*

Title: *Study on chemical components of Avicennia marina root*

TÓM TẮT

Từ rễ cây mắm ôi trồng tại ven biển tỉnh Bạc Liêu, cô lập được lupeol (C₃₀H₅₀O) và stigmasterol (C₂₉H₄₈O) từ dịch chiết petroleum ether, kaempferol (C₁₅H₁₀O₆) và esculetin (C₉H₆O₄) từ dịch chiết ethyl acetate. Cấu trúc hóa học các chất này đã được xác định bằng các loại phổ MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, COSY và HMBC.

Từ khóa: *Avicennia marina, component, stigmasterol và lupeol, kaempferol, esculetin.*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây *Avicennia marina* thuộc họ mắm (*Verbenaceae*), là một nhóm các loài cây thuộc rừng ngập mặn phân bố trong các vùng bờ biển nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trong cây *Avicennia marina* có chứa các hợp chất hữu cơ quan trọng như: alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid and iridoid. Theo y học dân gian, loài cây này được dùng để chữa bệnh thấp khớp, các bệnh về da, thân của nó có thể chữa bệnh ung thư. Có rất nhiều công trình nghiên cứu về cây *Avicennia marina*, nhưng rễ của loài cây này ít được sự quan tâm nghiên cứu. Mặc khác đặc điểm đặc trưng của cây mắm là sống được trong môi trường nước mặn khắc nghiệt nhờ vào bộ rễ của nó. Nên đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là rễ cây *Avicennia marina*.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Mẫu rễ phơi hay còn gọi là phé căn (phần ngoi trên mặt đất) của cây mắm ôi (trồng tại ven biển ấp Nhà Mát, xã Hiệp Thành, thị xã Bạc Liêu) thu hái về được rửa, tách lấy vỏ, xắt nhỏ và phơi khô.

2.2 Phương pháp

Chiết hoạt chất: ngâm mẫu vỏ rễ mắm ôi trong cồn 96°, loại dung môi dưới áp suất kém bằng máy cô quay (Rotavapor của Buchi). Sau đó, chiết lần lượt với

¹ Trường Đại học Cần Thơ

petroleum ether và ethyl acetate và loại dung môi bằng máy cô quay được cao petroleum ether (PE) và cao ethyl acetate (EtOAc).

Phân lập các chất từ dịch chiết petroleum ether và ethyl acetate: thực hiện sắc ký cột, chất hấp phụ là silica gel, sử dụng những hỗn hợp dung môi giải hấp của petroleum ether và ethyl acetate và methanol (MeOH) có độ phân cực tăng dần. Theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký bản mỏng với hệ dung môi giải ly là PE:EtOAc, PE:CHCl₃ và CHCl₃:EtOAc thuốc thử hiện vết là dung dịch H₂SO₄ 10% trong methanol và sấy bản mỏng ở 110°C. Các phân đoạn có cùng giá trị R_f trên sắc ký bản mỏng được gộp lại. Tiến hành sắc ký cột tiếp tục với các phân đoạn giống nhau để cô lập được chất sạch.

Xác định cấu trúc của các chất đã cô lập được: sử dụng các phương pháp phổ nghiệm: IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC và HMBC.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Từ cao chiết petroleum ether

3.1.1 Kết quả sắc ký

Từ 20 g cao chiết xuất được trong dung môi petroleum ether sắc ký cột trên silica gel cho 11 phân đoạn được trình bày ở bảng 1.

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

Phân đoạn	Hệ dung môi giải ly	Trọng lượng cặn (g)	Sắc ký bản mỏng	Ghi chú
1	PE:EtOAc = 99:1	0,692	vết dầu	
2	PE:EtOAc = 98:2	0,751	3 vết tạt chất và 1 vết chính màu tím phân cực hơn	Khảo sát
3	PE:EtOAc = 98:2	1,448	1 vết chính màu xanh đậm và 2 vết mờ	Khảo sát
4	PE:EtOAc = 95:5	3,813	nhiều vết	
5	PE:EtOAc = 9:1 PE:EtOAc = 7:3	6,433	nhiều vết	
6	PE:EtOAc = 5:5	1,706	nhiều vết	
7	PE:EtOAc = 2:8	0,889	nhiều vết	
8	EtOAc = 100%	0,296	nhiều vết	
9	EtOAc:MeOH = 9:1	0,107	nhiều vết	
10	EtOAc:MeOH = 1:1	0,391	nhiều vết	
11	MeOH = 100%	0,452	nhiều vết	

