



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.139

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CAO CHIẾT ETHYL ACETATE TỪ CÂY BA CHÈ *Desmodium triangulare* (Retz.) Merr

Mai Phương Trang¹, Trần Thị Hồng Nhung², Nguyễn Ngọc Hiếu³, Lê Thế Tâm⁴, Vũ Đình Hoàng¹, Võ Thị Kiều Anh^{5,6}, Lê Đăng Quang^{5,6*}, Nghiêm Đức Trọng⁷, Nguyễn Thị Duyên⁸, Bùi Thị Thu Trang², Phạm Gia Vũ^{5,6}, Nguyễn Cường Quốc⁹ và Trần Quang Đệ^{9*}

¹Bộ môn Hóa dược và Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Khoa Công nghệ Hóa học, Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Khoa Dược, Trường Đại học Phenika

⁴Viện công nghệ hóa sinh và Môi trường, Đại học Vinh

⁵Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁶Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁷Bộ môn Thực vật, Trường Đại học Dược Hà Nội

⁸Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

⁹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Đăng Quang (email: ledangquang2011@gmail.com);

Trần Quang Đệ (email: tqde@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 22/06/2022

Ngày duyệt đăng: 28/06/2022

Title:

Chemical constituents of ethyl acetate extract from *Desmodium triangulare* (Retz.) Merr

Từ khóa:

Cây ba chẽ, HPLC, methyl ferulate, methyl protocatechuate, methyl syringate

Keywords:

Desmodium triangulare, HPLC, methyl ferulate, methyl protocatechuate, methyl syringate

ABSTRACT

In this study, the chemical constituents of the ethyl acetate extract from the stem and leaves of *Desmodium triangulare* were investigated. The dried material sample was crushed and then extracted exhaustively with methanol to obtain a crude extract. The crude extract was completely dispersed in water and performed liquid-liquid extraction with ethyl acetate solvent to obtain ethyl acetate extract. By column chromatography on silica gel and Sephadex LH20, the separation of the ethyl acetate extract was performed and led to the isolation of four compounds. Based on ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra and comparison with the previously reported data, the structures of the isolated compounds were identified as stigmaterol, methyl protocatechuate, methyl syringate, and methyl ferulate. HPLC analysis of the methanol extract was also conducted, and the results showed that the polar and non-polar compounds in this methanol extract were the main constituents.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, thành phần hóa học của cao chiết ethyl acetate từ thân và lá cây ba chẽ đã được nghiên cứu. Mẫu nguyên liệu khô được nghiền nhỏ, sau đó chiết bằng phương pháp ngâm kiệt với methanol thu được cao chiết thô. Cao chiết thô được phân tán trong nước và thực hiện quá trình chiết lỏng-lỏng với dung môi ethyl acetate nhằm thu được cao ethyl acetate. Cao chiết ethyl acetate đã được phân tách bằng phương pháp sắc ký trên cột silica gel và Sephadex LH20. Kết quả đã phân lập được bốn hợp chất sạch. Dựa vào dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR và kết hợp với các tài liệu tham khảo đã xác định được cấu trúc của bốn hợp chất hữu cơ đã phân lập là stigmaterol, methyl protocatechuate, methyl syringate và methyl ferulate. Kết quả phân tích HPLC của cao chiết methanol chỉ ra rằng các hợp chất phân cực và kém phân cực là thành phần chính của cao chiết.

1. GIỚI THIỆU

Các loại thực vật được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền chứa nhiều chất có thể được sử dụng để điều trị các bệnh mãn tính cũng như truyền nhiễm. Các hợp chất có hoạt tính dược lý thường được sinh tổng hợp thứ cấp bao gồm các alkaloids, terpenoids, saponins, flavonoids và các loại tinh dầu dễ bay hơi. Nhiều hoạt tính sinh dược học như ức chế các tế bào ung thư, kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau và tác dụng chữa lành vết thương của một số loài thực vật thuộc chi *Desmodium* đã được báo cáo (Ma et al., 2011).

Cây ba chẽ có tên khoa học là *Desmodium triangulare* (Retz.) Merr. Một số tên gọi khác của Cây ba chẽ là Niễng đực, Đậu bạc đầu, Ván đất,... là cây thuộc họ Đậu (Fabaceae). Cây ba chẽ có tính ôn, vị ngọt và hơi đắng, không độc. Trong dân gian, cây ba chẽ có tác dụng kháng viêm, chống viêm hiệu quả, được sử dụng để chữa kiết lỵ và tiêu chảy. Ngoài ra, dược liệu còn có khả năng điều trị bong gân, gãy xương, phù và một số bệnh về xương khớp khác. Các hoạt động gây độc tế bào và chống khối u của cao chiết methanol (MeOH) từ rễ cây ba chẽ cũng đã được nghiên cứu. Chiết xuất cho thấy hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* mạnh mẽ chống lại các dòng tế bào Dalton's Lymphoma Ascites (DLA) và Ehrlich Ascites Tumor (EAC). Giá trị IC₅₀ đối với dòng tế bào DLA là 99 µg và đối với dòng tế bào EAC là 89 µg. Sử dụng dòng tế bào DLA gây ra khối u rắn và dòng tế bào EAC gây ra u xơ cổ trướng ở chuột, thử nghiệm hoạt tính chống khối u của cao methanol từ rễ cây ba chẽ và so sánh với đối chứng dương là thuốc chống ung thư tiêu chuẩn Cyclophosphamide. Cao chiết methanol của rễ cây ba chẽ (50 mg/kg và 250 mg/kg thể trọng) làm giảm đáng kể khối lượng phát triển khối u rắn và sự gia tăng trọng lượng cơ thể của mô hình khối u xơ cổ trướng. Tuổi thọ của động vật được điều trị đã tăng lên đến 74,47% (Jayaseelan et al., 2012).

