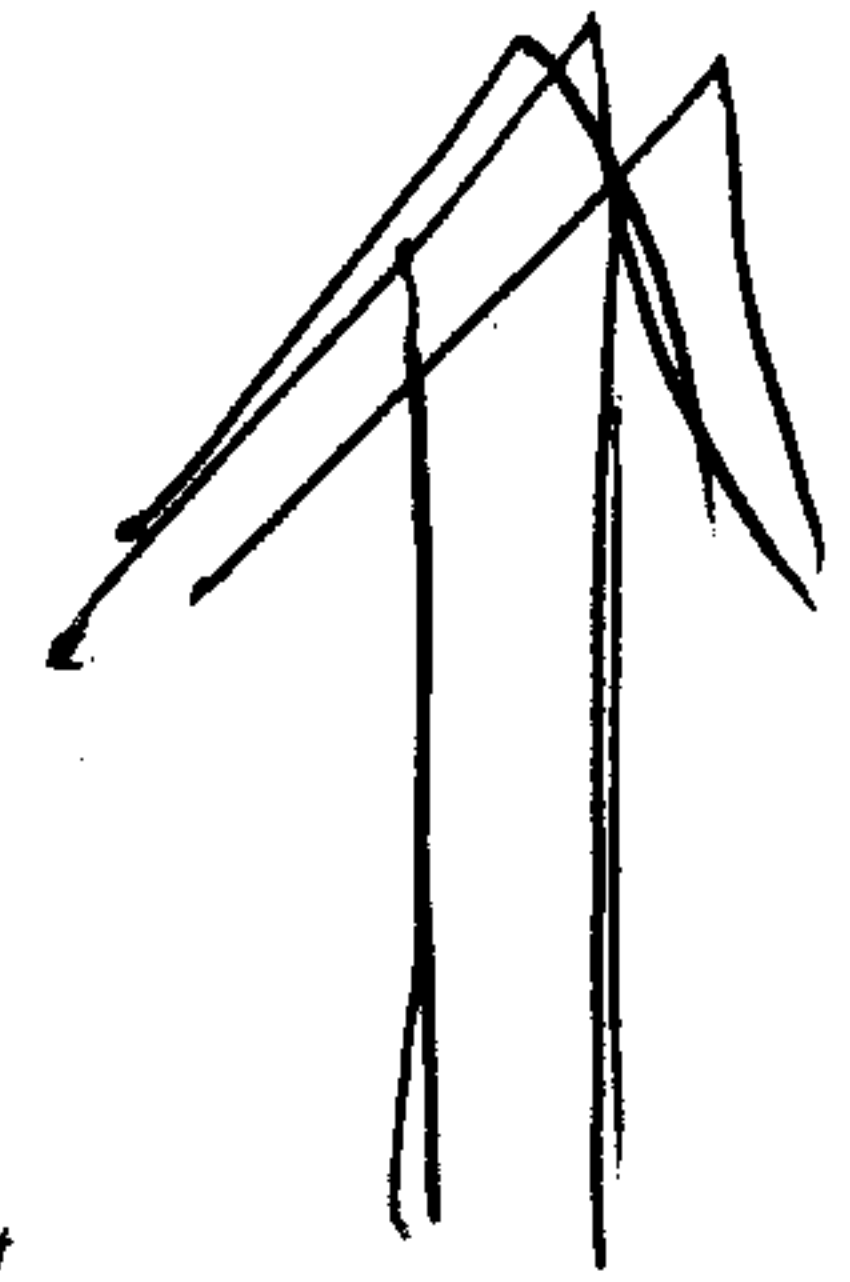


## NHẬN BIẾT LOÀI CỐI XAY ĐƯỢC SỬ DỤNG LÀM THUỐC TRONG CHI *ABUTILON* Mill. (MALVACEAE) Ở VIỆT NAM

Đỗ Thị Xuyên, Nguyễn Khắc Khôi  
Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật  
(Nhận bài ngày 28 tháng 1 năm 2004)



### Summary

#### Authentification of the *Abutilon* Species Used Medicinally in Vietnam

*The genus Abutilon Mill. (Malvaceae) has 2 species in Viet Nam, i.e., Abutilon crispum (L.) Sweet and A. indicum (L.) Sweet with different morphological features. Of them, Abutilon indicum (L.) Sweet has been used medicinally. It differs from Abutilon crispum in the morphology of the stem and the number of the carpels (15-20 vs. 8-15).*

*Key words: Abutilon indicum, Abutilon crispum, Medicinal Plant.*

Ở Việt Nam, chi Cối xay (*Abutilon* Mill.) có 2 loài, trong đó *Abutilon indicum* (L.) Sweet là loài cây thuốc có giá trị. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi muốn đề cập đến đặc điểm chung của chi, xây dựng khoá định loại các loài, danh pháp, mô tả tóm tắt và phân bố của các loài ở Việt Nam.

#### Đặc điểm chung của chi Cối xay

Cây thân cỏ hay nửa bụi, cao 1-2 m, phân nhánh nhiều. Lá mọc so le, hình tim tròn hay gần tròn, gân chân vịt. Lá kèm hình chỉ hay mũi nhọn. Hoa nhỏ, mọc đơn độc ở kẽ lá, màu vàng tươi, đường kính 1-2 cm; đài hình chuông hay hình ống, 5 thùy nhỏ hình trứng, chóp nhọn; cánh hoa 5, hình tam giác hay trứng ngược, hàn liền ở gốc, dính với ống nhị; nhị nhiều, chỉ nhị dính với nhau thành cột ngắn hơn cánh hoa; bầu hình cầu hay hơi dẹt, có 8-20 ô, mỗi ô có 2-9 noãn, khi chín chúng rời với trục chính; vòi nhụy phân nhánh bằng số ô, núm nhụy dạng đầu. Quả nang, hình đĩa, kích thước nhỏ, khoảng 1,2-2 cm gồm 8-20 mảnh, các mảnh dính trên một trục nghiêng, dính lại với nhau giống hình cái cối xay, trục phát triển tự do, lá noãn có đầu mỏ hơi chẻ ra hay ít khi không có ở đỉnh, mở ở lưng ô hay ở đỉnh; khi quả chín, mảnh vỏ quả rụng đi, tồn tại đế hoa dài; hạt nhiều, hình thận, màu đen.

*Lectotypus: Gossypium avicenna* Gaertn. (vide Britt. & Millsp. 1920)

Chi này có 150 loài phân bố ở vùng nhiệt đới và

á nhiệt đới như châu Á (Trung Quốc, Ấn Độ, các nước Đông nam Á), châu Phi, châu Mỹ.

Việt Nam có 2 loài là *Abutilon crispum* (L.) Sweet và *Abutilon indicum* (L.) Sweet. Loài sau được dùng làm thuốc.

#### Khoá định loại các loài trong chi Cối xay ở Việt Nam

1A. Bầu 8-15 lá noãn, không có mỏ: *A. crispum*

1B. Bầu 15-20 lá noãn, có mỏ: *A. indicum*

#### Đặc điểm của 2 loài trong chi Cối xay:

1. *Abutilon crispum* (L.) Sweet, 1826. – *Sida crista* L. 1753 – *Herisantia crista* (L.) Medik. 1789. – *Abutilon neurocarpum* Miq. 1854. – *Gayoides crispum* (L.) Small 1903. – *Pseudobastardia crista* (L.) Hass. 1909 – *Bogenhardia crista* (L.) Kearney, 1954 – *Herisantia crista* (L.) Briz. 1968. – Cối xay tà.

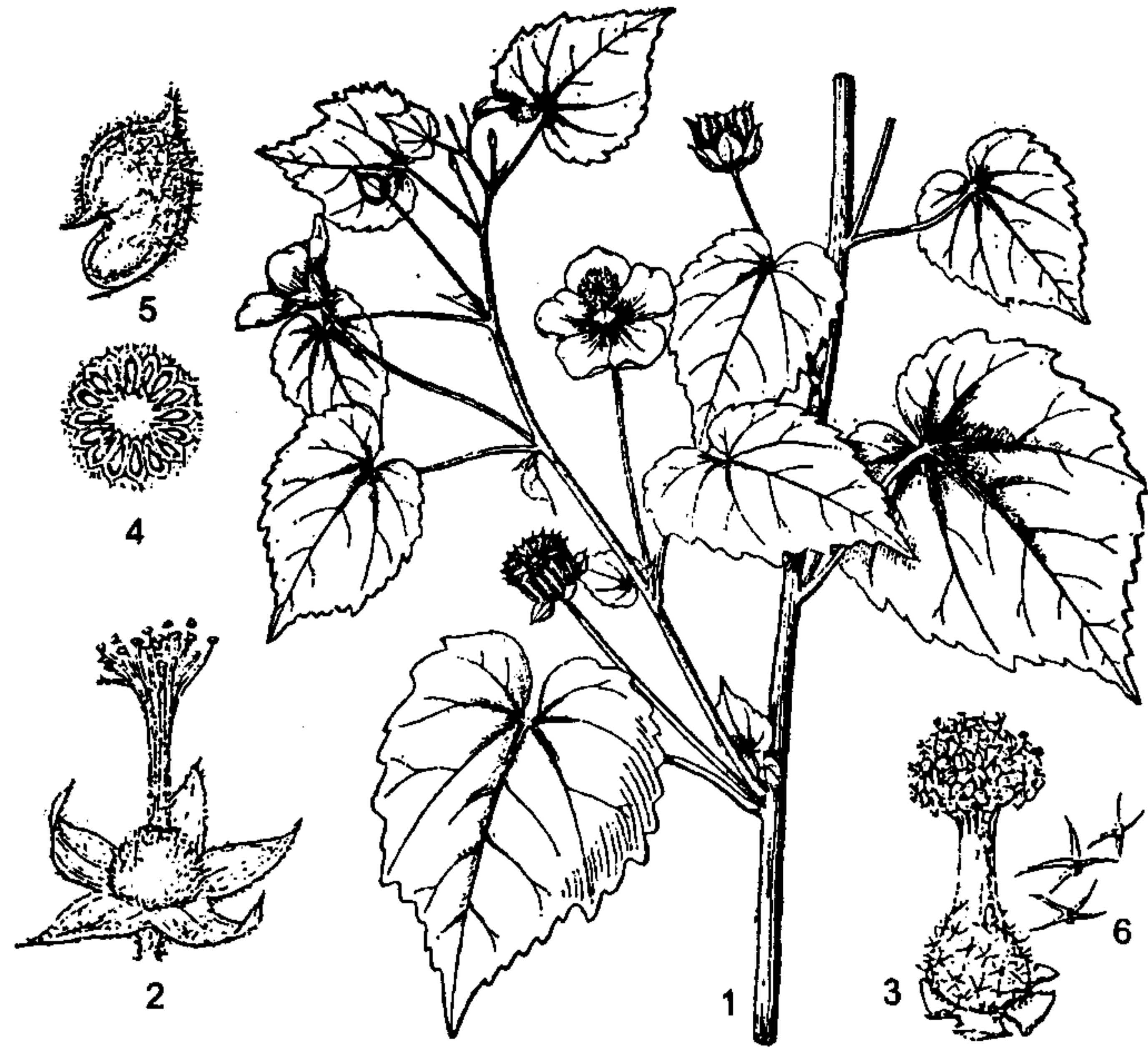
*Đặc điểm hình thái:* Cỏ nằm hay đứng, nhánh có lông tơ dài màu trắng hay lông hình sao màu vàng, gốc thường hoá gỗ. Lá hình tim với chóp nhọn, kích thước 4-6 x 3-5 cm, mép có răng tròn, phiến xanh dợt vì có nhiều lông mềm trắng bao phủ; những lá phía trên có cuống ngắn, những lá phía dưới có cuống dài 0,2-5 cm, có lông hình sao dày; lá kèm hình chỉ, cao 0,5 cm, có lông. Hoa mọc đơn độc ở kẽ lá, màu vàng, đường kính 1-1,2 cm, có cuống mảnh như sợi, có lông, có khuỷu ở

1/2 phía trên, dài 2-4 cm; đài hình ống, cao 0,4-0,5 cm, 5 thùy hình trứng, chóp nhọn, có lông tơ và lông dạng sao bao phủ; cánh tràng hình trứng hay trứng ngược; nhị nhiều, chỉ nhị dính thành cột; bầu hình cầu, 8-15 ô, mỗi ô 2-3 noãn. Quả nang, hình

cầu cụt đầu, đường kính 1-1,5 cm phình lên thành dạng đèn lồng, có lông, khi chín mở ở lưng, mảnh vỏ quả rụng để lại đế hoa dài 0,2cm, vỏ quả mỏng, mảnh quả không có mủ; hạt hình thận, dài 1,5 mm, màu đen, có lông rải rác (hình 1).



**Hình 1. *Abutilon crispum* (L.) Sweet**  
1. Cành mang hoa; 2. Hoa; 3. Đài mở; 4. Hạt  
(Hình theo FRPS, 1984)



**Hình 2. *Abutilon indicum* (L.) Sweet**  
1. Cành mang hoa; 2. Hoa tách tràng và nhị; 3. Cột nhị nhụy;  
4. Bầu cắt ngang; 5. Phân quả; 6. Lông hình sao  
(1: hình theo ICS, 1972; 2, 3, 4, 5, 6: hình theo FRPS, 1984)

**Sinh học và sinh thái:** Mọc rải rác ở ven rừng, bãi hoang, độ cao dưới 600 m. Ra hoa tháng 3-7, có quả tháng 7-10. Cây tái sinh bằng hạt.

**Phân bố:** Đà Nẵng (Tourane), Khánh Hòa, Ninh Thuận (Phan Rang). Còn có ở Ấn Độ, Trung Quốc (Hải Nam), Đài Loan, các nước nhiệt đới châu Á, châu Phi, châu Mỹ, châu Úc.

**2. *Abutilon indicum* (L.) Sweet, 1826.** - *Sida indica* L. 1756. - *Sida populifolia* Lamk. 1783 - *Abutilon populifolium* G. Don 1831. - *Abutilon indicum* var. *populifolium* (Lamk.) W. & Arn. 1834. - *Abutilon cysticarpum* Hance ex Walp. 1851 - *Abutilon cavaleriei* Lévl. 1913 - **Cối xay**, tên khác là giềng xay, dăng xay, nhĩ hường, ma mãnh, quỳnh ma, kim hoa thảo, ma bản thảo, co tó ép (Thái), phao tôn (Tày), mắc tu mong (Cao Lan), dok toc lai (Campuchia), houk phao ton (Lào), country mallow (Anh).

**Đặc điểm hình thái:** Cây nửa bụi, cao 1-3m, phân nhánh nhiều, toàn thân phủ lông mềm màu xám trắng hay lông hình sao màu vàng. Lá hình tim hay gần tròn, có khía răng, kích thước không đều nhau, có lông hình sao ngắn ở mặt trên, lông trắng phớt ở mặt dưới, cuống bằng hay dài hơn phiến lá, có lông. Lá kèm hình chỉ hay hình mũi nhọn, dài 4-5mm. Hoa đơn độc ở kẽ lá, màu vàng, đường kính 1,5-2 cm; cuống hoa dài có đốt tạo thành, khuỷu ở 1/2 phía trên, có lông; đài hình chuông, ít khi hình ống, cao 0,6-1 cm, 5 thùy hình trứng với chóp nhọn nhưng ngắn, có lông ở 2 mặt; cánh hoa 5, hình tam giác hay trứng ngược; nhị nhiều, chỉ nhị dính nhau thành cột dài; bầu hình cầu bị nén, có lông, gồm 15-20 ô hợp thành, mỗi ô chứa 2 đến nhiều noãn, núm nhụy dày lên dạng đầu. Quả nang hình giống cối xay, đường kính 1,5-2 cm, màu đen, có nhiều lông, khi chín tách thành nhiều mảnh quả, mỗi mảnh quả có một mỏ nhọn hơi cong; hạt hình

thận, dài 2-3 mm, màu đen, nhẵn hay ít khi có lông (hình 2).

*Sinh học và sinh thái:* Mọc rải rác ở ven rừng, bãi hoang, bờ đê, thường ở độ cao dưới 400 m. Mùa hoa quả 6-12. Tái sinh bằng hạt vào đầu mùa mưa.

*Phân bố:* Khá phổ biến ở Việt Nam. Còn có ở Ấn Độ, Trung Quốc (Vân Nam, Hải Nam,...), Đài Loan, Srilanka, các nước Đông nam Á.

*Công dụng:* Cây được dùng trị sổ mũi, đau đầu, ù hay điếc tai, vàng da, hậu sản, phong thấp tê bại, đau nhức gân xương, ngã ứ huyết, viêm gan cấp, viêm ruột, li, viêm amydal, viêm hầu, viêm khí quản, viêm phổi, viêm ruột cấp, nhiễm trùng đường

niệu, kinh nguyệt khó khăn, vô kinh, táo bón. Vỏ cây lợi tiểu, lá hoạt nhuận, trị đi tiểu nước đái đỏ, đấp nhọt, hạt xỏ. Ngoài ra, vỏ còn dùng bện thùng, đan túi, làm giấy hay làm bông nhân tạo [1, 2, 3, 4, 8, 9, 10].

Như vậy, trong 2 loài thuộc chi *Abutilon* chỉ có loài *Abutilon indicum* được ghi nhận làm thuốc. Cho đến nay, chưa có công trình nghiên cứu nào đề cập đến thành phần hoá học của loài *Abutilon crispum*. Theo nhiều tác giả, các loài thực vật trong cùng một chi thường có thành phần hoá học ít nhiều giống nhau. Liệu *Abutilon crispum* có thể được dùng làm thuốc không? Đó là một vấn đề cần sớm được nghiên cứu.

#### Một số đặc điểm nhận dạng nhanh 2 loài:

Tên bộ phận	Đặc điểm	
	<i>Abutilon crispum</i>	<i>Abutilon indicum</i>
Thân	Cỏ mảnh, thường nằm, ít khi đứng	Nửa bụi, đứng
Cuống lá	Lá phía trên gần như không có cuống.	Lá phía trên có cuống dài
Bầu	8 - 15 ô	15 - 20 ô
Quả	Mảnh quả không có mỏ	Mảnh quả có mỏ nhọn hơi cong
Phân bố	Đà Nẵng, Khánh Hoà, Ninh Thuận	Phổ biến khắp Việt Nam

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Võ Văn Chi. 1997. Từ điển cây thuốc Việt Nam, tr: 309. NXB Y học T.p. Hồ Chí Minh; 2). Lê Khả Kế và cs. 1971, Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam, 2: 323. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội; 3). Phạm Hoàng Hộ. 1991. Cây cỏ Việt Nam, 1: 656-657. NXB Mekong, Santa Ana/Montreal; 4). Đỗ Tất Lợi, 1995. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, tr: 755. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội; 5). Auct. 1972. Iconographia Cormophytorum Sinicorum, 2: 811. Pekin; 6). Feng K. M. 1984. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, 49(2): 30-37. Pekin (in Chinese); 7). Gagnepain in H'Leconte. 1910. Flore générale de L'Indo-chine, 1: 438-443. Paris; 8). Gagnepain, 1945. Supplément flore générale de L'Indo-chine, 1: 365-367. Paris; 9). Nguyen Van Duong, 1993. Medicinal plants of Vietnam, Cambodia and Laos, tr. 239. Mekong Printing; 10). J. L. C. H. van Valkenburg and N. Bunyapraphatsara, 2001. Plant Resources of South-East Asia, 12(2): 29-31. Leiden; 11). Walker J. V. B. 1966-1967. Malesian Malvaceae revised. Blumea, 14: 160-176. Leyden, Holland.

*Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 2/2004 (trang 39-42)*

### NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA CÂY *SAMBUCUS NIGRA* SSP. *CANADENSIS* (L.) R. BOLLI (HỌ CỎM CHÁY - *SAMBUCACEAE*)

*Nguyễn Thu Hằng<sup>1</sup>, Phạm Thanh Kỳ<sup>1</sup>, Chu Đình Kính<sup>2</sup>*

*1 : Bộ môn Dược liệu - Đại học Dược Hà nội*

*2 : Viện Hoá học - TT KHTN & CNQG*

(Nhận bài ngày 7 tháng 1 năm 2004)

#### Summary

#### Studies on Chemical Composition of *Sambucus nigra* ssp. *canadensis*

*Flowers of Sambucus nigra ssp. canadensis (L.) R. Bolli were qualitatively determined to contain flavonoids, amino acids, organic acids and sugars, flavonoids being the main component accounting*

for  $7,19 \pm 0,10$  %. From the total flavonoid extract, two compounds were isolated by column chromatography and identified as quercetin-3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranose and quercetin on basis of UV, MS and NMR spectroscopic data.

**Key words:** *Sambucus*, *Sambucus nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli, Quercetin, Quercetin 3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranose, Flavonoids.

## 1. Đặt vấn đề

*Sambucus nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli thuộc họ Côm cháy (*Sambucaceae*) là một trong hai taxon thuộc chi *Sambucus* L. ở Việt Nam [2, 3, 4], được nhân dân dùng nhiều để chữa mụn nhọt, lở loét, vết thương... Cho đến nay, ở nước ta chưa thấy có công trình nào nghiên cứu về thành phần hoá học của cây này. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học của hoa cây *Sambucus nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli thu hái ở Sa Pa.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Hoa *Sambucus nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli thu hái ở Sa Pa (Lào Cai), tháng 9/2002.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Định tính các nhóm chất theo phương pháp ghi trong tài liệu thực tập Dược liệu của Bộ môn Dược liệu - Trường đại học Dược Hà Nội.
- Định lượng flavonoid bằng phương pháp cân.
- Sắc ký lớp mỏng dùng bản mỏng tráng sẵn silica gel GF<sub>254</sub> của MERCK (Đức).
- Sắc ký cột dùng chất nhồi là Sephadex LH - 20.
- Đo phổ tử ngoại trên máy UV-VIS Spectrophotometer Cary IE- Varian (Australia) tại Phòng thí nghiệm trung tâm - Trường đại học Dược Hà Nội.
- Đo phổ khối trên máy 5989-MS tại Phòng Cấu trúc - Viện Hoá học - TTKHTN & CNQG.
- Đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân trên máy NMR-Bruker 500 MHz tại Phòng Cộng hưởng từ hạt nhân - Viện Hoá học - TTKHTN & CNQG.
- Số liệu cộng hưởng từ hạt nhân thực nghiệm đã được kiểm tra, so sánh với số liệu lấy từ phổ mô phỏng dựa vào phần mềm mô phỏng ACD/NMR Viewer ( V. 5.12 và phần mềm ACD/IUPAC Name (V. 7.06).

## 3. Kết quả thực nghiệm

### 3.1. Định tính

Chúng tôi đã tiến hành định tính hoa cây *S.*

*nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli bằng các phản ứng hoá học. Kết quả cho thấy thành phần của hoa gồm các nhóm chất như flavonoid, đường khử, acid hữu cơ và acid amin.

- Định tính flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng: Flavonoid toàn phần của hoa được hòa tan trong ethyl acetat rồi tiến hành sắc ký lớp mỏng với chất hấp phụ là silica gel GF 254 (MERCK). Dung môi khai triển :

Hệ 1: Ethyl acetat : Methanol : Nước (100: 17: 13).

Hệ 2: Ethyl acetat : Toluene : Nước ( 2 : 1 : 1 ).

Hệ 3: Ethyl acetat : Methanol ( 4 : 1 ).

Thuốc thử hiện màu: AlCl<sub>3</sub> 5% trong cồn tuyệt đối. Quan sát màu dưới ánh sáng tử ngoại 366nm.

Kết quả cho thấy cả 3 hệ dung môi đều tách tốt với hệ 1 và hệ 3 cho 11 vết, hệ 2 cho 12 vết. Các vết đều có màu vàng với cường độ màu đậm nhạt khác nhau. Trên sắc ký đồ ở cả ba hệ, thấy vết số 11 và số 9 có màu vàng đậm nhất.

