

Nghiên cứu thành phần hóa học từ cặn dichloromethane của cây đại bi – *B. Balsamifera* nhằm thực hiện mục tiêu đào tạo theo định hướng ứng dụng của Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

Lê Thị Thúy Hằng*

*Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

Received: 20/09/2024; Accepted: 26/09/2024; Published: 02/10/2024

Abstract: *B. Balsamifera* is a medicinal plant that is commonly used for many medicinal applications in life. Many studies have been conducted to extract compounds for medical research from this plant. From the dichloromethane residue of - *B. Balsamifera*, we isolated the compounds Balsamiferine K (1), 6,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane (2) and Blumeanen J (3). This paper will present the isolation process and determine the molecular structure of the three compounds above.

Keywords: *B. Balsamifera*, Balsamiferine K, 6,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane, Blumeanen J

I. Mở đầu

Cây đại bi - *Blumea balsamifera* (L.) DC. là cây thuốc thuộc họ Cúc – Asteraceae được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền trong nước cũng như các nước trong khu vực. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng cây đại bi có khả năng chống vi khuẩn và chống viêm, tác dụng chống co thắt, chữa lành vết thương và các hoạt tính kháng bệnh và côn trùng [2]. Hơn nữa, một số ứng dụng dược lý mới đã được phát hiện, như gây độc tế bào ung thư, bảo vệ gan, chống oxy hóa. Ở Việt Nam, cây đại bi được sử dụng như một bài thuốc dân gian, tuy nhiên việc nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của nó chưa được nhiều. Bài báo này công bố kết quả phân lập của 3 hợp chất từ phân đoạn dịch chiết cặn dichloromethane của cây đại bi. Cấu trúc hóa học của chúng được chứng minh bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều (1D và 2D NMR)

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị và hóa chất

Phổ ^1H NMR (500MHz) và ^{13}C NMR (125Hz) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR và AVANCE III HD 500 với TMS được sử dụng làm chất nội chuẩn. Sắc ký lỏng trung áp (MPLC) được đo trên máy Biotage - Isolera One system. Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel (Kieselgel 60, 70-230 mesh and 230-400 mesh, Merck. Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ và RP-18 F_{254s} plates.

2.2. Mẫu thực vật

Mẫu cây đại bi - *B. balsamifera* (L.) DC. được thu hái tại Vĩnh Phúc vào tháng 5 năm 2021 được Viện

Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định và lưu bản mẫu để khẳng định đúng mẫu cần nghiên cứu

2.3. Phân lập các hợp chất

Mẫu đại bi – *B. balsamifera* sau khi thu hái về được phơi trong bóng râm rồi nghiền mịn thành bột thu được 2kg. Mẫu bột này được ngâm trong methanol ở nhiệt độ phòng trong 24h, sau đó được đem chiết không có siêu âm. Dịch chiết được rút ra và quay dưới áp suất giảm để loại hết dung môi và thu được phần cặn chiết methanol. Quá trình này được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 lít methanol, để thu được 300 gam phần cặn chiết methanol. Cặn chiết methanol sau đó được hòa vào nước rồi đem chiết lần lượt với các loại dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexane, dichloromethane với mỗi loại dung môi được lặp lại 3 lần, mỗi lần 2 lít, để thu được các cặn chiết: *n*-hexane (39 g), dichloromethane (45 g), phần dịch nước và phần không tan.

Phần cặn dichloromethane (45 gam) được lọc hết cặn không tan trước khi đưa lên cột silica gel pha thường và được phân cắt bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol với các tỷ lệ lần lượt 100% dichloromethane; 50/1; 20/1; 10/1; 5/1; 2/1 và 100% methanol thu được các phân đoạn D1-D7. Trong các phân đoạn đã được tách ra cho thấy phân đoạn D3 có nhiều vết chất nhất nên chúng tôi tiến hành phân lập chất từ phân đoạn D3.

Phân phân đoạn D3 (9,89 gam) được đưa vào cột sắc ký silica gel pha thường và được phân cắt bằng hệ dung môi *n*-hexane/acetone với tỷ lệ lần lượt là 5/1; 3/1 và 1/1 được 3 phân đoạn D3A; D3B và D3C.

Phân đoạn D3B (3,27 gam) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hỗn hợp dung môi methanol/nước với tỷ lệ 1/1 thu được các phân đoạn D3B1 đến D3B7.

