

Khảo sát thành phần hóa học cao ethyl acetate của cây Quyển bá trường sinh (*Selaginella tamariscina*)

Ngô Thị Châu

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
ntchau@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Cây Quyển bá trường sinh thuộc chi *Selaginella* thu hái ở tỉnh Quảng Ngãi được nghiên cứu với mục đích tìm ra thành phần hóa học trong cao ethyl acetate bằng cách phân lập và xác định cấu trúc các thành phần hóa học. Từ 7,3 kg mẫu cây Quyển bá trường sinh (*Selaginella tamariscina*), bằng kỹ thuật trích Soxhlet lần lượt với các dung môi *n*-hexane, ethyl acetate và methanol, thu hồi dung môi cho ra các cao chiết tương ứng. Thực hiện sắc ký cột kết hợp với sắc ký bản mỏng cao chiết ethyl acetate (50,2 g) trên silica gel pha thường, pha đảo RP-18 và Sephadex LH-20 với những hệ dung môi khác nhau, hai hợp chất tinh khiết đã được phân lập. Dựa trên phổ ^1H và ^{13}C NMR kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định, bao gồm: một dẫn xuất chromone, 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone (1) và một dẫn xuất glycoside steroid, stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside (2). Đây là lần đầu hai hợp chất này được tìm thấy trong cây Quyển bá trường sinh ở Việt Nam. Những phân đoạn còn lại cũng đang được tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học để phân lập thêm những hợp chất khác.

Nhận 27/07/2022
Được duyệt 27/10/2022
Công bố 02/11/2022

Từ khoá

Selaginella tamariscina, ethyl acetate, 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone, stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Quyển bá trường sinh (QBTS) hay Trường sinh thảo (*Selaginella tamariscina* Spring) là một loài thuộc chi *Selaginella* đã được sử dụng trong y học dân gian để trị viêm khí quản mãn tính, giảm đau và ung thư [1]. Ở Việt Nam, cây mọc phổ biến ở các tỉnh vùng núi có độ cao 600 m trở lên (ở miền Bắc) và khoảng trên 800 m (ở miền Nam). Cây ưa bóng râm và ưa ẩm, thường mọc ở đất hay các khe đá, dưới tán rừng kín thường xanh ẩm hoặc rừng núi đá vôi, tái sinh tự nhiên bằng bào tử và đẻ nhánh nhiều ở gốc. Loài này thường gặp ở Thái Nguyên, Cao Bằng, Lào Cai, Hà Giang, Lai Châu, Sơn La và Hòa Bình [2].

QBTS còn được sử dụng để trị ho ra máu, kinh nguyệt quá nhiều, vàng da, viêm gan, bổ máu. Cây mọc hoang và được khai thác nhiều ở vùng ven biển Nha Trang,

Phan Rang, Đà Nẵng [1]. *Selaginella* là chi còn lại duy nhất của họ Selaginellaceae. Đây là một chi lớn với khoảng 700 loài đã được nhận danh. *Selaginella* được tìm thấy ở hầu hết các nơi trên thế giới và có thể chịu đựng được nhiều loại khí hậu, từ vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới đến các vùng ôn đới và Bắc cực [2]. Phần lớn các loài thuộc chi này phân bố ở những vùng ẩm ướt và râm mát, khoảng 50 loài được tìm thấy ở khu vực ôn đới và khô hạn trên thế giới, chẳng hạn như *Selaginella lepidophylla* mọc ở sa mạc Chihuahuan, Mexico [3]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy loài này chứa nhiều dẫn xuất biflavonoid [4]. Nghiên cứu này khảo sát thành phần hóa học cao chiết ethyl acetate của cây QBTS.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu và thiết bị



2.1.1 Nguyên vật liệu

Phần trên mặt đất của cây QBTS được thu hái ở huyện Mộ Đức, tỉnh Quảng Ngãi vào tháng 08 năm 2021. Cây được định danh bởi TS. Đặng Văn Sơn (Viện Sinh học Nhiệt đới, Tp.HCM) và lưu mẫu tại Phòng thí nghiệm Dược liệu, Khoa Dược. Mẫu cây tươi (7,3 kg) được làm mất nước bằng cách phơi dưới nắng nhẹ đến khô, sau đó xay nhỏ bằng cối chuyên dụng thu được 1,1 kg mẫu khô với kích thước (1-2) mm.