### 3.2. Định lượng flavonoid

Tiến hành định lượng flavonoid trong hoa bằng phương pháp cân. Kết quả cho thấy hàm lượng này là  $7,19 \pm 0,10\%$ .

### 3.3. Chiết xuất và phân lập

Từ hoa *S. nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli sau khi chiết được flavonoid toàn phần, chúng tôi đã tiến hành phân lập chất này bằng phương pháp sắc ký lọc gel với chất nhồi cột là Sephadex LH 20, dung môi rửa giải là methanol 80%. Kết quả đã thu được hai chất ký hiệu là KH<sub>2</sub> và KH<sub>3</sub>.

### 3.4. Nhận dạng các chất KH<sub>2</sub> và KH<sub>3</sub>

#### a/ Chất KH<sub>2</sub>

- Thể chất : KH<sub>2</sub> là các tinh thể hình kim, màu vàng đậm, không mùi, không vị.
- Độ tan: Tan tốt trong ethanol, methanol, ethyl acetat. Ít tan trong nước. Không tan trong ether, chloroform.
- Phổ UV đo trong methanol cho đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\lambda = 257,1\text{nm}$  và  $\lambda = 373,5\text{nm}$  đặc trưng cho

cấu trúc flavonol.

- Phổ MS có pic ion phân tử  $[M]^+ = 302$  amu. Đối chiếu với thư viện phổ cho thấy phân cơ bản của  $KH_2$  là khung quercetin với độ chính xác là 95%. Như vậy,  $KH_2$  là dẫn chất của quercetin.

- Từ phổ  $^{13}C$ -NMR,  $^1H$ -NMR và DEPT cho thấy trong cấu trúc phân tử  $KH_2$  có 27 carbon, trong đó có 1 nhóm  $CH_3$ , 1 nhóm  $CH_2$ , 15 nhóm CH và 10 carbon bậc 4. Như vậy, phân tử  $KH_2$  có công thức cộng là  $C_{27}H_{30}O_{16}$ . Số liệu phổ được ghi ở bảng 1.

**Bảng 1.** Bảng số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân ( $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR) của  $KH_2$

TT	Ký hiệu	$^{13}C$ -NMR $\delta$ ppm	$^1H$ -NMR $\delta$ ppm, J(Hz)	TT	Ký hiệu	$^{13}C$ -NMR $\delta$ ppm	$^1H$ -NMR $\delta$ ppm, J(Hz)
1	$CH_3(6'')$	17.880	1.143d J=6Hz	15	C(10)	106.666	-
2	$CH_2(6''')$	68.567	3.825d J=11,5Hz	16	CH(5')	116.076	6.899d J=8,5Hz
3	CH(4''')	69.723	$\approx 3,4$ (không phân giải)	17	CH(2')	117.701	7.689d J=2Hz
4	CH(5'')	71.423	$\approx 3,2$ (không phân giải)	18	C(1')	123.159	-
5	CH(3'')	72.122	3.557dd $J_1=7$ $J_2=3,5$ Hz	19	CH(6')	123.559	7.654dd $J_1=8,5$ $J_2=2$ Hz
6	CH(2'')	72.264	3.650dd $J_1=1,5$ $J_2=3,5$ Hz	20	C(3)	135.367	-
7	CH(2''')	73.954	$\approx 3,2$ (không phân giải)	21	C(3')	145.871	-
8	CH(5''')	75.742	$\approx 3,5$ (không phân giải)	22	C(4')	149.824	-
9	CH(3''')	77.258	$\approx 3,3$ (không phân giải)	23	C(2)	158.552	-
10	CH(4'')	78.213	$\approx 3,4$ (không phân giải)	24	C(9)	159.363	-
11	CH(8)	94.870	6.429d J= 2Hz	25	C(5)	163.026	-
12	CH(6)	99.961	6.239d J= 2Hz	26	C(7)	166.051	-
13	CH(1''')	102.435	4.568d J= 7Hz	27	=C=O(4)	179.462	-
14	CH(1'')	104.707	5.133d J= 7,5Hz				

Từ các dữ liệu phổ đã cho phép xác định  $KH_2$  là quercetin 3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranose có cấu trúc phân tử như hình 1.

Để kiểm tra cấu trúc phân tử  $KH_2$  theo kết quả phân tích phổ thực nghiệm đưa ra ở bảng 1, chúng tôi đã sử dụng phần mềm chương trình ACD/NMR VIEWER (V. 5. 12) để vẽ phổ mô phỏng. Kết quả cho thấy các số liệu phổ mô phỏng phù hợp với các số liệu của phổ thực nghiệm.

Kết luận: Căn cứ vào các số liệu phổ UV, MS,  $^{13}C$ -NMR,  $^1H$ -NMR và DEPT chúng tôi nhận dạng chất  $KH_2$  là quercetin 3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranose.

b/ Chất  $KH_3$

- Thể chất:  $KH_3$  là bột màu vàng, không mùi, không vị.

- Độ tan: Tan tốt trong ethanol và methanol nóng. Ít tan trong nước, ether, chloroform.

- Phổ UV: Phổ UV đo trong methanol cho đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\lambda = 258,3$ nm và  $\lambda = 368,8$ nm đặc trưng cho cấu trúc flavonol.

- Phổ MS,  $KH_3$  cho pic cơ bản có số khối  $m/z = 302$  amu. Đây cũng chính là cụm pic phân tử với tập hợp pic đồng vị  $M^+ = 302$  amu (100%),  $(M+1)^+ = 303$  amu (16,7%),  $(M+2)^+ = 304$  amu (2,7%) ứng với công thức cộng  $C_{15}H_{10}O_7$ .

- Từ phổ  $^{13}C$ -NMR,  $^1H$ -NMR và DEPT cho thấy trong cấu trúc phân tử  $KH_3$  có 15 carbon, trong đó có 5 nhóm -CH và 10 carbon bậc 4. Số liệu phổ được ghi ở bảng 2.

**Bảng 2.** Bảng số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) của  $\text{KH}_3$

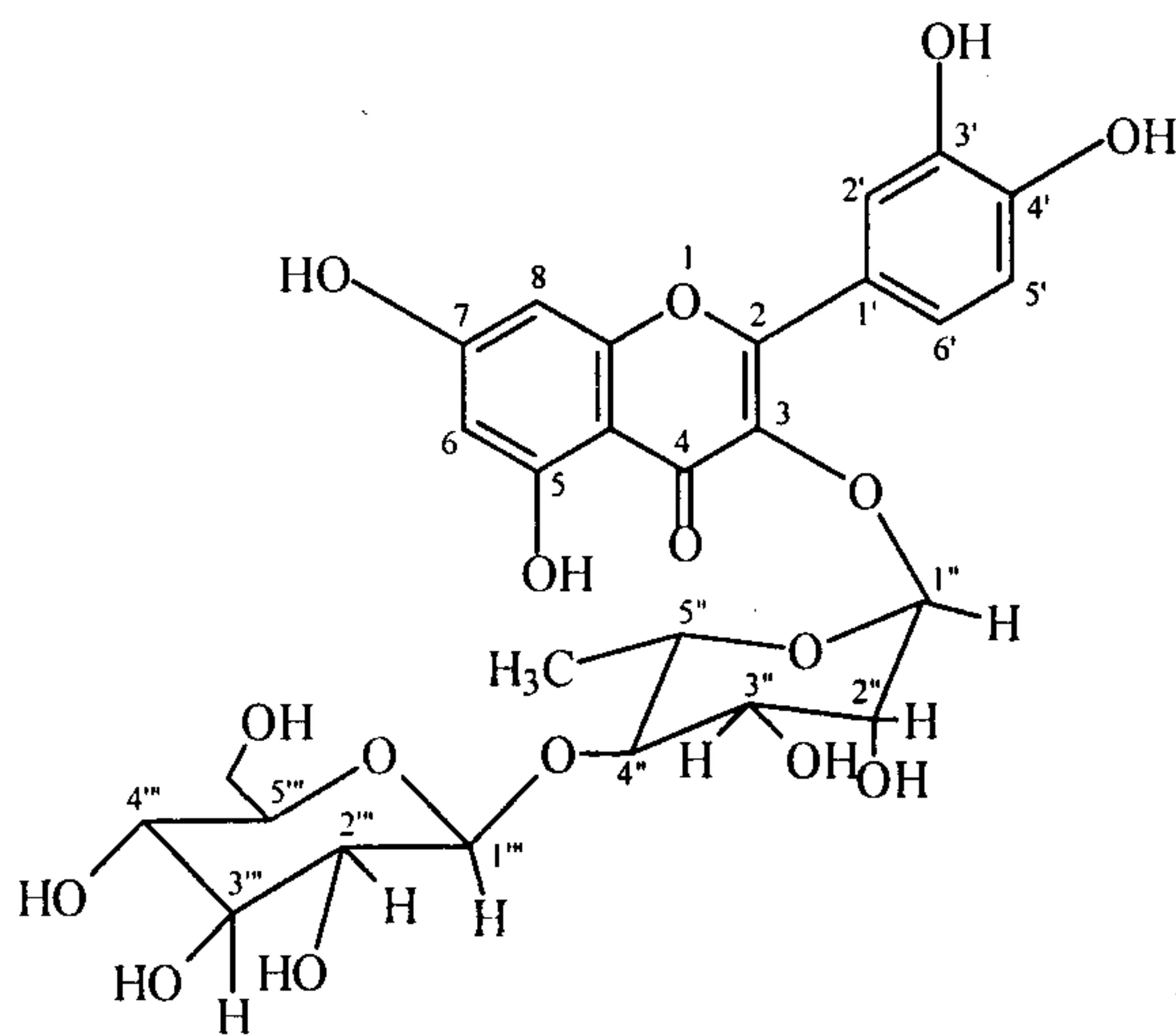
TT	Ký hiệu	$^{13}\text{C-NMR}$ $\delta\text{ppm}$	$^1\text{H-NMR}$ $\delta\text{ppm, J(Hz)}$	TT	Ký hiệu	$^{13}\text{C-NMR}$ $\delta\text{ppm}$	$^1\text{H-NMR}$ $\delta\text{ppm, J(Hz)}$
1	CH(8)	94.479	6.422 d $J=1,5\text{Hz}$	9	C(3')	146.158	
2	CH(6)	99.303	6.213 d $J=1,5\text{Hz}$	10	C(4')	148.113	
3	C(10)	104.505		11	C(2)	148.722	
4	CH(2')	116.016	7.751 d $J_2=1,5\text{Hz}$	12	C(9)	158.162	
5	CH(5')	116.278	6.916 d $J_1=8,5\text{Hz}$	13	C(5)	162.396	
6	CH(6')	121.719	7.653dd $J_1=8,5\text{Hz}, J_2=1,5\text{Hz}$	14	C(7)	165.499	
7	C(1')	124.112		15	C(4)	177.344	
8	C(3)	137.176					

Từ các dữ liệu phổ đã cho phép xác định  $\text{KH}_3$  là quercetin có cấu trúc phân tử như hình 2. Để kiểm tra kết quả phân tích phổ thực nghiệm, cấu trúc phân tử dự kiến đã được đưa vào phần mềm chương trình ACD/NMR VIEWER (V. 5. 12) để vẽ phổ mô phỏng. So sánh số liệu phổ NMR thực nghiệm với phổ mô phỏng thấy có sự phù hợp tốt.

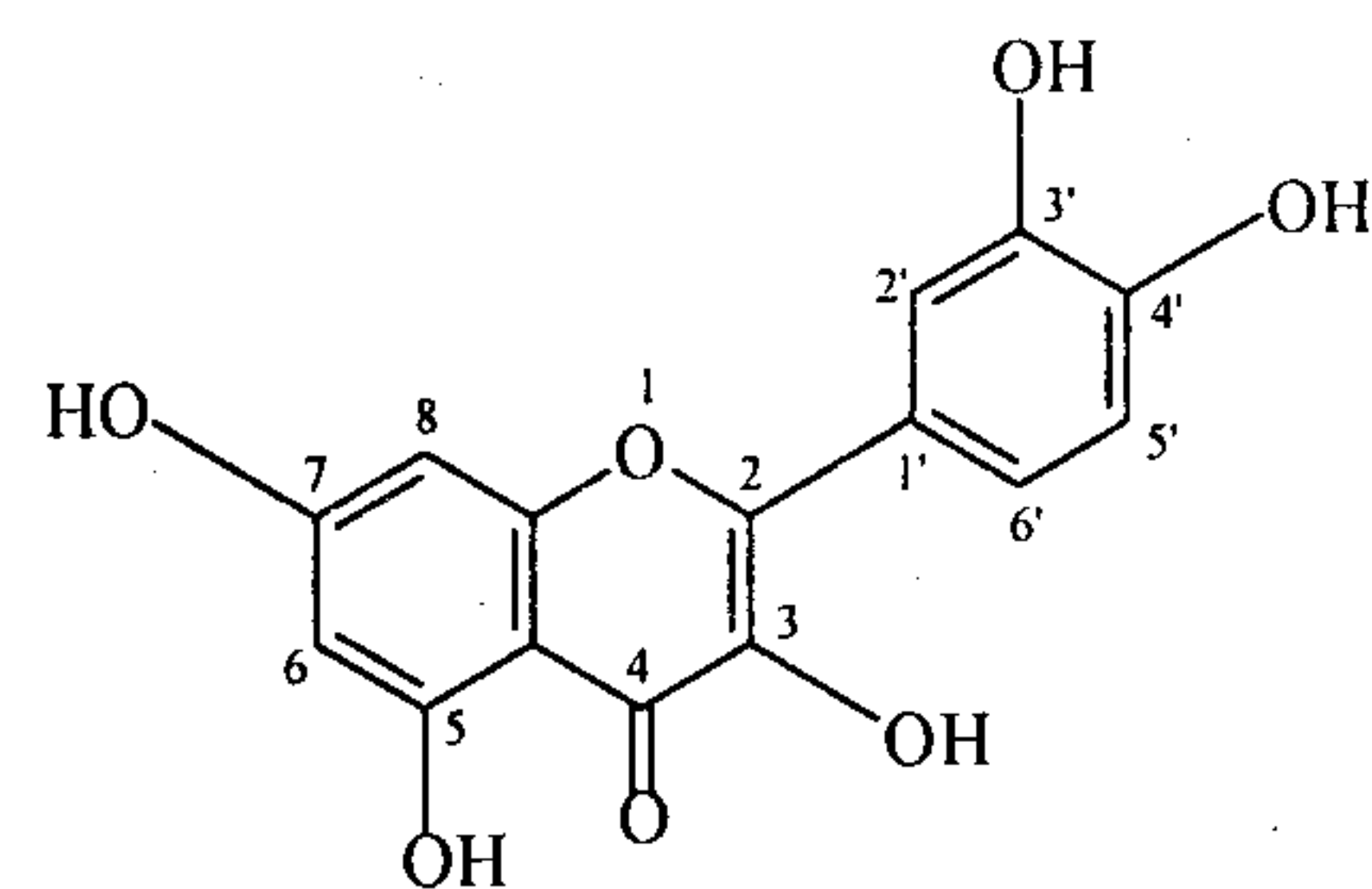
Kết luận: Căn cứ vào các số liệu phổ UV, MS,  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  và DEPT, chúng tôi nhận dạng chất  $\text{KH}_3$  là quercetin.

#### 4. Kết luận chung

Từ hoa *S. nigra* ssp. *canadensis* (L.) R. Bolli, đã xác định có flavonoid, acid hữu cơ, acid amin và đường khử. Trong đó, flavonoid là thành phần chính có hàm lượng  $7,19 \pm 0,10\%$ . Từ dịch chiết flavonoid toàn phần, đã phân lập được hai flavonoid là  $\text{KH}_2$  và  $\text{KH}_3$ . Căn cứ vào các số liệu phổ UV, MS,  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  và DEPT, đã nhận dạng được  $\text{KH}_2$  là quercetin-3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranose và  $\text{KH}_3$  là quercetin.



**Hình 1.** Quercetin - 3- $\alpha$ -rhamnopyranosyl - $\beta$ -glucopyranose ( $\text{KH}_2$ )



**Hình 2.** Quercetin ( $\text{KH}_3$ )

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Harbone J.B. (1992), *The Flavonoid : Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, p. 1 - 638;
- 2). Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt nam*, NXB trẻ, Hà nội, tr. 274-275; 3). Lecomte H. (1922-1933), *Flore générale de l'Indochine*, vol. III, p. 1; 4). Richard Bolli (1994), *Revision of the genus Sambucus*, Dissertationes Botanicae, Berlin, p. 1-227; 5). Bộ môn Dược liệu, Thực tập dược liệu (Phần hoá học).

## KẾT QUẢ BAN ĐẦU VỀ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC QUẢ CHUỐI HỘT CỦA VIỆT NAM

Trần Văn Sung, Trương Bích Ngân, Trịnh Thị Thuý

Viện Hoá Học, Trung tâm KHTN & CNQG

(Nhận bài ngày 23 tháng 9 năm 2003)

### Summary

#### Preliminary Results of Chemical Studies on *Musa balbisiana* Colla. Fruits

*Stigmasterol and 3-oxo-29-norcycloartane (cyclomusalenone) have been isolated from the dichloromethane extract of the fruit of Musa balbisiana Colla. collected in Vietnam. The structures of the isolated compounds were determined by spectroscopic methods including 2D-NMR technique.*

*Key words: Musa balbisiana; Musaceae; Triterpene; Norcycloartane; Cyclomusalenone*

### I. Mở đầu

Cây chuối hột hay chuối chát (*Musa balbisiana* Colla.; *M. brachycarpa* Back.), thuộc họ Chuối (Musaceae), mọc phổ biến ở Việt Nam, Lào, Campuchia, Malaixia, Trung Quốc và Ấn Độ. Theo kinh nghiệm dân gian, quả chuối hột có công dụng trị bệnh đường ruột, sỏi đường tiết niệu và đặc biệt là bệnh tiểu đường...[1]. Đến nay trên thế giới, mới chỉ có một công bố về thành phần hoá học của cây chuối hột mọc ở Ấn Độ. Ở Việt Nam, chưa có tài liệu nào nghiên cứu về cây này. Tiến hành nghiên cứu quả chuối hột thu hái ở Nam Định, chúng tôi đã phân lập và xác định được cấu trúc của một triterpen có cấu trúc 3-oxo-29-norcycloartan là cyclomusalenon [(24S)-24-methyl-29-norcycloart-25-en-3-on] và stigmasterol. Cấu trúc hoá học của hai chất này được xác định bằng cách kết hợp các phương pháp phổ như phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR một chiều và hai chiều (1D- và 2D NMR).

### II. Kết quả và thảo luận

Phổ hồng ngoại (FT-IR) của chất 1 có hấp thụ đặc trưng của ceton vòng 6 ở  $1710,6\text{ cm}^{-1}$ . Cực đại hấp thụ mạnh ở  $884,4\text{ cm}^{-1}$  gợi ý cho thấy trong phân tử có vòng cyclopropan. Một số đỉnh ở 2923, 1452 và  $1377\text{ cm}^{-1}$  cho phân tử có nhiều nhóm  $\text{CH}_2$

và  $\text{CH}_3$ . Phổ khối va chạm electron (EI-MS) của chất 1 có pic ion phân tử ở  $m/z$  424  $[\text{M}]^+$  (41) và có sự cắt mảnh lần lượt ở mạch nhánh rất rõ (hình 1), được thể hiện qua một số pic quan trọng như  $m/z$  409  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$  (17), 381  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$  (4), 354  $[\text{M}-\text{CH}_2(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2]^+$  (5), 341  $[\text{M}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)]^+$  (5), 328  $[\text{M}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)]^+$  (11), 299  $[\text{M}-\text{mạch nhánh}]^+$  (36), 257  $[\text{M}-42-\text{vòng D}-\text{mạch nhánh}]^+$  (4), 243  $[\text{M}-42-\text{CH}_2]^+$  (10), 95  $[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2]^+$  (87), 69  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2]^+$  (73), 55 (100). Qua phân tích phổ khối, cho thấy sự cắt mảnh ở mạch nhánh của chất 1 hoàn toàn phù hợp với cyclomusalenon [2, 3]. Kết luận này được khẳng định thêm qua phổ  $^1\text{H}$ -NMR: singulet ở vùng trường thấp đặc trưng cho proton olefinic  $\delta$  4,67 (s,  $\text{H}_2$ -27), doublet của nhóm methyl ở  $\delta$  0,87 (d, 6,4Hz,  $\text{H}_3$ -21), 0,99 (d,  $J=6,7\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_3$ -30) và 1,64 (s,  $\text{H}_3$ -26). Cặp doublet ở vùng trường cao  $\delta$  0,39 (1H, d,  $J=4,1\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_\alpha$ -19) và  $\delta$  0,62 (1H, d,  $J=3,8\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_\beta$ -19), đặc trưng cho sự có mặt của hai proton không tương đương của vòng cyclopropan.

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT cho thấy chất 1 có 30 nguyên tử carbon, trong đó có 6 nhóm methyl, 12 nhóm methylen ( $\text{CH}_2$ ) [có 1 nhóm  $\text{CH}_2$  cạnh nối đôi ( $=\text{CH}_2$ )], 6 nhóm methyn ( $\text{CH}$ ) và 6 carbon bậc 4 (Cq).

