

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC TRONG CAO ETHYL ACETATE CỦA RỄ CAU (*ARECA CATECHU* L.)

Đỗ Thanh Thùy và Lê Thanh Phước¹

ABSTRACT

Luteolin-7,4'-dimethyl ether ($C_{17}H_{14}O_6$); *apigenin-5-methyl ether* ($C_{16}H_{12}O_5$) and β -*sitosterol-3-O- β -glucopyranoside* ($C_{35}H_{60}O_6$) were isolated from ethyl acetate extracts of *Areca catechu* L. root. Structures of these compounds have been elucidated by modern spectroscopic methods: MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, COSY and HMBC.

Keywords: *Areca catechu* L., components, *luteolin-7,4'-dimethyl ether*, *apigenin-5-methyl ether*, β -*sitosterol-3-O- β -glucopyranoside*, root

Title: Study on the chemical components of *Areca catechu* L. root

TÓM TẮT

Luteolin-7,4'-dimethyl ether ($C_{17}H_{14}O_6$), *apigenin-5-methyl ether* ($C_{16}H_{12}O_5$) và β -*sitosterol-3-O- β -glucopyranoside* ($C_{35}H_{60}O_6$) được cô lập từ cao ethyl acetate của rễ Cau. Cấu trúc hóa học các chất này đã được xác định bằng các loại phổ MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, COSY và HMBC.

Từ khóa: *Areca catechu* L., *luteolin-7,4'-dimethyl ether*, *apigenin-5-methyl ether*, β -*sitosterol-3-O- β -glucopyranoside*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Cau còn được gọi là Tân lang, Bình lang, Pơ lạng... Tên khoa học *Areca catechu* L., thuộc họ Cau (Arecaceae). Ở Việt Nam, Cau là cây trồng lâu đời rất quen thuộc ở khắp nơi, nhất là ở vùng trung du và đồng bằng. Các bộ phận của cây Cau được dùng nhiều trong y học cổ truyền để chữa nhiều bệnh như: hạt Cau dùng chữa bệnh sán xơ mít, sán lá, chữa viêm ruột, lỵ...; vỏ quả Cau dùng trị thủy thũng, cước khí, bụng đầy trướng, bí tiểu tiện; rễ Cau nổi có tác dụng bổ dương, chữa đái nhất, đái són và là thành phần của bài thuốc hạn chế sinh đẻ... Công trình này chúng tôi phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ cao ethyl acetate của rễ Cau (*Areca catechu* L.) ở Việt Nam.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Rễ Cau non thu hái tại huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp. Rễ Cau được rửa sạch, loại bỏ phần sâu, sấy khô ở nhiệt độ 55°C đến khối lượng không đổi và xay nhỏ trước khi sử dụng.

Rễ Cau được định danh khoa học là rễ của loài *Areca catechu* L. bởi Ths. Nguyễn Thị Kim Huê, Bộ Môn Sinh, Khoa Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

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

2.2 Phương pháp

Chiết hoạt chất: bột rễ Cau (1150 g) được chiết ngấm kiệt với cồn ethylic 96° (EtOH) trong 7 ngày, tách lấy phần lỏng đem cô quay dưới áp suất kém thu cao EtOH thô (105 g). Cho phần cao thô hòa tan trong một lượng nước cất nhất định, sau đó chiết lỏng lỏng lần lượt với các dung môi petroleum ether (PE), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH). Thu gom các dịch trích và sau khi loại dung môi dưới áp suất kém thu được các cao PE (19 g), cao EtOAc (9 g) và cao BuOH (16,5 g), tương ứng.

Phân lập các chất từ cao ethyl acetate: thực hiện sắc ký cột, chất hấp phụ là silica gel, sử dụng những hệ dung môi giải ly gồm PE, EtOAc 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 chloroform:methanol, thuốc thử hiện vết là dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol và sấy bản mỏng ở 110°C. Các phân đoạn thể hiện giống nhau trên sắc ký bản mỏng được gộp lại. Tiến hành sắc ký cột lần 2 với các phân đoạn giống nhau để cô lập được chất sạch.

Xác định cấu trúc của các chất đã cô lập được bằng cách sử dụng các phương pháp phổ nghiệm: MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC. Phổ NMR được đo trên máy Bruker Advance 500 MHz (Viện Công Nghệ, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội).

