

## PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ HỢP CHẤT TỪ CÂY AN XOA (*HELICTERES HIRSUTA* LOUR.) Ở HUYỆN BÁ THƯỚC, TỈNH THANH HOÁ

Lê Anh Tuấn<sup>1</sup>, Lê Thị Hoa<sup>2</sup>, Lê Thị Bình<sup>3</sup>

Từ cao ethanol thân cây An xoa (*Helicteres hirsuta* L.) ở Bá Thước, Thanh Hoá đã tách và xác định được cấu trúc của 3 hợp chất, oleanolic acid (1), 18 $\alpha$ -oleanolic acid (2) và stigmasterol (3). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ MS, 1H-NMR, 13C-NMR, DEPT kết hợp so sánh tài liệu tham khảo đã công bố. Hợp chất oleanolic acid (1) được kiểm tra về hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, chất 1 thể hiện hoạt tính chống oxy hóa ở mức trung bình. Đây là nghiên cứu đầu tiên về các thành phần hóa học của cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.) ở Bá Thước, Thanh Hoá.

**Từ khóa:** Cây An xoa, oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid,

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây An xoa (*Helicteres hirsuta* L.) đã được nhắc đến trong danh mục Thực vật chí ở Việt Nam và trên thế giới, dùng để chữa nhiều bệnh khác nhau như cảm cúm, sỏi, ung nhọt, kiết lỵ, các bệnh về gan [1]. Theo y học cổ truyền, từ xa xưa, cây An xoa được xem như là một bài thuốc gia truyền hỗ trợ điều trị xơ gan. Gần đây, từ thân của *Helicteres hirsuta* L. ở Indonesia đã tách được 6 lignan, trong đó ( $\pm$ )-pinosresinol có khả năng gây độc tế bào mạnh trên dòng ung thư phổi Lu1, ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú MCF-7, với IC50 từ 0,5-1,7 $\mu$ g/ml [2]. Cặn chiết từ cây An xoa *Helicteres hirsuta* L. thu hái ở Khánh Hòa, Việt Nam được làm giàu saponin có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất đối với *E. coli* (MIC = 2,50 và 5,00 mg/mL, tương ứng) và *S. lugdunensis* (giá trị MIC tương ứng là 0,35 và 0,50 mg/mL) và hoạt tính chống ung thư mạnh mẽ trong ống nghiệm với các tế bào MIA PaCa-2, BxPC-3 và CFPAC-1 với giá trị IC<sub>50</sub> là 1.80 - 6.43  $\mu$ g/mL [3]. 6 trong 12 hợp chất phân lập được từ loài An xoa *H.hirsuta* thu hái ở Bình Phước có hoạt tính chống lại 5 dòng tế bào ung thư (Hela, HepG2, SK-LU-1, AGS và SK-MEL-2) ở mức độ trung bình [4].

### 2. THỰC NGHIỆM

#### 2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu

Mẫu thực vật được dùng là thân, lá và hoa cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.), được thu hái vào tháng 8 năm 2021 tại huyện Bá Thước, tỉnh Thanh Hóa, Việt Nam. Mẫu thực vật được giám định và nhận dạng là loài cây An xoa với tên khoa học là *Helicteres hirsuta* Lour. bởi TS. Triệu Anh Trung - Khoa Sinh học trường ĐHSPT Hà Nội. Mẫu thực vật

<sup>1</sup> Học viên cao học Lớp K13 chuyên ngành Hóa học Hữu cơ, Trường Đại học Hồng Đức

<sup>2</sup> Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức; Email: lethihoatn@hdu.edu.vn

<sup>3</sup> Trường THPT Đông Sơn, huyện Đông Sơn, tỉnh Thanh Hóa

được rửa sạch, phơi khô và xay nhỏ làm nguyên liệu dùng trong nghiên cứu.

Thân cây An xoa được phơi khô dưới bóng râm, sau đó xay nhỏ. Bột thân khô (2,0 kg) được ngâm chiết với EtOH ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày (10 lít × 2 lần), sau đó lọc qua phễu để thu dịch chiết, lặp lại thí nghiệm này 2 lần, cất chân không để loại bỏ dung môi thu được dịch chiết ở dạng sệt (kí hiệu là AX - 56 gram).

