

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA KAEMPFEROL 3-(2,3-di-E-p-COUMAROYL- α -L-RHAMNOPYRANOSIDE) TỪ CÂY ĐƠN KIM (*BIDENS PILOSA* L.,)

Phạm Văn Vượng*; Phạm Thanh Kỳ**
Hoàng Văn Lương*; Nguyễn Văn Long*

TÓM TẮT

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp đã tách chiết và phân lập một hợp chất flavonoid từ phần trên mặt đất cây Đơn kim. Cấu trúc của chất này được xác định là *kaempferol 3-(2,3-di-E-p-coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside)* trên cơ sở phân tích phổ khối phun mù điện tử (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều và 2 chiều. Đây là hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ cây Đơn kim.

* Từ khóa: Cây Đơn kim; Kaempferol; Flavonoid.

STUDY OF ISOLATION AND DETERMINED STRUCTURE OF KAEMPFEROL 3-(2,3-di-E-p-COUMAROYL- α -L-RHAMNOPYRANOSIDE) FROM *BIDENS PILOSA* L.,

SUMMARY

By various chromatography methods, one of flavonoids was isolated from ethanol 80% extract of the aerial parts from *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). The structure was determined to be *kaempferol 3-(2,3-di-E-p-coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside)* using combination of ESI-MS and NMR techniques including 1D- and 2D-NMR. This compound was first isolated from *Bidens pilosa* L.

* Key words: *Bidens pilosa* L.,; Kaempferol; Flavonoids.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Đơn kim có tên khoa học *Bidens pilosa* L., thuộc họ cúc-Asteraceae, là cây mọc hoang nhiều nơi như miền núi, trung du và đồng bằng, ở nhiều nước trên thế giới như: Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Brazil.... Đây là loài cây mọc quanh năm, sinh sản nhanh và được coi như loài "cỏ dại". Theo kinh nghiệm dân gian, cây Đơn kim được sử dụng nấu nước tắm điều

trị mọn nhọt, mẩn ngứa hoặc uống thay trà vào mùa hè để điều trị bệnh đường ruột.

Trong bài báo trước, chúng tôi đã công bố về định tính flavonoid cây Đơn kim bằng phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng [1]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của *kaempferol 3-(2,3-di-E-p-coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside)* từ cây Đơn kim thu hái ở Hà Đông.

* Học viện Quân y

** Đại học Dược Hà Nội

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP
NGHIÊN CỨU

1. Mẫu thực vật.

Phần trên mặt đất cây Đơn kim thu hái ở khu vực Hà Đông vào tháng 5 - 2009, được Vũ Xuân Phương và Đỗ Thế Cường (Phòng thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật) xác định tên khoa học là *Bidens pilosa* L., thuộc họ Cúc - Asteraceae. Mẫu tiêu bản được lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) đo trên các máy Bruker AM300, Bruker AM600 của Viện Nghiên cứu khoa học cơ bản Hàn Quốc (KBSI) và máy AVANCE 500 của Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là TMS (tetrametyl silan). Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Sắc ký lớp mỏng: thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1.05715), RP₁₈ F_{254s} (Merk). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 và 368 nm, hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

- Sắc ký cột: tiến hành với chất hấp phụ là silicagel pha thường và pha đảo. Silicagel pha thường có cỡ hạt 0,04 - 0,063 mm (230 - 400 mesh) (Merk) silicael pha đảo ODS-R18 (Merck).

Chiết xuất và phân lập

Rửa sạch phần trên mặt đất cây Đơn kim, thái nhỏ, phơi và sấy khô ở 50°C. Lấy 2 kg bột này ngâm chiết với ethanol 80% 3 lần, sau đó gộp các dịch chiết lại, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm được 220g cao đậm đặc. Phân tán cao đặc này vào 1 lít nước rồi chiết lần lượt bằng n-hexan,

cloroform, ethyl acetat và n-butanol. Các dịch chiết n-hexan, cloroform, ethyl acetat và n-butanol cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, cô đến kiệt dung môi được cặn n-hexan (94g), cặn cloroform (5g), cặn ethyl acetat (15g), cặn n-butanol (22g) và dung dịch nước. Phân lập cặn ethyl acetat trên cột Silicagel pha thường với hệ dung môi CHCl₃: MeOH với độ phân cực tăng dần 20:1 (v/v, 2 lít), 10:1 (v/v, 2 lít), 5:1 (v/v, 2 lít), 2,5:1 (v/v, 2 lít), và 100% methanol. Sau khi loại dung môi dưới áp suất giảm, được các phân đoạn tương ứng là BP3A (4g), BP3B (8g), BP3C (7g), BP3D (5g), BP3E (4g). Phân đoạn BP3A phân lập trên cột Silicagel pha thường với hệ dung môi CHCl₃ : MeOH (8:1, v/v) được 18 mg hợp chất 1.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Hợp chất 1 nhận được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ ¹H-NMR xuất hiện hai tín hiệu doublet tại δ 6,23 (d, *J* = 1,5 Hz) và 6,42 (d, *J* = 1,5 Hz) điển hình cho H-6 và H-8 của vòng A của khung flavon; hai tín hiệu doublet khác tại δ 7,89 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2'/H-6') và 7,01 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3'/H-6') cho thấy vòng B đối xứng trục bậc hai do thế para; xác định 2 phần cấu trúc p-coumaroyl bởi tín hiệu của 8 proton tại δ 7,46 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2'''/H-6'''), 6,81 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3'''/H-5'''), 7,38 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2''''/H-6''') và 6,76 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3''''/H-5''') của hai vòng benzen thế para, cùng với 4 tín hiệu doublet với hằng số tương tác lớn của hai cặp proton cùng nằm ở vị trí *trans* với nhau của hai nối đôi tại δ 7,63 (d, *J* = 16,0 Hz, H-7'''), 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, H-8'''), 7,60 (d, *J* = 16,0 Hz,