2.1.2 Thiết bị

Phổ NMR được đo bằng máy Bruker Avance III 400 và 500 (500 MHz đối với ¹H NMR và 125 MHz đối với ¹³C NMR). CD₃OCD₃ và CDCl₃ là dung môi pha mẫu, độ dịch chuyển hóa học (tính bằng ppm) được hiệu chỉnh dựa trên độ dịch chuyển hóa học của dung môi sử dụng. Sắc kí cột được thực hiện trên silica gel pha thường hoặc pha đảo RP-18 [(40-63) μm, Merck]. Sắc kí lọc gel được thực hiện trên Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Sắc kí bản mỏng được thực hiện trên bản silica gel 60 (250 μm, Merck) và RP-18 (250 μm, Merck). Sắc kí cột được thực hiện trên các cột thủy tinh có đường kính khác nhau. Cao thô được điều chế bằng hệ Soxhlet (Duran). Các cấu tử trên bản mỏng được phát hiện bằng đèn tử ngoại (Philips) với bước sóng 254 nm hoặc phun sấy bản mỏng với dung dịch vanillin/H₂SO₄. Tất cả dung môi đều được chưng cất lại trước khi sử dụng và được thu hồi bằng máy cô quay chân không (Heidolph). Các dụng cụ thủy tinh được dùng hứng mẫu và pha chế dung môi bao gồm erlenmayer, becher, ống nghiệm, ống đong (ISOLAB).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Điều chế cao thô

Mẫu cây QBTS khô (1,1 kg) được trích kiệt bằng hệ thống Soxhlet với lần lượt các dung môi: *n*-hexane, ethyl acetate và methanol. Cô quay thu hồi dung môi cho ra các cao chiết tương ứng. Kết quả sắc kí bản mỏng cho thấy: cao chiết *n*-hexane chứa nhiều chất kém phân cực (chất màu và chất béo), cao methanol kéo vệt không rõ ràng, trong khi đó cao ethyl acetate cho nhiều vệt rõ dưới ánh đèn tử ngoại.

