

# Khảo sát thành phần hóa học của lá cây Trường Sinh *Kalanchoe pinnata* L. (Crassulaceae)

- Đặng Hoàng Phú
- Dương Thị Yến Phương
- Phan Nguyễn Hữu Trọng
- Nguyễn Anh Thy
- Nguyễn Trung Nhân

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 03 tháng 7 năm 2013)

## TÓM TẮT:

Từ cao chloroform và cao ethyl acetate của lá cây Trường Sinh (*Kalanchoe pinnata* L.) họ Crassulaceae, năm hợp chất đã được cô lập bao gồm: quercetin (1), 5,7,4'-trihydroxy-8,3'-dimethoxyflavone (2), acid

gallic (3), acid ferulic (4) và acid isoferulic (5). Cấu trúc hóa học của các hợp chất trên được xác định bởi phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh với tài liệu tham khảo.

**Từ khóa:** Trường Sinh, *Kalanchoe pinnata*, Crassulaceae.

## MỞ ĐẦU

Chi *Kalanchoe* có khoảng 200 loài, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và nam Phi; ở châu Á có khoảng 10 loài, trong đó hầu hết cũng có mặt ở Việt Nam. Trường sinh là cây đặc biệt ưa sáng, chịu hạn tốt, thường mọc hoang dại trên các hốc mùn đá ở vùng núi đá vôi và đồi thấp ven biển. Cây thân cỏ, cao 40 – 60 cm, thân rồng, mọc đứng, hình trụ, nhẵn, có đốm tím, lá mọc đối hình chữ thập. Hoa mọc ở ngọn hoặc kẽ lá, hoa đều, hình trụ, màu tím hồng, đỏ hoặc vàng cam sẫm hơn ở đầu [1].

Trong lá chứa các hoạt chất bryophyllin, là các bufadienolid có độc tính mạnh với tế bào ung thư. Các bufadienolide có trong cây trường sinh có tác dụng kháng khuẩn, kháng ung bướu, ngăn ngừa ung thư và có thể dùng điều trị một số bệnh về đường ruột. Bên cạnh đó trong cây trường sinh còn có chứa các hợp chất phenol, flavonoid, steroid và triterpen. Theo y học dân gian thì lá trường sinh được dùng chữa bong, vết thương,

đau mắt đỏ, viêm kết mạc, lở ngứa, mặt sưng đỏ, chảy máu, ung nhọt sưng tấy, bệnh viêm loét dạ dày, viêm ruột, ngộ độc, trĩ nội đi ngoài ra máu [2].

Cao nước và cao cồn của lá trường sinh có tác dụng ức chế các vi khuẩn tụ cầu vàng, trực khuẩn mủ xanh, trực khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas* và *Streptococcus viridans*. Cao methanol của lá Trường Sinh có hoạt tính chống viêm trên chuột cống và chuột nhắt trắng trong các mô hình thực nghiệm, có thể trong thành phần của cây có  $\beta$ -sitosterol và một số alcol béo tham gia vào tác dụng này. Ba hợp chất bryophyllin A, bryophyllin B, bersaldegenin-3-acetat trong cây tươi có độc tính tế bào mạnh (*in vitro*) đối với tế bào u KB. Bryophyllin A và bersaldegenin-3-acetat còn có tác dụng gây độc đối với các tế bào A-549 và HCT-8 [3].

Vì những hoạt tính sinh học có giá trị và thành phần hóa học đa dạng nên chúng tôi tiến hành khảo sát thành phần hóa học của lá cây **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

#### Thiết bị và hóa chất

Máy Bruker Avance 500 [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) và 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ )]. Máy Agilent 1100 ghi phổ khối lượng. Máy Spectroline MODEL ENF-240C/FE (USA) hai bước sóng 254 nm và 365 nm. Sắc kí lớp mỏng trên bản nhôm tráng sẵn và sắc kí cột sử dụng silica gel Merck, Kielselgel 60 F<sub>254</sub> (40-63  $\mu\text{m}$ ) và silica gel Merck 60 RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ).