H-7''''') và 6,38 (d, $J = 16,0$ Hz, H-8'''''). Ngoài ra, trên phổ này còn xuất hiện các tín hiệu của một phân tử đường rhamnose, trong đó tín hiệu của proton anome tại δ 5,62 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1'') mà hằng số tương tác (J) nhỏ chứng tỏ proton này nằm ở vị trí equatorial. Nhóm methyl tại δ 1,07 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6'') cũng rất đặc trưng cho đường rhamnose. Cùng với các tín hiệu tại

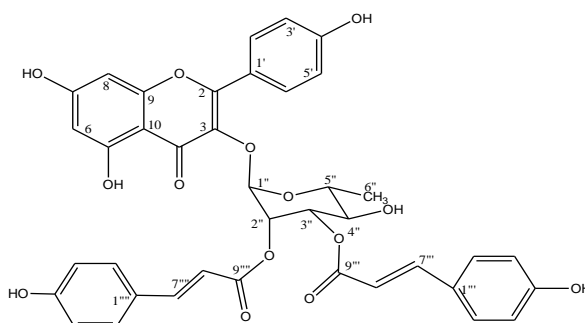
δ 5,83 (dd, $J = 1,5, 3,5$ Hz, H-2''), 5,29 (dd, $J = 3,5, 10,0$ Hz, H-3''), 3,58 (t, $J = 10,0$ Hz, H-4''), 3,54 (m, H-5'') càng khẳng định những dự đoán nêu trên. Như vậy, thông qua phổ $^1\text{H-NMR}$ có thể sơ bộ dự đoán được hợp chất 1 bao gồm phần aglycon là có khung flavon kiểu hợp chất keampferol, một phân tử đường rhamnose và hai phần cấu trúc p-coumaroyl.

Bảng 1: Kết quả phổ NMR của hợp chất 1.

C	δ_c	$\delta_c^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult. $J = \text{Hz}$)	HMBC
2	158,8	159,13	C	-	
3	135,2	135,49	C	-	
4	178,9	179,38	C	-	
5	163,0	163,26	C	-	
6	100,2	99,97	CH	6,23 d (1,5)	C-5, C-7
7	165,8	165,94	C	-	
8	95,7	94,86	CH	6,42 d (1,5)	C-7, C-9
9	158,8	158,58	C	-	
10	104,8	105,95	C	-	
1'	122,5	122,45	C	-	
2', 6'	131,8	131,90	CH	7,89 d (8,5)	C-2, C-3'(C-5'), C-4'
3', 5'	116,9	116,90	CH	7,01 d (8,5)	C-4'', C-1''
4'	161,5	161,74	C	-	
1''	101,2	100,33	CH	5,62 d (1,5)	C-3, C-2''
2''	72,2	70,92	CH	5,83 dd (1,5, 3,5)	C-1''', C-1'', C-3'', C-4'',
3''	73,1	73,09	CH	5,29 dd (3,5, 10,0)	C-1''', C-2'', C-4''
4''	71,0	71,03	CH	3,58 (t, 10,0)	C-5'', C-6''
5''	70,9	72,26	CH	3,54 (m)	
6''	17,9	17,78	CH ₃	1,07 d (6,0)	C-4'', C-5''
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(1)
1'''	127,0	127,17	C	-	
2''', 6'''	131,4	131,43	CH	7,46 d (8,5)	C-4''', C-7''', C-3'''