Tác động chống viêm của rễ cây ba chẽ cũng đã được đánh giá trên cả viêm cấp tính và viêm mãn tính trên chuột bạch (carrageenan và dextran gây phù nề bàn chân cấp tính và formalin gây phù nề chân mãn tính). Việc sử dụng cao chiết ba chẽ ở liều 50 và 250 mg/kg thể trọng bằng đường uống gây ức chế carrageenan sau 3 giờ ở 50 mg/kg là 47,06% và ở 250 mg/kg là 64,70%. Với dextran, cao ba chẽ ức chế giảm sau 5 giờ ở 50 mg/kg là 30,84% và tại 250 mg/kg là 53,86%, đối với formaline sau 6 ngày sử dụng tại nồng độ 50 mg/kg và 250 mg/kg gây ức chế lần lượt là 49,38 và 64,50% ((Jayaseelan et al., 2013).

Hiện nay, trên thế giới các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của cây ba chẽ chưa nhiều. Do vậy, việc tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học của thân và lá của mẫu cây ba chẽ sử dụng làm dược liệu ở tại Việt Nam là cần thiết để đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu hóa thực vật của cây này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

2.1.1. Nguyên liệu

Mẫu cây ba chẽ *Desmodium triangulare* (Retz.) Merr được thu hoạch vào tháng 9/2019 ở tỉnh Bắc Giang, được giám định bởi ThS. Nghiêm Đức Trọng, Đại học Dược Hà Nội. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai các Hoạt chất Sinh học, thuộc Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam.

2.1.2. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

Một số dung môi hữu cơ sử dụng trong nghiên cứu: methanol (MeOH); *n*-hexane (Hex); ethyl acetate (EtOAc); dichloromethane (DCM); acetone và nước cất.

Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel Merck (40–63 µm) và Sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được tiến hành trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 Merck F₂₅₄ có độ dày 0,25 mm.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker Avance 500 FT-NMR Spectrometer và Bruker Avance 600 FT-NMR Spectrometer của Phòng Nghiên cứu cấu trúc, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Dung môi do phổ được sử dụng là những dung môi deuterated solvents như CD₃OD, CDCl₃, DMSO-*d*₆ và TMS được sử dụng như chất nội chuẩn.

2.2. Chế tạo cao chiết

Sau khi thu hái, 8 kg thân và lá cây ba chẽ tươi được sơ chế làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ 40-50°C cho tới khi độ ẩm <7%, sau đó nghiền nhỏ. Tiếp theo, 2,9 kg mẫu nguyên liệu được ngâm trong 15 L dung môi MeOH ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ. Sau đó, ta tiến hành tách riêng bã nguyên liệu và dịch chiết MeOH. Dịch chiết MeOH được tiến hành cô quay hút chân không và thu được cao chiết MeOH thô. Quá trình ngâm, lọc và cô quay loại bỏ dung môi được lặp lại 3 lần.

Cao chiết MeOH thô được phân tán hoàn toàn trong nước. Sau đó thực hiện quá trình chiết lỏng - lỏng với dung môi EtOAc với tỉ lệ phân lớp nước:

EtOAc (1:1, v/v) thu được phân lớp nước và phân lớp EtOAc (lặp lại 3 lần). Cô quay phân lớp EtOAc loại bỏ dung môi để thu được cao chiết EtOAc.

2.3. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

Bảy mươi gam cao EtOAc được hòa tan trong 40 mL dung môi dichloromethane (DCM), tẩm 100 g silica gel (40–63 μm), cô quay chân không loại hết dung môi ra khỏi hỗn hợp. Hỗn hợp trên được đưa lên cột sắc ký silica gel (500 g SiO_2 , 40–63 μm , 7 \times 28 cm) với hệ dung môi rửa giải gradient nồng độ từ Hex/EtOAc (50/1–100/0) và EtOAc/MeOH (0:100–60:40). Quá trình sắc ký được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Gộp các dịch tại các ống nghiệm có sắc ký đồ TLC gần giống nhau thu được 15 phân đoạn từ BCE1-BCE15.

Phân đoạn BCE2 xuất hiện một lượng lớn một tinh thể màu trắng, tiến hành rửa kết tinh bằng dung môi Hex, thu được một hợp chất sạch ký hiệu là **BC2.1**.