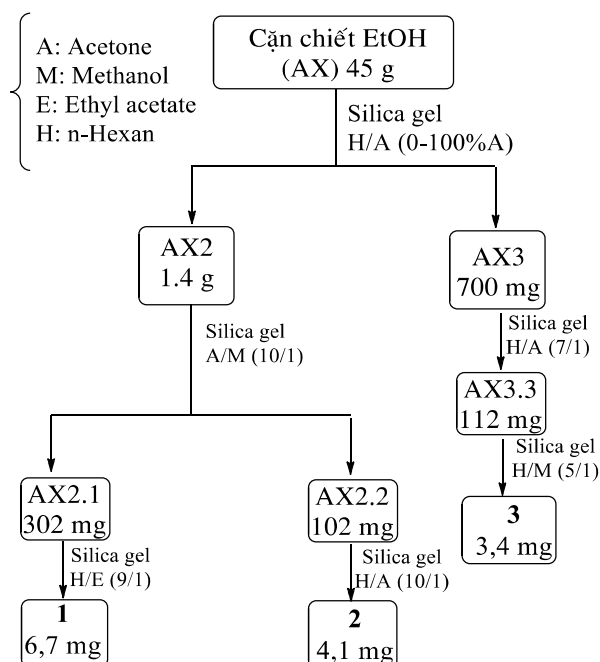
## 2.2. Xử lý cao chiết và tách chất

Cân 45 gram cao chiết và trộn với 70 gram silica gel thu được mẫu tẩm silica gel, mẫu này được dùng để tiến hành thí nghiệm phân tách trên sắc kí cột.

Chuẩn bị cột sắc kí: Cột sắc kí sử dụng pha tĩnh là silicagel (cỡ hạt 40-63 µm, Merck), cột được chuẩn bị bằng phương pháp nhồi cột ướt. Khi cột sắc kí đã ổn định, mẫu được đưa lên cột. Tiến hành rửa giải mẫu phân tích với hệ dung môi hữu cơ n-hexane:acetone với các tỉ lệ 19:1, 15:1, 10:1; 8:1, 5:1; 2:1; 1:1, và 100% acetone để phân tách mẫu thành các phân đoạn nhỏ. Qua triển khai phân tích sắc kí cột thường (CC), mẫu phân tích đã được phân tách thành các phân đoạn nhỏ. Các phân đoạn nhỏ này được tiến hành khảo sát trên sắc kí lớp mỏng TLC; các phân đoạn khảo sát có sự tương đồng về  $R_f$  sẽ được gom lại với nhau thành các nhóm phân đoạn. Kết quả thu được 8 nhóm phân đoạn, kí hiệu từ AX1 đến AX8. Các nhóm phân đoạn này sẽ được để bay hơi ở nhiệt độ phòng hoặc cô quay để loại bỏ dung môi.

Tiếp tục triển khai phân tách gradient nhóm phân đoạn AX2 trên sắc kí cột thường (CC) với hệ dung môi acetone: methanol tỉ lệ 10:1; thu được 5 nhóm phân đoạn, kí hiệu là AX2.1 đến AX2.5. Tiếp tục tách phân đoạn AX2.1 trên sắc kí cột với hệ dung môi n-hexan: ethyl acetate với tỉ lệ 9:1, thu được 1 tinh thể hình kim màu trắng (kí hiệu là **1**).

Phân tách phân đoạn AX2.2 trên sắc kí cột với hệ dung môi n-hexan: acetone với tỉ lệ 10:1 thu được 1 tinh thể hình kim màu trắng (kí hiệu là **2**).



Sơ đồ 1. Phân lập các hợp chất từ thân cây an xoa

Phân tách phân đoạn AX3 trên sắc kí cột thường (CC) với hệ dung môi n-hexan: acetone tỉ lệ 7:1; thu được 6 nhóm phân đoạn, kí hiệu là AX3.1 đến AX3.6. Tiếp tục tách phân đoạn AX3.3 trên sắc kí cột với hệ dung môi n-hexan: methanol với tỉ lệ 5:1, thu được 1 tinh thể hình kim màu trắng (kí hiệu là **3**).