#### Nguyên liệu

Mẫu cây Trường Sinh, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Perk, được thu hái tại Hòa Thành-Tây Ninh vào tháng 1 năm 2008 và được định danh bởi ThS. Kiều Phương Nam, khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

#### Chiết tách và phân lập

Bột khô của lá (5,9 kg) được chiết nóng với methanol bằng cách đun hoàn lưu trong 3h, lọc lấy dịch chiết, cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được cao methanol thô (515,9 g). Cao thô methanol được hòa tan với nước rồi trích lỏng- lỏng lần lượt với các dung môi petroleum ether, chloroform và ethyl acetate thu được các cao tương ứng: cao petroleum ether (150 g), cao chloroform (17,5 g), cao ethyl acetate (12,5 g) và phần còn lại là cao nước (202,5 g).

Tiến hành sắc ký bản mỏng các loại cao trên với hệ dung ly chloroform : methanol (9:1), hiện màu bằng dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20%, đun nóng. Kết quả sắc ký bản mỏng cho thấy các vết của cao chloroform và cao ethyl acetate tách rõ nên được chọn để khảo sát thành phần hóa học.

Sắc ký cột cao ethyl acetate với hệ dung môi giải ly là  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (0-30% MeOH) thu được 4 phân đoạn (EA1-EA4). Sắc ký cột phân đoạn EA3 với hệ dung môi giải ly là petroleum ether:ethyl acetate (70:30) thu được 5 phân đoạn

trường sinh nhằm mục đích tìm kiếm thêm các hợp chất có cấu trúc và hoạt tính lí thú.

(EA3.1- EA3.5). Tiếp tục sắc kí cột phân đoạn EA3.2 với hệ dung môi giải ly là  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2-5% MeOH) thu được phân đoạn EA3.2.2, sử dụng sắc kí cột silica gel pha đảo RP18 với hệ dung môi giải ly là MeOH:H<sub>2</sub>O (1:3) trên phân đoạn này thu được hợp chất (1) (42,8 mg).

Tương tự, sắc kí cột phân đoạn EA2 với các hệ dung môi giải ly là petroleum ether:ethyl acetate (70:30),  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2-5% MeOH) thu được hợp chất (2) (9,3 mg).

Thực hiện sắc ký cột cao chloroform với hệ dung môi giải ly là petroleum ether:ethyl acetate (0-100% ethyl acetate) thu được 8 phân đoạn (C1-C8). Sắc kí cột phân đoạn C7 với hệ dung môi giải ly là petroleum ether:ethyl acetate (30-35% ethyl acetate) thu được hợp chất (3) (4,8 mg).

Sắc kí cột phân đoạn C6 với hệ dung môi giải ly là petroleum ether:ethyl acetate (20-25% ethyl acetate) thu được hai phân đoạn C6.1 và C6.2. Sắc kí cột phân đoạn C6.1 với hệ dung môi giải ly là  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (7% MeOH) thu được hợp chất (5) (5,9 mg). Tương tự với phân đoạn C6.2 với hệ dung môi giải ly là  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (10% MeOH) thu được hợp chất (4) (4,5 mg).

Hợp chất (1): bột màu vàng sậm, tan tốt trong các dung môi acetone, methanol và DMSO;  $R_f = 0,4$  (12% MeOH: $\text{CHCl}_3$ ); hấp thu UV, hiện màu bằng dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20%, hơi nóng cho vết tròn màu cam;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  6,18 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ; H-6); 6,40 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ; H-8); 7,67 (1H; d;  $J=2,5\text{Hz}$ ; H-2'); 6,88 (1H; d;  $J=8,5\text{Hz}$ ; H-5'); 7,54 (1H; dd;  $J=8,5$  và  $2,5\text{Hz}$ ; H-6'); 12,47 (1H; s; 5-OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  146,8 (C-2); 136,0 (C-3); 175,8 (C-4); 103,0 (C-4a); 160,7 (C-5); 98,1 (C-6); 163,9 (C-7); 93,3 (C-8); 156,1 (C-8a); 120,0 (C-1'); 115,6 (C-2'); 145,0 (C-3'); 147,7 (C-4'); 115,6 (C-5'); 122,0 (C-6').