Bảng 1. Số liệu phổ NMR của chất 1 và 2 [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)]

Vị trí	1		2
	$\delta\text{H}$ [500 MHz, J (Hz)]	$\delta\text{C}$ (125MHz)	$\delta\text{C}$ (125MHz)
1	1,56	32,87	37,29
2	2,43	40,97	31,69
3		213,28	71,83

4	2,26	50,01	42,33
5	1,58	46,07	140,79
6	1,37 ( $\alpha$ ), 1,19 ( $\beta$ )	25,91	121,73
7	1,12 m ( $\alpha$ ), 1,30 ( $\beta$ )	25,21	31,93
8	1,61	47,09	31,89
9		24,98	50,17
10		29,30	36,53
11	2,06 ( $\alpha$ ), 1,17 ( $\beta$ )	26,96	21,10
12	1,65 (2H)	32,86	39,8
13		45,35	42,24
14		48,80	56,89
15	1,30, 2H, d (2,8)	35,43	24,38
16	1,91 ( $\alpha$ ), 1,31 ( $\beta$ )	28,06	28,92
17	1,57	52,23	55,99
18	1,00 s	17,90	12,07
19 $\alpha$	0,39 d (3,8)	26,95	19,41
$\beta$	0,62 d (3,8)		
20	1,35	36,02	40,49
21	0,87 d (6,4)	18,35	21,23
22	0,94 ( $\alpha$ ), 1,34 ( $\beta$ )	33,93	138,32
23	1,19 ( $\alpha$ ), 1,43 ( $\beta$ )	31,51	129,31
24	2,10 m	41,62	51,26
25		150,16	31,69
26	1,64 s	18,66	19,06
27	4,67, 2H, br t (1,4)	109,39	21,09
28	1,00 d (6,6)	20,17	25,41
29	1,25 s	10,76	12,25
30	0,99 d (6,7)	19,17	

Phổ hai chiều HMQC có tương tác ( $\delta_C$  26,9/ $\delta_H$  0,39; 0,62) của hai proton gắn với C-19. Phổ này cũng thấy rõ tương tác của  $\delta_C$ 109,39/ $\delta_H$  4,67, chứng tỏ nhóm methylen cạnh nối đôi phải nằm ở cuối mạch nhánh (=CH<sub>2</sub>). Ngoài ra, phổ HMQC cũng cho thấy rõ các tương tác của các proton và carbon còn lại như  $\delta_H$ 2,43/ $\delta_C$ 40,97 (H-2/C-2),  $\delta_H$ 1,55/ $\delta_C$ 32,87 (H-1/C-1),  $\delta_H$ 2,26/ $\delta_C$ 50,01 (H-4/C-4),  $\delta_H$ 1,57/ $\delta_C$ 46,07 (H-5/C-5). Phổ HMBC có tương tác qua hai hoặc ba liên kết của  $\delta_H$ 1,00/ $\delta_C$  46,07 (H-28/C-5) và tương tự như vậy H-27/C-24; H-18/C-17, C-14; H-21/ C-22; H-30/C-23 và H-5/ C-6. Qua phân tích phổ và so sánh với số liệu đã công bố trong tài liệu [2,3], đã xác định được cấu trúc của chất 1 là cyclomusalenon [(24S)-24-methyl-29-norcycloart-25-en-3-on]. Cyclomusalenon đã được tìm thấy từ loài *Musa sapientum* [2, 3]. Đây là một triterpen năm vòng có chứa vòng cyclopropan có cấu trúc 3-oxo-29-norcycloartan tương đối ít gặp trong tự nhiên. Trong môi trường acid, cyclomusalenon bị epime hoá thành 4-epicyclomusalenon. Về mặt hoá lập thể, 4-epicyclomusalenon (4 $\beta$ -methyl) kém bền vững

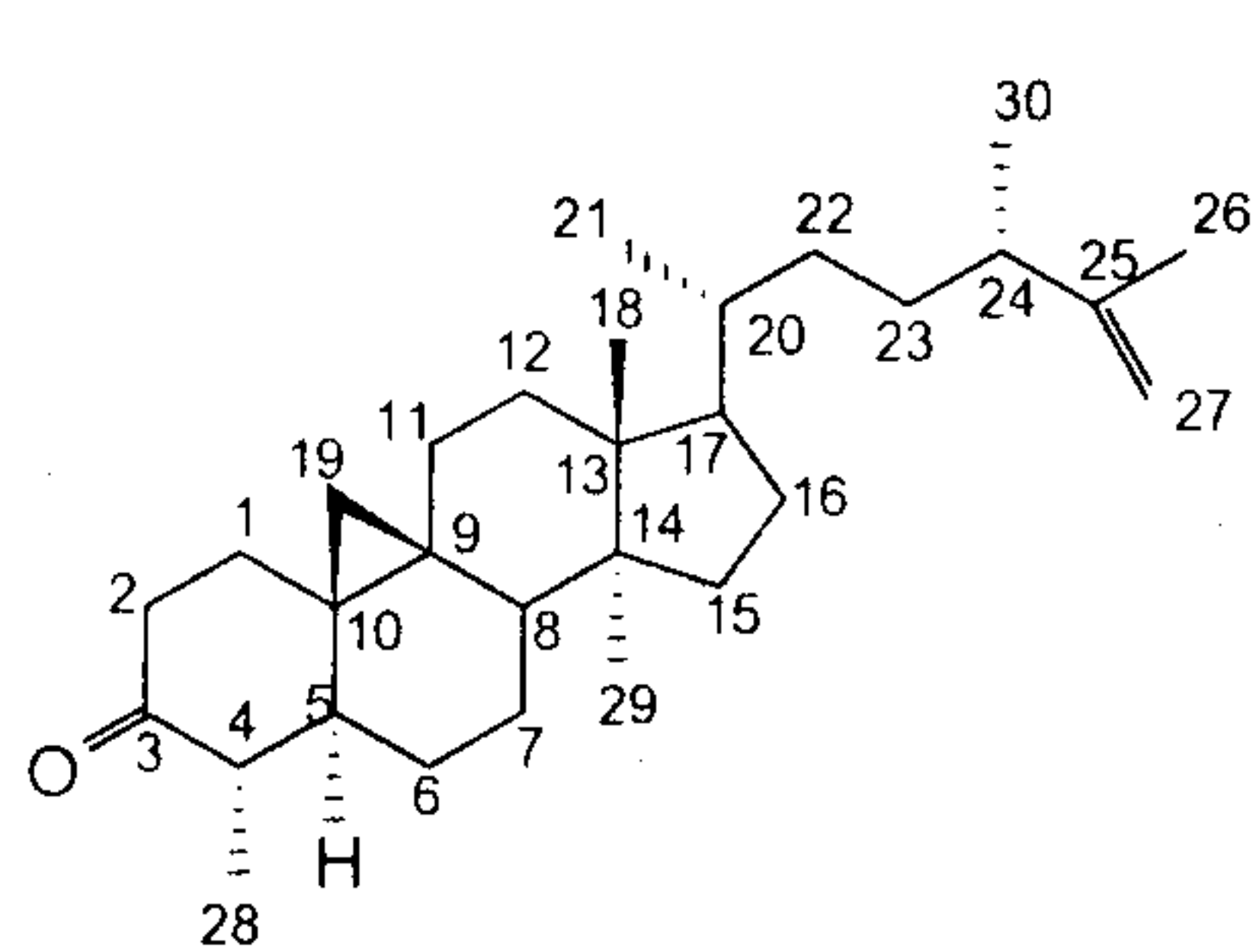
hơn. Người ta cũng đã phân lập được 4-epicyclomusalenon từ vỏ quả chuối *M. sapientum* [2, 3].

Phổ hồng ngoại (FT-IR) của chất 2 có đỉnh rộng từ ở 3430 cm<sup>-1</sup>, đặc trưng cho nhóm OH. Phổ khối và chạm electron (EI-MS) của chất 2 cho pic ion phân tử ở  $m/z$  412 [M]<sup>+</sup> và các pic có cường độ cao ở  $m/z$  369 (10), 351 (20), 271 (51), 255 (66), 213 (41), 173 (24), 159 (63), 133 (56), 91 (62), 55 (100). Sự cắt mảnh trong phổ khối của chất 2 phù hợp với stigmasterol. Điều này được khẳng định thêm qua phổ <sup>13</sup>C-NMR (bảng 1). Qua phân tích phổ và so sánh với số liệu đã công bố trong tài liệu [2, 3], đã xác định được cấu trúc của chất 2 là stigmasterol. Đây là một sterol khá phổ biến trong thiên nhiên.

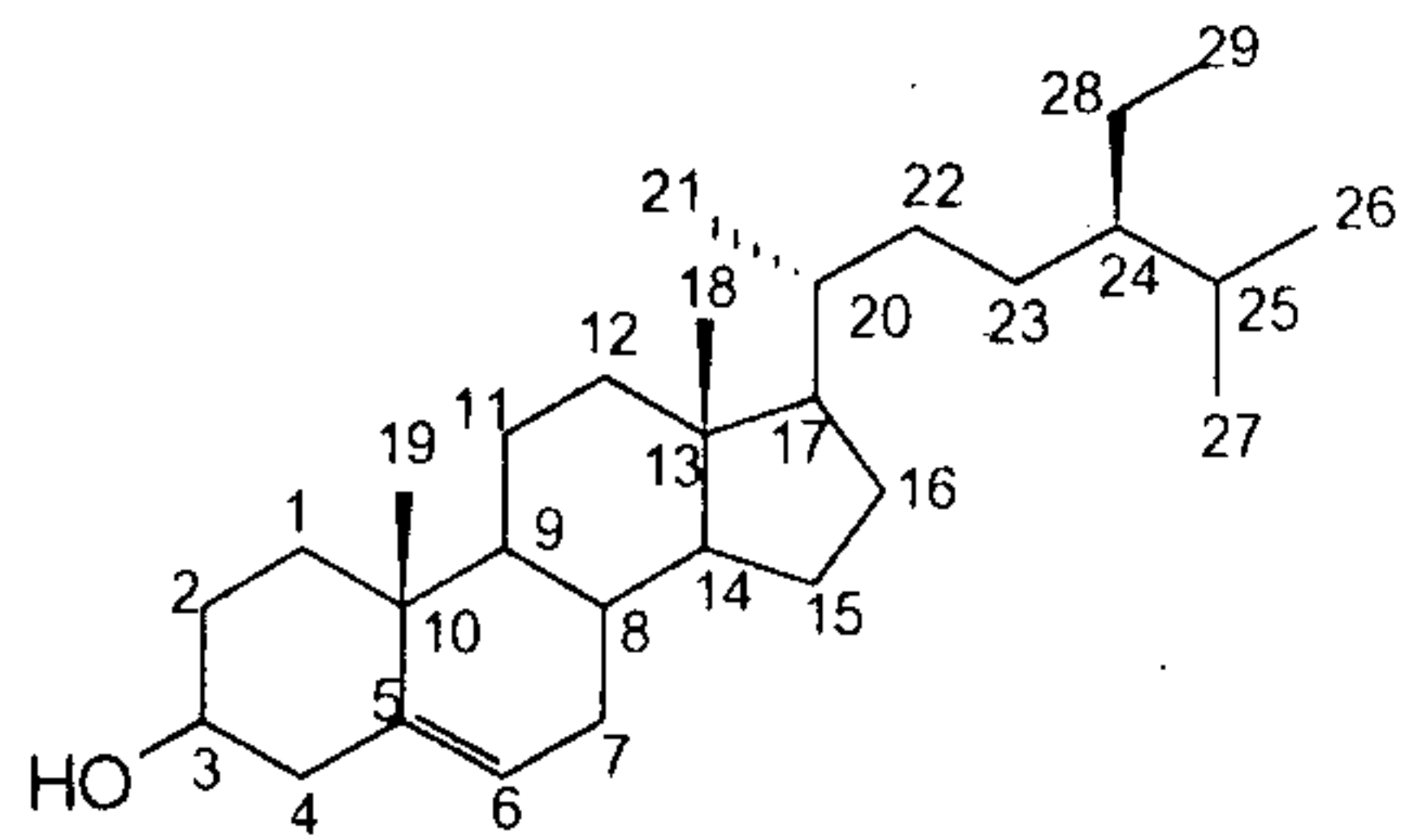
### III. Thực nghiệm

Điểm chảy đo trên máy Boëtius của Đức. Phổ FT-IR được ghi dưới dạng viên nén trong KBr, trên máy IMPACT-410. Phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C-NMR, HMQC, HMBC được ghi trên máy Bruker AVANCE 500 MHz, tetrametylsilan (cho <sup>1</sup>H) hoặc tín hiệu dung môi CDCl<sub>3</sub> (cho <sup>13</sup>C) được dùng làm nội chuẩn.



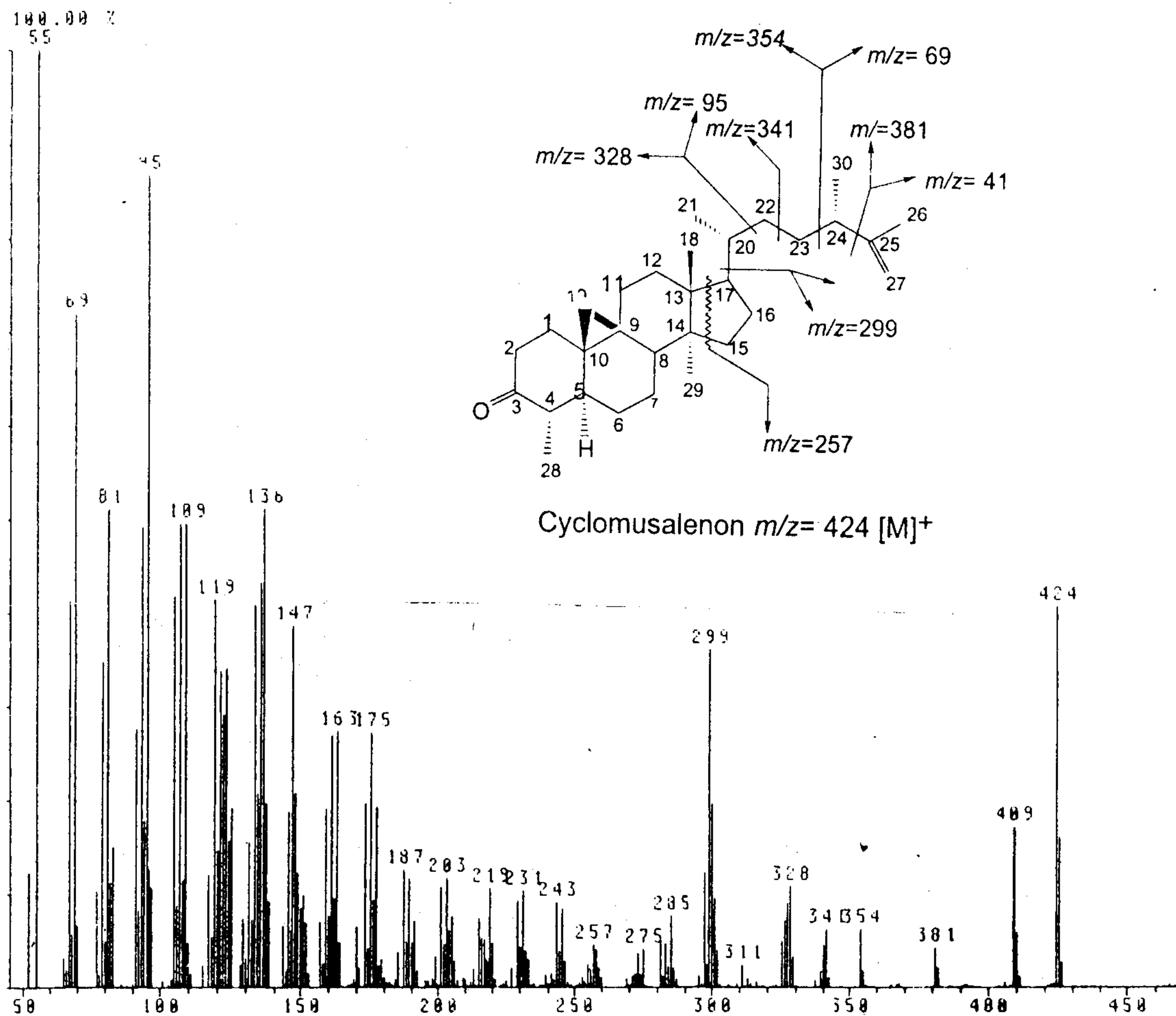


1: Cyclomusalenon



2: Stigmasterol

File : CH-2 Vers. 1 Comment : CH-2 DR. CH. KAMPERDICK  
 of 01, 21.05.1991, 08:39 h Commission: AMD 402 LW: 12 BEARBEITER: LERBS  
 Spectrum 6-10-4-12 subtra... <n> = basepeak <g> = 1.00 <d> = us



Hình 1: Phổ khối và chạm electron (EI-MS) của cyclomusalenon

Phổ khối (EI-MS) ghi trên máy AMD 402 Intecta GmbH, CHLB Đức và máy Hewlett Packard 5989B MS Engine (tại Viện Hoá học).

Sắc ký lớp mỏng silica gel Merck 60 F<sub>254</sub>, hệ dung môi n-hexan/ethyl acetat (90:10) và (75:25). Hiện màu bằng thuốc thử CeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và 2% vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## Xử lý mẫu thực vật và chiết tách

Quả chuối hột mua ở tỉnh Nam Định vào mùa hè năm 2001 được thái nhỏ, hong khô rồi sấy ở nhiệt 45°C đến khối lượng không đổi, sau đó xay nhỏ. Mẫu bột của quả (780 g) được chiết bằng siêu âm ở nhiệt độ phòng lần lượt với n-hexan, dichlometan và methanol. Loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 11, 10 và 60g cặn các dịch chiết tương ứng. Chạy sắc ký cột cặn dịch chiết dichlorometan trên silica gel Merck 60 cỡ hạt 0,063-0,2 mm, dung môi rửa giải là n-hexan/ethyl acetat (0-50%), thu được chất 1 (30 mg) và chất 2 (35 mg) sạch.

Cyclomusalenon (1): Tinh thể hình kim màu trắng, đnc. 133-135°C (CHCl<sub>3</sub>). R<sub>f</sub> = 0,75, dung môi n-hexan/ethyl acetat (90:10).

Stigmasterol (2): Tinh thể hình kim, không màu, đnc. 170°C (EtOH). FT-IR (ν<sub>MAX</sub><sup>KBR</sup>): 3430, 2936, 2870, 1646, 1463, 1378, 1060, 967, 802, 591 CM<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHZ, CDCl<sub>3</sub>): δ 5,35 (1H, BRD, 6,8 HZ, H-6), 5,15 (1H, DD, H-22), 5,02 (1H, DD, H-23), 3,5 (1H, M, H-3), 1,02 (3H, D, 6,7 HZ, H-21), 0,79 (3H, D, 6,5 HZ, H-26), 0,85 (3H, D, 6,4 HZ, H-27) VÀ δ 0,80 (3H, T, 7,0 HZ, H-29).

## Tài liệu tham khảo

1). Võ Văn Chi (1996), Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học TP Hồ Chí Minh, tr. 250; 2). Akihisa T., Shimizu N., Tamura T. and Matsumoto T. (1986). *Lipids*, 21 (8), 494-497; 3). T. Akihisa, Y. Kimura, W.C.M.C. Kokke, S.-I Takase, K. Yasukawa, A. Jin-Nai, T. Tamura (1997). *Chem. Pharm. Bull*, 45 (4), 744-746

*Tap chí Dược liệu, tập 9, số 2/2004 (trang 46-50)*

## NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HỢP CHẤT SAPONIN CỦA CÂY CHÂN CHIM KHÔNG CUỐNG QUẢ (*SCHEFFLERA SP3*)

*Võ Duy Huân, Trần Công Luận – Trung tâm Sâm và Dược liệu TPHCM  
Đương Hồng Tố Quyên – Trường Đại học Y Dược TPHCM  
(Nhận bài ngày 10 tháng 9 năm 2003)*

### Summary

#### Studies on Saponin Composition of *Schefflera sp3*

*The saponin composition of the leaf, stem and root of Schefflera sp3 was quantitatively determined by NAMBA's weight method. The result revealed that the total saponin content was 3.66% in the leaf, 0.93% in the stem and 0.77% in the root, on absolutely dry basis.*

*Two sapogenins were isolated from the hydrolysed product of total saponins from the leaf by different columns. Their structures were identified as oleanolic acid and hederagenin on the basis of m.p., IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMQC and HMBC analysis.*

*Key words: Schefflera sp3, Saponin, Sapogenin, Leaf, Stem and Root.*

### 1. Đặt vấn đề

Cây chân chim không cuống quả (*Schefflera sp3*) là một loài *Schefflera* có tác dụng tăng lực, được phát hiện trong quá trình sàng lọc các cây thuốc họ Nhân sâm (Araliaceae) [1]. Trong thông báo trước đây [2], chúng tôi đã công bố

các kết quả khảo sát ban đầu về thực vật và hoá học của cây. Về hoá học, lá, thân và rễ đều chứa các thành phần saponin triterpen, phytosterol, đường khử, tanin, coumarin, acid hữu cơ và hợp chất uronic, trong đó, hợp chất saponin là thành phần hoạt chất chính của các cây thuộc chi

*Schefflera*. Với mục tiêu nghiên cứu thành phần hợp chất saponin nhằm phát huy giá trị sử dụng và phục vụ công tác kiểm nghiệm dược liệu này, trong thông báo này, chúng tôi trình bày kết quả định lượng saponin toàn phần trong lá, thân và rễ, đồng thời mô tả việc phân lập và xác định cấu trúc hoá học các sapogenin chiết tách được từ việc thủy phân saponin toàn phần của lá.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu:

### 2.1. Nguyên liệu:

Nguyên liệu sử dụng để nghiên cứu là lá, thân và rễ của *Schefflera sp3* thu hái ở vùng Suối Tre, thôn Pró, xã Kado, huyện Đơn Dương, tỉnh Lâm Đồng. Sau khi thu hái, mẫu được phơi khô và xay thành bột.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Định lượng saponin toàn phần của lá, thân và rễ theo phương pháp cân Namba [3].

- Định tính saponin toàn phần của lá, thân và rễ bằng phản ứng hoá học và sắc ký lớp mỏng [4,5].

- Chiết xuất và phân lập sapogenin của lá bằng sắc ký cột silica gel và cột pha đảo RP-18.

- Nghiên cứu cấu trúc các sapogenin dựa trên điểm chảy, phổ hồng ngoại (IR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, HMQC và HMBC.

## 3. Kết quả nghiên cứu:

**3.1 Định lượng saponin toàn phần của lá, thân và rễ:** Lấy 20 g bột dược liệu chiết bằng Soxhlet với 400 ml MeOH cho đến kiệt saponin. Dịch MeOH được cô giảm áp cho thành cặn. Hòa cặn trong một lượng nước vừa đủ. Dịch nước được lắc với ether cho đến khi lớp ether không màu hoặc có màu rất nhạt. Lớp nước lắc tiếp với n-BuOH bão hòa nước đến khi hết saponin. Gộp dịch n-BuOH, rửa nhiều lần bằng nước cất. Cô giảm áp dịch n-BuOH thu được cặn, làm khô trong tủ sấy chân không đến khối lượng không đổi thu được saponin toàn phần. Cân và tính hàm lượng saponin toàn phần trong dược liệu. Tiến

hành định lượng 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Hàm lượng saponin toàn phần của lá, thân và rễ là 3,66%, 0,93% và 0,77%, tính theo trọng lượng khô tuyệt đối.

**3.2 Định tính saponin toàn phần của lá, thân và rễ:** Saponin toàn phần chiết xuất ở mục 3.1 được hoà trong MeOH để định tính saponin bằng các phản ứng hoá học và sắc ký lớp mỏng.

### 3.2.1 Phản ứng hoá học:

Dịch chiết MeOH của cả 3 mẫu lá, thân và rễ đều có phản ứng dương tính với các phản ứng Liebermann, Kahlenberg, Salkowski. Phản ứng tạo bọt Fontan – Kaudel trong HCl 0,5N và NaOH 0,5N cho cột bọt tương đương nhau.

Sơ bộ cho thấy lá, thân và rễ của *Schefflera sp3* đều có chứa saponin triterpen.

### 3.2.2 Sắc ký lớp mỏng:

- Chất hấp phụ: Bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

- Hệ dung môi khai triển: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (61:32:7, lớp dưới).

- Thuốc thử phát hiện: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong nước.

- Phun, sấy ở 110°C trong 5 phút.

Sơ bộ nhận định lá cho 11 vết với các giá trị R<sub>f</sub>: 0,16, 0,19, 0,23, 0,27, 0,31, 0,37, 0,39, 0,54, 0,60, 0,67 và 0,78. Thân và rễ cho 7 vết với các giá trị R<sub>f</sub>: 0,19, 0,23, 0,27, 0,31, 0,37, 0,39 và 0,78.

## 3.3 Chiết xuất và phân lập sapogenin của lá:

### 3.3.1 Chiết xuất saponin toàn phần của lá:

Lấy 1000 g bột lá đem chiết bằng cách đun hồi lưu với MeOH đến hết saponin. Dịch chiết MeOH được cô giảm áp đến cặn thu được 94,5 g cặn MeOH. Hoà cặn trong một lượng nước vừa đủ. Dịch nước được lắc với ether cho đến khi lớp ether hết màu hoặc có màu rất nhạt. Dịch nước được cô cách thủy đến khi thành cặn. Hoà cặn trong một lượng nước vừa đủ cho qua cột Diaion HP-20. Lần lượt dùng các dung môi rửa giải:

H<sub>2</sub>O, MeOH 50%, MeOH, Aceton. Qua các phân đoạn, ta thu được các lượng cần như cần nước (12,445 g), cần MeOH 50% (19,969 g), cần MeOH (37.726 g) chứa saponin toàn phần của lá và cần aceton (0,065 g).

### 3.3.2 Thủy phân saponin

Lấy 7 g saponin toàn phần chiết xuất từ lá, thêm vào 250 ml EtOH 50% có chứa 7% HCl, đun hồi lưu thủy phân trong 4 giờ. Để nguội, thêm nước vào dịch thủy phân cho đến thể tích 350 ml, cô giảm áp cho đến hết EtOH. Dịch nước acid lắc với CHCl<sub>3</sub> (50 ml × 6 lần). Lớp CHCl<sub>3</sub> được rửa nước đến khi nước rửa trung tính (50 ml × 3 lần). Làm khan dịch CHCl<sub>3</sub> bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan, cô giảm áp thu hồi dung môi, thu được sapogenin toàn phần (3,492 g).

