

PHÂN LẬP ANDROGRAPHOLID VÀ NEOANDROGRAPHOLID TỪ CÂY XUYÊN TÂM LIÊN (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NEES)

Huỳnh Văn Hóa¹, Phùng Văn Trung và Nguyễn Ngọc Hạnh²

ABSTRACT

Two diterpenic lactones, andrographolid (XTL1) and neoandrographolid (XTL2) were isolated from ethanol extracts of the whole plant of *Andrographis paniculata* Nees from Phu Yen by chromatographic methods. Their structures were elucidated by spectrometric methods including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HSQC, HMBC, MS.

Keywords: *Andrographis paniculata*, *Acanthaceae*, diterpenoids, andrographolid, neoandrographolid

Title: Isolation andrographolid and neoandrographolid from *Andrographis paniculata* Nees

TÓM TẮT

Từ dịch chiết etanol của cây Xuyên tâm liên trồng tại Phú Yên đã cô lập được hai diterpen lacton là andrographolid (XTL1) và neoandrographolid (XTL2) bằng các phương pháp sắc ký. Cấu trúc được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HSQC, HMBC, MS.

Từ khóa: Xuyên tâm liên, Ô rô, diterpenoids, andrographolid, neoandrographolid

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Xuyên tâm liên tên khoa học là *Andrographis paniculata*, họ Ô rô (Acanthaceae). Cây Xuyên tâm liên còn gọi là cây Công cộng, Lãm hạch liên, Hùng húc, Khổ đấm thảo hay tên tiếng Anh là Chiretta, Creat, Kariyat, King of bitters sinta, Halviva và tên tiếng Pháp là Roi des amers (Đỗ Huy Bích và cộng sự, 2004). Cây phân bố ở nhiều nước châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam ... Ở Việt Nam, cây được trồng rộng rãi trong cả nước.

Về công dụng trong y học, từ lâu dân gian đã biết dùng Xuyên tâm liên để chữa bệnh tả, sốt, viêm họng, đau lưng, rắn cắn, nhiễm trùng, tiêu chảy... Trong những năm gần đây Xuyên tâm liên còn được phát hiện làm tăng bài tiết mật, bảo vệ gan mật và cơ tim, điều hòa tuần hoàn máu và tuyến giáp, đặc biệt có khả năng chống ung thư và kháng HIV.

Thành phần hóa học của cây Xuyên tâm liên đã được nhiều tác giả nước ngoài nghiên cứu. Cho đến nay còn ít tác giả công bố về thành phần hóa học của cây Xuyên tâm liên Việt Nam, một số tác giả đã phân lập và khảo sát hoạt tính sinh học của các diterpen lacton từ lá Xuyên tâm liên (Nguyễn Văn Đậu, Lê Duy Hiếu, 2007). Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả về sự phân lập và nhận danh

¹ Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Công nghệ hóa học – Viện Khoa học & và Công nghệ Việt Nam

cấu trúc 2 diterpen lacton là andrographolid và neoandrographolid từ cây Xuyên tâm liên trồng tại Phú Yên.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Cây Xuyên tâm liên do Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung cung cấp. Cây được trồng tại Phú Yên, thu hái vào tháng 10 năm 2007 khi cây bắt đầu ra hoa.

2.2 Chiết xuất và cô lập

Toàn cây Xuyên tâm liên bỏ rễ (10kg) được chiết nóng với cồn loãng theo phương pháp đun hoàn lưu. Sau khi cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao tổng (2.53kg). Cao này được lacer chiết với ethyl acetate, cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao Ac (280g).

Từ cao Ac (10g), tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly là petroleum ether (PE) và ethyl acetate (EtOAc). Kết quả thu được 12 phân đoạn (X1, X2, ..., X12).

Tại phân đoạn X8 (dung môi giải ly PE : EtOAc = 6 : 4) thu được cặn màu vàng có vết chính với $R_f = 0.35$ (CHCl_3 : MeOH = 9 : 1). Kết tinh lại trong metanol (MeOH) thu được tinh thể hình lăng trụ không màu, có điểm tan chảy $mp = 235^\circ\text{C}$, ký hiệu là XTL1 (363 mg).