Phân đoạn D3B3 (280 mg) bằng sắc ký cột silica gel pha thường và được rửa giải bằng dung môi dichloromethane/methanol với tỷ lệ 17/1 thu được các phân đoạn nhỏ hơn từ D3B3A đến D3B3D. Phân đoạn D3B3A (18 mg) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột silica gel pha thường và được rửa giải bằng dung môi *n*-hexane/ethylacetate với tỷ lệ 1/1,5 thu được phân đoạn D3B3A1. Phân đoạn D3B3A1 (11 mg) tiếp tục được phân giải bằng sắc ký cột sephadex LH-20, rửa giải bằng dung môi methanol/nước với tỷ lệ 1/1 thu được hợp chất **1** (2,4 mg).

Phân đoạn D3A (2,22 gam) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hỗn hợp dung môi methanol/nước với tỷ lệ 1/1 thu được các phân đoạn D3A1 đến D3A4. Tiếp tục phân tách phân đoạn D3A1 (296 mg) bằng sắc ký cột silica gel pha thường và được rửa giải bằng dung môi dichloromethane/methanol với tỷ lệ 30/1 thu được các phân đoạn nhỏ hơn từ D3A1A đến D3A1D. Phân đoạn D3A1C (24,6 mg) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột pha đảo RP-18 và được rửa giải bằng dung môi methanol/nước với tỷ lệ: 1/1 thu được các phân đoạn D3A1C1 đến D3A1C3.

Phân đoạn D3A1C3 (11 mg) tiếp tục đưa lên cột nhồi silica gel pha thường và rửa giải bằng dung môi *n*-hexane/ethylacetate với tỷ lệ 1/1,5 thu được hợp chất **2** (1,8 mg). Phân đoạn D3A1B (15 mg) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột sephadex LH-20, rửa giải bằng dung môi methanol/nước với tỷ lệ 1/1 thu được phân đoạn D3A1B1. Sau đó tiếp tục phân tách phân đoạn D3A1B1 bằng sắc ký cột silica gel pha thường và được rửa giải bằng dung môi *n*-hexane/acetone với tỷ lệ 3/1 thu được D3A1B1.1, rồi tiếp tục đưa lên cột sắc ký pha đảo RP-18 và rửa giải bằng dung môi methanol/nước với tỷ lệ 1,5/1 thu được hợp chất **3** (3,7 mg).

Hợp chất 1: Balsamiferine K

Chất dạng dầu, không màu. Độ quay cực = +25 (c = 0,05, CH₃OH)

Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): xem Bảng 2.1

HR-ESI-MS: *m/z* = 407,2046 [M + Na]⁺

Tính toán lý thuyết cho cation [C₂₀H₃₂NaO₇]⁺ là 407,2040)

Hợp chất 2: 6,15α-epoxy-1β,4β-dihydroxyeudesmane

mane

Chất dạng bột, màu trắng. Độ quay cực = -25⁰ (c = 0,1, CHCl₃)

Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): xem Bảng 2.2

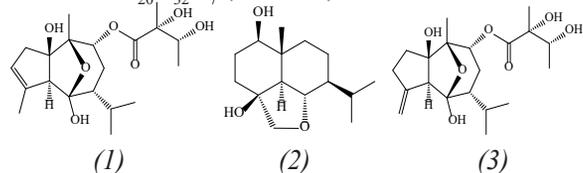
CTPT C₁₅H₂₆O₃ (M = 254)

Hợp chất 3: Blumeanen J

Chất dạng dầu, không màu. Độ quay cực = +35⁰ (c = 0,06, CH₃OH)

Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD)

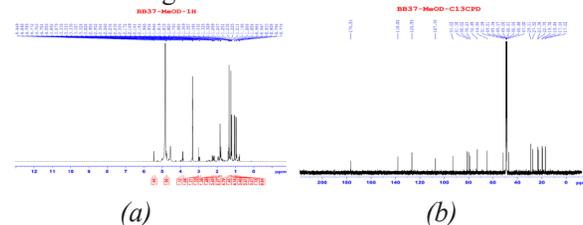
CTPT C₂₀H₃₂O₇ (M = 384)