Các mẫu **1**, **2**, **3** được khảo sát và xác định cấu trúc bằng phương pháp khối phổ và cộng hưởng từ hạt nhân. Quy trình thực hiện tách chiết các chất được mô tả trong sơ đồ 1.

### 2.3. Thử hoạt tính chống oxy hóa

Mẫu được thử tại Phòng thí nghiệm Hoá dược, Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hoạt động chống oxy hóa được thử bằng Phương pháp bắt gốc tự do DPPH, sử dụng thiết bị Shimadzu UV-2401 PC Spectrometer.

1 mL dung dịch chất chống oxy hóa (0.5 mg chất chống oxy hoá/mL DMSO) được trộn với 2 mL dung dịch DPPH pha trong MeOH (10 mg DPPH/L MeOH). Dung dịch này được giữ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm.

Đối chứng sử dụng cho thí nghiệm này là Acabose. Khả năng bắt gốc tự do được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = \frac{\text{Đối chứng} - \text{Mẫu khảo sát}}{\text{Đối chứng}} \times 100$$

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định cấu trúc và nhận danh các hợp chất

#### 3.1.1. Hợp chất 1

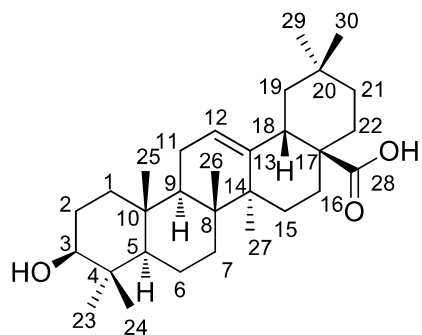
Chất **1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng,  $t_{nc}$ : 299 - 300°C. Phổ MS: m/z 456  $M^+$ .  $C_{30}H_{48}O_3$ . Phổ  $^1H-NMR$  (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  ở 0.75 (s, 3H, H-25); 0.77 (s, 3H, H-29); 0.90 (s, 3H, H-30); 0.91 (s, 3H, H-24); 0.92 (s, 3H, H-26); 0.98 (s, 3H, H-23); 1.13 (s, 3H, H-27); 5.28 (t,  $J=3.5$  Hz, 1H, H-12); 3.21 (dd,  $J=4.5$  Hz, 10.7 Hz, 3H, H-3); 2.83 ( $J=13.0$ ; 4.0 Hz, 1H, H-18). Phổ  $^{13}C-NMR$  (125MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_C$  (từ C-1 đến C-30) 38.40, 27.69, 79.04, 38.76, 55.22, 18.30, 32.61, 39.27, 47.63, 37.09, 23.40, 122.64, 143.60, 41.61, 27.10, 27.69, 46.52, 41.00, 47.63, 30.68, 38.76, 37.09, 28.10, 15.55, 15.32, 17.14, 25.94, 182.99, 33.07, 23.58.

Phổ  $^1H-NMR$  của **1** cho thấy sự có mặt của 7 nhóm methyl bậc ba [ $\delta_H$  0.75 (s, 3H); 0.77 (s, 3H); 0.90 (s, 3H); 0.91 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); và 1.13 (s, 3H)] thuộc khung triterpen olean. Một tín hiệu triplet ở 5.28 (t,  $J=3.5$  Hz, 1H) đặc trưng cho proton olefin H-12 của khung triterpen 5 vòng và một tín hiệu doublet doublet ở 2.82 (dd,  $J=4.0$  Hz, 13.0 Hz, 1H) được gán cho H-18. Tín hiệu doublet doublet ở 3.21 (dd,  $J=4.0$  Hz, 11.5 Hz, 1H) là đặc trưng của proton gắn với nhóm hydroxyl H-3.