Tại phân đoạn X10 (dung môi giải ly PE : EtOAc = 45 : 55) thu được cặn màu vàng có vết chính với $R_f = 0.21$ (CHCl_3 : MeOH = 9 : 1). Kết tinh lại trong MeOH thu được tinh thể hình kim không màu, có điểm tan chảy $mp = 174^\circ\text{C}$, ký hiệu là XTL2 (348 mg).

2.3 Phương pháp nhận dạng cấu trúc

Điểm nóng chảy được đo trên máy Electrothermal 9100 (UK), mao quản không hiệu chỉnh. Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMQC, HMBC được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz, độ dịch chuyển hóa học được tính theo δ (ppm), hằng số ghép cặp (J) tính bằng Hz. Phổ khối lượng được đo trên máy 1100 series LC/MS Trap Agilent. Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silica gel Merck 60F254 trắng sẵn dày 0.2 mm. Sắc ký cột dùng silicagel 60, 0.04-0.06 mm Scharlau GE 0048.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nhận danh cấu trúc XTL1

Tinh thể XTL1 kết tinh trong MeOH có hình lăng trụ to, không màu, điểm tan chảy $mp = 235^\circ\text{C}$, sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (CHCl_3 : MeOH = 9 : 1) hiện vết bằng thuốc thử H_2SO_4 10% trong cồn cho vết màu nâu có $R_f = 0.35$.

– Phổ LC/MS cho pic m/z $[\text{M-H}]^+$ là 349 ứng với công thức nguyên $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$.

- Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, δ ppm) (Bảng 1) cho các mũi tín hiệu proton: nhóm mũi trong khoảng (0.66; 1.08) là proton của hai nhóm $-\text{CH}_3$ ứng với C_{20} và C_{18} ; ba mũi tín hiệu proton của nhóm OH (4.12; 5.03; 5.69); một proton của olefin ở 6.62 (td; $J = 7$ và 1.5 Hz) ứng với $=\text{CH}-$ của C_{12} ; hai proton của nhóm methin kề O ở 3.25 và 4.91 ứng với CH-O ở vị trí 3 và 14; ngoài ra còn có bốn tín hiệu proton của nhóm methylen $\text{CH}_2\text{-O}$ ở 4.04 (dd; $J = 10.0$ và 2.0 Hz; H-15a); 4.39 (dd; $J = 10.0$ và 7.0 Hz; H-15b); 3.25 (br; H-19a) và 3.85 (dd; $J = 11.0$ và 2.5 Hz; H-19b).
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, δ ppm) (Bảng 1) kết hợp với phổ DEPT cho thấy trong phân tử XTL1 có tất cả 20 carbon, trong đó có hai nhóm CH tại $\text{C}_{5,9}$ (54.3; 55.4); hai nhóm CH kề O tại $\text{C}_{3,14}$ ở (78.4; 64.5); một nhóm carbonyl bởi sự hiện diện của tín hiệu 169.9 (lacton); mũi 14.7 và 23.0 là đặc trưng của hai nhóm CH_3 ; một mũi hấp thụ ở 108.2 là của nhóm $=\text{CH}_2$ ứng với C_{17} .
- Phổ HSQC cho biết tương quan giữa C và H trong từng vị trí.
- Phổ HMBC (Bảng 1) cho thấy proton của nhóm olefin H-12 tương tác với C_{11} , C_9 , C_{14} và C_{16} ; H-14 tương tác C_{13} , C_{12} và C_{16} ; nhóm methylen kề nối đôi $=\text{CH}_2$ ở vị trí 17 tương tác với C_7 và C_9 ...
- Từ các phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, δ ppm); Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, δ ppm) kết hợp với phổ DEPT; COSY; HSQC; HMBC và so sánh tài liệu đã công bố (Akowuah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., Maria, A, 2006; Du, Q., Jerz, G., Winterhalter, P., 2003) hợp chất XTL1 được nhận danh là andrographolid có công thức cấu tạo như Hình 1.