Phân đoạn BCE2 (3,95 g) được đưa lên cột sắc ký silica-gel (25 g SiO_2 , 40–63 μm , 2 \times 40 cm). Dung môi rửa giải là hệ dung môi Hex/EtOAc (95:5) thu được 3 phân đoạn BCE2.1-BCE2.3. Phân đoạn BCE2.3 được đưa lên cột Sephadex LH20 (2 \times 50 cm) với hệ dung môi rửa giải MeOH, thu được một hợp chất sạch ký hiệu là **BC3.1**.

Phân đoạn BCE4 gộp với BCE5 và một phần BCE6 (3,221 g) được đưa lên cột sắc ký silica gel (60 g SiO_2 , 40–63 μm , 3 \times 25 cm). Rửa giải gradient nồng độ Hex/EtOAc (9:1–1/1) thu được 20 phân đoạn. Phân đoạn BCE46L (172 mg) được tách bằng cột silica gel với các hệ dung môi Hex/EtOAc (98:2–6:4) thu được 9 phân đoạn. Phân đoạn BCE46L2 được tách tiếp bằng cột silica gel với hệ dung môi Hex/acetone (4:1–3:1 và 7:3) thu được 10 phân đoạn. Phân đoạn 2 và 3 được gộp và tinh chế với bản mỏng điều chế sử dụng hệ dung môi dichloromethane/ acetone (100:1), thu được 3 mg một hợp chất sạch ký hiệu là **BC46L21**.

Phân đoạn BCE7 (4,082 g) được hòa tan bằng dung môi DCM và tẩm 7 g silica gel (40–63 μm). Dung môi được cô loại, sau đó tiến hành đưa lên cột sắc ký silica gel (150 g SiO_2 , 40–63 μm , 5 \times 14 cm). Dung môi rửa giải lần lượt là Hex/EtOAc (90:10–73:30) thu được 7 phân đoạn từ BCE7.1–BCE7.7. Phân đoạn BCE 7.7 được đưa lên bản mỏng điều chế và triển khai sắc ký với hệ dung môi DCM/MeOH (88:12). Dưới ánh sáng đèn UV phát hiện một hợp chất hấp thụ ở bước sóng 245 nm. Vùng chất trên ra khỏi bản mỏng được tiến hành cạo và phân hấp phụ

chúng bằng dung môi DCM, thu được một hợp chất ký hiệu là **BC7.1**.

Cấu trúc hóa học của 4 hợp chất vừa phân lập được xác định dựa trên dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR trên máy Bruker Avance 500 MHz và 600 MHz tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Dữ liệu phổ của 4 hợp chất được liệt kê và phân tích chi tiết tại mục 2.4 và 3.2.

2.4. Dữ liệu phổ của các hợp chất

Hợp chất BC2.1: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm): 3,52 (1H, m, H-3 α); 5,35 (1H, br.s, H-6); 0,70 (3H, s, H-18); 0,83 (3H, s, H-19); 1,03 (3H, d, $J=8,5$ Hz, H-21); 5,02 (1H, m, H-22); 5,16 (1H, m, H-23); 0,83 (3H, d, $J=5,5$ Hz, H-26); 0,85 (3H, d, $J=6,0$ Hz, H-27); 0,80 (3H, t, $J=7,5$ Hz, H-29). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm): 37,3 (C-1); 31,4 (C-2); 71,8 (C-3); 45,9 (C-4); 140,8 (C-5); 121,7 (C-6); 31,9 (C-7); 31,9 (C-8); 50,1 (C-9); 36,2 (C-10); 21,2 (C-11); 39,7 (C-12); 42,3 (C-13); 56,8 (C-14); 25,4 (C-15); 28,9 (C-16); 55,9 (C-17); 12,2 (C-18); 19,4 (C-19); 40,5 (C-20); 21,1 (C-21); 138,3 (C-22); 51,3 (C-24); 31,9 (C-25); 19,0 (C-26); 21,1 (C-27); 24,4 (C-28); 12,1 (C-29).

Hợp chất BC3.1: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm): 7,06 (1H, dd, $J=1,8$; 8,4 Hz, H-6); 7,02 (1H, br.d, $J=1,8$ Hz, H-2); 6,92 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-5); 3,92 (3H, s, OCH_3 -3); 3,79 (3H, s, OCH_3 -3'); 7,62 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7); 6,29 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8); 5,84 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm): 126,9 (C-1); 109,4 (C-2); 147,9 (C-3); 146,7 (C-4); 114,7 (C-5); 23,0 (C-6); 144,9 (C-7); 115,2 (C-8); 167,6 (C-9); 55,9 ($-\text{OCH}_3$); 51,5 ($-\text{OCH}_3$).

Hợp chất BC46L21: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm): 7,33 (2H, s, H-2, 6); 3,90 (6H, s, 2 $-\text{OMe}$); 3,89 (3H, s, $-\text{OMe}$)/ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ_{H} ppm): 7,21 (2H, s, H-2, 6); 3,80 (9H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ_{C} ppm): 106,8 (C-2, 6); 147,6 (C-3, 5); 166,1 (COO); 56,0 ($-\text{OCH}_3$); 51,8 ($-\text{COOCH}_3$).