Mẫu thân và rễ được thủy phân với phương pháp trên, lượng khoảng 100 mg saponin thu được lượng nhỏ sapogenin để so sánh đối chiếu với mẫu lá.

### 3.3.3 So sánh sapogenin toàn phần giữa các bộ phận bằng SKLM:

Sapogenin toàn phần của lá, thân và rễ được so sánh trên SKLM đối chiếu với chất chuẩn là acid oleanolic trên 2 hệ dung môi:

G1 = CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1)

G2 = C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:3:0,5)

Trên hệ dung môi G1, mẫu lá, thân và rễ đều có 3 vết tương đồng nhau với các Rf: 0,24, 0,41 và 0,58; ngoài ra mẫu lá còn có một vết có Rf 0,17 còn thân và rễ có một vết có Rf 0,69. Cả ba mẫu đều có vết có Rf 0,58 tương ứng với acid oleanolic chuẩn.

### 3.3.4 Phân lập các sapogenin của lá:

Sapogenin toàn phần của lá (3,492 g) thu được ở mục 3.3.2 được sử dụng để phân lập các sapogenin bằng phương pháp sắc ký cột qua silica gel với hệ dung môi rửa giải C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-EtOAc (2:1→1:3) thu được 6 phân đoạn tập hợp I, II, III, IV, V và VI.

Phân đoạn tập hợp II, sau khi bốc hơi dung môi có dạng bột vô định hình màu trắng ngà. Phân đoạn này được tinh chế bằng cách rửa rửa với một lượng tối thiểu MeOH lạnh, sau đó kết tinh lại trong MeOH thu được 477 mg genin I kết tinh tinh thể hình kim.

Phân đoạn tập hợp IV chứa hai vết và tạp được tiếp tục phân lập qua cột sắc ký pha đảo RP-18 với dung môi 87% MeOH trong nước thu được 5 phân đoạn A, B, C, D và E. Phân đoạn C, sau khi bốc hơi dung môi thu được dạng bột vô định hình màu trắng, được tinh chế bằng cách rửa rửa với MeOH lạnh và kết tinh lại trong MeOH thu được 37 mg genin II kết tinh tinh thể hình kim.

### 3.2.5 Xác định cấu trúc hoá học của các genin:

#### Genin I:

+ Điểm chảy đo trên máy Gallenkamp: 299°C.

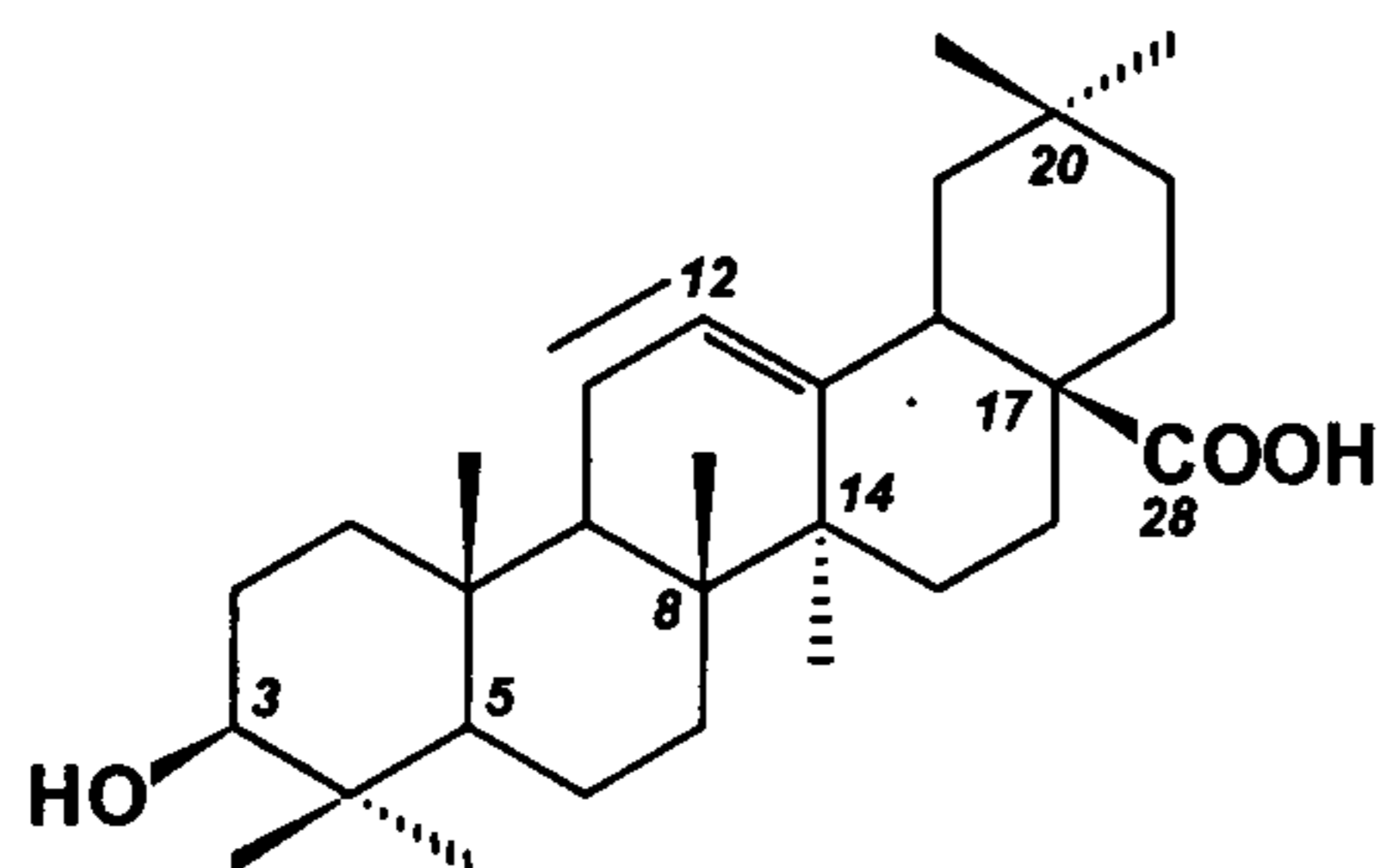
+ Phổ hồng ngoại: đo trên máy FTIR 8201 (SHIMADZU) với kỹ thuật viên nén KBr, cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng của các nhóm chức OH (3421 cm<sup>-1</sup>) và nhóm COOH (1697 cm<sup>-1</sup>) tương đồng với các đỉnh hấp thụ đặc trưng của acid oleanolic (3440 cm<sup>-1</sup> và 1690 cm<sup>-1</sup>) [6].

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy AC 500 BRUKER trong dung môi pyridin-d<sub>5</sub>, chất chuẩn nội tetrametylsilan (TMS), độ dời hoá học  $\delta$  tính theo ppm.

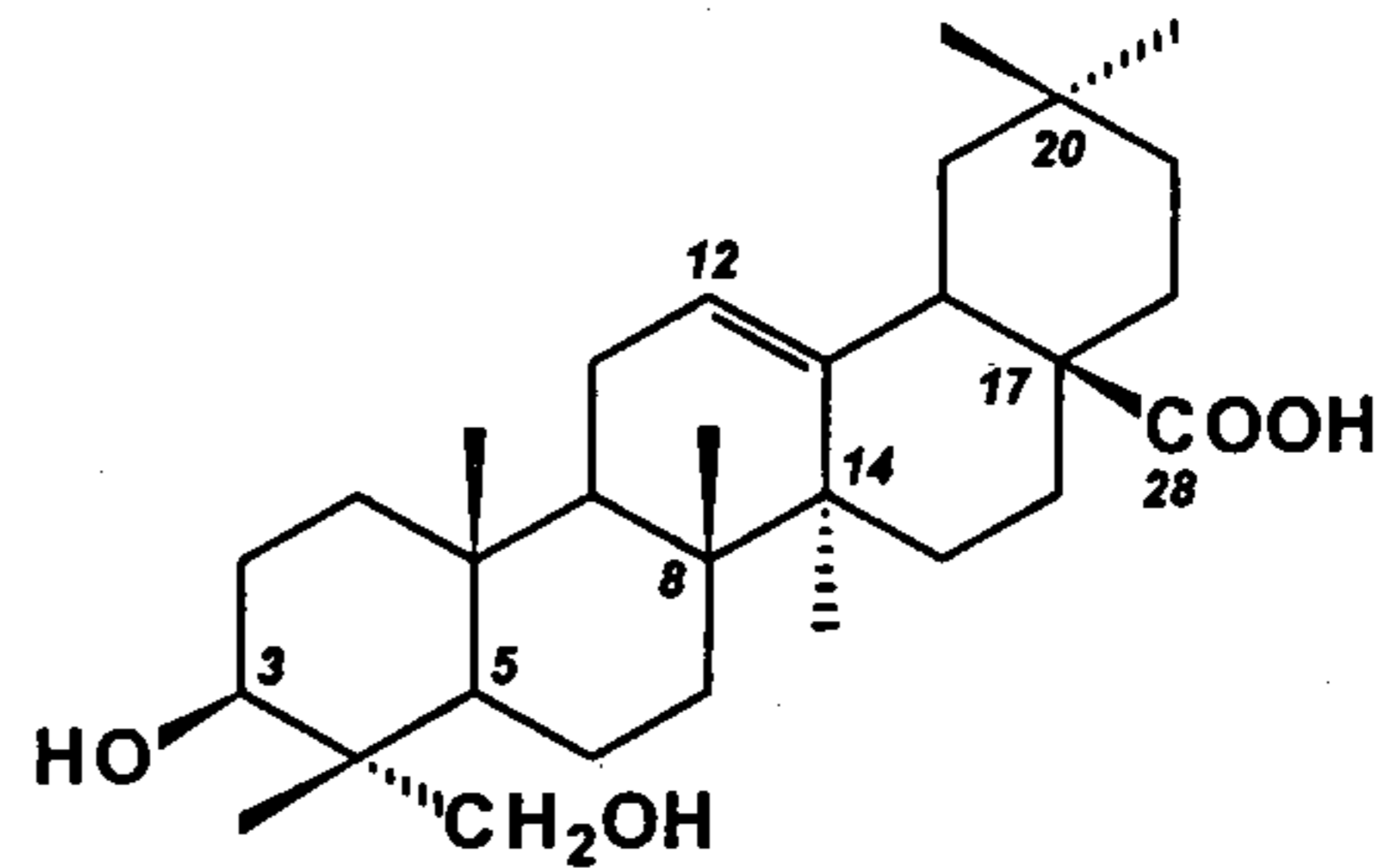
Phổ <sup>13</sup>C-NMR cho phép dự đoán genin I có 30 carbon, là một genin của saponin triterpen. Hai tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta$  122.6 và 144.8 đặc trưng cho nối đôi giữa C<sub>12</sub> và C<sub>13</sub> thường gặp trong dẫn chất thuộc nhóm olean. Phổ <sup>13</sup>C-NMR còn cho thấy sự hiện diện của một nhóm carboxyl (-COOH) qua sự tồn tại của pic carbon có độ dời hóa học  $\delta$  180.0 và một nhóm hydroxyl (-OH) có độ dời hóa học  $\delta$  78.1. So sánh các giá trị cộng hưởng <sup>13</sup>C của genin I với các giá trị của acid oleanolic công bố trong tài liệu, genin I được xác định là acid oleanolic [6].

**Bảng 1.** Độ dời hóa học  $^{13}\text{C}$ -NMR của genin I so với độ dời hóa học  $^{13}\text{C}$ -NMR của acid oleanolic (125 MHz, pyridin- $d_5$ ,  $\delta$ )

C	Genin I	Acid oleanolic	C	Genin I	Acid oleanolic	C	Genin I	Acid oleanolic
1	38,9	39,1	11	23,8	23,8	21	34,2	34,4
2	28,0	28,1	12	122,6	122,5	22	33,3	33,4
3	78,1	78,3	13	144,8	144,8	23	28,8	28,8
4	39,4	39,4	14	42,2	42,0	24	16,5	16,4
5	55,8	55,9	15	28,4	28,3	25	15,5	15,6
6	18,8	18,9	16	23,8	23,8	26	17,4	17,5
7	33,3	33,3	17	46,7	46,7	27	26,1	26,2
8	39,7	39,9	18	42,3	42,1	28	180,2	180,0
9	48,1	48,2	19	46,7	46,5	29	33,3	33,3
10	37,3	37,5	20	30,9	30,9	30	23,7	23,8



Hình 1. Acid oleanonic



Hình 2. Hederagenin

Genin II:

+ Điểm chảy: 309°C.

+ Phổ hồng ngoại: cho các tần số hấp thụ đặc trưng của các nhóm chức OH ( $3448\text{ cm}^{-1}$ ) và COOH ( $1697\text{ cm}^{-1}$ ).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân:

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cho thấy genin II là một genin của saponin triterpen có 30 carbon. Các phổ DEPT 90, DEPT 135 cho thấy trong phân tử của genin II có mặt 6 nhóm carbon bậc 1, 11 nhóm carbon bậc 2, 5 nhóm carbon bậc 3 và 8 nhóm carbon bậc 4. Hai tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta$  122.6 và 144.8 cho thấy sự hiện diện của một nối đôi giữa  $\text{C}_{12}$  và  $\text{C}_{13}$ . Ngoài ra, phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR còn cho thấy sự hiện diện của một nhóm carboxyl (-COOH) có độ dời hoá học  $\delta$  180.1 và 2 nhóm hydroxyl (-OH) có độ dời hoá học  $\delta$  73.5 và 68.0.

Các giá trị cộng hưởng  $^{13}\text{C}$ -NMR của genin II hoàn toàn tương đồng so với các giá trị của hederagenin công bố trong tài liệu [7].

Để phân tích hơn nữa chi tiết cấu trúc phân tử, các phổ  $^1\text{H}$ -NMR, HMQC, HMBC đã được sử dụng. Kết quả phân tích nêu trong bảng 2 cho thấy genin II có cấu trúc hoàn toàn tương đồng với hederagenin. Vì vậy, genin II được xác định là hederagenin.

#### 4. Kết luận:

- Bằng những phản ứng hoá học, thấy lá, thân và rễ của *Schefflera sp3* đều chứa saponin triterpen.

- Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, sơ bộ nhận định saponin toàn phần của lá có 11 vết saponin, thân và rễ có 7 vết.

- Kết quả định lượng theo phương pháp cân NAMBA cho thấy hàm lượng saponin toàn phần trong lá, thân và rễ là 3,66%, 0,93% và 0,77%, tính theo trọng lượng khô tuyệt đối.

- Sơ bộ nhận định trên sắc ký lớp mỏng, sapogenin toàn phần của lá có 4 vết và bằng

phương pháp sắc ký cột, đã phân lập được hai genin. Căn cứ vào điểm chảy, sắc ký lớp mỏng, phổ IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, HMQC và HMBC, cấu trúc của hai genin được xác định là acid oleanolic và hederagenin.

**Bảng 2.** Các thông số phổ của genin II so với hederagenin

Genin II						Hederagenin
C	DEPT	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMQC	HMBC	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	$\text{CH}_2$	38.8		H-1		38.9
2	$\text{CH}_2$	27.6		H-2		27.6
3	CH	73.5	4.13 (dd, J=3.9, 12.0)	H-3		73.7
4	C	42.8				42.9
5	CH	48.6		H-5	$\text{C}_{4,6,10,24,25}$	48.8
6	$\text{CH}_2$	18.6		H-6		18.7
7	$\text{CH}_2$	33.0		H-7		33.6
8	C	39.7				39.8
9	CH	48.1		H-9	$\text{C}_{8,10,11,26}$	48.2
10	C	37.2				37.3
11	$\text{CH}_2$	23.7		H-11	$\text{C}_{12,13}$	23.8
12	CH	122.6	5.46 (br s)	H-12	$\text{C}_{8,9,11}$	122.7
13	C	144.8				145.0
14	C	42.2				42.2
15	$\text{CH}_2$	28.3		H-15		28.4
16	$\text{CH}_2$	23.7		H-16		23.8
17	C	46.6				46.7
18	CH	42.0	3.25 (dd, J=3.9, 13.9)	H-18	$\text{C}_{12,13,14,16,17,19}$	42.0
19	$\text{CH}_2$	46.4		H-19	$\text{C}_{18,20}$	46.5
20	C	30.9				31.0
21	$\text{CH}_2$	34.2		H-21		34.3
22	$\text{CH}_2$	33.2		H-22	$\text{C}_{29}$	33.3
23	$\text{CH}_2$	68.0	4.11 (d, J=10.6) 3.67 (d, J=10.3)	H-23	$\text{C}_{3,4,5,24}$	68.2
24	$\text{CH}_3$	13.0	1.01 (s)	H-24		13.1
25	$\text{CH}_3$	15.9	0.95 (s)	H-25		16.0
26	$\text{CH}_3$	17.4	1.00 (s)	H-26		17.5
27	$\text{CH}_3$	26.1	1.20 (s)	H-27	$\text{C}_{8,13,14,15}$	26.2
28	COOH	180.1				180.4
29	$\text{CH}_3$	33.2	0.90 (s)	H-29	$\text{C}_{19,20,21,30}$	33.3
30	$\text{CH}_3$	23.8	0.97 (s)	H-30		23.8

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Trần Công Luận và cộng sự, Proceeding of Pharma Indochina II, 2001, Hanoi – Vietnam, tr 329-334; 2). Võ Duy Huấn, Trần Công Luận, Dương Hồng Tố Quyên, Tạp chí Dược liệu số 6, 2003, tr161-167; 3). Tsuneo Namba, Nasao Yashyaki, Yakugata Zasshi, 94, 1970, p 252; 4). Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tự, Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc, NXB Y học Hà Nội, 1985; 5). Ngô Văn Thu, Bài giảng Dược liệu tập 1, 1981; 6). Nguyen Thoi Nham, Study on *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. – Araliaceae, Botany – Tissue Culture – Chemistry – Biological Properties, Herba polonica, 35, Suppl.2, 1989, p 129; 7). Shashi B. Mahato, Asish P. Kundu, Review article number 98, Phytochemistry, 36, 1994, p 1525.

## PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA ASIATICOSID CHIẾT XUẤT TỪ RAU MÁ

Nguyễn Thị Hoài, Bế Thị Thuần - Trường Đại học Dược Hà Nội  
Chu Đình Kính - Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia  
(Nhận bài ngày 10 tháng 2 năm 2004)

### Summary

#### Isolation and Identification of Asiaticoside from *Centella asiatica* (L.) Urb.

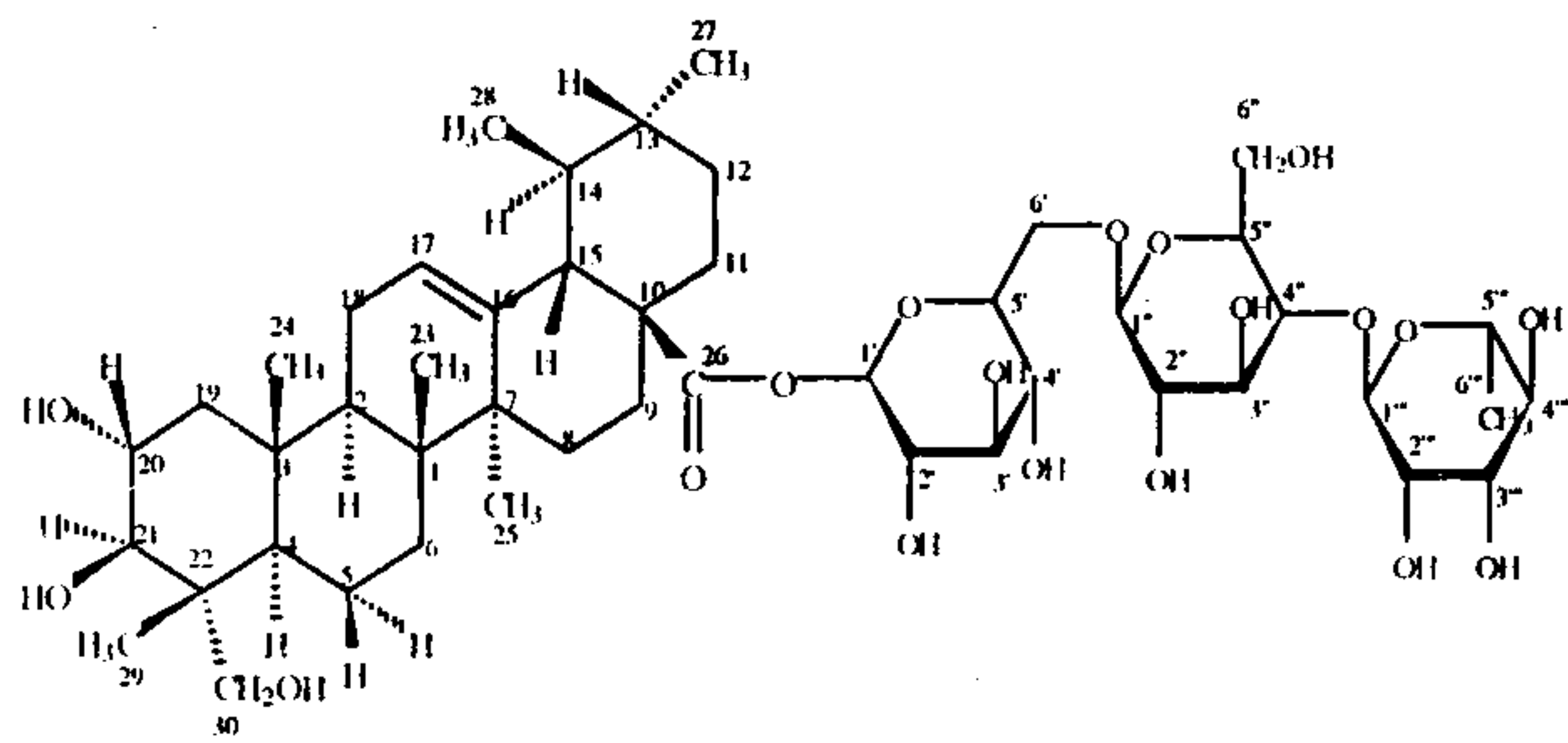
A substance isolated from the herb of *Centella asiatica* (L.) Urb. was identified to be asiaticoside on the basis of m.p, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMQC, HMBC and COSY analyses.

Key words: *Centella asiatica* (L.) Urb., Asiaticoside.

### I. Đặt vấn đề

Rau má là loại cây mọc hoang và trồng khá phổ biến ở Việt Nam, được dùng với tác dụng kích thích lên da non điều trị sẹo lồi, giảm triglycerid máu, cải thiện và tăng cường chức năng gan [1,3,6]. Trong quá trình nghiên cứu loài này, chúng tôi đã chiết xuất được một hỗn hợp saponin và từ hỗn hợp này đã phân lập được một chất H3 tinh khiết, dự kiến là asiaticosid.

Theo các tài liệu đã công bố [4,5,6], asiaticosid có cấu trúc như ở hình 1. Trong bài này, chúng tôi sử dụng chủ yếu phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) để xác định cấu trúc của saponin H3.



Hình 1. Cấu trúc của asiaticosid

### II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 1. Nguyên liệu

Cây rau má (rễ, thân, lá, hoa, quả) thu hái ở Từ Liêm, Hà Nội vào tháng 9/ 2002, rửa sạch, sấy khô ở 50-60<sup>0</sup>C, tán bột.

#### 2. Phương pháp nghiên cứu

Saponin toàn phần được chiết bằng methanol nóng trong bình cầu có ống sinh hàn hồi lưu. Bằng sắc ký

cột và sắc ký lớp mỏng điều chế đã phân lập được chất H3 tinh khiết. Nhận dạng H3 dựa vào nhiệt độ nóng chảy và phân tích các số liệu phổ IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMQC, HMBC, COSY thu được.

### III. Kết quả nghiên cứu

Chất H3 kết tinh ở dạng tinh thể màu trắng, tan tốt trong methanol và hỗn hợp methanol - nước, khó tan trong chloroform.