Silica gel 60 F₂₅₄ (0.04-0.05), bản mỏng TLC của hãng Merck, Đức. 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

Từ 9,023 g cao ethyl acetate tiến hành sắc ký cột nhanh trên silica gel cho 7 phân đoạn. Kết quả sắc ký cột silica gel đối với cao chiết bằng ethyl acetate được tóm tắt qua bảng 1.

Bảng 1: Kết quả sắc ký cột silica gel của cao ethyl acetate

Phân đoạn	Hệ dung môi giải ly	Tên mã hóa	Sắc ký bản mỏng	Ghi chú
1	PE:EtOAc (99:1→1:1)	EA1	Nhiều vết	
2	PE:EtOAc (1:1→3:7)	EA2	Nhiều vết có 2 vết chính	Khảo sát
3	PE:EtOAc (3:7)	EA3	3 vết, có 1 vết chính	Khảo sát
4	PE:EtOAc (2:8→0:100)	EA4	Nhiều vết	
5	EtOAc:MeOH (99:1→98:2)	EA5	Nhiều vết	
6	EtOAc:MeOH (98:2→9:1)	EA6	3 vết	
7	EtOAc:MeOH (9:1→0:100)	EA7	Vết kéo dài	

3.2 Cô lập các chất tinh khiết từ các phân đoạn sắc ký cột nhanh của cao ethyl acetate

Từ các phân đoạn tương đối sạch của sắc ký cột nhanh cao ethyl acetate EA2, EA3 tiếp tục tinh chế để thu được các chất tinh khiết.

3.2.1 Phân đoạn EA2

Phân đoạn EA2 (400 mg) thu được dưới dạng bột màu vàng, sắc ký bản mỏng cho 2 vết chính còn lẫn nhiều vết mờ. Bột màu vàng này được rửa bằng CHCl_3 nhiều lần thu được phần tinh thể và nước rửa riêng biệt. Kết quả sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 95:5$ cho thấy phần nước rửa có nhiều vết, còn phần tinh thể còn lại 2 vết tách nhau, nên phần tinh thể được khảo sát tiếp. Phần tinh thể được tiến hành sắc ký cột thường. Dung môi giải ly cột $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (tăng dần tỉ lệ MeOH 1%-5%). Kết quả thu được 2 hợp chất sạch: chất thứ nhất dưới dạng tinh thể màu vàng (10 mg), sắc ký bản mỏng hiện hình bằng H_2SO_4 10% trong EtOH, giải ly bằng $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 95:5$ cho vết màu vàng có $R_f = 0.53$, nhiệt độ nóng chảy $236-238^\circ\text{C}$, ký hiệu PHUOC-TAR-I1; chất thứ hai là tinh thể màu vàng (15 mg), sắc ký bản mỏng hiện hình bằng H_2SO_4 10% trong EtOH, giải ly bằng $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 9:1$ cho vết màu vàng có $R_f = 0.54$, nhiệt độ nóng chảy: $266-268^\circ\text{C}$, ký hiệu PHUOC-TAR-I2.

Hợp chất PHUOC-TAR-I1

Phổ MS: 315 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 & MeOD , δ ppm, 500 MHz) cho:

- 2 mũi đơn ở δ 3.89 ppm và δ 4.01 ppm: 6 proton của 2 nhóm OCH_3 gắn vào vòng benzene.
- 2 mũi đôi ở δ 6.37 ppm (1H, d, $J = 2.5$ Hz) và δ 6.49 ppm (1H, d, $J = 2.0$ Hz) là 2 tín hiệu của 2 proton ở vị trí *meta*, chứng tỏ vòng A đã bị thế ở 2 vị trí C_5 và C_7 .
- 1 mũi đôi đôi tại δ 7.49 ppm (1H, dd, $J = 2.0$ và 6.5 Hz): 1 proton ghép *meta* và *ortho* của vòng B khung flavonoid, chứng tỏ vòng B đã bị thế ở vị trí $\text{C}_{3'}$ và $\text{C}_{4'}$.
- 2 mũi đôi tại δ 7.04 ppm (1H, d, $J = 8.5$ Hz) và δ 7.33 ppm (1H, d, $J = 2.5$ Hz) là 2 proton ở $\text{C}_{5'}$ và $\text{C}_{2'}$ của vòng B.
- 1 mũi đơn tại vị trí δ 5.59 ppm là tín hiệu của proton nhóm OH gắn trên vòng B.
- 1 mũi đơn tại vị trí δ 6.57 ppm là tín hiệu proton $-\text{CH}=\text{}$ trong vòng thơm.
- 1 mũi ở δ 12.79 ppm là tín hiệu đặc trưng cho proton của nhóm hydroxy có liên kết hydro nội phân tử, điều này chứng tỏ PHUOC-TAR-I1 có nhóm OH kề $\text{C}=\text{O}$, ở vị trí C_5 .