3 ^{'''} , 5 ^{'''}	117,0	116,84	CH	6,81 d (8,5)	C-4 ^{'''} , C-3 ^{'''} , C-1 ^{'''}
4 ^{'''}	161,8	161,50	C		
7 ^{'''}	147,8	147,75	CH	7,63 d (16,0)	C-8 ^{'''} , C-1 ^{'''} , C-2 ^{'''} ,
8 ^{'''}	114,8	114,87	CH	6,29 d (16,0)	C-1 ^{'''} , C-9 ^{'''} ,
9 ^{'''}	168,5	168,53	C=O	-	
1 ^{'''}	126,9	127,08	C	-	
2 ^{'''} , 6 ^{'''}	131,2	131,23	CH	7,38 d (8,5)	C-7 ^{'''} , C-4 ^{'''}
3 ^{'''} , 5 ^{'''}	116,8	116,81	CH	6,76 d (8,5)	C-1 ^{'''} , C-3 ^{'''} ,
4 ^{'''}	161,8	161,28	C	-	
7 ^{'''}	147,0	147,02	CH	7,60 d (16,0)	C-8 ^{'''} , C-1 ^{'''} , C-2 ^{'''}
8 ^{'''}	114,2	114,40	CH	6,38 d (16,0)	C-1 ^{'''} , C-9 ^{'''}
9 ^{'''}	167,8	167,79	C=O	-	

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^{*}δ_C của platanoside [2].



Hình 1: Cấu trúc hóa học của hợp chất 1.

Phổ ¹³C-NMR xuất hiện tất cả 33 tín hiệu của 39 nguyên tử cacbon, hoàn toàn phù hợp với nhận định phân tích trên phổ ¹H-NMR: đó là do sự có mặt của 3 vòng benzen thế para. Trong đó, 13 tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon thuộc phần khung aglycon tại δ 159,13 (C-2), 135,49 (C-3), 179,38 (C-4), 163,26 (C-5), 99,97 (C-6), 165,94 (C-7), 94,86 (C-8), 158,58 (C-9), 105,95 (C-10), 122,45 (C-1'), 131,90 (C-2'/ C-6'), 116,90 (C-3'/C-5'), 161,74 (C-4'); các tín hiệu của hai nhánh coumaroyl xuất hiện tại δ 127,17 (C-1^{'''}), 131,43 (C-2^{'''}/C-6^{'''}), 116,84 (C-3^{'''}/C-5^{'''}), 161,50 (C-4^{'''}), 147,75 (C-7^{'''}), 114,87 (C-8^{'''}), 168,53 (C-9^{'''}), 127,08 (C-1^{'''}), 131,23 (C-2^{'''}/C-6^{'''}), 116,81 (C-3^{'''}/C-5^{'''}), 161,28 (C-4^{'''}), 147,02 (C-7^{'''}), 114,40 (C-8^{'''}), 167,79 (C-9^{'''}); các tín hiệu của phân tử đường rhamnose xuất hiện tại δ 100,33 (C-1^{''}), 70,92 (C-2^{''}), 73,09 (C-3^{''}), 71,03 (C-4^{''}), 72,26 (C-5^{''}), 17,78 (C-6^{''}). Các tín hiệu proton được gán cùng với cacbon tương ứng nhờ phổ HSQC. Trong đó, các tín hiệu proton gắn trực tiếp với

Như vậy, hợp chất 1 có thể là Kaempferol-3-(2,3-di-*E-p*-coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside) hay còn gọi là platanoside, với công thức phân tử dự đoán là $C_{39}H_{32}O_{14}$, (M= 724). Phổ khối lượng xuất hiện pic ion ESI-MS m/z: 723 [M+H]⁺ hoàn toàn tương ứng với công thức phân tử nêu trên. Thêm vào đó, so sánh các dữ kiện phổ NMR của hợp chất 1 với các số liệu tương ứng của platanoside (bảng 1) thì hoàn toàn tương ứng. Như vậy, hợp chất 1 chính là platanoside, một hợp chất lần đầu được biết đến từ cây *Bidens pilosa*.

KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp đã phân lập hợp chất Kaempferol 3-(2,3-di-*E-p*-coumaroyl- α -L-rhamnopyranoside), từ dịch chiết ethanol 80% của phần trên mặt đất cây Đơn kim. Cấu trúc hóa học của hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ khối lượng (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Hợp chất này lần đầu tiên công bố được phân lập từ cây Đơn kim.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Vượng, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Văn Long, Phạm Thanh Kỳ. Nghiên cứu thành phần hóa học cây Đơn kim (*Bidens pilosa* .L., *Astearaceae*). Tạp chí Y - Dược học Quân Sự. Vol 34, N^o9/2009, tr.94-98.
2. Maourad Kaouadji. Acylated and non-acylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* Buds., *Phytochemistry*. 1990, Vol. 29 (7), pp.2295-2297.
3. Wenjie Peng, Yuwen Li, Cunsheng Zhu, Xiuwen Han and Biao Yu. Synthesis of tamarixetin and isorhamnetin 3-O-neohesperidoside. *Carbohydrate Research*. 2005, 340, pp.1682-1688.
4. Kohei Kazuma, Naonobu Noda and Masahiko Suzuki. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*, *Phytochemistry*. 2003, 62, pp.229-237.
5. Xiang Hua Han, Seong Su Hong Ji Sang Hwang, Myung Koo Lee, Bang Yeon Hwang, and Jai Seup Ro. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*., *Arch Pharm Res*. 2007, 30 (1), pp.13-17.