Bảng 1 : Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC và COSY của XTL1

Vị trí C/H	Phổ ^{13}C δ ppm	Phổ ^1H δ ppm, J = Hz	Phổ HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$	Phổ COSY
1	36.5	1.21; 1.72	C_{20} ; C_{10} ; C_9	$\text{H}_{1a}/\text{H}_{1b}$
2	27.8	1.65	C_{10} ; C_4 ; C_3	H_2/H_3
3	78.4	3.25	C_{18} ; C_4 ; C_{19}	H_3/H_2
4	42.2			
5	54.3	1.21	C_{20} ; C_{18} ; C_{10} ; C_4 ; C_{19}	H_5/H_{6a}
6	23.9	1.36; 1.75		H_{6a}/H_5 ; $\text{H}_{6a}/\text{H}_{6b}$;
7	37.5	1.95 (td; 13 và 4.5); 2.32 (m)	C_5	$\text{H}_{6a}/\text{H}_{7b}$; $\text{H}_{7a}/\text{H}_{7b}$;
8	147.6			
9	55.4	1.85 (d; 8)	C_{20} ; C_{10}	H_9/H_{11}
10	38.5			
11	23.9	1.70; 2.46	C_{13} ; C_{12} ; C_9	H_{11}/H_9 ;
12	146.2	6.62 (td; 7 và 1.5)	C_{11} ; C_9 ; C_{14} ; C_{16}	$\text{H}_{12}/\text{H}_{11}$

13	128.9			
14	64.5	4.91 (t; 6)	C ₁₃ ; C ₁₂ ; C ₁₆	H ₁₄ /H ₁₅
15	74.3	4.04 (dd; 10 và 2; H-15a)	C ₁₃ ; C ₁₆	H _{15a} /H _{15b} ;
		H ₁₅ /H ₁₄		
		4.39 (dd; 10 và 7; H-15b)		
16	169.9			
17	108.2	4.62 (s) ; 4.81 (s)	C ₇ ; C ₉	H _{17a} /H _{17b}
18	23.0	1.08 (s)	C ₄ ; C ₅ ; C ₁₉ ; C ₃	
19	62.6	3.25 (br; H-19a);	C ₁₈ ; C ₄ ; C ₃	H _{19a} /H _{19b}
		3.85 (dd; 11 và 2.5; H-19b)		
20	14.7	0.66 (s)	C ₁ ; C ₁₀ ; C ₅ ; C ₉	
OH ₁₉		4.12	C ₄ ; C ₁₉	OH ₁₉ /H ₁₉
OH ₃		5.03	C ₄ ; C ₃	OH ₃ /H ₃
OH ₁₄		5.69	C ₁₄ ; C ₁₅ ; C ₁₃	OH ₁₄ /H ₁₄

3.2 Nhận danh cấu trúc XTL2

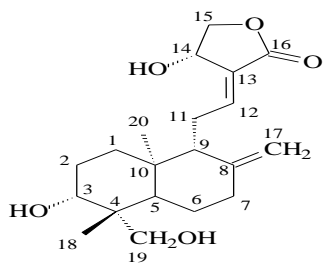
Tinh thể XTL2 kết tinh trong MeOH có hình kim, không màu, điểm tan chảy mp = 174°C, sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong cồn cho vết màu tím có R_f = 0.21.