Phổ  $^{13}C-NMR$  và phổ DEPT của chất **1** cho thấy sự có mặt của 30 tín hiệu carbon, phù hợp với công thức dự kiến, trong đó có 7 nhóm  $CH_3$  ( $\delta_C$  15.32; 15.55; 17.14; 23.58;

25.94; 28.10; và 33.07 ppm), 10 nhóm CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  38.40 C-1; 27.69 (C-2); 18.30 (C-6); 32.61 (C-7); 23.40 (C-11); 27.10 (C-15); 27.69 (C-16); 47.63 (C-19); 38.76 (C-21); 37.09 (C-22)), 5 nhóm CH và 8 nhóm C bậc 4. Tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta_C$  182.99 ppm cho thấy có một nhóm carboxylic (COOH) trong cấu trúc. Các giá trị  $\delta_C$  143.60 và 122.64 ppm khẳng định sự tồn tại của một liên kết đôi giữa C-12 và C-13. Một nhóm methyl liên kết trực tiếp với nguyên tử oxygen cộng hưởng ở  $\delta_C$  79.04 ppm.

Từ các đặc trưng phổ nói trên, dự kiến chất **1** là một triterpen có tên gọi là oleanolic acid. So sánh với nghiên cứu của Gohari AR và cộng sự [20] về oleanolic acid, thấy tương đồng về các số liệu phổ cho phép kết luận hợp chất **1** là oleanolic acid (Hình 1).



**Hình 1. Cấu trúc hợp chất 1 (oleanolic acid)**

### 3.1.2. Xác định cấu trúc hợp chất **A2**

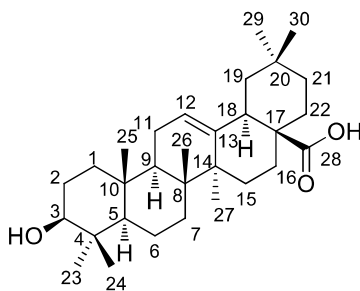
Chất **A2** thu được có dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ **MS**:  $m/z$  456. C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>. Phổ **<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ở 0.82 (s, 3H, H-25); 0.92 (s, 3H, H-29); 0.94 (s, 3H, H-24); 1.04 (s, 3H, H-30); 1.14 (s, 3H, H-26); 1.14 (s, 3H, H-23); 1.16 (s, 3H, H-27); 5.61 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H-12); 3.21 (dd,  $J = 4.5$  Hz, 10.7 Hz, 3H, H-3); 2.40 ( $J = 13.5$ ; 4.5 Hz, 1H, H-18). Phổ **<sup>13</sup>C-NMR** (125MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  (từ C-1 đến C-30) 35.85, 28.48, 77.23, 35.11, 49.40, 18.33, 32.49, 37.81, 44.72, 34.34, 23.47, 121.74, 141.55, 40.83, 28.95, 34.87, 47.75, 38.66, 37.18, 29.76, 34.51, 32.80, 29.35, 18.24, 15.62, 20.33, 25.44, 183.48, 30.92, 27.82.

Phổ **MS** của **2** cũng cho thấy pic ion M<sup>+</sup> tại  $m/z$  456, giống như chất **1** cho phép dự kiến công thức phân tử C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>.

Phổ **<sup>1</sup>H-NMR** của chất **2** cho thấy các tín hiệu  $\delta_H$  trên phổ **<sup>1</sup>H-NMR** của chất **2** có hầu hết các tín hiệu giống với phổ của chất **1**. Tuy nhiên tín hiệu proton ở  $\delta_H$  2.82 của H ở vị trí 18 xuất hiện trên phổ **1** lại hoàn toàn biến mất trên phổ **<sup>1</sup>H-NMR** của chất **2**, thay vào đó lại xuất hiện tín hiệu proton ở  $\delta_H$  2.41 ppm, 1H. So sánh với tài liệu [6] thì tín hiệu này được quy kết cho H18 ở vị trí  $\alpha$ .

Phổ **<sup>13</sup>C-NMR** và phổ **DEPT** của chất **2** hoàn toàn trùng khớp với chất **1**. Từ các dữ kiện phổ trên có thể kết luận chất **2** là 18 $\alpha$ -oleanolic acid.