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 & MeOD , δ ppm, 125 MHz) kết hợp phổ DEPT cho thấy PHUOC-TAR-I1 có 17 carbon trong đó có 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$, 2 nhóm CH_3 , 6 nhóm CH, 8 nhóm carbon tứ cấp.

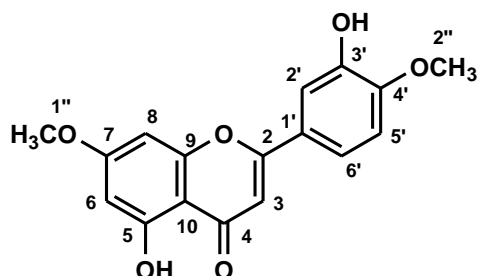
Phổ DEPT 90 cho 6 mũi dương trong khoảng δ 92.69-120.78 ppm gồm các carbon loại CH kề nối đôi.

Phổ DEPT 135 cho 8 mũi dương trong khoảng δ 55.82-120.78 ppm gồm:

- 6 mũi dương trong khoảng δ 92.69-120.78 ppm (đã xuất hiện trong phổ DEPT 90): các carbon của CH kề nối đôi.
- 2 mũi dương trong khoảng δ 55.82-56.20 ppm (không xuất hiện trong phổ DEPT 90): 2 carbon của 2 nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
- Không có mũi âm chứng tỏ PHUOC-TAR-I1 không có carbon loại CH₂.
- 9 mũi còn lại không xuất hiện trong phổ DEPT gồm các carbon tứ cấp:
 - + 8 mũi trong khoảng δ 123.47-165.51 ppm là 8 carbon tứ cấp của vòng benzene.
 - + 1 mũi ở δ 182.43 ppm là carbon của nhóm C=O đặc trưng của ketone.

Kết hợp phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều HSQC và HMBC cho thấy PHUOC-TAR-I1 thuộc nhóm flavone và là dẫn xuất của luteolin.

Từ các kết quả phân tích phổ ở trên chúng tôi kết luận chất PHUOC-TAR-I1 là **luteolin-7,4'-dimethyl ether**, có công thức phân tử là C₁₇H₁₄O₆. Công thức cấu tạo hóa học như sau (Hình 1).



Hình 1: Công thức cấu tạo hóa học luteolin-7,4'-dimethyl ether

Luteolin-7,4'-dimethyl ether là một dẫn xuất của luteolin, có tiềm năng ứng dụng trong y học. Nó được cô lập từ một vài loại cây và có hoạt tính ức chế nguyên sinh động vật ký sinh (trypanosoma) (Yang *et al.*, 2008), có khả năng làm thay đổi hoặc điều chỉnh chức năng miễn dịch (Michelis *et al.*, 2002) và tiến trình biến đổi tế bào bạch cầu.

Hợp chất PHUOC-TAR-I2

Phổ MS: 285 [M + H]⁺

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃&MeOD, δ ppm, 500 MHz) cho:

- 1 mũi đơn trong khoảng δ 3.89 ppm: 3 proton của 1 nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
- 2 mũi đôi trong khoảng δ 6.37-6.51 ppm là tín hiệu của 2 proton của nhóm CH trong vòng benzene với J = 2.0 và 2.5 Hz chứng tỏ chúng ở vị trí *meta* của nhau.

- 2 mũi đôi có cường độ mạnh gấp đôi các mũi khác là tín hiệu của 4 proton nhân thơm trong khoảng δ 6.95-7.79 ppm, kết hợp phổ HMBC cho thấy mỗi mũi có thể là 2 proton của 1 cặp proton tương đương độ dời hóa học.
- 1 mũi đơn tại vị trí δ 6.57 ppm là tín hiệu của proton $-\text{CH}=\text{}$ trong vòng thơm.

Phổ ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, δ ppm, 125 MHz) kết hợp phổ DEPT cho thấy PHUOC-TAR-I2 có 16 carbon trong đó có 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$, 1 nhóm CH_3 , 7 nhóm CH, 7 nhóm carbon tứ cấp.