Hình 2.1: Cấu trúc hóa học các hợp chất

3. Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng chất dầu không màu. Công thức phân tử của hợp chất **1** được xác định là C₂₀H₃₂O₇ (tương ứng với 5 độ bất bão hòa) bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử [M+Na]⁺ tại *m/z*: 407,2046 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho cation [C₂₀H₃₂NaO₇]⁺ là 407,2040). Trên phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR xuất hiện các tín hiệu của một nhóm carbonyl, một carbon bậc 4 mang oxy, một nhóm oxymethine, một nhóm methyl vạch kép và một nhóm methyl vạch đơn, cho phép xác định sự xuất hiện của 1 nhóm 2,3-dihydroxy-2-methylbutanoyl [5]. Với 15 nguyên tử carbon còn lại, hợp chất **1** được dự đoán có dạng khung sesquiterpene, một lớp chất chính của cây đại bi *B. balsamifera* [6]. Ngoài ra, các tín hiệu đặc trưng của một liên kết đôi bị thế 3 vị trí, một carbon bậc 4 mang 2 oxy, hai carbon bậc 4 mang oxy, một nhóm oxymethine, hai nhóm methyl vạch kép và hai nhóm methyl vạch đơn. Như vậy, với 3 độ bất bão hòa còn lại (tổng 5, trừ 1 liên kết đôi và 1 nhóm carbonyl), hợp chất này phải có cấu trúc dạng khung sesquiterpene có chứa 3 vòng.



Hình 2.2. Phổ ¹H-NMR(a) và ¹³C-NMR(b) của hợp chất **1**

Bảng 2.1. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất 1 và hợp chất so sánh

C	#δ _C	##δ _C ^{a,b}	δ _C ^{a,b}	DEPT	δ _H ^{a,c} (J = Hz)	HMBC (H→C)
1	92,9	92,9	93,02	C	-	
2	38,9	39,0	47,00	CH ₂	2,25 dd (17,0, 2,0) 2,96 dd (17,0, 2,0)	1, 4
3	34,4	34,4	126,55	CH	5,45 br s	1, 2, 5
4	151,1	151,1	138,08	C	-	
5	58,9	59,0	64,86	CH	3,02 s	1, 2, 3, 4, 6, 7, 15
6	105,3	105,6	107,30	C	-	
7	51,4	51,5	51,69	CH	1,80 m	
8	27,1	27,1	27,52	CH ₂	1,81 m/2,18 m	6
9	79,7	79,7	80,02	CH	4,77 dd (11,0, 6,5)	1, 8, 10, 16
10	81,1	81,0	81,30	C	-	
11	29,1	29,1	29,11	CH	1,95 m	
12	23,5	23,5	23,38	CH ₃	1,06 d (7,0)	7, 11, 13
13	19,4	19,4	19,44	CH ₃	0,98 d (7,0)	7, 11, 12
14	18,8	18,8	19,70	CH ₃	1,25 s	1, 9, 10
15	110,6	110,4	17,16	CH ₃	1,84 s	3, 4, 5
1'	176,7	176,5	176,53	C	-	
2'	79,7	78,8	78,83	C	-	
3'	72,9	72,9	72,95	CH	3,88 q (6,5)	16, 19, 20
4'	17,0	17,0	17,02	CH ₃	1,20 d (6,5)	17, 18
5'	22,7	22,7	22,75	CH ₃	1,36 s	16, 17, 18

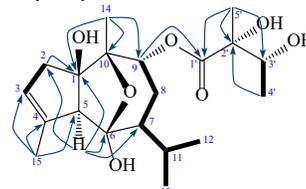
#δ_C: số liệu phổ của hợp chất blumeaene J trong pyridine-d₅