Hợp chất BC7.1: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm): 7,56 (1H, dd, $J=2,4$; 8,4 Hz, H-6); 7,61 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H-2); 6,91 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-5); 3,88 (3H, s, $-\text{OCH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm): 167,0 (C-7); 148,6 (C-4); 142,9 (C-3); 123,8 (C-1); 122,7 (C-6); 116,6 (C-5); 114,8 (C-2); 52,0 ($-\text{OCH}_3$).

2.5. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

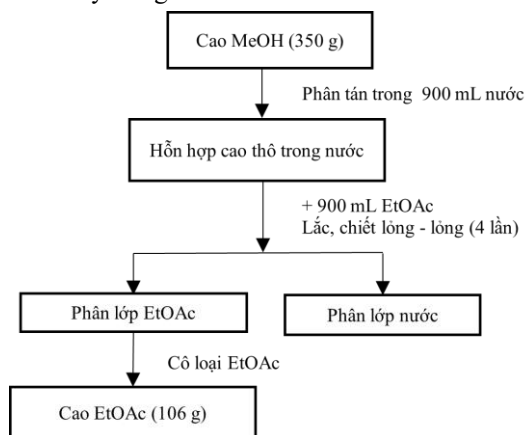
Cao MeOH của ba chẽ được phân tích định lượng hàm lượng các thành phần bằng phương pháp

HPLC trên máy Agilent 1260 Infinity II HPLC với các điều kiện sau: Cột Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6×250 mm; 5 μm); dung môi chạy: A (0,1% formic acid trong H₂O); B (acetonitrile) 0–40 phút: 5–50% B; tốc độ dòng 1,0 mL/phút; nhiệt độ cột 40°C; thể tích mẫu tiêm: 10 μL, nồng độ mẫu cao chiết ~ 10 mg/mL; nồng độ mẫu chất: ~ 1 mg/mL.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo cao chiết

Từ 2,9 kg nguyên liệu khô của thân, lá cây ba chẽ ban đầu thu được 649 g cao chiết thô, hiệu suất đạt 22,4%. Kết quả quá trình chiết phân bố được trình bày trong sơ đồ Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ chiết phân bố cao chiết từ cao chiết thô của thân và lá cây ba chẽ

3.2. Xác định cấu trúc các hợp chất

3.2.1. Hợp chất BC2.1 (Stigmasterol)

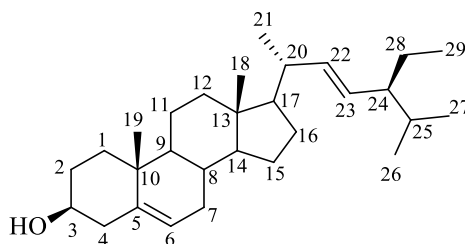
Chất **BC2.1** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng.

Trên phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) cho thấy sự có mặt của hai nhóm thế methyl với các tín hiệu singlet tại δ_H 0,70 (3H, s, H-18) và δ_H 0,83 (3H, s, H-19), ba nhóm thế methyl gắn với -CH với các tín hiệu doublet tại: δ_H 0,83 (3H, d, J=5,5 Hz, H-26), 0,85 (3H, d, J=6,0 Hz, H-27), 1,03 (3H, d, J=8,5 Hz, H-21) và một nhóm methyl bậc một δ_H 0,80 (3H, t, J=7,5 Hz, H-29). Ở vùng trường thấp cho tín hiệu cộng hưởng của một olefinic proton δ_H 5,35 (1H, br.s, H-6) và hai olefinic proton δ_H 5,02 (1H, m, H-22) và 5,16 (1H, m, H-23); một proton carbinol: δ_H 3,52 (1H, m, H-3α) chứng minh cho nhóm β-OH ở vị trí C-3.

Phổ ¹³C-NMR-JMOD (125 MHz, CDCl₃) của **BC2.1** cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 29 carbon, trong đó có 3 carbon bậc bốn, 11 carbon bậc ba, 9

carbon bậc hai và 6 nhóm methyl. Phổ ¹³C-NMR cũng cho tín hiệu cộng hưởng của liên kết đôi ở vị trí giữa C-5 và C-6 (δ_C 140,8 và 121,7) và vị trí C-22 và C-23 (δ_C 138,3 và 129,3). Tín hiệu trên phổ tại δ_C 71,8 (C-3) xác nhận sự có mặt 1 liên kết C-O trong phân tử.

Kết hợp các dữ liệu phổ MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR và so sánh tài liệu tham khảo (Jang et al., 1993; Kim et al., 2014) cho phép khẳng định hợp chất **BC2.1** là stigmasterol (Hình 2).