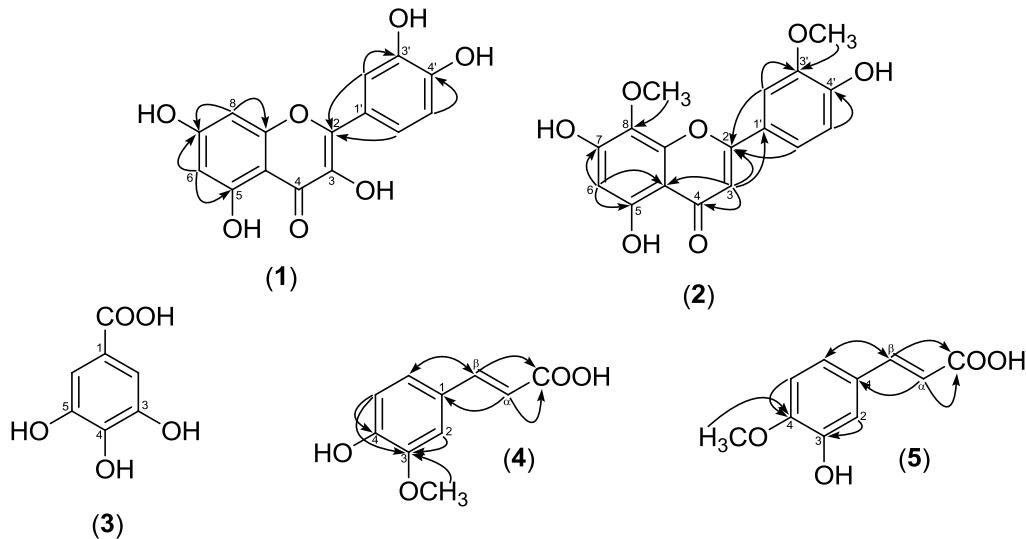
Hợp chất (2): bột màu vàng sậm, tan tốt trong các dung môi pyridine;  $R_f = 0,42$  (10% MeOH:CHCl<sub>3</sub>); hấp thu UV, hiện màu bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%, hơi nóng cho vết tròn màu vàng; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  $\delta_H$  7,00 (1H; s; H-3); 6,83 (1H; s; H-6); 7,70 (1H; *d*;  $J=1,8$ Hz; H-2'); 7,34 (1H; *d*;  $J=8,3$ Hz; H-5'); 7,80 (1H; *dd*;  $J=8,3$  và  $1,8$ Hz; H-6'); 4,03 (3H; s; 8-OCH<sub>3</sub>); 3,89 (3H; s; 3'-OCH<sub>3</sub>); 13,43 (1H; s; 5-OH); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>):  $\delta_C$  164,8 (C-2); 104,5 (C-3); 183,4 (C-4); 105,4 (C-4a); 158,6 (C-5); 100,8 (C-6); 159,3 (C-7); 129,5 (C-8); 151,0 (C-8a); 123,2 (C-1'); 110,9 (C-2'); 149,7 (C-3'); 153,1 (C-4'); 117,7 (C-5'); 121,8 (C-6'); 61,9 (8-OCH<sub>3</sub>); 56,6 (3'-OCH<sub>3</sub>).

Hợp chất (3): tinh thể không màu, tan trong methanol,  $R_f = 0,190$  (30% AcOH:CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  7,08 (2H; s; H-2, 6); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  121,9 (C-1); 110,3 (C-2, 6); 146,2 (C-3, 5); 139,4 (C-4); 170,2 (-COOH).

Hợp chất (4): bột màu trắng, tan trong CHCl<sub>3</sub>,  $R_f=0,60$  (10% MeOH:CHCl<sub>3</sub>), hiện màu

bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%, hơi nóng cho vết tròn màu đen; <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  6,48 (1H; *d*;  $J=16,0$ Hz; H- $\alpha$ ); 7,59 (1H; *d*;  $J=16,0$ Hz; H- $\beta$ ); 7,05 (1H; *d*;  $J=1,6$ Hz; H-2); 6,93 (1H; *d*;  $J=8,0$ Hz; H-5); 7,12 (1H; *dd*;  $J=1,6$  và  $8,0$ Hz; H-6); 3,94 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  127,9 (C-1); 109,9 (C-2); 147,0 (C-3); 148,0 (C-4); 115,0 (C-5); 123,0 (C-6); 122,0 (C- $\alpha$ ); 140,6 (C- $\beta$ ); 56,1 (3-OCH<sub>3</sub>); 183,4 (-COOH).