##δ_C^{a,b}: số liệu phổ của hợp chất 3, ^a đo trong CD₃OD, ^b125MHz, ^c500MHz

δ_C^{a,b}: số liệu phổ của hợp chất 1, ^a đo trong CD₃OD, ^b125MHz, ^c500MHz,

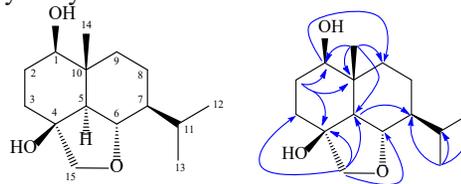
Từ các phân tích nêu trên, số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất 1 được tiến hành so sánh và cho thấy sự phù hợp tại các vị trí tương ứng so với hợp chất blumeaene J cũng được phân lập từ cây đại bi [7], ngoại trừ sự xuất hiện các tín hiệu của một liên kết đôi bị thế 3 vị trí và một nhóm methyl vạch đơn ở hợp chất 1 thay cho một nhóm methylen và một liên kết đôi bị thế 2 vị trí ở blumeaene J. Tương tác COSY nhận được giữa H-2 và H-3 cùng với các tương tác HMBC của H-15 với C-3, C-4 và C-5 cho phép xác định chính xác vị trí của liên kết đôi bị thế 3 vị trí tại C-3/C-4 và nhóm methyl C-15. Cấu trúc phẳng của hợp chất này được khẳng định bằng các tương tác COSY của H-9/H-8/H-7/H-11/H-12 (H-13), H-3'/H-4' và các tương tác HMBC của H-2 với C-1; H-5 với C-1, C-2, C-6, C-7, H-9 với C-1', H-4' với C-2', H-5' với C-1', C-2' và C-3' (xem hình 2.3). Cấu hình tương đối của hợp chất 1 tại các liên kết của C với O ở các vị trí 1, 5, 6, 7, 9, 10, 2', 3' được xác định trùng với các hợp chất blumeaene J [7] và balsamiferine H-J [8] cũng

như sự tương đồng về cấu hình tương đối của các hợp chất blumpene B-D [8] dựa trên cơ sở chúng đều cùng được phân lập từ cây đại bi B. balsamifer. Sự phù hợp về số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR cũng như các tương tác nhận được trên phổ NOESY giữa H_b-2 với H-14, H-5 với H_a-8 và H-11 và của H-9 với H-7, H_b-8 và H-14 [7, 8]. Từ tất cả các dữ kiện nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất 1 được xác định là một hợp chất thuộc nhóm chất sesquiterpene thuộc lớp chất terpene – là một lớp chất chính trong cây đại bi – và là một hợp chất mới được đặt tên là balsamiferine K



Hình 2.3. Các tương tác COSY (—), HMBC (---) chính của hợp chất 1

Hợp chất 2 được xác định là 6,15α-epoxy-1β,4β-dihydroxyeudesmane



Hình 2.4. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất 2

Phổ ¹H-NMR của hợp chất 2 cho thấy tín hiệu proton của ba nhóm methyl tại δ_H 1,04 (3H, s), 0,94 (3H, d), 1,00 (3H, d), một nhóm oxymethylene tại δ_H 3,59 (1H, d) và 3,70 (1H, d), hai proton của nguyên tử carbon liên kết với nhóm hydroxyl tại δ_H 3,36 (1H, dd) và 3,86 (1H, dd) và tín hiệu của ba nhóm methine cùng bốn nhóm methylene khác.

Bảng 2.2. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất 2 và hợp chất so sánh

C	#δ _C	2			
		δ _C	DEPT	δ _H (J = Hz)	HMBC (H→C)
1	80,5	81,3	CH	3,36 dd (4,0, 11,5)	9
2	28,0	28,7	CH ₂	1,62 m	1, 4, 10
				2,04 m	
3	39,7	40,4	CH ₂	1,08 m	
				1,81 m	
4	77,2	76,8	C	-	
5	57,5	58,8	CH	1,06 m	6, 7
6	75,6	77,2	CH	3,86 dd (11,5, 9,0)	
7	51,2	52,5	CH	1,34 m	

8	22,2	23,2	CH ₂	1,26 m	
				1,6 m	
9	33,2	34,2	CH ₂	1,59 m	
				1,90 m	
10	39,1	40,4	C	-	
11	29,5	30,6	CH	1,89 m	
12	18,5	18,7	CH ₃	0,94 d (7,0)	
13	20,7	21,0	CH ₃	1,00 d (6,5)	7, 11, 12
14	12,8	13,4	CH ₃	1,04 s	1, 10, 9
15	80,4	81,3	CH ₂	3,59 d (8,5)	3, 4, 5, 6
				3,70 d (9,0)	

δ_c : độ dịch chuyển ¹³C-NMR của 6,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane được đo ở 90 MHz trong dung môi CDCl₃