Hình 2. Cấu trúc hóa học của hợp chất stigmasterol

Stigmasterol đã được tìm thấy ở nhiều loài thực vật trước đây. Đây là một sterol thực vật dồi dào nhất có chức năng duy trì cấu trúc và sinh lý của màng tế bào. Ngoài ra, trong công nghệ thực phẩm, stigmasterol được coi như một phụ gia thực phẩm, có khả năng làm giảm mức cholesterol, hoạt động chống oxy hóa và ức chế α-amylase trong các thử nghiệm *in vitro*. Một số thử nghiệm *in vivo* cũng đã chứng minh rằng stigmasterol có tác dụng chống tiểu đường ở chuột. Phân tích sinh hóa cho thấy việc sử dụng stigmasterol làm giảm lượng đường, urê và creatinine trong máu (Gabay et al., 2010). Poulouse et al. (2021) đã nghiên cứu và kết luận stigmasterol là một phytosterol có khả năng ức chế một số chất trung gian gây thoái hóa chất nền và tiền viêm thường liên quan đến sự thoái hóa sụn do viêm khớp gây ra.

Nghiên cứu của Mbambo et al. (2012) về hoạt tính kháng nấm của stigmasterol cũng đã chỉ ra rằng hợp chất này có hiệu lực ức chế tương đối với chủng nấm *Penicillium digitatum* gây bệnh mốc xanh hại cam sau thu hoạch và chủng nấm *Fusarium verticilloides* gây bệnh trên ngô.

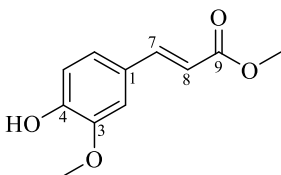
3.2.2. Hợp chất BC3.1 (Methyl ferulate)

Chất **BC3.1** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Trên phổ ¹H-NMR của chất **BC3.1** xuất hiện tín hiệu của 3 proton vòng thơm hệ ABX ở δ_H 7,06 (1H, dd, J=1,8; 8,4 Hz, H-6); 7,02 (1H, br.d, J=1,8 Hz, H-2); 6,92 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5) gọi ý cho 1 vòng benzene bị thế tại 3 vị trí 1, 3 và 4. Sự

có mặt của 2 nhóm methoxy được xác định bởi 2 tín hiệu ở δ_H (ppm) 3,92 (3H, s, OCH₃-3); 3,79 (3H, s, OCH₃-3). Ngoài ra, có tín hiệu doublet của proton gắn với carbon mang nối đôi ở δ_H 7,62 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7); 6,29 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8), hai proton này có hằng số ghép cặp lớn $J=16$ Hz chứng tỏ ở vị trí *trans*, hay chứng minh cho sự xuất hiện của một nhóm -CH=CH- có cấu hình *trans*.

Trên phổ ¹³C-NMR thấy xuất hiện tín hiệu của 11 nguyên tử carbon trong đó có 2 nhóm methoxyl tại δ_C 55,9 và 51,5; 5 nhóm methine sp² tại δ_C 109,4, 114,7, 123,0, 144,9, 115,2 (các tín hiệu này được phân biệt nhờ có cường độ tín hiệu cao hơn so với carbon không liên kết trực tiếp với hydrogen); và 4 carbon không liên kết trực tiếp với hydrogen tại δ_C 126,9; 147,9; 146,7 và 167,6. Trong số carbon không liên kết trực tiếp với hydrogen, tín hiệu tại δ_C 167,6 ppm được quy kết cho nhóm carbonyl, và hai tín hiệu khác tại δ_C 147,9 và 146,7 được quy kết cho 2 carbon thơm liên kết với oxygen. Bên cạnh đó, từ giá trị độ chuyển dịch hóa học của carbon methoxy (δ_C 55,9 và 51,5) cho thấy một nhóm methoxy (δ_C 55,9) liên kết với vòng benzene và một nhóm methoxy khác (δ_C 51,5) liên kết với carbon carbonyl, hình thành nhóm methoxycarbonyl (-COOCH₃). Như vậy, ngoài nhóm methoxy liên kết với vòng benzene thì có thêm một nhóm thể hydroxy cũng liên kết với vòng benzene để hình thành 2 tín hiệu carbon thơm liên kết với nguyên tử oxygen. Từ các phân tích trên, hợp chất **BC3.1** có cấu trúc 11 carbon bao gồm 1 vòng benzene thế 3 vị trí 1, 3 và 4 và các mảnh cấu trúc khác bao gồm một nhóm methoxy, một nhóm hydroxy, một nhóm -CH=CH- và một nhóm methoxycarbonyl (-COOCH₃). Hơn nữa, từ dạng tín hiệu doublet của mỗi một proton olefine thuộc nhóm -CH=CH- cho thấy nhóm này liên kết với hai carbon khác không có hydrogen, hay nhóm này liên kết với vòng benzene và nhóm methoxycarbonyl.

Tra cứu và so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **BC3.1** với các số liệu NMR được công bố gần đây của methyl ferulate trong cùng dung môi là CDCl₃ (Ilmiawati et al., 2020) nhận thấy các dữ liệu phổ hoàn toàn tương đồng, từ đó kết luận **BC3.1** là methyl ferulate (Hình 3).