2.2.2 Phân lập chất từ cao ethyl acetate

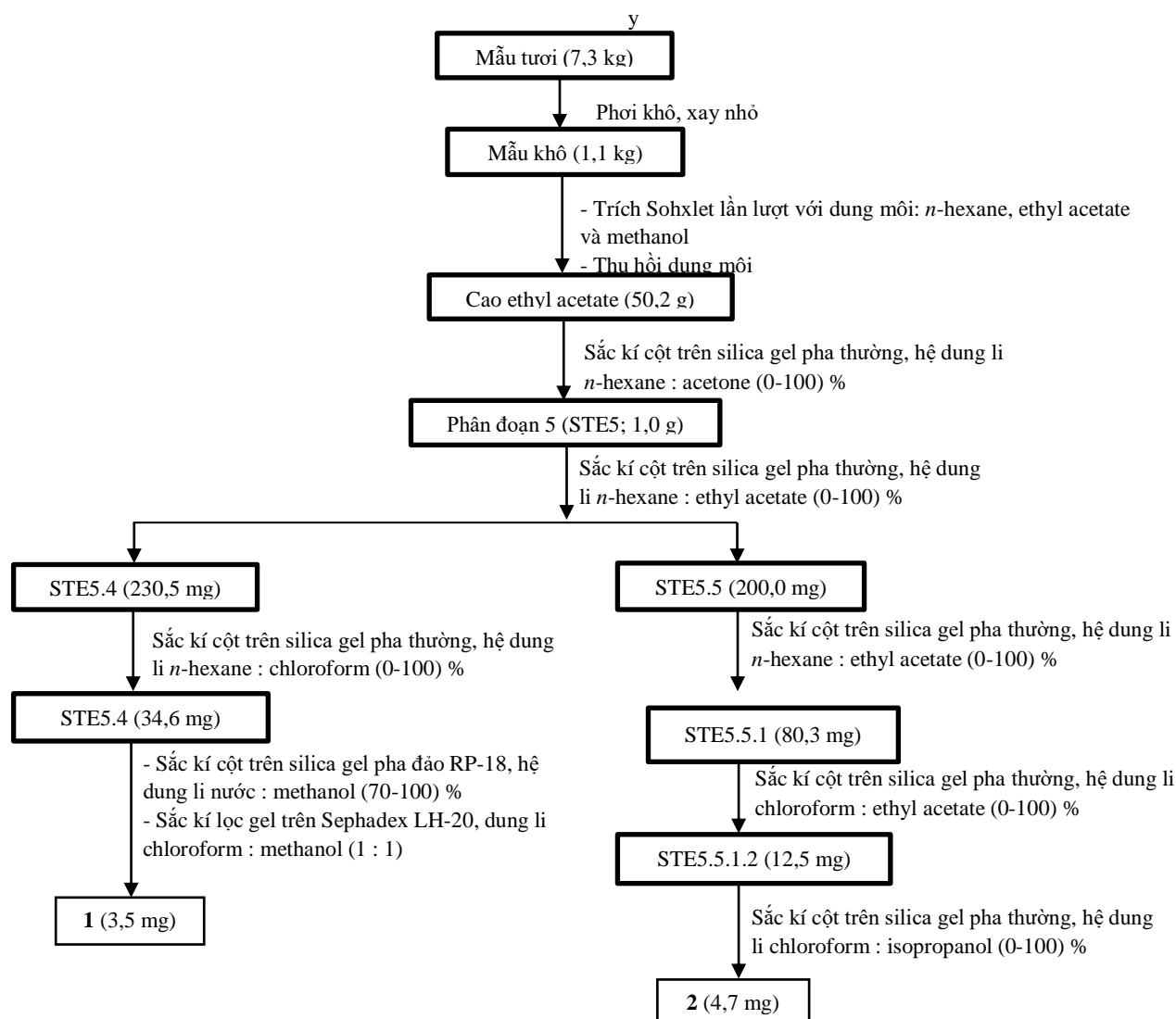
Phân đoạn cao ethyl acetate (50,2 g) bằng sắc kí cột trên silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane :

acetone (0-100) % thu được 24 phân đoạn (mỗi phân đoạn một lít), dựa trên kết quả sắc kí bản mỏng gộp lại thành 9 phân đoạn chính, kí hiệu STE (1-9). Sắc kí cột phân đoạn 5 (STE5; 1,0 g) trên silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane : acetone (0-100) % thu được 30 phân đoạn (mỗi phân đoạn 50 mL), sau đó gộp lại thành 7 phân đoạn [(STE5 (1-7)]. Tiếp tục sắc kí cột phân đoạn STE5.4 (230,5 mg) trên silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi giải môi *n*-hexane : chloroform (0-100) % thu được 27 phân đoạn (mỗi phân đoạn 20 mL), gộp lại thành 8 phân đoạn [STE5.4 (1-8)]. Tinh chế phân đoạn STE5.4.5 (34,6 mg) trên silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi nước : methanol (70-100) %, theo sau là sắc kí lọc gel trên Sephadex LH-20 với hệ dung môi chloroform : methanol (1:1) thu được hợp chất tinh khiết 1 (3,5 mg).

Sắc kí cột phân đoạn STE5.5 (200,0 mg) trên silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate (0-100) % cho ra 30 phân đoạn (mỗi phân đoạn 50 mL), sau đó gộp lại thành 5 phân đoạn [STE5.5 (1-5)]. Tiếp tục sắc kí cột phân đoạn STE5.5.1 (80,3 mg) trên silica gel pha thường với hệ dung môi chloroform : ethyl acetate (0-100) % thu được 25 phân đoạn (mỗi phân đoạn 15 mL), gộp lại thành 3 phân đoạn [STE5.5.1 (1-3)]. Tinh chế phân đoạn STE5.5.1.2 (12,5 mg) trên silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi giải môi chloroform : isopropanol (0-100) % cho ra hợp chất 2 (4,7 mg).