Hợp chất (5): bột màu trắng, tan trong acetone,  $R_f=0,42$  (5% MeOH:CHCl<sub>3</sub>), hiện màu bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%, hơi nóng cho vết tròn màu tím; <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_H$  6,32 (1H; *d*;  $J=16,0$ Hz; H- $\alpha$ ); 7,56 (1H; *d*;  $J=16,0$ Hz; H- $\beta$ ); 7,17 (1H; *d*;  $J=2,0$ Hz; H-2); 6,99 (1H; *d*;  $J=8,3$ Hz; H-5); 7,11 (1H; *dd*;  $J=2,0$  và  $8,3$ Hz; H-6); 3,89 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_C$  128,6 (C-1); 114,4 (C-2); 147,7 (C-3); 150,5 (C-4); 112,2 (C-5); 122,0 (C-6); 116,6 (C- $\alpha$ ); 145,4 (C- $\beta$ ); 56,1 (4-OCH<sub>3</sub>); 168,1 (-COOH).



Hình 1. Cấu trúc hóa học và các tương quan HMBC của các hợp chất (1)-(5)

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất (1) cho thấy có sự hiện diện của proton tại  $\delta_{\text{H}}$  12,47 ppm (1H; s; 5-OH) đặc trưng cho nối hydrogen nội phân tử của một nhóm -OH gần nhóm carbonyl trong khung flavone. Các tín hiệu proton của nhân benzene cộng hưởng ở  $\delta_{\text{H}}$  6,0-8,0; trong đó các tín hiệu cộng hưởng [ $\delta_{\text{H}}$  6,88 (1H; d;  $J=8,5\text{Hz}$ ; H-5'); 7,54 (1H; dd;  $J=8,5\text{Hz}$  và  $2,5\text{Hz}$ ; H-6') và 7,67 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ; H-2')] chứng tỏ hợp chất (1) có chứa vòng benzene thế ở vị trí 1, 3, 4. Ngoài ra còn có các tín hiệu  $\delta_{\text{H}}$  6,40 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ; H-8) và 6,18 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ; H-6) chứng tỏ hợp chất (1) có chứa thêm một vòng benzene thế ở vị trí 1, 2, 3 và 5. Bên cạnh đó, phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cho các tín hiệu ứng với sự hiện diện của 15 carbon, kết hợp với dữ liệu phổ  $^1\text{H}$ -NMR cho thấy hợp chất (1) là một flavone. Phổ DEPT-NMR cho thấy có 5 carbon metin  $>\text{CH}-$  và 10 carbon bậc bốn  $>\text{C}<$ , trong đó có 7 tín hiệu carbon bậc bốn ở vùng  $\delta_{\text{C}}$  135,0–163,9 ppm cho thấy chúng mang oxygen và một tín hiệu carbon carbonyl tiếp cách  $\delta_{\text{C}}$  175,8 ppm. Phân tích phổ HSQC và HMBC kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [4] đề nghị hợp chất (1) là quercetin.

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất (2) tương tự với phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất (1) các tín hiệu proton cũng cho thấy hợp chất (2) gồm hai vòng benzen trong đó có một vòng benzene thế ở vị trí 1, 3, 4 và một vòng benzen thế ở vị trí 1, 2, 3, 4, 5. Ngoài ra còn xuất hiện thêm một tín hiệu proton olefine tại  $\delta_{\text{H}}$  7,00 (1H; s; H-3) và hai tín hiệu proton của nhóm methoxyl tại  $\delta_{\text{H}}$  4,03 (3H; s; 8-OCH<sub>3</sub>) và 3,89 (3H; s; 3'-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất (2) cho các mũi ứng với sự hiện diện của 15 carbon. Kết hợp với dữ liệu phổ  $^1\text{H}$ -NMR cho thấy hợp chất (2) cũng là một flavone. Tiến hành phân tích phổ HSQC và HMBC kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [5] đề nghị hợp chất (2) là 5,7,4'-trihydroxy-8,3'-dimethoxyflavone.

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất (3) chỉ cho duy nhất 1 tín hiệu proton tại  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (2H; s; H-2, 6), chứng tỏ hợp chất (3) có 1 vòng benzene thế ở vị trí 1, 3, 4, 5. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất (3) cho tín hiệu của 6 carbon vòng benzene nằm trong vùng 110-147 ppm và tín hiệu của 1 carbon carbonyl nhóm acid carboxylic tại 170,2 ppm. So sánh các dữ liệu phổ thu được với tài liệu tham khảo [6] kết luận hợp chất (3) là acid gallic.