δ_c : độ dịch chuyển ¹³C-NMR của hợp chất 2 được đo ở 125MHz trong CD₃OD

Trên phổ ¹³C-NMR cho thấy tín hiệu của 15 nguyên tử carbon với: ba nhóm methyl (CH₃), năm carbon của nhóm methine (CH), năm carbon của nhóm methylene (CH₂) và hai carbon không liên kết với hydro. Các số liệu phổ proton được gán với các số liệu carbon tương ứng thông qua phổ HSQC. Phân tích số liệu phổ ¹H-, ¹³C-NMR và phổ HSQC cho phép xác định sự tồn tại cấu trúc khung sesquiterpene với các tín hiệu đặc trưng: ba nhóm methyl tại δ_c 13,4 (C-14)/ δ_H 1,04 (3H, s), δ_c 18,7 (C-12)/ δ_H 0,94 (3H, d) và δ_c 21,0 (C-13)/ δ_H 1,00 (3H, d), hai tín hiệu của carbon không liên kết với hydro trong đó có một carbon chứa liên kết với nhóm hydroxyl tại δ_c 76,8 (C-4) và một carbon còn lại tại δ_c 40,4 (C-10), một nhóm oxymethylene tại δ_c 81,3 (C-15)/ δ_H 3,59 (1H, d) và 3,70 (1H, d). Trên phổ ¹³C-NMR còn cho thấy tín hiệu của một nhóm methine chứa liên kết với nhóm hydroxyl tại δ_c 81,3 (C-1)/ δ_H 3,37 (1H, d), một nhóm oxymethine tại δ_c 77,2 (C-6)/ δ_H 3,86 (1H, dd) cùng với tín hiệu của ba nhóm methine và bốn nhóm methylene khác. Ngoài ra trên phổ HMBC và phổ HSQC H/C cho phép qui kết các giá trị phổ ¹H-, ¹³C- tại các vị trí này cũng như cho phép xác định các tương tác giữa các tương tác H-H và C-H tương ứng. Từ các dữ kiện đã nêu, cùng với sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ ¹³C-NMR và giá trị độ quay cực ($\alpha = -25^0$ ($c = 0,1$, CHCl₃)) đã xác định so với các số liệu đã được công bố ($\alpha = -28^0$ ($c = 0,15$, CHCl₃)), hợp chất 2 được xác định có cấu hình tương đối là 6,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane [9]. Hợp chất 2 cũng là một chất sesquiterpene thuộc lớp chất terpene – một lớp chất chính của cây đại bi.

Bằng phương pháp phổ tương tự, hợp chất hợp chất 3 được chứng minh là blumeanen J, cũng là một

sesquiterpeneoid esters thuộc lớp chất terpene – một lớp chất chính của cây đại bi. [7].

4. Kết luận

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, 3 hợp chất thuộc lớp chất terpen đã được phân lập từ dịch căn dichloromethane của cây đại bi là balsamiferine K (1); 6,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane (2) và blumeanen J (3)

Tài liệu tham khảo

- [1] D. Wang, W.J. Fu, Y.X. Pang, H. Wang, X. Hu, H. Nie. The study of skin allergy and acute toxicity of *Blumea balsamifera* oil. *Chin. J. Trop. Crop.*, 2013, 34, 2499–2502.
- [2] S.S. Chu, S.S. Du, Z.L. Liu. Fumigant compounds from the essential oil of Chinese *Blumea balsamifera* leaves against the Maize Weevil (*Sitophilus zeamais*). *Journal of Chemistry*, 2013, 2013, 289874.
- [3] N. Saewan, S. Koysomboon, K. Chantrapromma. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(6), 1018-1025.
- [4] I.G. Widhiantara, I.M. Jawi. Phytochemical composition and health properties of Sembung plant (*Blumea balsamifera*): A review. *Veterinary World*, 2021, 14(5), 1185-1196.
- [5] A. Saifudin, K. Tanaka, S. Kadota, Y. Tezuka. Chemical constituents of *Blumea balsamifera* of Indonesia and their protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(7), 815-818.
- [6] Y. Pang, D. Wang, Z. Fan, X. Chen, F. Yu, X. Hu, K. Wang, L. Yuan. *Blumea balsamifera* - A phytochemical and pharmacological review. *Molecules*, 2014, 19(7), 9453-9477.
- [7] M. Chen, J.J. Qin, J.J. Fu, X.J. Hu, X.H. Liu, W.D. Zhang, H.Z. Jin. Blumeaenes A-J, sesquiterpenoid esters from *Blumea balsamifera* with NO inhibitory activity. *Planta Med*, 2010, 76(9), 897-902.
- [8] J. Xu, D.Q. Jin, C. Liu, C. Xie, Y. Guo, L. Fang. Isolation, characterization, and NO inhibitory activities of sesquiterpenes from *Blumea balsamifera*. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(32), 8051-8058.
- [9] N. Li, J.J. Chen, J. Zhou. Capitulin B, a new eudesmane derivative from *Curculigo capitulata*, and revised assignment of 13C NMR data of 6 α ,15 α -epoxy-1 β ,4 β -dihydroxyeudesmane. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3), 279-282.