3.1.2 Cô lập các chất tinh khiết từ các phân đoạn tinh sạch của cao chiết petroleum ether

Phân đoạn 2, thấy có tinh thể, tinh chế bằng cách sắc ký cột thường với hệ dung môi giải ly PE:EtOAc = 99:1; 98:2. Kết quả tại phân đoạn PE:EtOAc = 98:2 thu được tinh thể hình kim màu trắng đục, hiện vết màu tím có R_f = 0,43 (PE:EtOAc = 75:25) trên TLC khi dùng thuốc thử là H₂SO₄ 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là chất **I** (0,225 g).

Phổ khối va chạm electron (*EI* - MS) cho pic phân tử m/z (%): 426 [M^+] (49), ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{50}O$. Các pic cơ bản: 411 (23%, $M^+ - CH_3$), 218 (73%), 207 (28%), 203 (26%), 189 (27%), 175 (10%), 135 (27%), 95 (100%).

Phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, δ ppm, $J = Hz$) cho thấy trong phân tử chất **I** có 1 tín hiệu mũi dd của 1 proton ở vùng từ trường cao 3,18 ppm là dấu hiệu đặc trưng cho proton gắn ở vị trí nguyên tử C số 3 của hợp chất pentacyclic triterpenoid. Tín hiệu phổ cho 2 mũi đa ở vị trí 4,68 và 4,56 chỉ định cho mỗi proton gắn ở vị trí nguyên tử C số 3. Tín hiệu phổ cho thấy có 7 mũi đơn ở các vị trí δ 0,75; 0,78; 0,81; 0,92; 0,94; 1,02; và 1,68 ppm chỉ định cho 3 proton của nhóm metyl lần lượt gắn vào nguyên tử C có vị trí tương ứng là C-17 (H_3 -28), C-4 (H_3 -23; H_3 -24), C-10 (H_3 -25), C-18 (H_3 -26), C-14 (H_3 -27) và C-20 (H_3 -30).

Phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, δ ppm) cho thấy trong phân tử chất **I** có 30 C.

Phổ DEPT NMR kết hợp ^{13}C -NMR cho thấy có 11 nhóm $-CH_2$, 6 nhóm $-CH=$, 8 nhóm $-CH_3$.

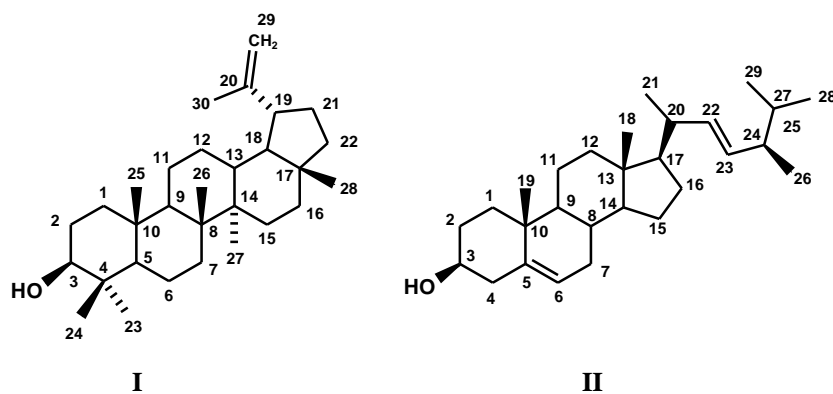
Từ các dữ liệu về phổ, kết luận chất **I** là lupeol, có công thức phân tử là $C_{30}H_{50}O$. Công thức cấu tạo hóa học được trình bày ở hình 1.

Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Ali *et al.* (2007). Lupeol có thể ngăn chặn sự di chuyển và sự phát triển của của tế bào ung thư vùng đầu và cổ bao gồm ung thư mũi, khoang miệng, họng, thanh quản, tuyến giáp và tuyến nước bọt. Căn bệnh này thường tấn công người châu Á hơn so với người châu Âu do một số tập quán ăn uống như hút thuốc lá, uống rượu quá nhiều, ăn trầu cau và thực phẩm bảo quản lâu ngày như cá muối. Các bệnh ung thư này đều rất khó chữa bằng phẫu thuật (Mohammad Saleem *et al.* 2009).

Phân đoạn 3: thấy có tinh thể, tinh chế bằng cách sắc ký cột thường với hệ dung môi giải ly PE: $CHCl_3 = 1:1$ thu được tinh thể hình kim màu trắng, hiện một vết tròn màu xanh đen có $R_f = 0,42$ (PE:EtOAc = 75:25) trên TLC khi dùng thuốc thử là H_2SO_4 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là chất **II** (0,184 g).

Phổ 1H -NMR, $CDCl_3$, δ , ppm: 5,36(d, 5 Hz, $-CH=$); 5,16 (dd, 8,5 Hz; 15,1 Hz; $-CH=$); 5,02 (dd, 8,5 Hz; 15,1 Hz; $-CH=$); 3,53 (m, $>CH-O-$); 0,69-1,03 H của 6 nhóm $-CH_3$. Từ các dữ liệu về phổ, kết luận chất **II** là stigmasterol. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Wilart Pompimon *et al.* (2009).

Stigmasterol là một phytosterol, được nghiên cứu sử dụng trong phòng ngừa ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú và ung thư kết tràng (Award & Fink, 2000).



Hình 1: Cấu trúc hóa học của lupeol (I) và stigmasterol (II)

3.2 Từ cao chiết ethyl acetate

3.2.1 Kết quả sắc ký

Từ 12 g cao ethyl acetate tiến hành sắc ký cột trên silica gel cho 8 phân đoạn như được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Kết quả sắc ký cột silica gel của cao chiết ethyl acetate

Phân đoạn	Hệ dung môi giải ly	Trọng lượng cặn (g)	Sắc ký bản mỏng	Ghi chú
1	EtOAc 100%	1,037	2 vết vàng đậm và 1 vết tạp chất	Khảo sát
2	EtOAc:MeOH = 99:1	0,765	nhiều vết	
3	EtOAc:MeOH = 97:3	1,027	nhiều vết	
4	EtOAc:MeOH = 9:1	0,503	nhiều vết	
5	EtOAc:MeOH = 7:3	0,592	nhiều vết	
6	EtOAc:MeOH = 1:1	0,236	nhiều vết	
7	EtOAc:MeOH = 3:7	0,992	nhiều vết	
8	MeOH = 100%	1,896	nhiều vết	

3.2.2 Cô lập các chất tinh khiết từ các phân đoạn tinh sạch của cao chiết ethyl acetate

Phân đoạn 1 (1,037 g) thấy 2 vết vàng đậm, tiến hành sắc ký cột thường với hệ dung môi giải ly: PE:EtOAc = 9:1; 8:2; 1:1;... Kiểm tra các phân đoạn bằng TLC dùng dung dịch H₂SO₄ 10% trong MeOH làm thuốc thử. Các phân đoạn có R_f giống nhau được gom chung và được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả sắc ký cột trên phân đoạn 1 của cao chiết ethyl acetate

Phân đoạn	Hệ dung môi giải ly	Trọng lượng cặn (g)	Sắc ký bản mỏng	Ghi chú
1-1	PE:EtOAc = 9:1	0,055	nhiều vết	
1-2	PE:EtOAc = 8:2	0,287	2 vết vàng đậm	Khảo sát
1-3	PE:EtOAc = 5:5	3,335	nhiều vết	
1-4	EtOAc = 100%	0,217	nhiều vết	
1-5	EtOAc: MeOH = 5:5	0,065	nhiều vết	

Phân đoạn 1-2 (0,287 g) thấy 2 vết vàng đậm, tiến hành sắc ký cột thường với hệ dung môi giải ly CHCl₃:EtOAc = 1:1 thu được 3 phân đoạn.