Độ chảy được đo trên máy Kallen Kamp - ở phòng thí nghiệm trung tâm, trường Đại học Dược Hà Nội; H3 có độ chảy 237-239<sup>0</sup>C.

Đo phổ hồng ngoại (IR) trên máy Bermam ở dạng viên nén KBr tại phòng thí nghiệm trung tâm-trường Đại học Dược Hà Nội; H3 cho các đỉnh hấp thụ  $\lambda_{max}(cm^{-1})$ : 3404,9; 2927,0; 1736,6; 1648,4; 1456,6, 1063,1 và 565,3.

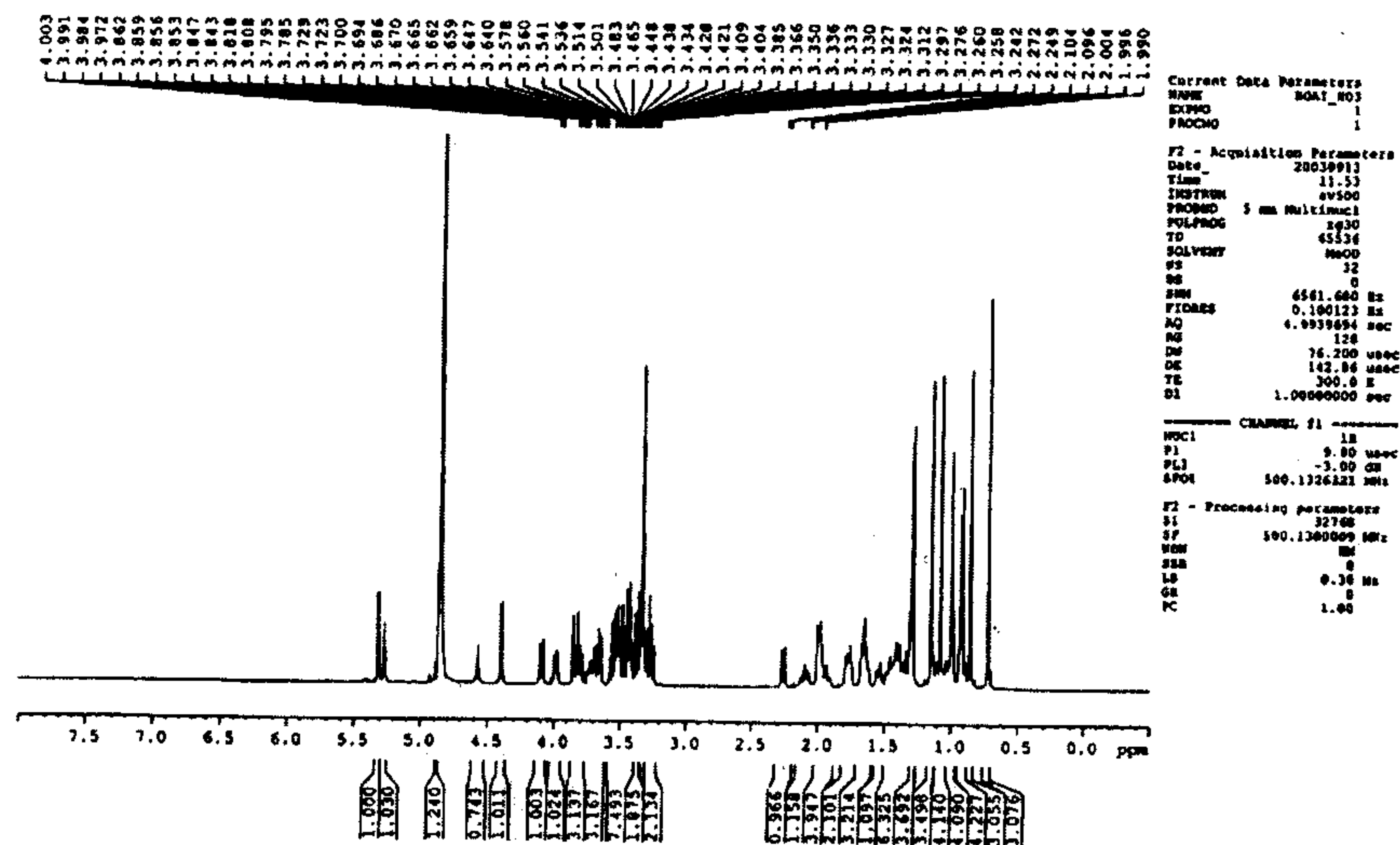
Phổ khối (MS): Ghi phổ khối lượng trên máy 5889-B-HP-MS ở phòng cấu trúc, Viện hoá học, Trung tâm khoa học và công nghệ quốc gia, bằng cách đưa mẫu trực tiếp, bắn phá bằng va chạm electron với năng lượng 70ev, vùng nhiệt độ lên tới 310<sup>0</sup>C. Tuy đo nhiều lần nhưng chỉ thu được phổ mảnh vỡ. Sự khảo sát phổ khối đưa tới 2 kết luận:

+ H3 là một phân tử có khối lượng phân tử lớn (> 600 mu).

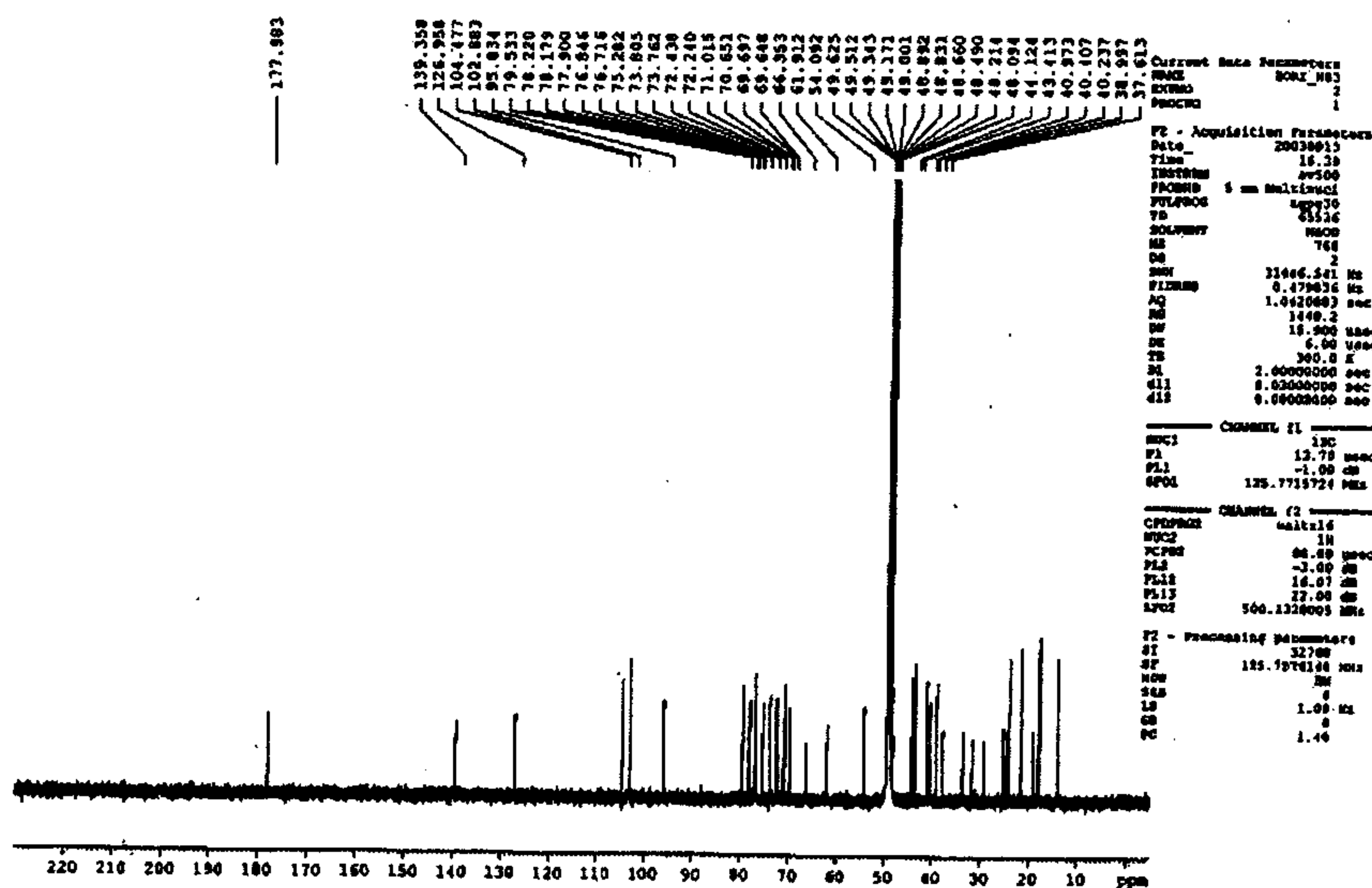
+ Dạng phổ cho thấy phân tử H3 có khả năng chứa nhiều gốc đường.

Như vậy, muốn thực hiện việc đo dạng mẫu này cần sử dụng kỹ thuật đo phổ khối ở vùng khối rộng, nhiệt độ cao và bắn phá mềm.

- Đo phổ NMR bằng máy Bruker 500 MHz ở Viện hoá học, Trung tâm khoa học và công nghệ quốc gia. Xác định cấu trúc của H3 với nhiều dạng phổ NMR khác nhau (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-1D-NMR, DEPT, COSY 90, HMQC, HMBC).



Hình 2: Phổ <sup>1</sup>H-NMR của H3



Hình 3: Phổ <sup>13</sup>C-NMR của H3

Từ phổ DEPT đã nhận dạng được H3 bao gồm 48C, trong đó có 7 nhóm CH<sub>3</sub>, 11 nhóm CH<sub>2</sub>, 23 nhóm CH, 7 nhóm >C<.

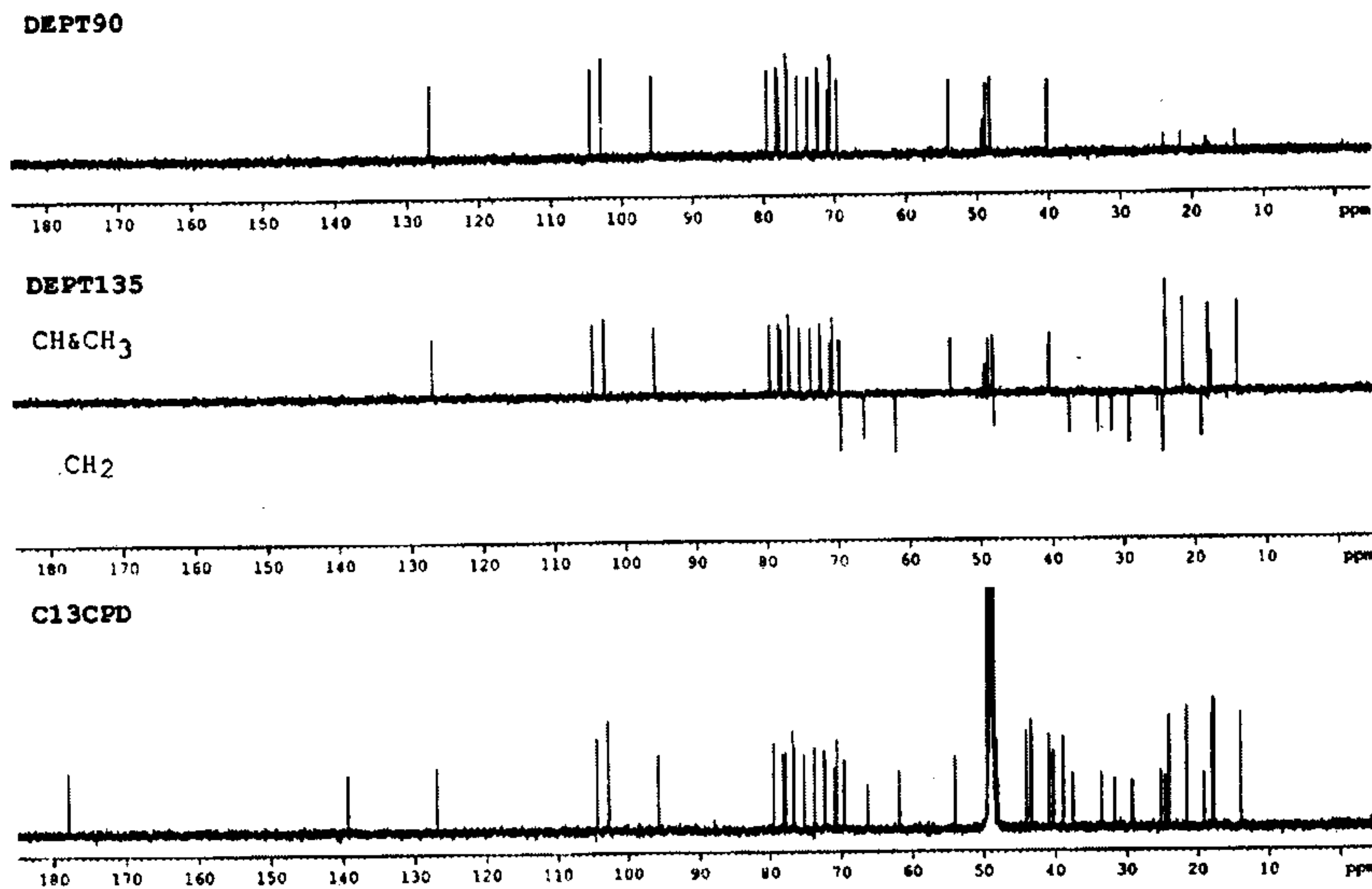
Qua phổ <sup>13</sup>C-NMR, DEPT có thể rút ra H3 chứa 1 gốc -COO, 1 liên kết đôi và nhiều nhóm CH mang đặc trưng của CH mạch đường (12 < x < 18).

Như vậy, qua phổ <sup>13</sup>C-NMR có thể sơ bộ kết luận là H3 chứa 3 gốc đường, khung phân tử của phần còn lại có dạng đa vòng và chỉ chứa 1 nối đôi.

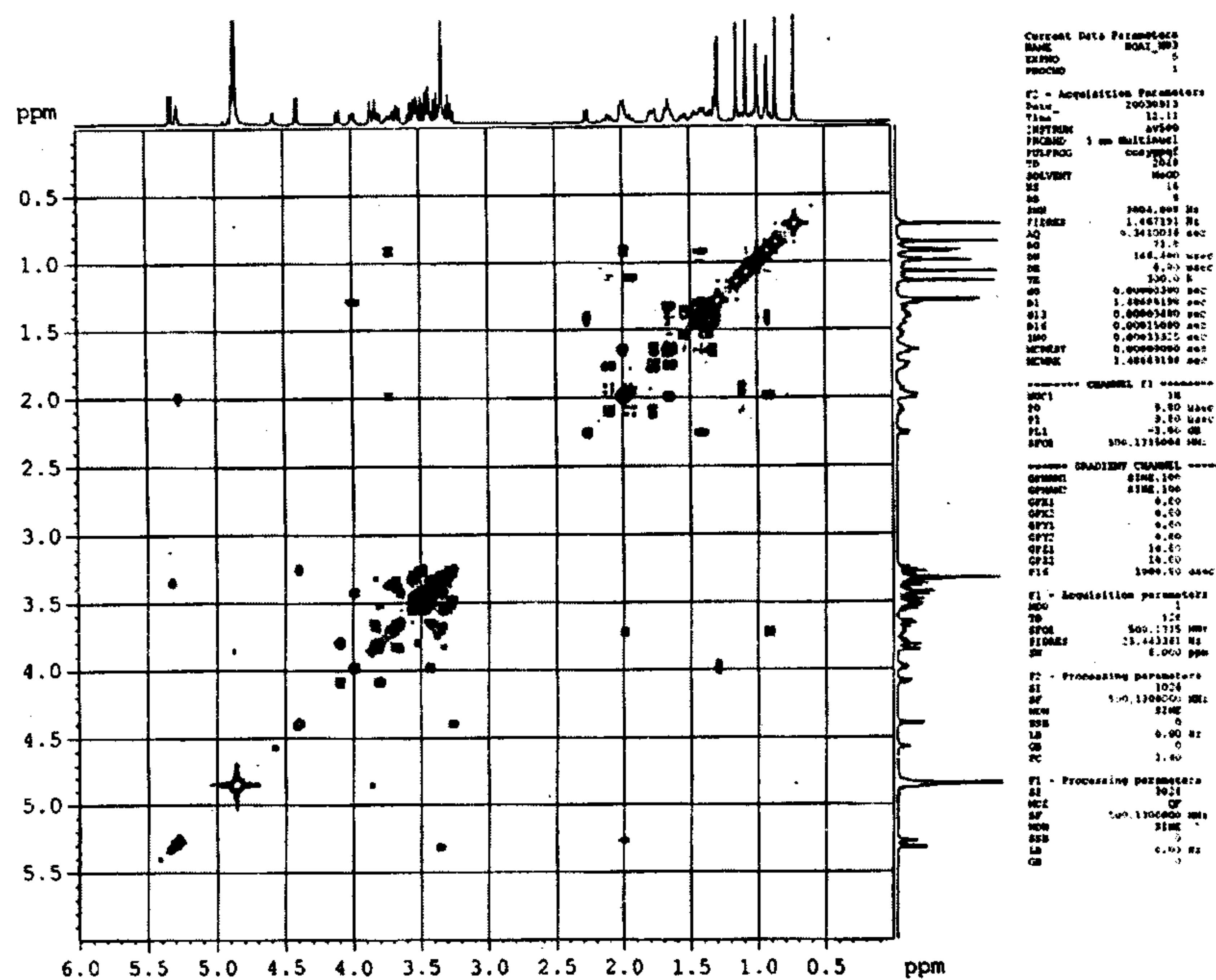
Việc khảo sát phổ <sup>1</sup>H-NMR cho thấy có 3 doublet rất đặc trưng cho các proton anomeric của gốc đường có độ chuyển dịch hóa học 5.316, 4.850 và 4.397 ppm. Qua phổ tương quan HMQC tìm ra 3 pic proton này tương ứng lần lượt với các pic carbon là 95.434, 102.883 và 104.477 ppm.

Như vậy, có thể sơ bộ kết luận H3 là một phân tử chứa 3 gốc đường và căn cứ vào phổ COSY có thể thấy rõ 3 đường này chứa 18 carbon và phần khung còn lại chứa 30 carbon, trong đó 3 carbon có đặc trưng là những carbon liên kết với OH.





Hình 4: Phổ DEPT của H3



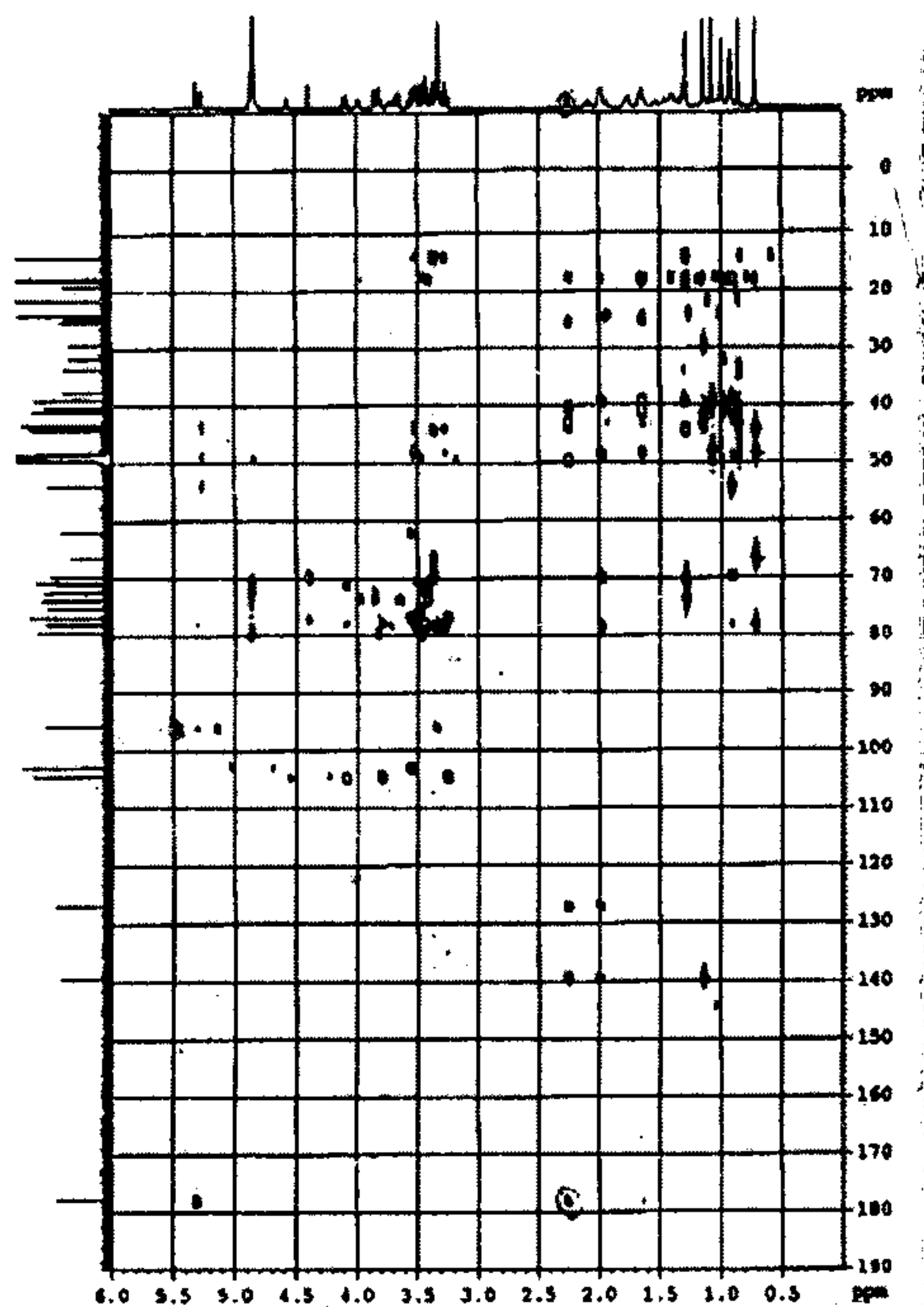
Hình 5: Phổ COSY của H3

Từ đó có thể thấy phân khung có những đặc điểm như 30 carbon (có khả năng là 1 triterpen), 1 gốc acid, 3 nhóm OH và 1 liên kết đôi.