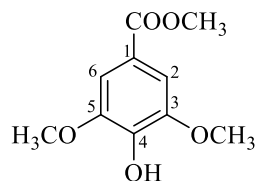


Hình 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất methyl ferulate

Hợp chất methyl ferulate đã được chứng minh là có hoạt tính chống viêm và chống oxy hóa. Đây là một hợp chất có tính thấm qua màng tế bào và não, thể hiện khả năng quét gốc tự do, được sử dụng trong nghiên cứu các rối loạn thoái hóa thần kinh (Sultana, 2012; Phuong et al., 2014) đã nghiên cứu về hoạt tính chống viêm của hoạt chất này và nhận thấy methyl ferulate có còn có khả năng ức chế sự biểu hiện COX-2, ngăn chặn p-p38 và p-JNK trong các đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương sơ cấp.

3.2.3. Hợp chất BC46L21 (Methyl syringate)

Trên phổ ¹H-NMR (500 MHz) ghi trong dung môi CD₃OD thể hiện đặc trưng của một dẫn xuất từ gallic acid trên cơ sở các tín hiệu δ_H 7,33 (2H, s, H-2, 6). Tại vùng trường thấp hơn có sự xuất hiện của các peak singlet tại δ_H 3,90 (6H, s, 2 -OMe) và 3,89 (3H, s, -OMe) thể hiện rõ các tín hiệu của 3 nhóm methoxy; trong đó 2 nhóm methoxy tại 3,90 ppm liên kết đối xứng tại các vị trí 3 và 5 trên vòng thơm. Tín hiệu δ_H 3,89 ppm còn lại tương ứng với nhóm methoxy của nhóm ester. Tuy nhiên, khi ghi lại trong dung môi DMSO-*d*₆ (600 MHz), các tín hiệu proton của 3 nhóm methoxy nói trên được thấy xuất hiện ở 1 peak singlet tại δ_H 3,80 ppm tương ứng với 9 proton của 3 nhóm methoxy. Hai proton H-2 và H-6 xuất hiện tại 7,21 ppm (singlet) do đối xứng trên vòng thơm. Trên phổ ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) tín hiệu carbon δ_C 106,8 ppm tương ứng 2 nhóm CH thơm tại các vị trí đối xứng C-2 và C-6; tương tự với tín hiệu carbon δ_C 147,7 ppm tương ứng với 2 carbon đối xứng và liên kết với nhóm methoxy là C-3 và C-5. Tín hiệu δ_C 166,1 ppm thể hiện sự xuất hiện của 1 nhóm methoxycarbonyl (-COOCH₃). Các tín hiệu của C-1 và C-4 không xuất hiện trên phổ ¹³C-NMR. Tuy nhiên, các tín hiệu của 3 nhóm methoxy xuất hiện trên phổ ¹³C-NMR tại vị trí δ_C 51,8 ppm tương ứng với nhóm methoxy trong nhóm chức ester và tại vị trí δ_C 56,0 ppm cường độ peak tín hiệu mạnh thể hiện sự xuất hiện của 2 nhóm methoxy liên kết với carbon thơm đối xứng tại C-3 và C-5 trên vòng thơm. Từ các dữ liệu phổ đã phân tích như trên và kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo (Rob et al., 2020) có thể nhận danh cấu trúc của **BC46L21** là methyl syringate (Hình 4).



Hình 4. Cấu trúc hóa học của hợp chất methyl syringate

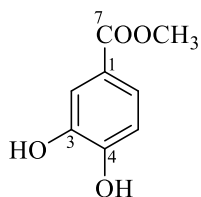
Hợp chất methyl syringate được thấy như một chỉ thị phân tử trong các sản phẩm mật ong và có các hoạt tính ức chế vi khuẩn (Tuberoso et al., 2009). Nghiên cứu của Rob et al., (2020) về khả năng diệt cỏ dại của một số phenolic acid, cho thấy syringic acid và methyl syringate từ cây *Schumannianthus dichotomus* đều có tác dụng gây độc thực vật đáng kể đối với cải xoong và cỏ lúa mạch đen Ý (Rob et al., 2020). Trong đó, methyl syringate ức chế mầm ($IC_{50}=43,2 \mu M$) và rễ ($IC_{50}=31,5 \mu M$) của cây cải mạnh hơn so với syringic acid ($IC_{50}=75,8$ và $61,3 \mu M$) (Rob et al., 2020).

3.2.4. Hợp chất BC7.1 (Methyl protocatechuate)

Hợp chất **BC7.1** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Trên phổ ^1H-NMR của chất **BC7.1** xuất hiện tín hiệu của 3 proton vòng thơm ở δ_H 7,56 (1H, dd, $J=8,4; 2,4$ Hz, H-6); 7,61 (1H, d, $J=1,8$ Hz, H-2); 6,91 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-5) gợi ý cho một vòng benzen bị thế tại 3 vị trí 1, 3 và 4. Sự có mặt của một nhóm methoxy được các định bởi 1 tín hiệu ở δ_H 3,88 (3H, s, OCH_3); ngoài ra còn có hai vân từ được dự đoán là của 3-OH, 4-OH với độ chuyển dịch hóa học tương ứng tại δ_H 5,92 và 5,94 ppm.