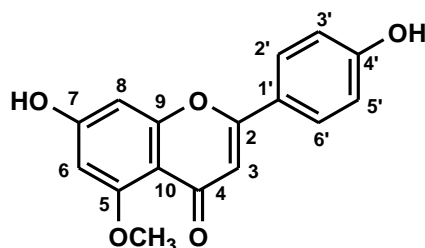
Phổ DEPT 90 cho 5 mũi dương trong khoảng δ 92.84-128.42 ppm gồm các carbon loại CH kề nối đôi.

Phổ DEPT 135 cho 6 mũi dương trong khoảng δ 55.89-128.42 ppm gồm:

- 5 mũi dương trong khoảng δ 92.84-128.42 ppm (đã xuất hiện trong phổ DEPT 90): các carbon của CH kề nối đôi, trong đó:
 - + 3 mũi dương tại các vị trí δ : 92.84; 98.20; 103.76 ppm: 3 carbon loại CH của vòng benzene.
 - + 2 mũi dương ở δ 116.17 và 128.42 ppm có cường độ mạnh tương đương gấp đôi các mũi khác, kết hợp phổ HMBC cho thấy: mỗi mũi là 2 carbon CH tương đương độ dời hóa học của vòng benzene.
- 1 mũi dương ở δ 55.89 ppm (không xuất hiện trong phổ DEPT 90): 1 carbon của nhóm OCH_3 gắn vào vòng benzene.
- Không có mũi âm chứng tỏ PHUOC-TAR-I2 không có carbon loại CH_2 .
- 8 mũi còn lại không xuất hiện trong phổ DEPT gồm các carbon tứ cấp:
 - + 7 mũi trong khoảng δ 105.54-165.64 ppm là 7 carbon tứ cấp của vòng benzene.
 - + 1 mũi ở δ 182.74 ppm là carbon của nhóm $\text{C}=\text{O}$ đặc trưng của ketone.

Kết hợp phổ công hưởng từ hạt nhân 2 chiều HSQC và HMBC cho thấy PHUOC-TAR-I2 thuộc nhóm flavone và là dẫn xuất của apigenin.

Từ các số liệu về phổ, kết luận chất PHUOC-TAR-I2 là **apigenin-5-methyl ether**, có công thức phân tử là $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Công thức cấu tạo hóa học như sau (Hình 2):



Hình 2: Công thức cấu tạo hóa học apigenin-5-methyl ether

3.2.2 Phân đoạn EA3

Phân đoạn EA3 (1326 mg) thu được dưới dạng bột màu trắng, sắc ký bản mỏng trong hệ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 9:1$ cho 3 vết trong đó có một vết chính, nên được sắc ký cột lần 2 với hệ dung môi $\text{PE}:\text{CHCl}_3$, $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ tăng dần độ phân cực. Thu

được một hợp chất sạch dưới dạng tinh thể màu trắng (43 mg), sắc ký bản mỏng giải ly bằng hệ EtOAc:MeOH = 9:1 hiện hình bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong EtOH cho vết tròn màu tím có R_f = 0.35, nhiệt độ nóng chảy 282-283°C, ký hiệu là PHUOC-TAR-03.

Phổ MS: 599 [M + Na]⁺.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR kết hợp kỹ thuật DEPT: trong phân tử có 35 carbon, trong đó có 3 carbon tứ cấp, 14 nhóm CH, 12 nhóm CH₂, 6 nhóm CH₃.

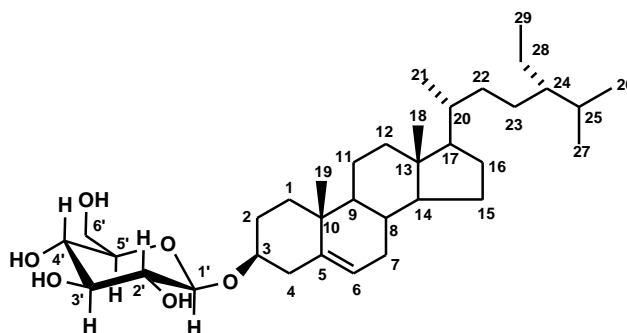
- Các mũi ở δ 140.17 và 121.82 ppm là dấu hiệu của nối đôi và ở 140.17 là C= (carbon tứ cấp có nối đôi), ở 121.82 là của CH=.
- Một mũi đặc trưng ở δ 100.94 ppm là mũi của acetal C_{1'} của đường gắn vào C ở vị trí số 3; được chứng minh nhờ phổ HMBC cho thấy sự tương tác giữa H_{1'} và C₃. Đồng thời hằng số tương tác spin-spin giữa H_{1'} và H_{2'} là J = 8.0 Hz, chứng tỏ liên kết kiểu *trans*-diaxial, kết hợp với các số liệu phổ ¹³C-NMR của phần đường và phổ proton hai chiều COSY cho thấy phù hợp với D-glucose và nối với khung aglycon bằng liên kết β.