Từ các dữ liệu phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã phân tích ở trên gợi ý hợp chất **2** là hợp chất 18 $\alpha$ -oleanolic acid. So sánh với nghiên cứu [6] về 18 $\alpha$ -oleanolic acid cho thấy tương đồng về các số liệu phổ tương cho phép kết luận hợp chất **2** là 18 $\alpha$ -oleanolic acid (Hình 2).



**Hình 2. Cấu trúc của 2 (18 $\alpha$ -oleanolic acid)**

### 3.1.3. Xác định cấu trúc hợp chất 3

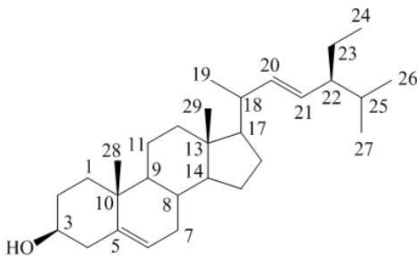
Chất **3** thu được có dạng tinh thể hình kim màu trắng, hiện màu tím hồng với vaniline trong,  $t_{nc}$ : 163°C. Phổ **MS**:  $m/z$  456.  $C_{29}H_{48}O$ . Phổ  **$^1H$ -NMR** (500MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta_H$  ở 1.02 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz, H-19); 1.01 (s, 3H, H-29); 0.85 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz, H-26); 0.81 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz, H-24); 0.80 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz, H-27); 0.70 (s, 3H, H-28). 3.52 (m, 1H, H-3); 5.16 (dd, 1H,  $J = 8.5$ ; 15.0 Hz, H-21) và 5.02 (dd, 1H,  $J = 8.5$ ; 15.0 Hz, H-20), 5.35 (m, 1H, H-6). Phổ  **$^{13}C$ -NMR** (125MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta_C$  (từ C-1 đến C-30) 37.32, 33.95, 71.83, 42.33, 121.74, 140.77, 31.73, 31.96, 50.14, 36.16, 21.14, 39.83, 42.33, 56.78, 24.34, 28.29, 56.06, 40.51, 19.83, 138.33, 129.28, 45.85, 26.11, 11.99, 29.16, 19.41, 19.04, 18.79, 12.06.

Phổ **MS** chất **3** cho thấy pic ion  $M^+$  tại  $m/z$  412.0 cho phép dự đoán công thức phân tử.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz.  $CD_3OD$ ).  $\delta_H$  (ppm): Phổ  **$^1H$ -NMR** cũng cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 3 proton olefin, nhưng ngoài 2 proton olefin mạch hở dạng  $HC=CH$  ở  $\delta_H$  5.16 (dd, 1H,  $J = 8.5$ ; 15.0 Hz) và 5.02 (dd, 1H,  $J = 8.5$ ; 15.0 Hz), còn có một tín hiệu đặc trưng cho proton của liên kết đôi dạng  $>C=CH$  ở  $C_5$  và  $C_6$  của khung stigmastan ở  $\delta_H$  5.35 (m, 1H). Phổ  **$^1H$ -NMR** cũng cho thấy tín hiệu của một proton liên kết với  $-COH$  ở 3.52 (m, 1H, H-3) và proton của 6 nhóm methyl ở  $\delta$  1.02 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz). 1.01 (s, 3H). 0.85 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz). 0.81 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz) 0.80 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz), và 0.70 (s. 3H).

**$^{13}C$  NMR** (125 MHz.  $CD_3OD$ ).  $\delta$  (ppm): Phổ  **$^{13}C$ -NMR** và phổ DEPT của chất **3** cũng thể hiện tín hiệu cộng hưởng của 29 carbon, trong đó có 4 carbon olefin tại  $\delta_C$  140.77; 138.33; 129.28; và 121.74 ppm; 1 carbon liên kết với  $-OH$  tại  $\delta_C$  71.83 ppm và 6 nhóm  $CH_3$ . Từ các bằng chứng phổ nói trên, chất **3** được xác định là một sterol có tên gọi là stigmasterol.

