

Thành phần triterpen khung ursan phân lập từ rễ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge.) trồng ở Việt Nam

Nguyễn Hữu Tùng^{1,*}, Vũ Đức Lợi¹, Bùi Thanh Tùng¹, Lê Quốc Hùng^{1,3},
Hà Bá Tiên², Trịnh Nam Trung², Dương Thị Ly Hương¹,
Bùi Thị Xuân¹, Nguyễn Thanh Hải¹

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Kiểm nghiệm Nghiên cứu Dược và Trang thiết bị y tế Quân đội-Bộ Quốc phòng,
1B Trần Thánh Tông, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) được trồng ở Tây Bắc là một trong những cây thuốc quan trọng và có giá trị sử dụng cao. Trong chương trình nghiên cứu và phát triển dược liệu Tây Bắc, trên cơ sở sử dụng các phương pháp sắc kí đã phân lập được hai hợp chất triterpene năm vòng khung ursan từ rễ cây đan sâm thu hái ở Lào Cai. Cấu trúc hóa học của hai hợp chất này được xác định là acid ursolic (1) và acid 2 β -Hydroxypomolic (2) dựa trên các dữ liệu phổ khối lượng và cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp so sánh với dữ liệu phổ được công bố trong tài liệu tham khảo. Đây là công bố đầu tiên về thành phần triterpen của cây đan sâm trồng ở Việt Nam.

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2015, Chính sửa ngày 10 tháng 9 năm 2015, Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 12 năm 2016

Từ khóa: Đan sâm, *Salvia miltiorrhiza*, ursolic, 2 β -Hydroxypomolic.

1. Đặt vấn đề

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), còn được gọi là huyết sâm, xích sâm là một loài thực vật sống lâu năm thuộc họ hoa môi (Lamiaceae) [1-3]. Đây là loài bản địa của Trung Quốc và được nhập nội vào nước ta [3]. Trong y học cổ truyền, rễ đan sâm được sử dụng để phòng và điều trị một số chứng bệnh liên quan tới tim mạch và đột quỵ như suy tim, tim hồi hộp, đau tức ngực, thấp khớp, viêm khớp, thần kinh suy nhược, nhức đầu mất ngủ và được dùng làm thuốc bổ. Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chứng minh đan sâm có tác dụng ức chế sự phát triển của xơ gan, bảo vệ

các mô thận khỏi thương tổn do bệnh đái đường gây ra, chống bệnh viêm và tổn thương tụy cấp tính, tác dụng bảo vệ hệ tim mạch, và ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư ở người và HIV [4, 5].

Các nghiên cứu về thành phần hóa học chỉ ra rằng rễ cây đan sâm có chứa nhiều diterpene khung abiatan hay còn gọi là các tanshinon như là tanshinon IIA, cryptotanshinon, tanshinon I, ... có màu đỏ tạo nên màu đặc trưng của đan sâm và các acid phenolic hữu cơ phân cực như salvianolic acid A-E cùng một số thành phần khác bao gồm sterol, acid béo và polysaccharid [6, 7]. Cây Đan sâm ngày càng được trồng nhiều đặc biệt là các tỉnh Tây Bắc bao gồm Lào Cai, Hà Giang. Tuy nhiên, ở nước ta cho đến nay có rất ít nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của dược liệu đan sâm di

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84- 978745494
Email: tungnh.smp@vnu.edu.vn

thực. Năm 2013, nhóm nghiên cứu Viện Dược liệu lần đầu tiên nghiên cứu về thành phần hóa học rễ cây đan sâm di thực công bố phân lập và xác định 3 thành phần tanshinon chính là tanshinon I, IIA và cryptotanshinon [8]. Năm 2014, nhóm nghiên cứu Ngô Quốc Luật và cộng sự nghiên cứu về thực vật học và khảo sát thành phần chất chính tanshinon IIA của đan sâm thu hái ở các địa điểm khác nhau của Việt Nam [9].

Trong chương trình nghiên cứu và phát triển dược liệu Tây Bắc, bước đầu nghiên cứu thành phần hoạt chất của đan sâm, chúng tôi đã phân lập được và xác định thêm hai thành phần tanshinon là trijuganon B và dihydrotanshinon I từ phân đoạn hữu cơ ít phân cực giàu tanshinon [10]. Tiếp tục nghiên cứu các phân đoạn phân cực hơn, chúng tôi đã phân lập được hai hợp chất triterpen khung ursan là acid ursolic (**1**) và acid 2 β -hydroxypomolic (**2**). Theo đó, bài báo này trình bày về phân lập và xác định cấu trúc hóa học của hai hợp chất triterpen mới được phân lập từ đan sâm trồng ở Lào Cai, Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây đan sâm được thu hái vào tháng 10 năm 2014 tại huyện huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai, sau một năm trồng. Mẫu thực vật đã được Viện Dược liệu giám định tên khoa học là: *Salvia miltiorrhiza* Bunge., mẫu được lưu giữ tại Khoa Y Dược, ĐHQGHN.