Phân đoạn 2-1 thấy có tinh thể, kết tinh lại trong CHCl_3 thu được chất bột màu vàng, hiện một vết tròn màu vàng đậm có $R_f = 0,42$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc} = 1:1$) trên TLC khi dùng thuốc thử là H_2SO_4 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là **III** (0,063 g).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (MeOD, δ ppm, $J = \text{Hz}$) cho thấy trong phân tử chất **III** có 2 proton ở vùng từ trường thấp của vòng thơm thể ở vị trí *meta* tại 6,19 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz; H-6); 6,39 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz; H-8); 2 proton vừa có tương tác thể *ortho* vừa có tương tác thể *meta* ở 8,08 ppm (H-2', H-6', 2H, dd, $J_{(\text{H-2}', \text{H-3}')} = 9,0$ Hz, $J_{(\text{H-2}', \text{H-6}')} = 2,0$ Hz) và 2 proton có tương tác thể *ortho* ở 6,92 ppm (H-3', H-5', 2H, dd, $J_{(\text{H-5}', \text{H-6}')} = 9,0$ Hz, $J_{(\text{H-3}', \text{H-5}')} = 2,0$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, δ ppm) cho thấy trong phân tử chất **III** có 15 C. Trong đó có 2 nhóm $\text{CH}=\text{C}$ tại 94,5 ppm và 99,3 ppm thuộc vòng thơm; 7 tín hiệu C từ cấp ở vùng từ trường thấp 137,1-165,5 ppm cho thấy chúng mang oxygen; 1 tín hiệu carbon carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) tại 177,3 ppm; chứng tỏ đây là khung flavonoid.

Phổ DEPT NMR kết hợp $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy chất **III** có 6 nhóm $-\text{CH}=\text{C}$, 9 nhóm C tứ cấp.

Phổ HSQC cho tín hiệu H tại 6,19 ppm gắn trực tiếp với C tại 99,3 ppm; H tại 6,39 ppm gắn trực tiếp với C tại 94,5 ppm; H tại 6,92 ppm gắn trực tiếp với C tại 116,3 ppm và H tại 8,08 ppm gắn trực tiếp với C tại 130,6 ppm.

Phổ COSY cho tín hiệu tương quan giữa proton tại 8,08 ppm (dd, $J = 9,0$ và 2,0) là của H-2' và H-6' và tại 6,92 ppm (dd, $J = 9,0$ và 2,0) là tín hiệu của H-3' và H-5', còn các tín hiệu $\delta = 6,39$ ppm và 6,19 ppm là tín hiệu tương quan giữa proton H-6 và H-8.

Từ phổ HMBC cho thấy H-2' ($\delta = 8,08$ ppm) có tương tác xa với các nguyên tử cacbon C-1' (123,7 ppm) và C-3' (116,3 ppm), H-3' ($\delta = 6,92$ ppm) có tương tác xa với C-2' (130,6 ppm) và C-4' (177,3 ppm), H-5' tương tác xa với C-4' (177,3 ppm) và C-6' (130,6 ppm), H-6' tương tác xa với C-5' (116,3 ppm) và C-1' (123,7 ppm), H-6 có tương tác xa với C-5 (160,5 ppm) và C-7 (162,4 ppm). Còn H-8 có tương tác xa với C-7 (162,4 ppm) và C-9 (158,2 ppm).

Từ các dữ liệu về phổ, kết luận chất **III** là 3,5,7,4'-tetrahydroxy flavone (kaempferol). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Rahaman *et al.* 2006.

Phân đoạn 2-3, thấy có tinh thể, kết tinh lại trong CHCl_3 thu được chất bột màu vàng, hiện một vết tròn vàng đậm có $R_f = 0,56$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc} = 3:7$) trên TLC khi dùng thuốc thử H_2SO_4 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là **IV** (0,088 g).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (MeOD, δ ppm, $J = \text{Hz}$) cho thấy phân tử chất **IV** có 2 tín hiệu mũi dd tương ứng $\delta 6,1$ (1H, d, $J_{(\text{H-3}, \text{H-4})} = 9,5$ Hz; H-3) và 7,7 (1H, d, $J_{(\text{H-3}, \text{H-4})} = 9,5$ Hz; H-4). Tín hiệu phổ cho thấy có 2 mũi đơn ở các vị trí $\delta 6,9$ và 6,7 ppm tương ứng với 2 proton 6,7 (1H, s, H-8) và 6,9 (1H, s, H-5).