Mặt khác, với kỹ thuật DEPT 90 cho 5 mũi ở các vị trí δ 70.08; 73.40; 75.71; 76.34; 78.91 ppm kết hợp phổ HSQC, HMBC cho biết đó là 5 nhóm CH-OH của gốc đường. Vậy trong phân tử có 1 đơn vị đường có 6 carbon.

Dựa vào phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR xác nhận có một vạch tại độ dịch chuyển hóa học là 5.37 ppm, cường độ tích phân là 1 đơn vị là của H₆, cùng với tín hiệu phổ ¹³C-NMR ở 121.82 ppm (-CH=); phù hợp trên phổ HSQC. Mặt khác dựa vào phổ HMBC cho thấy sự tương tác giữa H₆ với C₇, C₈, C₁₀, C₄ và sự tương tác giữa H₁ với C₃, C₅, C₁₀ nên CH₂ ở vị trí số 1 phải có độ dịch chuyển là 37.06 ppm và C= ở vị trí số 5; chứng tỏ khung sterol có một nối đôi tại vị trí 5-6.

Dựa trên kết quả phổ MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, COSY và HMBC cho thấy PHUOC-TAR-03 là chất **β-sitosterol-3-O-β-glucopyranoside**.

Dưới đây là công thức cấu tạo hóa học của β-sitosterol-3-O-β-glucopyranoside (C₃₅H₆₀O₆):



Hình 3: Công thức cấu tạo hóa học của β-sitosterol-3-O-β-glucopyranoside

Đây là dạng glycoside của β-sitosterol, ở dạng saponin này nó dễ tan trong nước hơn chất gốc β-sitosterol. Trong thiên nhiên β-sitosterol thường ở dạng ester hoặc glycoside, hoặc ở dạng đơn hay phối hợp với các phytosterol khác. Chúng có tác dụng làm giảm lượng cholesterol trong máu, do ngăn cản sự hấp thu cholesterol

(Grundy *et al.*, 1969; Normé *et al.*, 2000); kích thích chức năng miễn dịch, kiểm soát sự tăng sinh tế bào (Bouic & Lamprecht, 1999; Ju *et al.*, 2004). Ngoài ra, β -sitosterol còn làm giảm hàm lượng đường trong máu và là tác nhân kháng khuẩn, kháng virus và kháng nấm (Tahany *et al.*, (2010).

4 KẾT LUẬN

Đã phân lập và xác định cấu trúc của ba hợp chất: luteolin-7,4'-dimethyl ether, apigenin-5-methyl ether và β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside từ rễ Cau. Đây là những chất đều có hoạt tính sinh học nên đã giải thích được lý do tại sao rễ Cau được dùng chữa một số bệnh như đã nêu ở trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bouic P. J. and Lamprecht J. H. (1999), Plant sterols and sterolins: a review of their immune modulating properties, *Alternative Medicine Review: Journal of Clinical Therapeutic*, 4(3): 170-177.
- Grundy SM, Ahrens EH Jr, Davignon J. (1969), The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man, *J Lipid Res*;10:304-15
- Ju Sun Kim et al. (2006), Chemical Constituents of the Root of *Dystaenia takeshimana* and Their Anti-Inflammatory Activity, *Arch Pharm Res*, Vol 29, No 8, 617-623.
- Michelis F. et al. (2002), Effects of the flavonoid Pilloin isolated from *Marrubium cylleneum* on mitogen-induced lymphocyte transformation, *Pharm. Biol.* 40(4): 245-248.
- Normé n L, Dutta P, Lia A, Andersson H. (2000); Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel, *Am J Clin Nutr.* 71:908-913.
- Tahany M. A. et al., (2010), Study on combined antimicrobial activity of somebiologically active constituents from wild *Moringa peregrina* Forssk., *Journal of Yeast and Fungal Research* Vol. 1(1), 015-024.
- Voigtländer H. W., Balsam G., (1970), Apigenin-5-methylather, ein neues Flavon aus *Thevetia peruviana*, *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.*, 303, 782-787.
- Yang H. B. et al. (2008), Synthesis and crystal structure of Pilloin, *Turk. J. Chem.*, 32, 87-95.