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất (4) cho tín hiệu của vòng benzene thế ở vị trí 1, 3, 4 [ $\delta_{\text{H}}$  7,05 (1H; d;  $J=1,6\text{Hz}$ ; H-2); 6,93 (1H; d;  $J=8,0\text{Hz}$ ; H-5) và 7,12 (1H; dd;  $J=8,0$  và  $1,6\text{Hz}$ ; H-6)] và 1 tín hiệu proton của nhóm methoxyl [ $\delta_{\text{H}}$  3,94 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>)]. Ngoài ra, còn có tín hiệu của 2 proton olefine ghép cặp *trans* [ $\delta_{\text{H}}$  6,48 (1H; d;  $J=16,0\text{Hz}$ ; H- $\alpha$ ); 7,59 (1H; d;  $J=16,0\text{Hz}$ ; H- $\beta$ )]. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất (3) cho 10 tín hiệu, trong đó có 1 tín hiệu carbon carbonyl của nhóm carboxyl [ $\delta_{\text{C}}$  183,4], 1 tín hiệu carbon của nhóm methoxyl [ $\delta_{\text{C}}$  56,1] và 8 tín hiệu carbon trong vùng 109-150 ppm ứng với 6 carbon của vòng benzene và 2 carbon olefine. Phổ HMBC của hợp chất (3) cho thấy có sự tương quan giữa proton của nhóm methoxyl với carbon C-3 của vòng benzene. So sánh dữ liệu phổ với tài liệu tham khảo, [7] kết luận hợp chất (4) là acid ferulic.

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất (5) cho các tín hiệu tương tự như phổ  $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất (4). Tiến hành phân tích phổ HSQC và HMBC cho thấy tương quan giữa proton của nhóm methoxyl với carbon C-4 của vòng benzene. So sánh các dữ liệu phổ với tài liệu tham khảo [7] kết luận hợp chất (5) là acid isoferulic.

## KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, chúng tôi đã phân lập được 5 hợp chất từ lá cây Trường Sinh thu hái tại Hòa Thành–Tây Ninh. Sử dụng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) và hai

chiều (HSQC, HMBC) kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của 5 hợp chất được xác định là quercetin (1), 5,7,4'-trihydroxy-8,3'-dimethoxyflavone (2), acid gallic (3), acid ferulic (4) và acid isoferulic (5).

Trong số các hợp chất cô lập được, các hợp chất 5,7,4'-trihydroxy-8,3'-dimethoxyflavone (2), acid gallic (3) và acid isoferulic (5) lần đầu tiên được tìm thấy có trong lá cây Trường Sinh.

## Investigation of chemical constituents of the leaves from *Kalanchoe pinnata* L. (Crassulaceae)

- Dang Hoang Phu
- Duong Thi Yen Phuong
- Phan Nguyen Huu Trong
- Nguyen Anh Thy
- Nguyen Trung Nhan

University of Science, VNU-HCM

### ABSTRACT

*From the chloroform and ethyl acetate extracts of the leaves of Kalanchoe pinnata L. (Crassulaceae), two flavonoids and three phenolic compounds were isolated; named quercetin (1), 5,7,4'-trihydroxy-8,3'-dimethoxyflavone (2), gallic acid (3), ferulic*

**Key words:** *Kalanchoe pinnata*, Crassulaceae.

*acid (4) and isoferulic acid (5). Based on the NMR spectroscopy, their chemical structures were elucidated and the result was confirmed by comparison with published data.*

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 157 (1995).
- [2] Đỗ Huy Bích, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 912-914 (2004).
- [3] M.F. Muzitano, L.W. Tinoco, C. Guette, C.R. Kaiser, B.R. Bergmann, S.S. Costa., The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*, *Phytochemistry*, 67, 2071-2077 (2006).
- [4] X.W. Wang, Y. Mao, N.L. Wang, X. S. Yao, A New Phloroglucinol Diglycoside Derivative from *Hypericum japonicum* Thunb, *Molecules*, 13, 2796-2803 (2008).
- [5] A. Pukalska, P.R. Venskutonis, I. Dijkgraaf, T.A. van Beek, Isolation, identification and activity of natural antioxidants from

- costmary (*Chrysanthemum balsamita*) cultivated in Lithuania, *Food chemistry*, 122, 804-811 (2010).
- [6] B. Bhatt, Chemical constituents of *Solanum xanthocarpum*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 176-181 (2011).
- [7] S. Prachayasittikul, S. Suphamong, A. Worachartcheewan, R. Lawung, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr., *Molecules*, 14, 850-867 (2009).