- Phổ ¹H-NMR (DMSO, δ ppm) (Bảng 2) của XTL2 tương tự như của XTL1, chỉ khác là gắn thêm một nhóm đường và vị trí nối đôi ở C₁₂-C₁₃ chuyển vị vào C₁₃-C₁₄. Ví dụ, nhóm mũi (0.62; 0.96) là proton của hai nhóm -CH₃ ở vị trí 20 và 18; tín hiệu proton methylen CH₂-O ở 4.43 (d; J = 5 Hz; H-15), 3.07 (d; J = 9.5 Hz; H-19a) và ở 3.89 (d; J = 9.5 Hz; H-19b). Khác với XTL1, XTL2 không có tín hiệu proton của nhóm CH kề O ở vị trí 3 và 14 và cũng không có tín hiệu proton của OH gắn vào hai vị trí này; tín hiệu (4.39; 4.79; 4.84; 4.85) kết hợp với phổ COSY cho biết các proton OH gắn trên vòng đường; các proton của glucose nằm trong khoảng 2.94 - 4.04. Proton acetal của H-1' là 4.04 (d; J = 8 Hz), chứng tỏ phần đường nối vào CH₂ ở vị trí 19 theo β.
- Phổ ¹³C-NMR (DMSO, δ ppm) (Bảng 2) của XTL2 tương tự như của XTL1, chỉ khác là trong phân tử XTL2 có tất cả 26 carbon với sự có mặt của một gốc glucose. Một nhóm carbonyl bởi sự hiện diện của tín hiệu 174.2 (lacton), mũi 15.1 và 27.6 là đặc trưng của hai nhóm CH₃, một mũi hấp thu ở 106.6 là của nhóm =CH₂ ứng với C₁₇. Không thấy tín hiệu của nhóm CH kề O ở vị trí 3 và 14. Kết hợp với phổ HMBC cho thấy có sự tương tác của proton H-1' của phần đường với C₁₉, chứng tỏ phân tử đường gắn với C₁₉ qua liên kết C-O-C.
- Phổ HSQC cho biết tương quan giữa C và H trong từng vị trí.
- Phổ HMBC (Bảng 2) cho thấy proton của nhóm olefin H-14 tương tác với C₁₃; C₁₂; C₁₆; C₁₅; nhóm methylen kề nối đôi =CH₂ ở vị trí 17 tương tác với C₇ và C₉; H-1' của phần đường tương tác C₁₉, và C₃ ...
- Từ các phổ ¹H-NMR (DMSO, δ ppm); phổ ¹³C-NMR (DMSO, δ ppm) kết hợp với phổ DEPT; COSY; HSQC; HMBC và so sánh tài liệu (Du, Q., Jerz, G.,

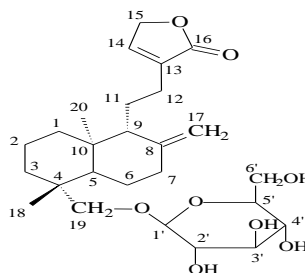
Winterhalter, P., 2003) hợp chất XTL2 được nhận danh là là neoandrographolid có công thức cấu tạo như Hình 2.