Bảng 1 Kết quả sắc kí cột cao ethyl acetate của cây QBTS

Phân đoạn	Kí hiệu	Khối lượng (g)
1	STE 1	1,6
2	STE 2	3,5
3	STE 3	0,9
4	STE 4	0,1
5	STE 5	1,0
6	STE 6	2,2
7	STE 7	1,4
8	STE 8	1,3
9	STE 9	1,5



Sơ đồ 1 Quy trình điều chế cao và phân lập chất từ cao ethyl acetate của cây QBTS, (dung li – viết tắt của “dung môi giải li”)

3 Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định cấu trúc hợp chất 1

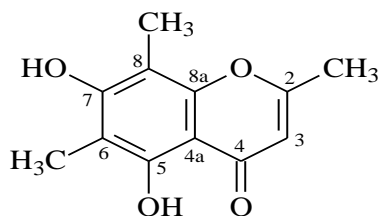
Hợp chất **1** thu được dưới dạng bột màu vàng, hấp thụ tia tử ngoại.

Phổ ^1H NMR cho các tín hiệu cộng hưởng của một proton olefin [δ_{H} 6,06 (1H, s, H-3)], ba nhóm methyl gắn với carbon olefin và carbon hương phương [δ_{H} 2,40 (3H, s, 2- CH_3); 2,21 (3H, s, 8- CH_3); 2,09 (3H, s, 6- CH_3)].

Phổ ^{13}C NMR cho các tín hiệu cộng hưởng tương ứng của một carbon carbonyl tiếp cách [δ_{C} 184,1 (C-4)], bốn carbon olefin và hương phương mang oxygen [δ_{C} 168,2 (C-2); 161,1 (C-7); 157,3 (C-5); 154,7 (C-8a)],

ba nhóm methyl [δ_{C} 20,4 (2- CH_3); 8,0 (8- CH_3); 7,7 (6- CH_3)].

Sự hiện diện của một carbon carbonyl tiếp cách, hai carbon olefin, trong đó có một carbon mang oxygen cùng với 6 carbon hương phương (*carbon gắn trên nhân thơm*) là đặc trưng cho khung chromone. Cho nên hợp chất **1** có thể là một chromone mang hai nhóm hydroxyl và ba nhóm methyl. Sau khi so sánh các dữ liệu phổ của **1** với tài liệu tham khảo cho thấy hợp chất này chính là 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone, được phân lập trước đây từ loài *Dianella ensifolia* [5]. Dạng glucoside của hợp chất này được tìm thấy trong loài quỳn bá *Selaginella uncinata* [6]. Bảng 2 là số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất **1** và 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone.



Hình 1 5,7-Dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone (1)

Bảng 2 Số liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của **1** (CDCl₃-MeOD) (trị số trong ngoặc là hằng số ghép cặp *J* tính bằng Hz)

Vị trí	1		5,7-Dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone (DMSO-d ₆)
	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
2		168,2	
3	6,06 s	104,7	6,13 s
4		184,1	
4a		103,0	
5		157,3	
6		108,4	
7		161,1	
8		108,4	
8a		154,7	
2-CH ₃	2,40 s	20,4	2,38 s
6-CH ₃	2,09 s	7,7	2,04 s
8-CH ₃	2,21 s	8,0	2,16 s

3.1. Xác định cấu trúc hợp chất **2**

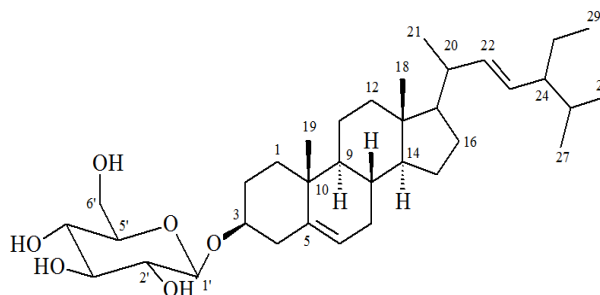
Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Phổ ¹H NMR cho thấy sự hiện diện của ba proton olefin [δ_H 5,33 (1H, br d, *J* = 5,6 Hz, H-6); 5,15 (1H, dd, *J* = 18,9 và 10,8 Hz, H-22); 5,02 (1H, dd, *J* = 18,9 và 10,8 Hz, H-23)], một proton anomer [δ_H 4,22 (1H, d, *J* = 9,7 Hz, H-1')], hai nhóm methyl bậc ba [δ_H 0,65 (3H, s, H-18); 0,96 (3H, s, C-19)], ba nhóm methyl bậc hai [δ_H 0,9 (3H, d, *J* = 8,0 Hz, C-21); 0,75-0,84 (6H, d, H-26 và H-27)], một nhóm methyl bậc một [δ_H 0,75-0,84 (3H, d, H-29)], bốn nhóm hydroxyl [δ_H 4,91 (1H, d, *J* = 6,7Hz, 2'-OH); 4,93 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, 3'-OH); 4,90 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, 4'-OH); 4,46 (1H, t, *J* = 7,1 Hz, 6'-OH)] và những proton của nhóm đường [δ_H 2,91-3,66 (6H, H-2',3',4',5')].