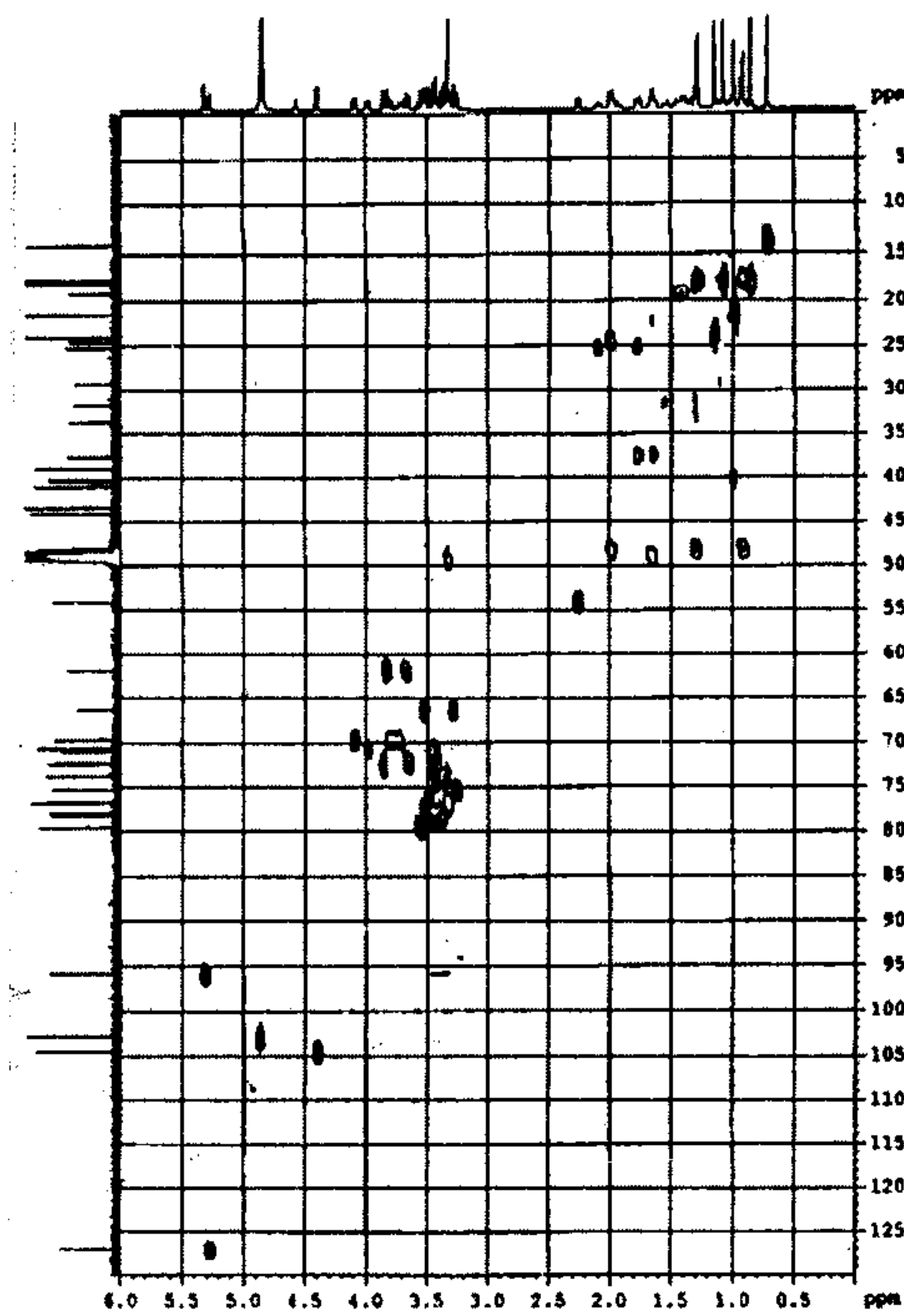
Từ phổ COSY, HMQC, HMBC cho thấy có 1

nhóm CH<sub>3</sub> nằm ở phân đường, 6 nhóm CH<sub>3</sub> nằm ở phân khung và khung nối với phân đường qua gốc acid. Phân đường chỉ chứa 2 nhóm CH<sub>2</sub>.

- Số liệu phổ NMR của H3 được ghi ở bảng 1.



Hình 6: Phổ HMBC của H3



Hình 7: Phổ HMQC của H3

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của H3/dung môi Methanol

Ký hiệu	<sup>13</sup> C-NMR δppm	<sup>1</sup> H-NMR δppm	J(H <sub>2</sub> )	Ký hiệu	<sup>13</sup> C-NMR δppm	<sup>1</sup> H-NMR δppm	J(H <sub>2</sub> )
CH <sub>3</sub> (23)	13.972	0.723 s		CH(15)	54.092	2.260 d	J= 11.5
CH <sub>3</sub> (6''')	17.658	0.922 d	J=6.5	CH <sub>2</sub> (6'')	61.912	CH <sub>2</sub> (6''a)~ 3.67 t (không phân giải) CH <sub>2</sub> (6''b)~ 3.82 t (không phân giải)	
CH <sub>3</sub> (28)	17.846	1.290 d	J= 6.0	CH <sub>3</sub> (29)	66.353	CH <sub>2</sub> (34a)~ 3.28 d (không phân giải) CH <sub>2</sub> (34b)~ 3.53 d (không phân giải)	
CH <sub>3</sub> (24)	17.926	1.078 s		CH <sub>2</sub> (6')	69.648	4.093 d	J= 10.5
CH <sub>3</sub> (30)	18.079	0.858 s		CH(20)	69.697	~ 3.7 ÷ 3.8 CH <sub>2</sub> (không phân giải)	
CH <sub>2</sub> (5)	19.094	~1.42 m	(không phân giải)	CH(5''')	70.651	3.987 dq	J <sub>1</sub> =6; J <sub>2</sub> = 10
CH <sub>3</sub> (29)	21.572	0.990 d	J=6.0	CH(4')	71.015	~ 3.43 t	(không phân giải)
CH <sub>3</sub> (25)	24.009	1.148 s		CH(2''')	72.240	~ 3.65 t	(không phân giải)
CH <sub>2</sub> (18)	24.532	1.993 dd	J <sub>1</sub> =7; J <sub>2</sub> =5	CH(3''')	72.438	~ 3.85 t	(không phân giải)
CH <sub>2</sub> (9)	25.244	CH <sub>2</sub> (9a) ~ 1.77 m; CH <sub>2</sub> (9b) ~ 2.11 m		CH(21)	73.762	~ 3.40 ÷ 3.44	(không phân giải)
CH <sub>2</sub> (8)	29.285	~ 1.12 m	(không phân giải)	CH(4''')	73.805	~ 3.3 ÷ 3.4	(không phân giải)
CH <sub>2</sub> (12)	31.703	~ 1.54 m	(không phân giải)	CH(2')	75.282	3.260 t	J <sub>1</sub> =J <sub>2</sub> = 9
CH <sub>2</sub> (6)	33.607	~ 1.3 m	(không phân giải)	CH(2'')	76.716	3.483 t	J <sub>1</sub> =J <sub>2</sub> = 9
CH <sub>2</sub> (11)	37.613	CH <sub>2</sub> (11a)~1.62 m (không phân giải) CH <sub>2</sub> (11b)~1.77 m (không phân giải)		CH(3''')	76.846	~3.32 t	(không phân giải)
>C- (3)	38.997			CH(5')	77.900	~ 3.35 ÷ 3.50	(không phân giải)
>CH(14)	40.237	~0.99 m (bị chèn bởi CH <sub>3</sub> (29))		CH(5''')	78.179	~ 3.35 ÷ 3.50	(không phân giải)
>CH(13)	40.407			CH(3')	78.220	~ 3.35 ÷ 3.48	(không phân giải)
>C<(1)	40.973			CH(4''')	79.533	3.560 t	J <sub>1</sub> =J <sub>2</sub> = 9
>C<(7)	43.413			CH(1''')	95.434	5.316 t	J= 8
>C<(22)	44.124			CH(1'')	102.883	~ 4.85	(bị che lấp)
CH <sub>2</sub> (6)	48.090	CH <sub>2</sub> (6a) ~ 0.91 m (bị chèn lấp) CH <sub>2</sub> (6b) ~ 1.3 m (bị chèn lấp)		CH(1')	104.477	4.397 d	J= 7
CH(2)	48.214	~ 1.98 t (bị chèn lấp)		CH(17)	126.958	5.279 t	J= 3.5
CH(4)	48.892	~ 1.64 t (bị chèn lấp)		>C<(16)	139.358		
>C<(10)	49.171			O-C=O(26)	177.983		

Phân tích tỉ mỉ các phổ NMR cho thấy cấu trúc H3 chính là asiaticosid với công thức phân tử  $C_{48}H_{78}O_{19}$ .

Chúng tôi đã tra cứu kỹ các tài liệu, thông tin được công bố cho đến nay, thấy rằng chưa một tài liệu nào đưa ra thông tin chi tiết về dữ liệu cộng hưởng từ hạt nhân ( $^1H$ -NMR và  $^{13}C$ -NMR) của hợp chất này. Vì đây là một cấu trúc phức tạp và lớn ( $M = 958$  mu.) nên việc phân tích phổ rất tỉ mỉ, khó khăn. Để tránh sai sót, chúng tôi đã sử dụng các phần mềm mô phỏng Chem-Draw,

ACD/NMR DB v7.05 để kiểm tra số liệu phổ chúng tôi đưa ra. Kết quả cho thấy số liệu phân tích của chúng tôi là hoàn toàn phù hợp với phổ mô phỏng.

#### IV. Kết luận

Căn cứ vào độ chảy, phổ hồng ngoại, kiểm tra phổ khối và kết quả phân tích các phổ  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -1D-NMR, DEPT, COSY 90, HMQC, HMBC đã khẳng định cấu trúc của saponin H3 chiết được từ loài *Centella asiatica* (L.) Urb. là phù hợp với cấu trúc của asiaticosid.

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Võ Văn Chi (1997), Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, 949; 2). Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Việt Tựu (1985), Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc, NXB Y học, Thành phố Hồ Chí Minh; 3). Đỗ Tất Lợi (1999), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 631- 632; 4). The Merck Index, twelfth Edition, 1996; 5). US Pharmacost (2001) Vol 26: 04; 6). WHO (1998), Quality control methods for medicinal plant materials.

*Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 2/2004 (trang 55-63)*

## SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY OF 2,5-DIHYDROXYCHALCONES

Nguyen-Hai Nam,<sup>1,2,3</sup> Byung-Zun Ahn,<sup>3</sup> Nguyen Tien Vung<sup>4</sup>

1. Department of Biomedical Sciences, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881, USA

2. Department of Pharmaceutical Chemistry, Hanoi College of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

3. College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea.

4. Institute of Drug Quality Control, 48 Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

(Received Jan 2, 2004)

### Summary

*A series of 2,5-dihydroxychalcones were synthesized and evaluated for cytotoxicity against cancer cell lines and human umbilical venous endothelial cells. It was found that chalcones with electron-withdrawing substituents on an A ring exhibited significant cytotoxicities. Among the synthesized compounds, 2'-chloro-2,5-dihydroxychalcone (9) is the most potent with  $IC_{50}$  value as low as 0.31  $\mu g/mL$*

**Keywords:** Chalcone, Synthesis, Cytotoxicity, Structure-activity relationship

### Introduction

In our search for novel antitumor agents from natural sources, we isolated a phenyl propanoid, methyl 3,4-dihydroxycinnamate (methyl caffeate **1**, Fig. 1), from the plant *Notopterygium incisum*. This compound showed a significant cytotoxicity against various cancer cell lines and greatly inhibited the invasion of B16 melanoma cells (Nam *et al.*, 2000). By variation of the aromatic

moiety we obtained a methyl 2,5-dihydroxycinnamate (**2**) with cytotoxicity of 10-fold as potent as **1** (Nam *et al.*, 2001). Structurally, **2** possesses two distinguished features; a hydroquinone and an  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl. The hydroquinone has been known to be easily autoxidised *in vivo* to quinone which elicits cytotoxicity *per se* or through a cascade of redox cycling (Ollinger *et al.*, 1989). The  $\alpha,\beta$ -unsaturated

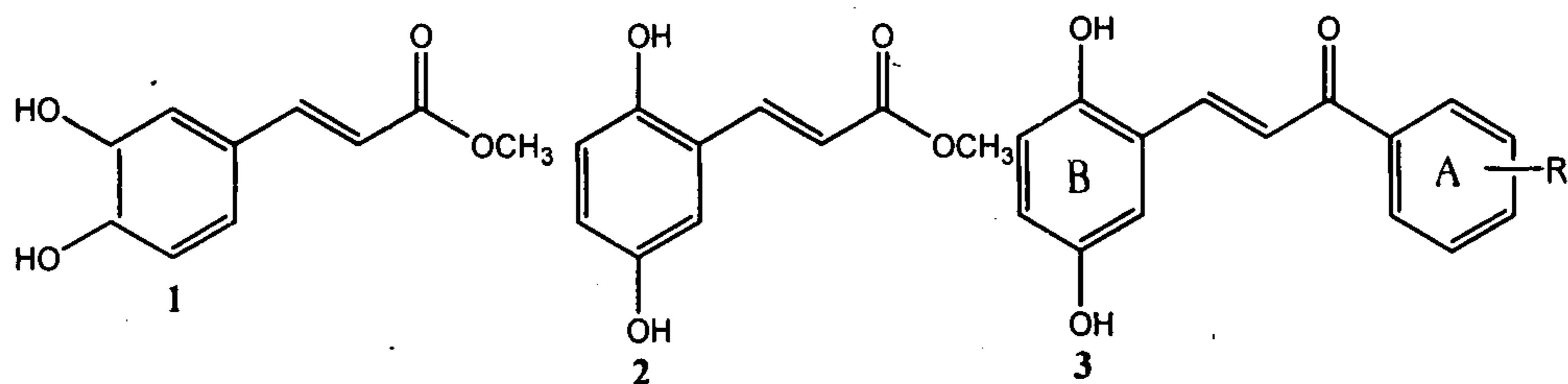


Fig. 1. Structures of some cinnamates and chalcones

carbonyl can be considered as a Michael acceptor, an active moiety often employed in the design of anticancer drugs (Ahn and Sok, 1996). A number of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones have demonstrated preferential activity toward thiol (Lee *et al.*, 1971). Alkylation with cellular thiols such as glutathione (GSH) may also occur with cinnamates like 2, leading to adducts at  $\beta$ -position. Hence,  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl-containing compounds may be free from problems of mutagenicity and carcinogenicity that are associated with many alkylating agents used in cancer chemotherapy (Lee *et al.*, 1977). Thus, 2 presents an interesting lead for the development of anticancer agents.

In a previous study we found that compound 2, despite a potent cytotoxicity *in vitro*, showed a marginal antitumor activity *in vivo* with T/C value (median survival day of a treated mice relative to untreated control) of 145% in BDF1 bearing B16 melanoma cells. A low *in vivo* activity was attributed to the fast hydrolysis of the compound in plasma (personal unpublished results). This observation prompted us to replace a methoxy group in 2 by various substituted phenyls. The resulting 2,5-dihydroxychalcones (3) should be stable in term of hydrolysis, thus expected to be more active *in vivo* given that they retain cytotoxicities *in vitro*. In this paper, we describe the synthesis and cytotoxicity of a series of such 2,5-dihydroxychalcones.

## Results and Discussions

The 2,5-dihydroxychalcones (7~27, 29~53)

Table I. Cytotoxicity of Synthesized 2,5-Dihydroxychalcones in Cancer Cell Lines<sup>1</sup> and HUVECs

Cpd	Substituent(s) on the A ring	Cytotoxicity ( $IC_{50}^2$ , $\mu\text{g/mL}$ )			
		B16	HCT116	A431	HUVEC
7	H	1.97	2.77	2.01	1.99
8	2-F	1.96	1.99	1.87	1.45
9	2-Cl	1.51	1.67	1.24	0.31
10	3-Cl	1.26	1.55	1.37	1.12
11	4-Cl	2.00	2.35	1.96	2.01

were synthesized in moderate to good yields as depicted in Scheme 1. A main step involved condensation of 2,5-dihydroxybenzaldehyde, protected as tetrahydropyranyl ether, with various acetophenones, also protected as tetrahydropyranyl ether wherever a phenol group was present, using barium hydroxide as a base. <sup>1</sup>H NMR spectra revealed that the olefinic bond in these chalcones adopted the *E* configuration (the coupling constants of the two olefinic protons were around 16 Hz). A chalcone 28 was obtained in 90% yield by oxidation of 28 with *m*-CPBA (*m*-chloro peroxybenzoic acid).

The synthesized chalcones were evaluated for cytotoxic activities in three cancer cell lines including B16 (murine melanoma), HCT116 (human colon cancer cells), and A431 (human epidermoid carcinoma). As already widely known, the formation of new blood vessels from human umbilical venous endothelial cells (HUVEC), so-called angiogenesis, is prerequisite for the growth of solid tumors (Folkman, 1971). Inhibition of angiogenesis has been postulated to be an attractive approach for cancer treatment (Gastl *et al.*, 1997) and a compound showing a selective cytotoxicity against HUVECs may be potential for further development as an angiogenesis inhibitor. For that reason, the HUVEC line was included in an assay panel in an attempt to unveil a selective cytotoxicity against this cell line of the compounds tested. The results expressed as  $IC_{50}$  values (a concentration produces 50% reduction in cell growth) are summarized in Table I.

12	2-Br	1.73	1.81	1.57	1.61
13	4-Br	1.59	1.64	1.55	1.45
14	2,3,4,5,6-F <sub>5</sub>	2.11	2.32	1.99	2.00
15	4-NO <sub>2</sub>	2.01	2.49	2.74	1.99
16	2,5-F <sub>2</sub>	1.81	1.87	2.01	1.71
17	3,5-F <sub>2</sub>	1.99	1.75	2.00	1.54
18	2,3-Cl <sub>2</sub>	1.78	1.83	1.65	1.61
19	3,4-Cl <sub>2</sub>	1.79	2.07	1.83	2.24
20	3,5-Cl <sub>2</sub>	2.14	1.98	2.17	1.95
21	2-OCH <sub>3</sub> -5-Br	1.15	2.08	1.44	1.01
22	2-CH <sub>3</sub>	2.56	3.01	2.43	2.17
23	4-CH <sub>3</sub>	2.61	3.00	2.41	1.97
24	2-OCH <sub>3</sub>	1.71	2.23	1.87	1.34
25	3-OCH <sub>3</sub>	1.91	3.01	1.71	2.01
26	4-OCH <sub>3</sub>	3.07	4.11	3.99	3.47
27	4-SCH <sub>3</sub>	2.47	5.99	2.61	1.79
28	4-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2.19	3.97	2.07	2.11
29	2,3-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>3.91</b>	<b>4.05</b>	<b>3.09</b>	<b>3.10</b>
30	2,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.70	7.51	3.14	2.94
31	2,5-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.87	3.02	2.99	3.01
32	3,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>11.57</b>	<b>9.35</b>	<b>5.09</b>	<b>6.41</b>
33	3,5-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>11.09</b>	<b>10.27</b>	<b>9.37</b>	<b>8.88</b>
34	2,3,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4.11	10.94	5.39	3.92
35	2,4,5-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	12.49	11.28	11.01	10.08
36	2,4,6-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.11	4.56	2.15	2.00
37	3,4,5-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4.56	10.26	7.44	4.15
38	2-OH	1.43	3.19	2.05	1.48
39	3-OH	1.57	4.53	2.76	2.01
40	4-OH	3.58	4.03	2.99	2.51
41	2-OH-5-OCH <sub>3</sub>	4.67	4.83	3.99	3.49
42	2-OH-6-OCH <sub>3</sub>	2.31	2.57	2.06	1.99
43	2,3-(OH) <sub>2</sub>	1.42	2.14	2.09	2.01
44	2,4-(OH) <sub>2</sub>	10.67	11.38	10.41	8.75
45	2,5-(OH) <sub>2</sub>	10.16	14.46	26.65	10.01
46	3,4-(OH) <sub>2</sub>	2.97	11.46	5.35	2.41
47	3,5-(OH) <sub>2</sub>	4.16	4.99	2.11	3.05
48	3,4-OCH <sub>2</sub> O	9.78	10.17	7.54	11.24
49	Pyridin-4-yl	2.00	2.34	1.98	1.93
50	2-Naphtyl	1.49	2.97	1.99	1.49
51	4-Bisphenyl	1.13	3.01	2.14	1.12
52	Indol-3-yl	2.09	2.16	1.95	1.48
53	Quinolin-2-yl	1.94	2.11	2.07	1.84
2 <sup>3</sup>		0.12	0.17	0.15	- <sup>4</sup>
ADR <sup>5</sup>		0.10	1.11	1.01	0.21

<sup>1</sup>Cancer cell lines: B16, murine melanoma; HCT116, colon cancer; A431, human epidermoid carcinoma.

<sup>2</sup>A sample's concentration produces a 50% reduction in cell growth. The values shown were the averages from a triplicate experiment. <sup>3</sup>Methyl 2,5-dihydroxycinnamate, synthesized as described previously (Nam *et al.*, 2001).

<sup>4</sup>Not tested. <sup>5</sup>Adriamycin, used as a positive control

As shown in Table I, most of the synthesized compounds exhibited significant cytotoxicities. Generally, the compounds bearing electron-withdrawing group(s) on an A ring (8~20) exerted comparable or slightly enhanced cytotoxicities ( $IC_{50}$  values ranged from 0.31 to 2.49  $\mu\text{g/mL}$ ) compared to compound 7 bearing no substituent on the A ring ( $IC_{50}$  values, 1.97~2.77  $\mu\text{g/mL}$ ). A similar result was observed with compound 21 that possesses both electron-withdrawing and electron-releasing groups. For these 2,5-dihydroxychalcones, the formation of quinonoid metabolites from a para-hydroquinone moiety might be one

mechanism leading to their cytotoxicities (Nam *et al.*, 2001). Moreover, it has been shown previously that a number of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones have demonstrated preferential activity toward bio-nucleophiles such as thiols (Lee *et al.*, 1971). Thus, alkylation with cellular thiols such as glutathione (GSH) may also occur with chalcones 3, leading to adducts at  $\beta$ -position (Fig. 2). The substitution of the electron-withdrawing group(s) on the A ring was expected to promote the alkylation of bio-nucleophiles, hence, enhanced the cytotoxicities of the related compounds (8~20).

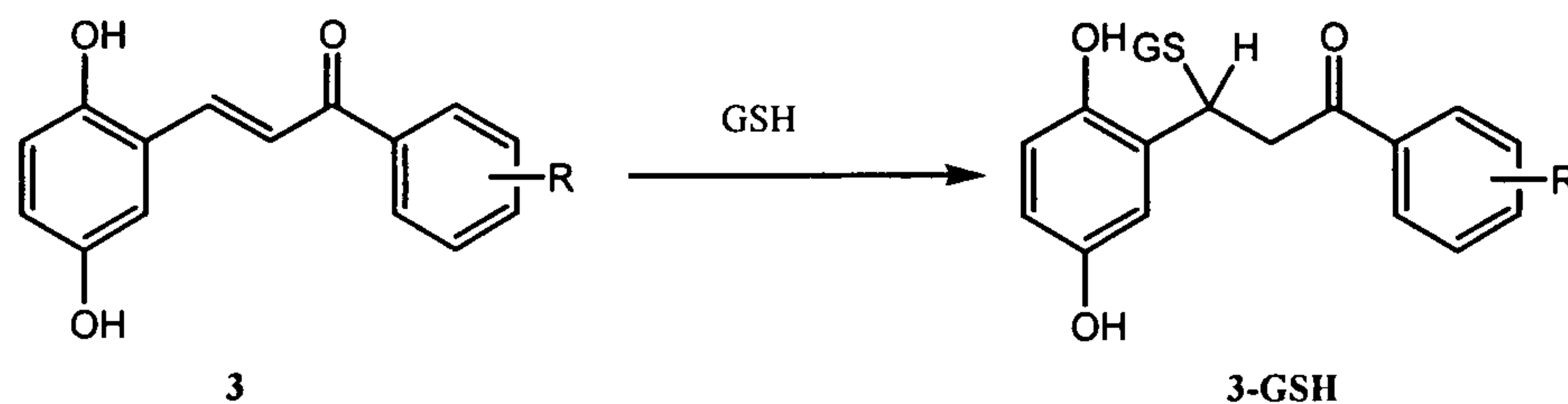


Fig. 2. Thiol-alkylation of chalcones 3 leading to adducts at  $\beta$ -position

For other compounds 22~27 and 38~40, an electron-releasing group on the A-ring was expected to retard the thiol-alkylation reaction, thus decreased their cytotoxicities. Actually however, they exhibited comparable bioactivities with 7 and other halogenated 2,5-dihydroxychalcones. It has been reported that a number of chalcones showed antimetabolic activities (Edwards *et al.*, 1990) and protein tyrosine kinase (TK) inhibitory activities (Gazit *et al.*, 1991). Mitosis inhibition is a mechanism of action of many currently used anticancer agents like combretastatin A-4, vincristine and vinblastine (Pratt *et al.*, 1994) and inhibition of tyrosine kinases is one attractive approach for cancer treatment in recent years (Kolibaba and Druker, 1997). It is highly possible that the 2,5-dihydroxychalcones synthesized might also exert antimetabolic and/or TK inhibitory activities. It could be postulated that, in the compounds 22~27 and 38~40, these activities likely produced predominant effects over the retardative effects of the single electron-releasing group substituted on the A ring, resulting in the cytotoxicities comparable to 7 and other halogenated 2,5-dihydroxychalcones. Nevertheless, with a few exceptions in compounds 31 and 42-43, the retardative effects of the electron-releasing groups could be realized in chalcones with multiple

electron-donating substituents, as demonstrated by 32~37 and 44-45, where a substantial decrease in the cytotoxicity compared to 7 was observed. Replacement of the phenyl ring by extended or heteroaromatic rings (49~53) produced derivatives with retained cytotoxicities. Among the synthesized compounds, only 2'-chlorinated chalcone 9 showed a marginal cytotoxic selectivity on HUVECs over the three cancer cell lines tested. Compound 9 also was the most potent in the series with  $IC_{50}$  values as low as 0.31  $\mu\text{g/mL}$ . Unfortunately however, the bioactivity of the whole series was found to be of nearly one magnitude lower than that of compound 2. Despite that the 2,5-dihydroxychalcones are obviously more stable than 2 in term of hydrolysis and their cytotoxic profile presented here should be sufficiently interesting and encouraging for this class of compounds to be further explored as anticancer agents.