2.2. Dung môi, hóa chất

Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như methanol (MeOH), n-hexan, ethyl acetat (EtOAc), và dicloromethan (DCM) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Dung môi phân tích gồm MeOH, n-hexan, EtOAc, H₂O dùng để phân tích sắc ký đều đạt tiêu chuẩn phân tích. Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột là *silica gel* pha thường (0,040 - 0,063 mm, Nicalai Tesque Inc., Nhật Bản), YMC ODS-A (50 μ m, YMC Co. Ltd., Nhật Bản). Bản mỏng tráng sẵn trên đế nhôm loại pha thường Kieselgel 60 F₂₅₄ và pha

đảo TLC Silica gel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, Damstadt, Đức). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % hơi nóng để phát hiện vết chất.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP3 (Sanyo, Nhật Bản). Phổ khối ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1260 Series LC-MS ion Trap (Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một và hai chiều được đo trên máy JEOL ECX 400 (Jeol, Nhật Bản) và sử dụng dung môi CDCl₃/CD₃OD, chất nội chuẩn là tetramethylsilan (TMS).

2.4. Chiết tách và phân lập chất

Mẫu rễ đan sâm (1000 g) sau khi rửa sạch, phơi khô, thái nhỏ được chiết kỹ bằng dung môi ethanol 80% 3 lần (mỗi lần 3 L) sử dụng thiết bị chiết siêu âm ở 40 °C trong 5 giờ. Các dịch chiết ethanol thu được được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 245 g cao chiết tổng ethanol. Lấy 100 g cao chiết hòa tan trong nước cất (700 mL) và chiết phân bố bằng hexane và ethyl axetat (mỗi dung môi 3 lần, mỗi lần 700 mL). Các phân đoạn hexane, ethyl axetat được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn tương ứng hexane (5,2 g) và ethyl axetat (33,8 g).

Tiến hành phân đoạn dịch chiết ethyl axetat (33,0 g) trên cột sắc ký silica gel (Φ85 mm × 90 mm) với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần bao gồm hexane-EtOAc (5:1→1:1, v/v, mỗi phân đoạn 600 mL) và tiếp sau là CHCl₃-MeOH (10:1→1:1, v/v, mỗi phân đoạn 500 mL) thu được 7 phân đoạn ký hiệu là F1~F7.

Từ phân đoạn F5 (8,3 g), chạy sắc ký cột silica gel (Φ45 mm × 350 mm) với hệ pha động CHCl₃-MeOH (15:1, v/v, 2,5 L) thu được 6 phân đoạn nhỏ hơn là F5.1~F5.6. Tiếp theo, tinh chế phân đoạn nhỏ F5.2 (815 mg) bằng sắc ký cột pha đảo YMC C-18 sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (4:1, v/v, 2,0 L) thu được hợp chất số **2** (48 mg). Phân đoạn F.5.2.4 được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel dùng hệ pha

động là CHCl₃-Etyl acetat (35:1, v/v) thu được hợp chất **1** (53 mg).

Hai hợp chất phân lập được (**1** và **2**) được xác định cấu trúc hóa học trên cơ sở các phương pháp hóa lý bao gồm phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR (Nuclear Magnetic Resonance) và phổ khối MS (Mass Spectroscopy). Cấu trúc hóa học của hai hợp chất được minh họa trong hình 1.

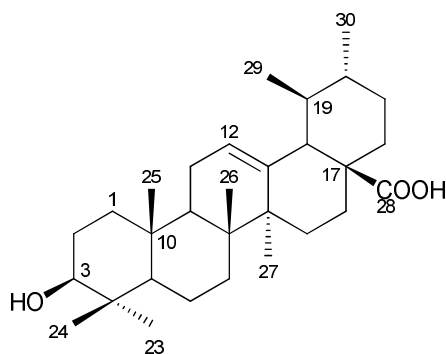
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính chất vật lý và số liệu phổ của các chất phân lập được