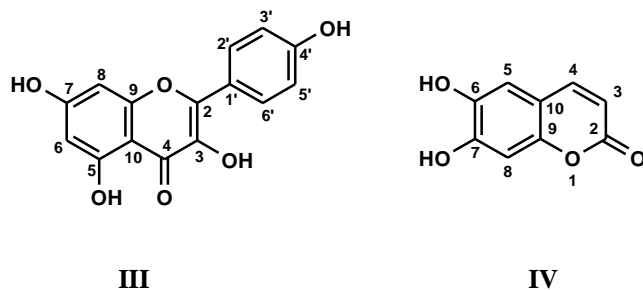
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, δ ppm) cho thấy trong phân tử chất **IV** có 9 C.

Phổ DEPT NMR kết hợp $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy chất **IV** có 4 nhóm $\text{CH}=\text{C}$, 5 nhóm C tứ cấp.

Phổ HSQC cho tín hiệu H tại 6,1 ppm gắn trực tiếp với C tại 112,8 ppm; H tại 6,7 ppm gắn trực tiếp với C tại 103,6 ppm; H tại 6,9 ppm gắn trực tiếp với C tại 113,0 ppm và H tại 7,7 ppm gắn trực tiếp với C tại 146,0 ppm.

Phổ COSY cho tín hiệu tương quan giữa H tại 7,7 (d, J = 9,5 Hz) và H tại 6,1 (d, J = 9,5 Hz).

Từ các dữ liệu về phổ, kết luận chất **IV** là esculetin. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Gherraf *et al.* (2006).



Hình 2: Công thức cấu tạo hóa học của kaempferol (III) và esculetin (IV)

4 KẾT LUẬN

Đã phân lập và xác định được cấu trúc bốn hợp chất: lupeol (C₃₀H₅₀O), stigmasterol (C₂₉H₄₈O), kaempferol (C₁₅H₁₀O₆) và esculetin (C₉H₆O₄) từ rễ phôi của cây mắm ổi (trồng tại ven biển ấp Nhà Mát, xã Hiệp Thành, thị xã Bạc Liêu). Điều này đã giải thích được việc sử dụng cây mắm để trị bệnh ung thư, các bệnh về da,...trong dân gian.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali M.S. and S. Waseemuddin Ahmed Shehla Imam, Iqbal Azhar, M. Mohtasheemul Hasan (2007), “Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus Indica* Linn”, Pak. J. Pharm. Sci., Vol.20(2), 125-127.
- Award A. B. and Fink C. S. (2000), “Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action”, Journal of Nutrition 130:2127-2130.
- Gherraf, N. El-Bassuony, A. A. Zellagui, A. Rhouati, S. Ahmed, A. A. Ouahrani, M. R. (2006), “Isolation of Coumarins and coumarin glucoside from *Launaea resedifolia*”, Asian Journal of Chemsitry, Vol.18 (3), 2348-2352.
- Mohammad Saleem, Imtiyaz Murtaza, Rohinton S. Tarapore, Yewseok Suh, Vaqar Mustafa Adhami, Jeremy James Johnson, Imtiaz Ahmad Siddiqui, Nagma Khan, Mohammad Asim, Bilal Bin Hafeez, Mohammed Talha Shekhani, Benyi Li and Hasan Mukhtar (2009), “Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling”, Carcinogenesis, 30(5):808-817.
- Rahaman M. S., AJM Moynul Hasan, M. Y. Ali and M. U. Ali (2006), “A Flavone from the Leaves of *Cassia Alata*”, Bangladesh J. Sci. Ind. Res., 41(1-2), 93-96.
- Wilart Pompimon, Sod Monkodkaw, Chatchanok Loetchutinat, Narong Nuntasaeen (2009), “Identification and antiproliferative activity evaluation of a series of triterpenoids isolated from *flueggea virosa*”, American Journal of Applied Sciences, Vol.6(10), 1800-1806.