Từ các dữ liệu phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã phân tích ở trên gợi ý hợp chất **3** là hợp chất stigmasterol hay Stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol. So sánh với nghiên cứu của Venkata Sai Prakash Chaturvedula và cộng sự [38] về stigmasterol thấy tương đồng về các số liệu phổ tương ứng, cho phép kết luận hợp chất **3** là stigmasterol.



**Hình 3. Cấu trúc của 3 (stigmasterol)**

### 3.2. Kết quả thử hoạt tính chống oxi hóa của hợp chất 1

STT	Tên mẫu	Phần trăm (%) ức chế tại các nồng độ $\mu\text{g/mL}$					Giá trị $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		256	64	16	4	1	
1	1	81	53,5	22	16	0	58,65 $\pm$ 1,20
Chất tham khảo Acarbose							77.11 $\pm$ 2,51

Từ bảng kết quả cho thấy, mẫu chất 1 biểu hiện hoạt tính chống oxi hóa với giá trị  $\text{IC}_{50} = 58.65 \mu\text{g/mL}$ .

### 4. KẾT LUẬN

Từ cao ethanol chiết từ thân cây An xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.) ở Bá Thước, Thanh Hoá đã phân lập và nhận danh được 3 hợp chất: oleanolic acid (1), 18 $\alpha$ -oleanolic acid (2) và stigmasterol (3). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ MS, NMR. Hợp chất 1 biểu hiện hoạt tính chống oxi hóa với giá trị  $\text{IC}_{50} = 58.65 \mu\text{g/mL}$ .

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội.
- [2] Chin YW, Jones WP, Rachman I, Riswan S, Kardono LB, Chai HB, Farnsworth NR, Cordell GA, Swanson SM, Cassidy JM, Kinghorn AD (2006), Cytotoxic lignans from the stems of *Helicteres hirsuta* collected in Indonesia, *Phytother Res*, 20, 62-65.
- [3] Pham Hong Ngoc Thuy, Jennette A. Sakoff, Danielle R. Bond, Vuong Van Quan, Michael C. Bowyer, Christopher J. Scarlett (2018), In vitro antibacterial and anticancer properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaf and stem extracts and their fractions, *Molecular Biology Reports*, 45 (6), 2125-2133.
- [4] Dang Ngoc Quang, Pham Thanh Chung, Le Thi Khanh Linh, Ta Ngoc Quynh, Dang Kim Ngoc, Hoang Thi Nhung, Pham Huu Dien (2019), Cytotoxic constituents from *Helicteres hirsuta* collected in Vietnam, *Natural product research*, 34(4), 585-589.
- [5] Gohari AR, Saeidnia S, Hadjiakhoondi A, Abdoullahi M, Nezafati M (2009), Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey, *Journal of Medicinal Plants*, 8(5), 65-69.
- [6] Werner Seebacher, Nebojsa Simic, Robert Weis, Robert Saf and Olaf Kunert (2003), Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives, *Magnetic Resonance In Chemistry*, 41, 636-638.
- [7] Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Indra Prakash (2012), Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9), 239-242.

**ISOLATION AND DETERMINATION OF SOME COMPOUNDS  
FROM *HELICTERES HIRSUTA* L., COLLECTED IN BA THUOC  
DISTRICT, THANH HOA PROVINCE**

Le Anh Tuan, Le Thi Hoa, Le Thi Binh

ABSTRACT

*The ethanol extract of Helicteres hirsuta L., was collected in Ba Thuoc district, Thanh Hoa province, of which three compounds were isolated: oleanolic acid (1), 18 $\alpha$ -oleanolic acid (2) and stigmasterol (3). The structures of these compounds have been elucidated by spectroscopic methods: MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT. The results show that compound 1 has moderate antioxidant activeness. This is the first study of the chemical constituents of the Ba Thuoc, Thanh Hoa Helicteres hirsuta L.*

**Keywords:** *An xoa, Helicteres hirsuta Lour., oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, stigmasterol.*

\* Ngày nộp bài: 10/6/2022; Ngày gửi phản biện: 22/6/2022; Ngày duyệt đăng: 7/2/2023