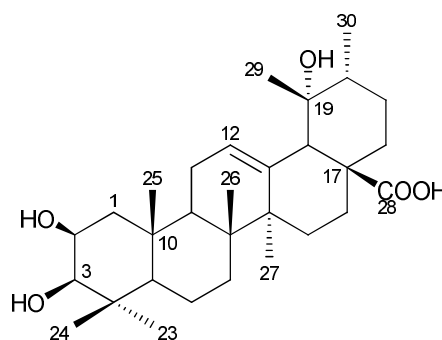
Chất số 1 (acid Ursolic): Chất bột màu trắng; Mp 291°C; $[\alpha]_D^{25} = -64^\circ$ (*c* 0,8, CH₃OH); ESI-MS: *m/z* 457 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5,26 (1H, br s, H-12), 3,35 (1H, m, H-3), 1,27 (3H, s), 1,15 (3H, s), 1,08 (3H, s), 0,98 (3H, s), 0,91 (3H, s), 0,78 (3H, s) (các tín hiệu methyl), 0,88 (3H, d, *J* = 5,2 Hz, 29-CH₃), 0,76 (3H, d, *J* = 6,0 Hz, 30-CH₃); ¹³C NMR (100 Hz, CDCl₃): δ 39,0 (C-1), 27,1 (C-2), 79,1 (C-3), 39,1 (C-4), 55,8 (C-5), 18,8 (C-6), 33,2 (C-7), 39,7 (C-8), 48,0 (C-9), 39,5

(C-10), 24,6 (C-11), 126,0 (C-12), 138,7 (C-13), 42,1 (C-14), 28,4 (C-15), 24,6 (C-16), 48,3 (C-17), 53,3 (C-18), 39,4 (C-19), 39,0 (C-20), 31,0 (C-21), 37,3 (C-22), 28,4 (C-23), 15,6 (C-24), 15,8 (C-25), 17,1 (C-26), 23,7 (C-27), 181,1 (C-28), 17,3 (C-29), 21,4 (C-30).

Chất số 2 (acid 2β-Hydroxypomolic): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25} = 38^\circ$ (*c* 0,6, CH₃OH); ESI-MS: *m/z* 489 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5,20 (1H, br s, H-12), 3,86 (1H, ddd, *J* = 11,2, 9,6, 4,0 Hz, H-2α), 3,23 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3α), 1,68 (3H, s), 1,45 (3H, s), 1,28 (3H, s), 1,25 (3H, s), 0,98 (3H, s), 0,92 (3H, s) (6 tín hiệu methyl bậc 3), 1,16 (3H, d, *J* = 4,0 Hz, H-30); ¹³C NMR (100 Hz, CD₃OD): δ 42,7 (C-1), 67,1 (C-2), 80,1 (C-3), 39,0 (C-4), 49,3 (C-5), 19,3 (C-6), 34,0 (C-7), 41,2 (C-8), 48,2 (C-9), 39,4 (C-10), 24,7 (C-11), 129,3 (C-12), 140,0 (C-13), 43,1 (C-14), 29,2 (C-15), 26,6 (C-16), 48,5 (C-17), 55,0 (C-18), 73,6 (C-19), 42,5 (C-20), 27,1 (C-21), 39,5 (C-22), 29,6 (C-23), 22,4 (C-24), 16,6 (C-25), 17,5 (C-26), 24,9 (C-27), 182,3 (C-28), 27,3 (C-29), 16,9 (C-30).



acid Ursolic (**1**)



acid 2β-Hydroxypomolic (**2**)

Hình 1. Cấu trúc phân tử của acid ursolic (**1**) và acid 2β-hydroxypomolic (**2**).

3.2. Biện luận xác định công thức hóa học của các chất

Hợp chất **1** thu được là chất bột màu trắng và được xác định cấu trúc dựa trên các hằng số vật lý, số liệu phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H và ¹³C NMR trong phần 3.1. Phổ NMR của chất **1** mang đặc trưng của một

triterpen khung ursane [11]. Phổ ¹³C NMR xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của một nhóm axit cacboxylic (COOH) tại δ 181,1 (C-28), hai olefin carbon của nối đôi C-12/C-13 tại δ 126,0 (C-12) và 138,7 (C-13) và một oxymethine carbon tại δ 79,1 (C-3). Kết hợp so sánh với số liệu phổ ¹³C NMR, điểm chảy và độ quay cực của hợp chất **1** với hợp chất ursolic acid thấy hoàn toàn phù hợp

[12], cho phép xác định hợp chất **1** chính là ursolic acid, một thành phần hóa học đã được công bố từ đan sâm nhưng lần đầu tiên phân lập được từ dược liệu này trồng ở nước ta.