Phổ ¹³C NMR cho thấy sự hiện diện của 35 carbon, trong đó có bốn carbon olefin gồm một carbon olefin nhị hoá [δ_C 140,5 (C-5)], ba carbon olefin đơn hoá [δ_C 138,2 (d, C-22); 128,9 (d, C-23); 119,5 (d, C-6)], một carbon anomer [δ_C 100,8 (d, C-1')], năm nhóm methine mang oxygen [δ_C 76,9 (d, C-3); 76,8 (d, C-3')];

76,8 (d, C-5'); 73,5 (d, C-4'); 70,1 (d, C-2')], một nhóm methylene mang oxygen [δ_C 61,1 (t, C-6')].

Những dữ liệu phổ trên cho thấy hợp chất này có thể là một steroid glycopyranoside. Sự hiện diện của 3 proton olefin, 3 nhóm -CH₃ nhị cấp và 1 nhóm -CH₃ nhất cấp tương đồng với cấu trúc của stigmaterol. Proton anomer ở 4,22 ppm cùng với những proton của nhóm methine mang oxygen ở (2,91-3,66) ppm tương thích với đường β-D-glucose. Như vậy, hợp chất **2** là một dẫn xuất glucoside của stigmaterol. So sánh với tài liệu tham khảo [7], hợp chất **2** được đề nghị là stigmast-5,22-dien-3-O-β-D-glucopyranoside. Số liệu phổ NMR của hợp chất **2** được tóm tắt trong Bảng 3.



Hình 2 Stigmast-5,22-dien-3-O-β-D-glucopyranoside (2)

Bảng 3 Số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của **2** trong DMSO- d_6 (trị số trong ngoặc là hằng số ghép cặp J tính bằng Hz)

Vị trí	2		Stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	(2,37 & 2,12) m	38,4	38,3
2	(1,29-1,43) m	33,4	33,3
3	(3,33-3,50) m	76,9	76,9
4	1,79 br d (10,2) (1,07-1,27) m	36,9	36,8
5		140,5	140,4
6	5,33 br d (4,5)	119,5	121,0
7	(1,43-1,56) m	31,4	31,3
8	(1,43-1,56) m	31,4	31,4
9	(0,92-1,04) m	49,6	49,6
10		35,6	36,2
11	(1,07-1,27) m	22,6	22,6
12	(1,87-2,00) m (1,07-1,27) m	41,9	41,7
13		41,8	41,8
14	(1,07-1,27) m	56,2	56,2
15	(1,07-1,27) m	24,0	24,7
16	(1,87-2,00) m	28,7	29,2
17	(0,92-1,04) m	56,2	56,1
18	0,65 s	11,9	11,8
19	0,95 s	19,2	19,0
20	(1,29-1,43) m	35,5	35,4
21	0,90 d (6,4)	19,0	18,8
22	5,15 dd (15,1 & 8,6)	138,2	137,8
23	5,01 dd (15,2 & 8,7)	128,9	128,8
24	(0,92-1,04) m	31,4	31,2
25	1,62 m	31,4	31,2
26	(0,75-0,84) d	19,8	19,3
27	(0,75-0,84) d	18,7	18,9
28	(0,92-1,04) m	22,6	23,8
29	(0,75-0,84) d	11,7	11,6
1'	4,21 d (7,8)	100,8	100,8
2'	2,88 td (8,3 & 4,8)	70,1	70,1
3'	3,10 dd (8,8 & 4,9)	76,8	76,7
4'	3,01 dd (8,6 & 5,1)	73,5	73,4
5'	3,05 dd (5,7 & 1,6)	76,8	76,6
6'	3,64 dd (10,1 & 5,8) (3,33-3,50) m	61,1	61,1
2'-OH	4,91 d (5,3)		
3'-OH	4,93 d (4,8)		
4'-OH	4,89 d (5,6)		
6'-OH	4,46 t (5,7)		