### Experimentals

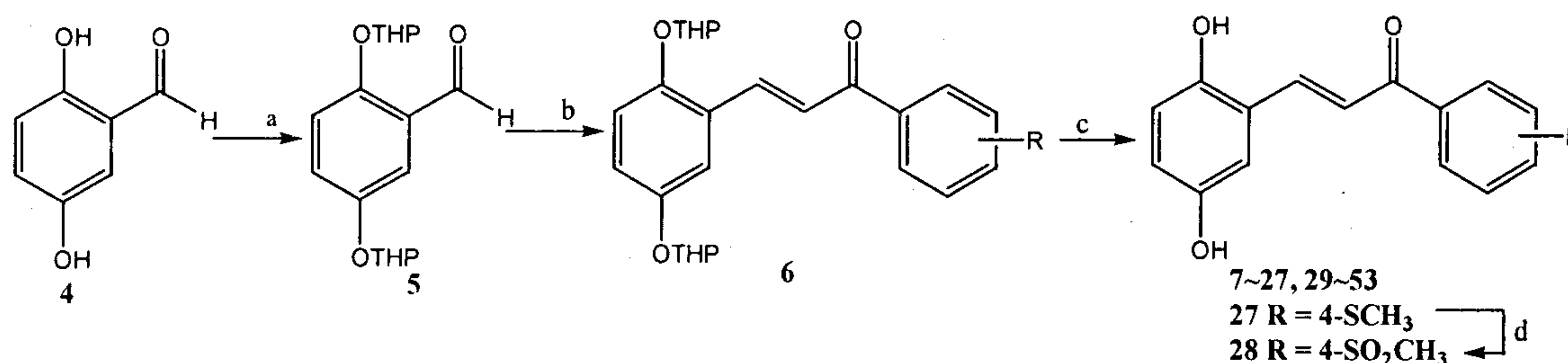
Chemicals and solvents were reagent grade and used without further purification. Tumor cell lines were obtained from a cancer cell bank at the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB). Media, Sera and other reagents used for cell culture were purchased from GIBCO Co. Ltd. Melting points were determined

on an electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Jasco Report-100 IR spectrometer.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded on a Varian-Gemini 90 MHz spectrometer using tetramethylsilane as internal standard. Mass spectra were determined with a Jeol JMS-D-100 mass spectrometer. Elemental analyses were within  $\pm 0.4\%$  of the theoretical values, unless otherwise noted. Analytical thin layer chromatography was

performed on a plastic sheet (0.2 mm) precoated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (E. Merck). Silica gel 60 (70-230 mesh, E. Merck) was used for column chromatography.

### Synthesis of compounds

Most of chalcones were synthesized by a Claisen-Schmidt condensation of appropriate acetophenones with 2,5-dihydroxybenzaldehyde, protected as tetrahydropyranyl ether (Scheme 1).



**Scheme 1.** a) Pyridinium *p*-toluene sulfonate, 3,4-dihydro-2*H*-pyran, MC, rt, 5h. b) ArCOCH<sub>3</sub>, Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, MeOH, 40 °C, 12 h. c) *p*-toluene sulfonic acid, MeOH, 5 h. d) *m*-CPBA, MC, rt, 4 h.

#### (*E*)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-phenyl-2-propene-1-one (7)

2,5-Dihydroxybenzaldehyde (3.45 g, 25 mmol) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (0.15 g, 0.6 mmol) were stirred at room temperature for 0.5 h in methylene chloride (MC, 100 mL), and then 3,4-dihydro- $\alpha$ -pyran (13 mL) in MC (20 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, then washed twice with water, dried and evaporated *in vacuo*. The residue yielded crude 2,5-bis(tetrahydropyran-2-yloxy)benzaldehyde (2,5-DHPB). Crude 2,5-DHPB, acetophenone (2.6 g, 25 mmol) and barium hydroxide octahydrate (8.15 g, 25 mmol) were dissolved in MeOH (100 mL). The reaction mixture was stirred for 12 h at 40 °C and then evaporated *in vacuo*. Water (100 mL) was added and the mixture was neutralized with HCl (1M, 35 mL) and extracted with MC. The organic layer was separated, washed with water, dried and evaporated *in vacuo*. The residue yielded crude (*E*)-3-[2,5-bis(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-1-phenyl-2-propene-1-one (2,5-DHPC). Crude 2,5-DHPC and *p*-toluenesulfonic acid (0.2 g, 1.05 mmol) were dissolved in MeOH (100 mL). The reaction mixture was stirred for 4 h at room temperature, and then evaporated *in vacuo*. Water (100 mL) was added and the resulting mixture was neutralized with 5% NaHCO<sub>3</sub> (50 mL), and

extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with water, dried and concentrated *in vacuo*. The residue was purified on silica gel column eluted with hexane-EtOAc (4:1) to give 7 (4.2 g, 45%) as pale yellow solids; m.p. 187-190 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1640, 1580 cm<sup>-1</sup>; MS (CIMS) *m/z* 240 (M<sup>+</sup>);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.17 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 7.55~7.89 (5H, m), 7.39 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 6.58~6.85 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

The following chalcones were synthesized by the same procedure described above.

(*E*)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2-fluorophenyl)-2-propene-1-one (8). Yellow crystals; Yield 51%; m.p. 135-137 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1630, 1580 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.24 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.51~7.97 (2H, m), 7.56 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.15~7.32 (2H, m), 6.61~6.83 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FO<sub>3</sub>) C, H.

(*E*)-1-(2-Chlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (9). Yellow crystals; Yield 36%; m.p. 113-115 °C; IR (KBr) 3320, 1680, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.21 (1H, d, *J* = 16.0), 7.49~7.95 (2H, m), 7.43 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.21~7.37 (2H, m), 6.55~6.78 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>) C, H.

(*E*)-1-(3-Chlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxy-

**phenyl)-2-propene-1-one (10).** Yellow crystals; Yield 47%; m.p. 125-127 °C; IR (KBr) 3330, 1680, 1640, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.17 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 7.40~7.85 (5H, m), 6.76~6.97 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(4-Chlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (11).** Yellow crystals; Yield 43%; m.p. 151-152 °C; IR (KBr) 3340, 1675, 1635, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.08 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.81 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.45 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.69~6.95 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(2-Bromophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (12).** Reddish crystals; Yield 42%; m.p. 113-115 °C; IR (KBr) 3320, 1680, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.15 (1H, d, *J* = 16.5), 7.51~7.86 (2H, m), 7.41 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 7.15~7.41 (2H, m), 6.50~6.99 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(4-Bromophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (13).** Reddish crystals; Yield 45%; m.p. 143-145 °C; IR (KBr) 3330, 1680, 16340 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.18 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.75 (2H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.39 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.73~6.99 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-2-propene-1-one (14).** Reddish crystals; Yield 37%; m.p. 157-159 °C; IR (KBr) 3350, 1660, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.18 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.39 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.66~6.87 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>7</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-nitrophenyl)-2-propene-1-one (15).** Reddish crystals; Yield 41%; m.p. 139-141 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1630, 1575 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.06 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.84 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.45 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 6.67~6.89 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>) C, H, N.

**(E)-1-(2,5-Difluorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (16).** Reddish crystals; Yield 44%; m.p. 127-129 °C; IR (KBr) 3330, 1680, 1615, 1590 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.07 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.47~7.85 (2H, m), 7.41(1H, d, *J* = 16.0 Hz), 6.65~6.89 (4H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(3,5-Difluorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (17).** Reddish crystals; Yield 41%; m.p. 115-117 °C; IR (KBr) 3340, 1680,

1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.03 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.40(1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 2.1 Hz ), 6.47~6.74 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(2,3-Dichlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (18).** Reddish crystals; Yield 37%; m.p. 148-149 °C; IR (KBr) 3345, 1680, 1610, 1590 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.17 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.25~7.56 (4H, m), 6.51~6.82 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (19).** Reddish crystals; Yield 42%; m.p. 131-132 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1640, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.11 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 7.38~7.55 (3H, m), 7.14 (1H, d, *J* = 9.4 Hz ), 6.56~6.84 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-(3,5-Dichlorophenyl)-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (20).** Reddish crystals; Yield 45%; m.p. 124-126 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1630, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.07 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.65 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.42(1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 2.3 Hz ), 6.51~6.79 (3H, m); Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-1-[(5-Bromo-2-methoxy)phenyl]-3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (21).** Reddish crystals; Yield 64%; m.p. 163-164 °C; IR (KBr) 3340, 2910, 1670, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.03 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 7.21~7.52 (3H, m), 6.41~6.84 (4H, m); Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>4</sub>) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2-methylphenyl)-2-propene-1-one (22).** Yellow crystals; Yield 57%; m.p. 171-173 °C; IR (KBr) 3340, 2910, 1680, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.19 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.39~7.71 (5H, m), 6.63~6.84 (3H, m); Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-methylphenyl)-2-propene-1-one (23).** Yellow crystals; Yield 65%; m.p. 168-170 °C; IR (KBr) 3320, 2915, 1680, 1620, 1575 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.01 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.29 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.59~6.87 (3H, m); Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-2-propene-1-one (24).** Reddish crystals; Yield 68%; m.p. 154-155 °C; IR (KBr) 3340, 2920, 1680, 1620, 1580 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ



8.27 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz), 7.40~7.74 (4H, m), 6.63~6.92 (4H, m), 3.91 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{14}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3-methoxyphenyl)-2-propene-1-one (25).** Reddish crystals; Yield 71%; m.p. 137-139 °C; IR (KBr) 3350, 2915, 1675, 1615, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.31 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz), 7.01~7.38 (4H, m), 7.41 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz), 6.47~6.71 (3H, m), 3.89 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{14}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-2-propene-1-one (26).** Reddish crystals; Yield 69%; m.p. 157-159 °C; IR (KBr) 3330, 2920, 1680, 1610, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.11 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 7.68 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.41 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 6.97 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 6.54~6.85 (3H, m), 3.89 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{14}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-thiomethylphenyl)-2-propene-1-one (27).** Reddish crystals; Yield 60%; m.p. 119-120 °C; IR (KBr) 3340, 2915, 1675, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.01 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 7.59 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.39 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 6.87 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 6.55~6.87 (3H, m), 3.98 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{14}O_3S$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-methylsulfonylphenyl)-2-propene-1-one (28).** Compound 22 (2 mmol, 598 mg) was dissolved in MC (20 mL). The resulting solution was cooled to 0 °C to which was added m-chloroperoxybenzoic acid (CPBA, 2.2 mmol, 345 mg). The mixture was stirred for 2 h and water (30 mL) was added. The reaction mixture was extracted with EA (50 mL x 2). The EA extracts were combined, concentrated and crystallized from hexane/EA to furnish the expected product as reddish crystals (528 mg). Yield 80%; m.p. 145-147 °C; IR (KBr) 3330, 2920, 1680, 1620, 1580, 1380  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.12 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 7.63 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 6.99 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.48~6.84 (3H, m), 3.23 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{14}O_5S$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,3-dimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (29).** Yellowish crystals; Yield 58%; m.p. 114-115 °C; IR (KBr) 3340, 2900, 1670, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.97 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 7.41 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 6.94~7.25 (3H, m), 6.45~6.79 (3H, m), 3.95 (3H, s), 3.84 (3H, s); Anal.

( $C_{17}H_{16}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (30).** Yellowish crystals; Yield 67%; m.p. 158-160 °C; IR (KBr) 3330, 2910, 1680, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz), 57.61 (1H, m), 7.38 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz), 6.39~6.75 (5H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{16}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (31).** Yellowish crystals; Yield 71%; m.p. 138-141 °C; IR (KBr) 3320, 2915, 1690, 1610, 1590  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.99 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.37 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.25 (1H, m), 6.51~6.82 (5H, m), 3.92 (3H, s), 3.90 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{16}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (32).** Yellowish crystals; Yield 77%; m.p. 155-156 °C; IR (KBr) 3340, 2920, 1690, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.01 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 7.38 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 7.29 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.26 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.7$  Hz), 6.94 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.51~6.82 (3H, m), 3.93 (3H, s), 3.92 (3H, s); Anal. ( $C_{17}H_{16}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (33).** Yellowish crystals; Yield 71%; m.p. 171-172 °C; IR (KBr) 3320, 2915, 1680, 1625, 1575  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.45 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.28 (2H, d,  $J = 2.5$  Hz), 6.84 (1H, t,  $J = 2.5$  Hz), 6.53~6.82 (3H, m), 3.91 (6H, s); Anal. ( $C_{17}H_{16}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (34).** Yellowish crystals; Yield 59%; m.p. 128-130 °C; IR (KBr) 3340, 2910, 1670, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.95 (1H, d,  $J = 15.5$  Hz), 7.58 (1H, d,  $J = 15.5$  Hz), 7.29 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 6.66 (1H, dd,  $J = 7.8, 2.4$  Hz), 6.51 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 6.44 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.41 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 3.95 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s); Anal. ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (35).** Yellowish crystals; Yield 77%; m.p. 149-151 °C; IR (KBr) 3330, 2920, 1680, 1610, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.47 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.27 (1H, s), 6.72 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz), 6.61 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.5$  Hz), 6.51 (1H, s),

6.44 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 3.94 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s); Anal. ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (36).** Yellowish crystals; Yield 66%; m.p. 171-173 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1620, 1575  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.67 (2H, s), 6.39~6.65 (3H, m), 3.87 (6H, s), 3.85 (3H, s); Anal. ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propene-1-one (37).** Yellowish crystals; Yield 66%; m.p. 171-173 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1620, 1575  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.67 (2H, s), 6.39~6.65 (3H, m), 3.87 (6H, s), 3.85 (3H, s); Anal. ( $C_{18}H_{18}O_6$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propene-1-one (38).** Reddish crystals; Yield 45%; m.p. 159-161 °C; IR (KBr) 3360, 1680, 1625, 1590  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 7.44 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 6.84~7.42 (4H, m), 6.66 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz), 6.52 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 6.43 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.1$  Hz); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3-hydroxyphenyl)-2-propene-1-one (39).** Reddish crystals; Yield 37%; m.p. 145-147 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1610, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.78 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.41 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.32 (1H, s), 7.00~7.38 (3H, m), 6.45~6.75 (3H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propene-1-one (40).** Reddish crystals; Yield 41%; m.p. 127-129 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1610, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 7.55 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz), 7.39 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 6.94 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz), 6.53~6.79 (3H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_4$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-[(2-hydroxy-5-methoxy)phenyl]-2-propene-1-one (41).** Yellowish crystals; Yield 41%; m.p. 119-121 °C; IR (KBr) 3340, 2910, 1680, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.39 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 6.88~7.21 (3H, m), 6.44~6.75 (3H, m), 3.94 (3H, m); Anal. ( $C_{16}H_{14}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-[(2-hydroxy-6-methoxy)phenyl]-2-propene-1-one (42).** Yellowish crystals; Yield 57%; m.p. 140-141 °C;

IR (KBr) 3345, 2915, 1680, 1625, 1575  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.01 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz), 6.76~7.00 (3H, m), 6.43~6.75 (3H, m), 3.89 (3H, m); Anal. ( $C_{16}H_{14}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,3-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (43).** Yellowish crystals; Yield 29%; m.p. 125-127 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1620, 1580  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.11 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.35 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.85~7.21 (3H, m), 6.51~6.82 (3H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (44).** Yellowish crystals; Yield 38%; m.p. 141-142 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1620, 1575  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.02 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.41 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.39~6.82 (5H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (45).** Yellowish crystals; Yield 35%; m.p. 144-145 °C; IR (KBr) 3345, 1680, 1610, 1590  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.99 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 7.41 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 6.88~7.02 (3H, m), 6.44~6.75 (3H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (46).** Yellowish crystals; Yield 28%; m.p. 111-113 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1615, 1585  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.10 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz), 7.45 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 6.88~7.11 (3H, m), 6.51~6.87 (3H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,5-dihydroxyphenyl)-2-propene-1-one (47).** Yellowish crystals; Yield 31%; m.p. 131-132 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1610, 1590  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.05 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz), 7.40 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz), 6.71 (2H, s), 6.50~6.82 (4H, m); Anal. ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propene-1-one (48).** Yellowish crystals; Yield 68%; m.p. 111-113 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1615, 1585  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 5.91 (2H, s), 6.84~7.10 (3H, m), 6.51~6.83 (3H, m); Anal. ( $C_{16}H_{12}O_5$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(4-phenylphenyl)-2-propene-1-one (49).** Yellowish

crystals; Yield 57%; m.p. 145-146 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1610, 1590  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.99 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.79~7.40 (9H, m), 6.50~6.78 (3H, m); Anal. ( $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{O}_3$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(2-naphthyl)-2-propene-1-one (50).** Yellowish crystals; Yield 65%; m.p. 147-148 °C; IR (KBr) 3350, 1680, 1620, 1580  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.01 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.61~8.00 (5H, m), 7.51 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.22~7.49 (2H, m), 6.47~6.79 (3H, m); Anal. ( $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(pyridin-4-yl)-2-propene-1-one (51).** Yellowish crystals; Yield 20%; m.p. 111-112 °C; IR (KBr) 3330, 1680, 1620, 1580  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.43~8.56 (2H, m), 8.01~8.12 (2H, m), 7.99 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.70 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 6.51~6.71 (3H, m); Anal. ( $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(indol-3-yl)-2-propene-1-one (52).** Yellowish crystals; Yield 25%; m.p. 121-123 °C; IR (KBr) 3420, 3340, 1680, 1620, 1580  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.23~8.26 (1H, m), 8.00 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 7.45~7.47 (1H, m), 7.02~7.35 (2H, m), 6.72 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz), 6.51~6.71 (3H, m); Anal. ( $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ ) C, H.

**(E)-3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-1-(quinolin-2-yl)-2-propene-1-one (53).** Reddish crystals; Yield 27%; m.p. 118-120 °C; IR (KBr) 3340, 1680, 1615, 1575  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.40~8.43 (2H, m), 7.85~8.01 (2H, m), 7.83 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.45~7.55 (2H, m), 6.49~6.75 (4H, m); Anal. ( $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ ) C, H.

**Cytotoxicity assay:** *In vitro* cytotoxicity against tumor cell lines were measured using SRB's method as described previously (Skehan *et al.*, 1990).

## References

- 1). Ahn, B. Z., and Sok, D. E. *Curr. Pharm. Design*, 2, 247-262 (1996);
- 2). Edwards, M. L., Stemerick, D. M., and Sunkara, P. S. *J. Med. Chem.*, 33, 1948-1954 (1990);
- 3). Folkman, J. *N. Engl. J. Med.*, 285, 1182-1186 (1971);
- 4). Gastl, G., Hermann, T., Steurer, M., Zmijia, J., Gunsilius, E., Unger, C., and Kraft, A. *Oncology* 54, 177-184 (1997);
- 5). Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C., and Levitzki, A. *J. Med. Chem.*, 34, 1896-1907 (1991);
- 6). Kolibaba, K. S., and Druker, B. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1333, 217-248 (1997);
- 7). Lee, K. H., Huang, E. S., Piantadosi, C., Pagano, J., Geissman, T. A. *Cancer Res.*, 31, 1649-1654 (1971);
- 8). Lee, K. H., Hall, I. H., Starness, C. D., Elgebaly, S. A., Waddell, T. G., Hadgraft, R. T., Ruffler, C. G., and Weidner, I. *Science* 196, 533-536 (1977);
- 9). Nam, N. H., Huong, H. T. T., Kim, H. M., and Ahn, B. Z. *Kor. J. Pharmacogn.*, 31, 77-81 (2000);
- 10). Nam, N. H., You, Y. J., Kim, Y., Hong, D. H., Kim, H. M., and Ahn, B. Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1173-1176 (2001);
- 11). Ollinger, K., Llopis, J., and Cadenas, E. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 275, 514-530 (1989);
- 12). Pratt, W. B., Ruddon, R. W., Ensminger, W. D., and Maybaum, J., *The anticancer drugs*. Oxford University Press, Oxford, pp. 183-198, 1994.

*Tap chí Dược liệu, tập 9, số 2/2004 (trang 63-68)*

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN ĐẾN THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA VỊ THUỐC MẠCH MÔN( thông báo số 1)

*Vũ Văn Điền, Vũ Thị Trám, Nguyễn Phương Mai - Đại học dược Hà Nội  
(Nhận bài ngày 26 tháng 11 năm 2003)*

### Summary

**Influence of Processing on Chemical Composition and Biological Activities of Radix Ophiopogi**

*Chemical composition and biological activities of intact and coreless Ophiopogon roots, in the forms of fresh, direct roasted or sand-roasted samples, has been evaluated. The study results showed*

that these samples contained saponosides, flavonoids, amino acids, carotenoids, fats, sugars and demonstrated 68,6- 79,6% inhibition of cough induced by ammoniac in mice. No effect was recorded in the clearing of phlegm induced by Phenol Sulfon Phtalein (PSP). Elimination of the core did not affect the contents of these chemicals as well as cough-reducing property of the samples significantly, suggesting that there is no need to core the roots when processing. No difference in chemical and biological activities was observed between direct and sand-roasted samples, indicating that the former is more convenient for use.

*Key words:* *Ophiopogon japonicus*, Chemical Composition, Cough, Processing.

## 1. Đặt vấn đề

Mạch môn là vị thuốc được dùng nhiều trong y học cổ truyền với tác dụng bổ âm, nhuận phế, sinh tân, thanh tâm, lợi sữa, nhuận tràng [3,7]. Khi sử dụng, dược liệu thường được chế biến theo nhiều cách như bỏ lõi, dùng sống, sao vàng, sao cách cát [5,7]. Để đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp chế biến đến thành phần hoá học và tác dụng sinh học liên quan đến công năng chủ trị của mạch môn, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài này và thu được một số kết quả bước đầu.

## II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu, hoá chất, súc vật thí nghiệm

- Mạch môn thu tại Thanh Sơn -Phú Thọ 9/2002

- Hoá chất thuốc thử: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích hoá học do phòng giáo tài Đại học Dược Hà Nội cung cấp

- Súc vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng, khoẻ mạnh bình thường đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, trọng lượng 18-22g, mua ở Hà Nội

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chế biến

+ Mạch môn sống: Dược liệu đào về, cắt bỏ rễ con, rửa sạch, phơi hoặc sấy khô.

+ Mạch môn sao vàng: Theo phương pháp sao vàng trực tiếp.

+ Mạch môn sao cách cát: Sao qua chất trung gian là cát sạch.

+ Mạch môn bỏ lõi: Dược liệu được làm mềm rồi rút bỏ lõi, dùng sống, sao vàng hoặc sao cách cát như trên [5]. Để riêng lõi để nghiên cứu.