Trên phổ $^{13}C-NMR$ thấy xuất hiện tín hiệu của 8 nguyên tử carbon. Trong đó, có một nhóm methoxy tại δ_C 52,0 ppm liên kết với carbon carbonyl hình thành nhóm methoxycarbonyl ($-COOCH_3$); 3 nhóm methine tại δ_C 114,8 (C-2), 116,6 (C-5) và 122,7 (C-6); 4 carbon không liên kết trực tiếp với hydrogen tại δ_C 123,8 (C-1), 142,9 (C-3), 148,6 (C-4) và 167,0 (CO). Trong số carbon không liên kết với hydrogen, tín hiệu tại δ_C 167,0 được quy kết cho nhóm carbonyl.

Dựa vào dữ liệu phổ NMR (Bảng 3) kết hợp so sánh với kết quả nghiên cứu của Tran et al. (2017) cho phép xác định **BC7.1** là methyl protocatechuate (Hình 5).



Hình 5. Cấu trúc hóa học của hợp chất methyl protocatechuate

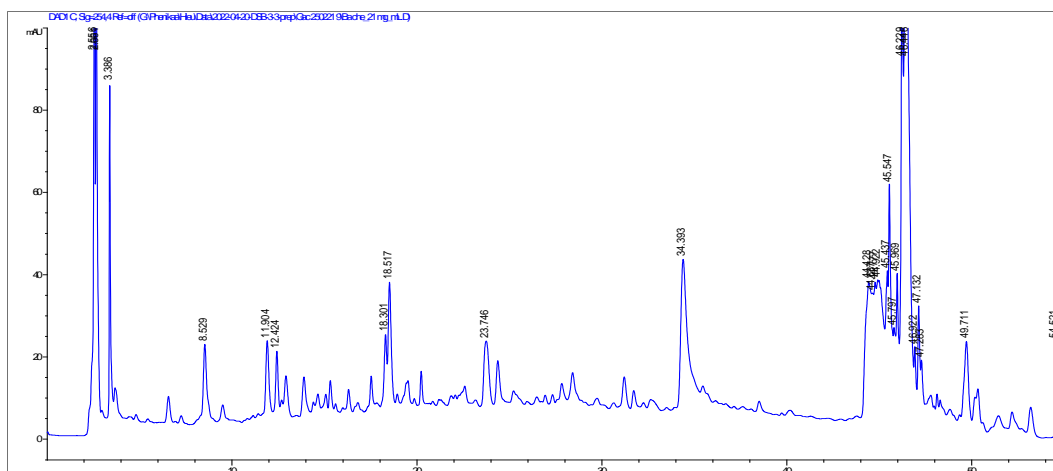
Methyl protocatechuate là một chất chuyển hóa chính của polyphenol có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ hệ thần kinh, kháng viêm hiệu quả và làm giảm bớt tác dụng độc hại của florua thông qua điều chỉnh khả năng sinh học; mức calcium nội bào, tính toàn vẹn của màng ti thể và tín hiệu oxy hóa khử trong tế bào A549, ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh viêm và xơ hóa liên quan bằng cách khôi phục sự biểu hiện của RAGE và Nrf2 (Ameeramja & Perumal, 2017; Ameeramja et al., 2018). Ngoài ra, Zhang et al. (2015) đã chỉ ra rằng methyl protocatechuate có thể đẩy nhanh tốc độ phát triển của các tế bào thần kinh vỏ não sơ cấp trong ống dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não.

Các hợp chất stigmasterol, methyl protocatechuate, methyl syringate và methyl ferulate thường được thấy trong các mẫu thực vật. Những hợp chất phenolic, flavonoids và isoflavonoids được thấy xuất hiện trong các cây họ đậu (Fabaceae) và một số loài thuộc chi thóc lép như *D. styracifolium*, *D. oxyphyllum* và *D. gangeticum* (Ma et al., 2011). Tuy nhiên, lần đầu tiên, methyl protocatechuate, methyl syringate và methyl ferulate được thấy ở mẫu cây ba chẽ *D. triangulare*.

3.3. Phân tích mẫu cao chiết MeOH từ thân, lá cây ba chẽ bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

HPLC là một kỹ thuật sắc ký đa năng và được sử dụng rộng rãi để phân lập các sản phẩm tự nhiên. HPLC được sử dụng trong hóa thực vật và hóa học phân tích để xác định, định lượng và tinh chế các thành phần riêng lẻ của hỗn hợp. Hiện nay, kỹ thuật này đang trở nên phổ biến trong số các kỹ thuật phân tích khác nhau như là sự lựa chọn chính để kiểm tra chất lượng cây dược liệu.

Phân tích trong cao chiết MeOH bằng phương pháp HPLC, sắc ký đồ của cao chiết MeOH từ thân, lá cây ba chẽ được thể hiện trong Hình 6. Trong đó, những thành phần phân cực từ trước thời gian lưu $t_R=10$ min và không phân cực từ sau $t_R=40$ min được thấy chiếm vai trò thành phần chính. Để có được thông tin về thành phần các peak chi tiết hơn, ta cần những nghiên cứu phân lập tiếp theo hoặc các công cụ mạnh hơn như LC-MS/MS để tiến hành nghiên cứu.