Hợp chất **2** thu được ở dạng bột màu trắng. Trên phổ ESI-MS của **2** xuất hiện peak ion tại 489 $[M+H]^+$ phù hợp với công thức phân tử là $C_{30}H_{48}O_5$. Phổ 1H NMR của **5** mang đặc điểm đặc trưng của hợp chất triterpene khung ursane với các tín hiệu của 6 nhóm methyl bậc 3 tại δ 1,68 (3H, s), 1,45 (3H, s), 1,28 (3H, s), 1,25 (3H, s), 0,98 (3H, s), 0,92 (3H, s) và một nhóm methyl bậc 2 đặc trưng δ 1,16 (3H, d, $J = 4,0$ Hz, H-30). Trên phổ cũng xác nhận sự có mặt của một proton olefin tại δ 5,20 (1H, br s, H-12) và 2 proton oxymetin tại δ 3,86 (1H, ddd, $J = 11,2, 9,6, 4,0$ Hz, H-2 α) và 3,23 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3 α). Phổ ^{13}C -NMR của **2** xuất hiện 30 tín hiệu cacbon của khung triterpene C_{30} , trong đó có một cacboxylic cacbon ở trường thấp δ 182,3 (28-COOH), 2 olefin cacbon tại δ 129,3 (C-12), 140,0 (C-13) đặc trưng của nối đôi C-12/C-13 cùng với 2 oxymetin cacbon tại δ 67,1 (C-2) và 80,1 (C-3) [11]. Từ những dữ kiện phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của 2 β -hydroxypomolic acid được công bố trong tài liệu thấy hoàn toàn phù hợp [13]. Như vậy hợp chất **2** được xác định là 2 β -hydroxypomolic acid, đây là lần đầu tiên được phân lập được từ đan sâm cũng như các loài thuộc chi *Salvia*.

4. Kết luận

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phân tích phổ hiện đại, chúng tôi đã phân lập xác định cấu trúc phân tử của 2 hợp chất triterpen năm vòng khung ursan là acid ursolic (**1**) và acid 2 β -hydroxypomolic (**2**). Đây là công bố đầu tiên về thành phần triterpen có trong cây đan sâm trồng ở Việt Nam và hợp chất **2** (acid 2 β -hydroxypomolic) lần đầu tiên phân lập được từ đan sâm cũng như chi *Salvia*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.05-2015.05.

Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 2001.
- [2] Võ Văn Chi, Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, 2012.
- [3] Viện Dược liệu, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2004.
- [4] Xu YY et al., Recent advance on research and application of *Salvia miltiorrhiza*. Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics 7 (2) (2007) 99.
- [5] Wang BQ, *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant. Journal of Medicinal Plants Research 4 (25) (2010) 2813.
- [6] Zhou L, Zuo Z, Chow MS, Dansen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. The Journal of Clinical Pharmacology 45 (12) (2005) 1345.
- [7] Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH, New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. Medicinal Research Reviews 27 (1) (2007) 133.
- [8] Phương Thiện Thương, Nguyễn Thị Kim An, Nguyễn Minh Khởi, Fumiaki Ito, Các tanshinon phân lập từ rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) di thực và trồng ở Việt Nam, Tạp chí Dược học 53 (1) (2013) 44.
- [9] Ngô Quốc Luật, Trần Danh Việt, Đào Văn Núi, Nghiên cứu di thực cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) tại Việt Nam, Tạp chí Dược học 54 (4) (2014) 687.
- [10] Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Thanh Hải, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Tiến Vững, Bùi Hồng Cường, Một số hợp chất phân lập từ rễ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) trồng ở huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai, Tạp chí Dược học 56 (4) (2016) 43.
- [11] Mahato S, Kundu A, ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features, Phytochemistry 37, (1994) 1517.
- [12] Đinh Gia Thiện, Trần Văn Chiến, Nguyễn Thị Hoàng Anh, Trần Văn Sung, Nghiên cứu thành phần hóa học lá cây sơn trà *Poilane* (*Eriobotrya poilanei* J.E.Vid), họ hoa hồng (Rosaceae), Tạp chí Hóa học 49 (2011) 223.
- [13] Cheng D., Cao X., Pomolic acid derivatives from the root of *Sanguisorba officinalis*, Phytochemistry 31 (4) (1992) 1317.

Triterpenen Ursan Frame Isolated from the Roots of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge Growing in Vietnam

Nguyen Huu Tung¹, Vu Duc Loi¹, Bui Thanh Tung¹, Le Quoc Hung^{1,3},
Ha Ba Tien², Trinh Nam Trung², Duong Thi Ly Huong²,
Bui Thi Xuan¹, Nguyen Thanh Hai¹

¹VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

³Military Institute of Drug Quality, Pharmaceutical Research and Medical Equipments,
1B Tran Thanh Tong, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

Abstract: Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) cultivated in the Northern West region of Vietnam is one of the most important and highly valuable medicinal plants. In our study course on medicinal materials of the Northern West region, using chromatography methods resulted in the isolation of two ursane-type pentacyclic triterpenes from the roots of danshen collected in Lao Cai. Their structures were identified as ursolic acid (**1**) và 2β -Hydroxypomolic acid (**2**) on the basis of spectroscopic data including mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectra together with comparison with those reported in the literature. This is the first report of triterpene components from danshen cultivated in Vietnam.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*, ursolic acid, 2β -Hydroxypomolic acid.