#### 2.2.2. Hoá học:

##### a- Định tính:

+ Định tính các nhóm chất trong mẫu mạch môn sống và lõi. Dùng các phương pháp hoá thực vật kinh điển và các thuốc thử đặc hiệu của từng nhóm chất để xác định [2].

+ Phân tích saponosid toàn phần bằng sắc kí lớp mỏng (SKLM): Tiến hành song song trên các mẫu sống, sao vàng, sao cách cát và lõi, dùng bản mỏng tráng sẵn GF254 của hãng Merck, khai triển trên một số hệ dung môi, chọn hệ tách tốt nhất ghi lại kết quả.

b- Định lượng: Saponosid, đường tự do, acid amin:

+ Saponosid: Bằng phương pháp cân.

+ Đường khử: Bằng phương pháp đo quang với thuốc thử Ortho toluidin, đường chuẩn glucose {5}.

+ Acid amin: Bằng máy phân tích tự động HPLC, HP-1090 amino quant series II.

#### 2.2.3. Thử tác dụng sinh học:

a- Thử tác dụng ức chế phản xạ ho: Theo phương pháp xông hơi amoniac [1,4,6].

b- Thử tác dụng long đờm: Theo phương pháp đo nồng độ đỏ phenol bài tiết qua phế, khí quản súc vật thí nghiệm. So sánh nồng độ đỏ phenol bài tiết ra giữa lô thử và lô đối chứng để đánh giá kết quả [1,4].

## III. Kết quả và bàn luận

### 3.1- Chế biến các mẫu mạch môn để nghiên cứu.

+ Mạch môn dùng sống: Mạch môn đã sơ chế, phơi hoặc sấy khô ở 60-70°C cho dẻo (ký hiệu S).

+ Mạch môn sao vàng: Dùng mạch môn sống làm ẩm đến mềm, rút bỏ lõi, sấy hoặc phơi khô rồi đem sao ở 100-120°C cho thơm và ngọt (ký hiệu SV).

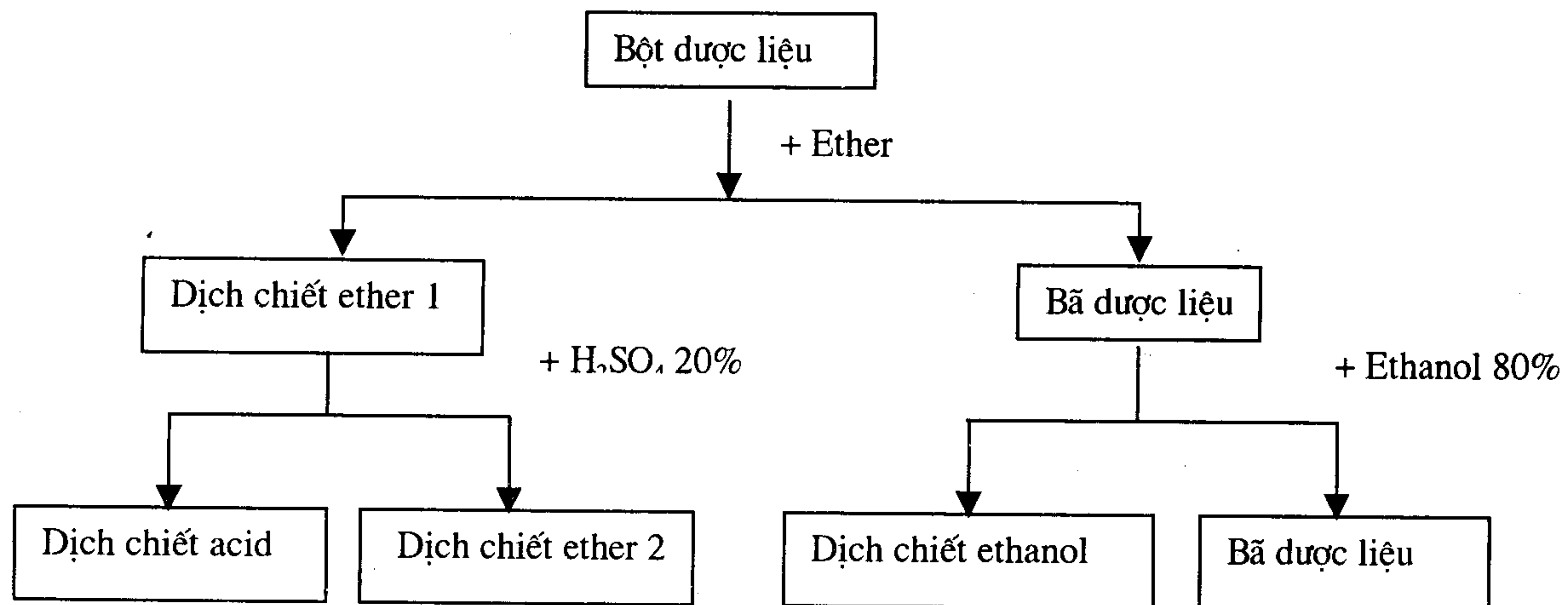
+ Mạch môn sao cách cát: Dùng mạch môn đã rút lõi, phơi sấy khô rồi sao với cát sạch đến khi mạch môn phồng đều xốp thơm; sàng bỏ cát (ký hiệu SCC).

+ Lõi mạch môn: phơi khô để nghiên cứu (ký hiệu L).

### 3.2- Hoá học:

a- Định tính các nhóm chất trong mạch môn:

Dược liệu được chiết để định tính theo sơ đồ sau:



- Dịch chiết acid: Để định tính alkaloid.
- Dịch chiết ether 2: Để định tính carotenoid, antranoid, chất béo, flavonoid.
- Dịch ethanol: Để định tính alkaloid, flavonoid, antranoid, saponosid, coumarin, tanin, đường khử, acid amin.

Các phản ứng được tiến hành song song hai mẫu sống và lõi. Kết quả hai mẫu có thành phần giống nhau là saponosid, flavonoid, đường, chất béo, carotenoid, acid amin.

*b-Định lượng và phân tích saponosid toàn phần:*

+ *Định lượng:* Cân chính xác 15g bột dược liệu, loại tạp bằng ether dầu hoả trong 12 giờ. Chiết kiệt saponosid bằng methanol 80% (kiểm tra bằng thuốc thử vanilin trong acid sulfuric đặc). Thu hồi methanol dưới áp lực giảm, hoà cạn vào nước nóng, chiết lại saponosid bằng n-butanol, thu hồi n-butanol được cạn, sấy khô ở 80°C đến khối lượng không đổi, cân được kết quả. Tiến hành với các mẫu S, SV, SCC, L, mỗi mẫu làm 3 lần, lấy kết quả trung bình. Kết quả được tóm tắt ở bảng 1.

**Bảng 1.** Hàm lượng saponosid toàn phần của các mẫu mạch môn(%)

Mẫu	S	SV	SCC	L
Hàm lượng(%)	3,1	1,95	0,93	2,25

+ *Phân tích saponosid toàn phần bằng sắc kí lớp mỏng(SKLM):*

Cặn saponosid định lượng được phân tích trên bản mỏng trắng sẵn, khai triển trên 8 hệ dung môi khác nhau, hiện màu bằng dung dịch vanilin 1%

trong acid sulfuric. Ở đây, chúng tôi mới chỉ phân tích được 3 mẫu S, SCC và L. Kết quả hệ dung môi n-butanol bão hoà nước-chloroform-ethanol (4:2:1) tách tốt hơn cả, số vết được ghi ở bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả SKLM saponosid của các mẫu mạch môn

Mẫu	Số vết	Rf x 100	Màu	Mẫu	Số vết	Rfx 100	Màu
Mẫu S	1	18,2	Xanh tím	Mẫu SCC	4	44,7	Xanh tím
	2	26,0	Xanh tím		5	54,0	Xanh tím
	3	32,5	Xanh tím		6	63,1	Xanh tím
	4	35,1	Xanh tím		7	77,6	Xanh tím
	5	45,5	Xanh tím	8	92,1	Tím	
	6	55,8	Xanh tím	Mẫu L	1	22,4	Xanh tím
	7	62,3	Xanh tím		2	32,9	Xanh tím
	8	72,7	Xanh tím		3	35,5	Xanh tím
	9	93,5	Tím		4	52,6	Xanh tím
Mẫu SCC	1	22,4	Xanh tím		5	63,1	Xanh tím
	2	30,3	Xanh tím		6	77,6	Xanh tím
	3	35,5	Xanh tím		7	90,8	Tím

Mẫu S: 9 vết, mẫu L: 7 vết, mẫu SCC: 8 vết.

c- Định lượng đường tự do và acid amin :

+ Định lượng đường (5):

Chiết đường bằng nước, tạo màu với thuốc thử Ortho toluidrin, đo quang ở bước sóng 630nm với dung dịch chuẩn glucose 0,1%, hàm lượng đường được tính theo công thức:

$$X = \frac{D_T}{D_C \cdot P \cdot (10 - B)} \cdot 100$$

Trong đó:  $D_T$ : mật độ quang của ống thử  
 $D_C$ : Mật độ quang ống chuẩn  
 $P$ : Lượng dược liệu đem thử (g)  
 $B$ : Độ ẩm dược liệu

Kết quả: Hàm lượng của mẫu S là 1,61%, SV: 2,55%; SCC: 2,53%. Sau khi chế biến, hàm lượng đường cao hơn có thể do sao dưới tác dụng của nhiệt độ đã phân huỷ các đường kép hoặc cắt mạch đường trong các glycosid hoặc tinh bột thành đường đơn.

+ Định lượng acid amin:

Trên máy HPLC với chương trình dẫn xuất hoá tiền cột tự động gồm 5µl đệm borat 0,4N (pH: 10,4); 1ml OPA (o-phtadialdehyd); 1ml FMC (9-fluorenyl methyl chloroformat) nồng độ 250 pmol. Trộn đều bơm vào cột. Quy trình sắc kí ở nhiệt độ không đổi là 40°C, tốc độ chảy 0,45 ml/phút; 0,8 ml/phút. Kết quả được ghi ở bảng 2.

**Bảng 2.** Hàm lượng acid amin toàn phần trong các mẫu mạch môn (g%)

STT	Tên acid amin	S	SCC	STT	Tên acid amin	S	SCC
1	Aspartic acid	0,24	0,12	10	Cystein+cystin	0,05	0,05
2	Glutamic acid	0,23	0,14	11	Valin	0,09	0,05
3	Serin	0,17	0,09	12	Methionin	0,05	0,05
4	Histidin	-	-	13	Phenyl alanin	0,14	0,06
5	Glycin	0,18	0,09	14	Isoleucin	0,07	0,04
6	Threonin	0,13	0,08	15	Leucin	0,14	0,09
7	Alanin	0,11	0,05	16	Lycin	0,09	0,01
8	Arginin	0,27	0,10	17	Prolin	0,05	0,05
9	Tyrosin	0,08	0,05		Tổng số	2,09%	1,10%

Rễ mạch môn có 17 acid amin, trong đó, 7 chất cần thiết cho cơ thể. Hàm lượng acid amin sau khi sao cách cát giảm đi hơn một nửa, có thể do sao ở nhiệt độ cao (200-250°C) acid amin bị phân huỷ một phần.

### 3.3- Thử tác dụng sinh học

3.3.1- Thử tác dụng long đờm: Dùng nước sắc 1:1 của các mẫu S, SV, SCC, L để thử. Chuột được chia ngẫu nhiên làm 5 lô mỗi lô 10 con. Ở lô 1 (lô đối chứng) cho chuột uống nước muối sinh lí; ở lô 2, 3, 4, 5 cho uống nước sắc 1:1 lần lượt các mẫu S, SV, SCC, L với liều 5ml/100g chuột. Sau khi cho chuột uống thuốc 1 giờ, tiêm phúc mạc 0,5ml dung dịch đỏ phenol 0,25%, sau 30 phút tiêm một lần nữa. Nửa giờ sau giết chuột, bóc lộ khí quản, rửa khí quản bằng NaHCO<sub>3</sub> 5%, gộp dịch rửa lại, đem đo quang với dung dịch đỏ phenol chuẩn có nồng độ 0,1µ g/ml. Nồng độ đỏ phenol trong dung dịch rửa khí quản được tính theo công thức:

$$C_x = \frac{D_o}{D_x \cdot C_o \cdot 2}$$

Trong đó,  $C_x$  là nồng độ dịch rửa phế quản;  $C_o$ : Nồng độ đỏ phenol chuẩn 0,1µ g/ml;  $D_x$ : Mật độ quang của dịch rửa phế quản;  $D_o$ : Mật độ quang của đỏ phenol chuẩn 0,1µ g/ml.

Kết quả cho thấy các mẫu thử đều không thể hiện tác dụng long đờm ở liều 25g/kg chuột nhất trắng so với lô đối chứng  $P > 0,05$

### 3.3.2- Thử tác dụng giảm ho:

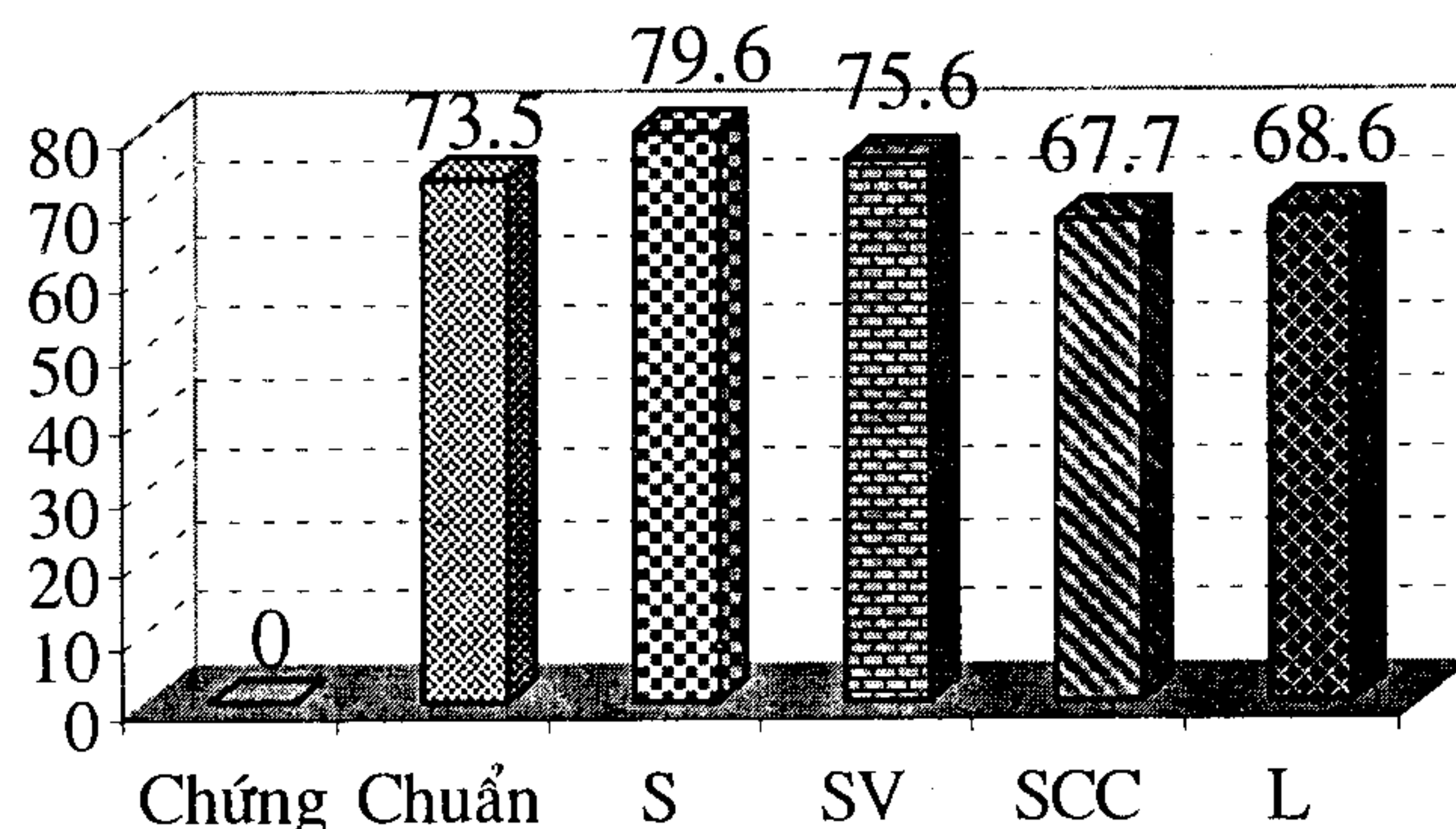
Chuột được chia làm 6 lô mỗi lô 10 con. Ở lô đối chứng, cho chuột uống nước muối sinh lí, ở lô thuốc chuẩn cho uống dung dịch terpen codein 0,4%, ở các lô thử cho uống nước sắc 1:1 của các mẫu S, SV, SCC, L. Tất cả chuột ở các lô đều được uống với liều 0,5ml/20g con. Sau khi cho chuột uống thuốc 1 giờ, cho xông hơi amoniac 45 giây, lấy ra đếm số lần ho trong 5 phút. Tỷ lệ ức chế ho

được tính theo công thức:

$$X = \frac{H_C - H_T}{H_C} \cdot 100$$

Trong đó, X là tỷ lệ ức chế ho (%);  $H_C$ : Số tiếng ho trung bình của lô đối chứng;  $H_T$ : Số tiếng ho trung bình của lô thử.

Kết quả được ghi ở hình 1



Hình 1: Tác dụng ức chế ho của các mẫu thử (%)

- Dịch nước sắc 1:1 của các mẫu thử đều có tác dụng giảm ho rõ rệt ở liều 25g/kg thể trọng so với lô đối chứng ( $P < 0,05$ ).

- Mẫu S, SV ức chế ho tương đương terpen codein  $P > 0,05$ , trong đó mẫu S, SV có tác dụng tốt hơn mẫu L và mẫu SCC ( $P < 0,05$ ).

- Như vậy, với mục đích chữa ho, không cần bỏ lõi và có thể dùng sống hoặc sao vàng sẽ tốt hơn sao cách cát.

- Những tác dụng này phần nào giải thích cho việc dùng mạch môn chữa ho trong y học cổ truyền.

- Ở các mẫu S, L trong thời gian được uống thuốc, chuột thường đại tiện nhiều, phân lỏng, dính bết vào lòng đuôi; có thể do mạch môn có tính hàn gây tiêu lỏng hoặc có tác dụng nhuận tẩy, còn ở mẫu SCC, không có hiện tượng này, có thể do nhiệt làm giảm tính hàn hoặc làm giảm tác dụng nhuận tẩy.

#### Nhận xét chung:

- Việc kiểm tra thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học cho thấy lõi mạch môn có thành phần hoá học và tác dụng sinh học tương tự như dược liệu bỏ lõi và dược liệu để cả lõi; vì vậy, khi chế biến, không cần bỏ lõi.

- Mẫu SV và SCC có thành phần hóa học và tác dụng sinh học như nhau; vì vậy, theo chúng tôi nên chế biến mạch môn theo phương pháp sao vàng trực tiếp thì tốt hơn, vì làm giảm được tính hàn không gây tiêu chảy và đơn giản dễ làm; còn nếu để sống, thuốc có vị ngái, không thơm, tính lạnh

để gây đầy bụng, sôi bụng, tiêu chảy.

- Tác dụng giảm ho ở đây là do ức chế phản xạ ho chứ không phải do long đờm. Điều này phù hợp với cách dùng mạch môn chữa ho trong y học cổ truyền là chữa ho nhiệt, ho khan không có đờm.

#### 4. Kết luận

- Thành phần hoá học của mạch môn có các nhóm chất là saponosid, flavonoid, đường khử, chất béo, carotenoid, acid amin.

- Mẫu mạch môn sống và mẫu lõi có thành phần hoá học giống nhau, chứa tất cả các nhóm chất trên.

- Hàm lượng đường tự do, saponosid toàn phần, acid amin toàn phần trong các mẫu có sự khác nhau nhưng không nhiều, cụ thể: Hàm lượng đường tự do của mẫu S là 1,61%, mẫu SV: 2,55%, mẫu SCC: 2,23%. Hàm lượng saponosid toàn phần của mẫu S là 3,01%, mẫu SV: 1,95%, mẫu L: 2,25%. Hàm lượng acid amin toàn phần của mẫu S: 2,09%, mẫu SCC: 1,10%. Đã xác định được hàm lượng 16 acid amin, trong đó có 7 chất cần thiết cho cơ thể.

- Các mẫu mạch môn ở dạng nước sắc 1:1 với liều 25g/kg thể trọng, có tác dụng ức chế phản xạ ho tương đương với terpen codein, liều 100mg/kg, với  $P > 0,05$  (S 79,6%, SV 75,6%, SCC 67,7%, L 68,6%, terpen codein 73,5%), không thể hiện tác dụng long đờm.

## Tài liệu tham khảo

1- Bộ môn dược lực Đại học dược Hà Nội (1994): Thực tập dược lực. Đại học dược Hà Nội in; 2)- Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Việt Tựu (1985): Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc. NXBYH; 3)- Trần Văn Kỳ (1997) Dược học cổ truyền. Tập 2. NXBTPHCM ; 4)- Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Minh Hải, Đỗ Nguyệt Nga (1983): Tạp chí Dược học số 6/83; 5)- Viện dược liệu: Tiêu chuẩn cơ sở thuốc Bidentin 1991; 6)- Viện YHCT Việt Nam (1993): Phương pháp bào chế và sử dụng đông dược. NXBYH; 7)- Kee chang Huang (1999): The pharmacology of chinese herbs. CRC Press, Boca raton London - New York - Washinton, D.C; 8)- The pharmacopoeia commission of PRC (1997): Pharmacopoeia of the People Republic of China. Chemical Industry Press, Beijing, China, Vol. II

## SÁCH MỚI:

### CÂY THUỐC VÀ ĐỘNG VẬT LÀM THUỐC Ở VIỆT NAM

Sách do tập thể tác giả gồm các nhà khoa học về y dược, hoá học, sinh học...có thâm niên nhiều năm nghiên cứu và tích lũy kinh nghiệm biên soạn trong 5 năm liên tục.

Bộ sách mang sắc thái tài nguyên, chứa đựng những thông tin toàn diện, đầy đủ nhất về dược liệu được cập nhật đến năm 2002 từ nhiều nguồn trong nước và trên thế giới. sách cũng tổng hợp kinh nghiệm sử dụng cây thuốc, động vật làm thuốc trong y học cổ truyền của Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ và nhiều nước khác.

Nội dung giới thiệu 920 cây và 80 con được lựa chọn từ hơn 3800 loài thực vật và 400 động vật làm thuốc đã biết. Mỗi cây, con làm thuốc là một chuyên luận có đủ các phân danh pháp, mô tả phân loại, phân bố, sinh thái, trồng trọt, bộ phận dùng, chế biến, thành phần hoá học, dược lý thực nghiệm, dược lý lâm sàng, tính vị, công năng, công dụng và các bài thuốc. Tranh vẽ cây và động vật làm thuốc được thể hiện rất công phu, có tính khoa học và nghệ thuật cao. Ngoài danh pháp khoa học và tên thông dụng, còn có tên gọi theo từng dân tộc sống ở miền núi của ba miền đất nước và tên nước ngoài (Anh, Pháp).

"Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam" là một bộ sách quý và cần thiết cho mọi người ở mọi trình độ, một cẩm nang cho những người làm nghề chữa bệnh cứu người. Sách có cấu trúc khoa học, dễ tra cứu như một cuốn từ điển, khổ sách 20,5 cm x 29,5 cm, in làm 2 tập, mỗi tập gồm 460 cây thuốc và 40 động vật làm thuốc.

Sách do Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội ấn hành. Bìa, sơ mi và ruột sách được in trên giấy ngoại, trình bày đẹp. Sách đang có bán ở Nhà sách 70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội và các nhà sách khác trong cả nước. Tập I: 1138 trang, giá 260.000 đồng; tập II: 1256 trang, giá 280.000 đồng.