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết MeOH từ thân, lá cây ba chẽ

(Điều kiện chạy: Cột Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6×250 mm; 5 μm); dung môi chạy: A (0.1% formic acid trong H₂O); B (acetonitrile) 0–40 phút: 5–50% B; tốc độ dòng 1,0 mL/phút; nhiệt độ cột 40°C; thể tích mẫu tiêm: 10 μL, nồng độ mẫu cao chiết ~ 10 mg/mL; nồng độ mẫu chất: ~ 1 mg/mL)

4. KẾT LUẬN

Từ cao chiết EtOAc từ của thân, lá cây ba chẽ, nghiên cứu đã phân lập và xác định được cấu trúc của bốn hợp chất gồm: stigmasterol, methyl protocatechuate, methyl syringate và methyl ferulate. Sự xuất hiện của methyl protocatechuate, methyl syringate và methyl ferulate được thấy lần đầu tiên ở mẫu cây ba chẽ *D. triangulare*. Kết quả

nghiên cứu góp phần bổ sung thông tin về thành phần hóa thực vật của cây ba chẽ được sử dụng làm dược liệu tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.03-2019.17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ameeramja, J., & Perumal, E. (2017). Protocatechuic acid methyl ester ameliorates fluoride toxicity in A549 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 109(2), 941-950. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.024>
- Ameeramja, J., Kanagaraj, V. V., & Perumal, E. (2018). Protocatechuic acid methyl ester modulates fluoride induced pulmonary toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.031>
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C., & Berenbaum, F. (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(1), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.019>
- Ilmiawati, A., Anggraini, D., Syahbirin, G., Rahayu, D. U. C., & Sugital P. (2020). Methyl ferulate from methanol extract of Indonesian sausage fruit (*Kigelia africana*). *AIP Conference Proceedings* 2243, 030009, 1-5. <https://doi.org/10.1063/5.0001095>
- Jang, Y. S., Su, Y. L., & Wang Y. L. (1993). Studies on the chemical constituents of *Desmonium Styrafolium* (Osbeck). Merr. *Acta Phamarceutica Sinica*, 28(3), 197-201.
- Jayaseelan, R. S., Vijayan, F., Mathesvaran, M., & Suresh, V. (2012). Cytotoxic and antitumor activity of methonolic extracts *Desmodium triangulare* (Retz) merr. Root. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 540-542.
- Jayaseelan, R. S., Vijayan F. P., Brindha, Suresh V., & Padikkala, J. (2013). Evaluation of the anti-inflammatory activity of *Desmodium triangulare* (Retz.) Merr. root. *International Journal of Pharmacy Teaching & Practices*, 4(4), 858-862.
- Kim, Y. S., Li, X. F., Kang, K. H., Ryu, B. M., & Kim, S. K. (2014). Stigmasterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *BMB Reports*, 48(7), 433-438. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.8.153>
- Mbambo, B., Odhav, B., & Mohanlall, V. (2012). Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *Journal of Medicinal Plant Research*, 6(38), 5135-5141.

- <https://doi.org/10.5897/JMPR12.151>
- Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K., & Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 314–332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.053>
- Phuong, N. T. M., Cuong, T. T., & Quang, D. N. (2014). Anti-inflammatory activity of methyl ferulate isolated from *Stemona tuberosa* Lour. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7S1, S327-S331. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60254-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60254-6)
- Poulose, N., Sajayan, A., Ravindran, A., Chandran, A., Priyadharshini, G. P., Selvin, J., & Kiran, G. S. (2021). Anti-diabetic potential of a stigmasterol from the seaweed *Gelidium spinosum* and its application in the formulation of nanoemulsion conjugate for the development of functional biscuits. *Frontiers in Nutrition*, 8, 694362. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.694362>
- Rob, M. M., Hossen, K. I., Wasaki, A., Suenaga, K., & Kato-Noguchi, H. (2020). Phytotoxic activity and identification of phytotoxic substances from *Schumannianthus dichotomus*. *Plants*, 9, 102. <https://doi.org/10.3390/plants9010102>
- Sultana, R. (2012). Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5), 748-752. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.015>
- Tran, T. T., Kim, M., Jang, Y., Lee, H. W., Nguyen, H. T., Nguyen, T. N., Park, H. W., Le Dang, Q., & Kim, J. C. (2017). Characterization and mechanisms of anti-influenza virus metabolites isolated from the Vietnamese medicinal plant *Polygonum chinense*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 (1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1675-6>
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Jerković, I., Caboni, P., Cabras, P., & Floris, I. (2009). Methyl syringate: A chemical marker of asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) monofloral honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3895–3900. <https://doi.org/10.1021/jf803991j>
- Zhang, Z., Cai, L., Zhou, X., Su, C., Xiao, F., Gao, Q., & Luo, H. (2015). Methyl 3,4-dihydroxybenzoate promote rat cortical neurons survival and neurite outgrowth through the adenosine A2a receptor/PI3K/Akt signaling pathway. *Neuroreport*, 26(6), 367-373. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000358>