Bảng 2 : Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC và COSY của XTL2

Vị trí C/H	Phổ ^{13}C δppm	Phổ ^1H δppm , J = Hz	Phổ HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$	Phổ COSY
1	38.4	0.98; 1.73	C_{20} ; C_3	$\text{H}_{1a}/\text{H}_{1b}$
2	18.6	1.41; 1.49		$\text{H}_{2a}/\text{H}_{3a}$; $\text{H}_{2a}/\text{H}_{2b}$
3	35.7	0.90; 1.82	C_1 ; C_5	$\text{H}_{3a}/\text{H}_{3b}$; $\text{H}_{3a}/\text{H}_{2a}$
4	41.9			
5	55.4	1.23 (t; 7)	C_{20} ; C_{18} ; C_{10} ; C_7 ; C_{19}	H_5/H_{6b}
6	21.5	1.51; 1.70		H_{6b}/H_5 ; $\text{H}_{6a}/\text{H}_{6b}$
7	38.0	1.91; 2.36	C_8	$\text{H}_{7a}/\text{H}_{7b}$
8	147.7			
9	55.7	1.62	C_{20} ; C_{10} ; C_{11} ; C_{12} ; C_8	$\text{H}_9/\text{H}_{11b}$
10	37.9			
11	24.0	1.29; 1.79	C_{10}	$\text{H}_{11b}/\text{H}_9$; $\text{H}_{11a}/\text{H}_{11b}$
		$\text{H}_{11b}/\text{H}_{12b}$;		$\text{H}_{12a}/\text{H}_{12b}$;
12	24.0	2.00; 2.27	C_{14} ; C_{13} ; C_{16}	
13	132.2			
14	146.9	7.46 (br s)	C_{13} ; C_{12} ; C_{16} ; C_{15}	$\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$
15	70.4	4.83 (d; 4.5)	C_{13} ; C_{16} ; C_{14}	$\text{H}_{15}/\text{H}_{14}$
16	174.2			
17	106.6	4.60 (s); 4.81 (br s)	C_7 ; C_9	$\text{H}_{17a}/\text{H}_{17b}$
18	27.6	0,96 (s)	C_3 ; C_5 ; C_{19}	
19	71.0	3.07 (d; 9.5); 3.89 (d; 9.5)	C_{18} ; C_3	$\text{H}_{19a}/\text{H}_{19b}$
20	15.1	0.62	C_1 ; C_{10} ; C_5 ; C_9	
1'	103.5	4.04 (d; 8)	C_3 ; C_{19}	$\text{H}_{1'}/\text{H}_{2'}$
2'	73.6	2.94	C_3 ; C_5	$\text{H}_{2'}/\text{H}_{3'}$; $\text{H}_{2'}/\text{H}_{1'}$
3'	76.9	3.08	C_4'	$\text{H}_{3'}/\text{H}_{2'}$
4'	70.2	3.01	C_3 ; C_5	$\text{H}_{4'}/\text{H}_5$
5'	76.7	3.03	C_3 ; C_4'	H_5/H_4 ; $\text{H}_5/\text{H}_{6'a}$
6'	61.1	3.44 (dd; 11.5 và 6); 3.65 (dd; 11.5 và 5.5)	C_4 ; C_5	$\text{H}_{6'a}/\text{H}_{6'b}$; $\text{H}_{6'a}/\text{H}_5$



Hình 1: Andrographolid



Hình 2: Neoandrographolid

4 KẾT LUẬN

Từ cao ethyl acetate của cây Xuyên tâm liên đã cô lập được 2 chất andrographolid (XTL1) và neoandrographolid (XTL2). Cấu trúc của hai chất trên được xác nhận chủ yếu bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akouwah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., Maria, A., 2006. HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 118 - 126.
- Chen, L., Jin, H., Ding, L., Zhang, H., Wang, X., Wang, Z., Li, J., Qu, C., Wang, Y., 2007. On-line coupling of dynamic microwave-assisted extraction with high-performance liquid chromatography for determination of andrographolide and dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* Nees. *Journal of Chromatography A*, 1140, 71 - 77.
- Du, Q., Jerz, G., Winterhalter, P., 2003. Separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *Andrographis paniculata* using high-speed counter-current Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 984, 147 - 151.
- Đỗ Huy Bích và cộng sự, 2004. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật, tập 2, 1138 - 1143.
- Đỗ Tất Lợi, 1995. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1119 - 1121.
- Jain, D.C., Gupta, M.M., Saxena, S., Kumar, S., 2000. LC analysis of hepatoprotective diterpenoids from *Andrographis paniculata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 705 - 709.
- Kumar, R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S., Rajagopal, S., 2004. Anticancer and immunostimulatory compound from *Andrographis paniculata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 291 - 295.
- Nguyễn Văn Đậu, Lê Duy Hiều, 2007. Phân lập và khảo sát hoạt tính sinh học của các diterpen- γ -lacton từ lá Xuyên tâm liên. *Tap chí Hóa học*, 45 (1), 12 - 27.
- Singha, P.K., Roy, S., Day, S., 2007. Protective activity of andrographolide and arabinogalactam proteins from *Andrographis paniculata* Nees. Against ethanol-induced toxicity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 13 - 21.