4 Kết luận và kiến nghị

Từ cao ethyl acetate của cây QBTS thu hái ở huyện Mộ Đức, tỉnh Quảng Ngãi, hai hợp chất tinh khiết đã được phân lập bằng phương pháp sắc kí bản mỏng kết hợp với sắc kí cột trên silica gel pha thường, pha đảo RP-18 và Sephadex LH-20 với những hệ (dung li khác) dung môi khác nhau. Cấu trúc của hai hợp chất này được xác định dựa trên phổ NMR bao gồm: một dẫn xuất chormanone, 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone

(1) và một dẫn xuất glycoside, stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside (2). Đây là lần đầu hai hợp chất này được tìm thấy trong cây QBTS ở Việt Nam (đã được kiểm chứng qua các số liệu phổ và kiểm tra trên công cụ tìm kiếm SciFinder). Bộ dữ liệu thu được cho thấy khả năng ứng dụng của cây QBTS và là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo.

Các phân đoạn còn lại của cao ethyl acetate cần tiếp tục được nghiên cứu, đặc biệt là các hoạt tính sinh học của cao: kháng ung thư, kháng oxi hóa hoặc kháng viêm.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học và NXB Thời đại, Hà Nội, pp. 269-270.
2. David, Y. (2002). *The Guarijios of the Sierra Madre: Hidden people of Northwestern Mexico*, University of New Mexico Press, Mexico, pp. 225.
3. Pampurova, S., Van Dijck, P. (2014). *The desiccation tolerant secrets of Selaginella lepidophylla: What we have learned so far?*. Plant Physiology and Biochemistry, 80, pp. 285–29.
4. Ahmad, D., S. (2011). *Natural products from Genus Selaginella (Selaginellaceae)*. Nusantara Bioscience, 3, pp.44-58
5. Vitchu, L., Kovit, C., Kanchana, S., và Pichaet, W. (1982). *Chemical constituents of Dianella ensifolia Redoute*. J. Sci. Soc. Thailand, 8, pp.95-102, 1982.
6. Ling-Yun, M. A., Feng, W., Shuang-Cheng, M. A., Rui-Chao, L. (2002). *Two new chromone glycosides from Selaginella uncinata*. Chinese Chemical Letters, 13(8), pp. 748-751.
7. Ahmad, R., Alfian, N., Nunuk, H. S. (2012). *A stigmasteryl glycoside from the root wood of Melochia umbellata (Houtt) Stapf var. degrabrata K., Indo. J. Chem., 12(1), pp. 100-103.*

Isolation Procedure of Chemical Composition in ethyl acetate from *Selaginella tamariscina*

Ngo Thi Chau

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

ntchau@ntt.edu.vn

Abstract *Selaginella tamariscina* was picked in Quang Ngai province and studied with the aim of finding out the chemical compositions in ethyl acetate solvent by isolating and determining the structure of its chemical component. Extraction of *Selaginella tamariscina* (7.3 kg) using Soxhlet method with the solvents of *n*-hexane, ethyl acetate and methanol in turn gave corresponding extracts after vaporization of the solvents. Column chromatography and thin layer chromatography of the ethyl acetate extract (50.2 g) on silica gel, RP-18 and Sephadex LH-20 with different solvent systems led to isolation of two compounds. Based on data of ^1H and ^{13}C NMR, as well as comparison of literature, the structure of these compounds were identified as a chromone, 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone (1) and a steroidal glycoside, stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside (2). This is the first time these compounds have been found in *Selaginella tamariscina* in Vietnam and the world. Furthermore, chemical study of remaining fractions are being carried out to collect more compounds in order to test for biological activity such as anticarcinogenic, anti-oxidant or anti-inflammatory.

Keywords *Selaginella tamariscina*, ethyl acetate, 5,7-dihydroxy-2,6,8-trimethylchromone, stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside