**Nghiên cứu thành phần hóa học của rễ cây sâm vũ diệp**

**(*Panax bipinnatifidius* Seem.) thu hái ở Sa Pa, Lào Cai**

Đỗ Văn Hào1, Nguyễn Thị Huệ1, Nguyễn Thị Thu Thủy2, Đặng Thị Ngần1,

Đào Thị Hồng Bích1, Nguyễn Thị Hoàng Anh1, Dương Thị Ly Hương1,

Hà Thị Thanh Hương1, Nguyễn Hữu Tùng1,\*

*1Khoa Y Dược Đai học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội*

*2Khoa Dược, Trường ĐH Y Dược Thái Nguyên, 284 Lương Ngọc Quyến, TP Thái Nguyên*

\* Tác giả liên hệ:

**TS. Nguyễn Hữu Tùng**

Khoa Y Dược, ĐHQGHN; 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: tunginpc@gmail.com

Điện thoại: +84-9787-454-94

**Tóm tắt**

Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidius* Seem.) là một dược liệu quý và đặc hữu của vùng Tây Bắc. Trong nghiên cứu về thành phần hóa thực vật của rễ sâm vũ diệp, bằng các phương pháp phân lập sắc ký chúng tôi đã tinh chế được 3 hợp chất từ phân đoạn hữu cơ ethyl acetat. Ba hợp chất lần lượt được xác định là *β*-sitosterol (**1**), acid oleanolic (**2**) và daucosterol (**3**) trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối MS. Đây là công bố đầu tiên về phân lập các hợp chất này từ sâm vũ diệp ở nước ta.

**Từ khóa**: Sâm vũ diệp, *Panax bipinnatifidius*, sterol, acid oleanolic

**Summary**

**Study on chemical constituents from the roots of *Panax bipinnatifidius* Seem.**

**collected in Sapa, Laocai**

*Panax bipinnatifidius* Seem. is one of the highly valuable and most used in Vietnam. By using the chromatographic techniques, we have purified three compounds from the ethyl acetate fraction of the root of *P.bipinnatifidius* Seem. Three compounds were identified as *β*-sitosterol (**1**), oleanolic acid (**2**), and daucosterol (**3**), respectively on the basis of analysis of NMR and MR spectrum data. This is the first publication on the isolation of these compounds from *P. bipinnatifidius* Seem. in Vietnam

**Keywords:** Sam vu diep, *Panax bipinnatifidius*, sterol, oleanolic acid

1. **Đặt vấn đề**

Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem., họ Nhân sâm-Araliaceae), còn gọi là Trúc tiết nhân sâm, Tam thất lá xẻ, Sâm hai lần xẻ hoặc Hoàng liên thất có thân thảo, sống nhiều năm; cao 0,25 – 0,7 m; đường kính thân từ 0,3 – 0,6 cm. Thân rễ mập, phân nhánh, nằm ngang và thường nổi trên mặt đất; đường kính 1,5 – 3,5 cm. Lá kép chân vịt, thường gồm 3 – 5 lá chét, mép khía răng cưa. Cụm hoa tán đơn, mọc ở ngọn; cuống cụm hoa 5 – 10 cm; cụm hoa có từ 20 – 90 hoa; cuống hoa mảnh dài 1 – 1,5 cm. Quả hình cầu đến hình cầu dẹt; đường kính 0,6 – 1,2 cm; khi chín màu đỏ. Hạt hình cầu hoặc gần cầu, màu xám trắng; vỏ cứng, có rốn hạt [1].

Trong tự nhiên, sâm vũ diệp phân bố ở Trung Quốc và dãy núi Hoàng Liên Sơn Tây Bắc nước ta. Gần đây sâm vũ diệp đã được thuần hóa và bước đầu được trồng thử nghiệm ở một số địa phương ở Hà Giang và Lào Cai. Về mặt y học, củ rễ của sâm vũ diệp đã được sử dụng làm thuốc bổ và trong một số bài thuốc truyền thống bởi các dân tộc vùng núi Tây Bắc [2]. Tra cứu tài liệu thấy rằng có rất ít nghiên cứu về thành phần hóa học, tác dụng sinh học và dược lý để phát triển sử dụng dược liệu quý thuộc chi Sâm (*Panax*) này.

Tiếp theo các nghiên cứu của Nhóm nghiên cứu về thành phần hóa học các cây thuốc, dược liệu tiềm năng của vùng Tây Bắc bao gồm đan sâm [3], tam thất [4], bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu bước đầu về thành phần hóa học của rễ sâm vũ diệp thu hái ở Lào Cai.

1. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**
	1. *Đối tượng nghiên cứu sâm vũ diệp*

Mẫu nghiên cứu rễ sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) được thu hái ở Sa Pa, Lào Cai vào tháng 3-2016 và được giám định tên khoa học bởi TS Phạm Thanh Huyền, Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Mẫu tiêu bản (PB-001/2016) được lưu giữ tại Khoa Y Dược, ĐHQGHN.

* 1. *Dung môi, hóa chất*

Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như ethanol (EtOH), methanol (MeOH), *n*-hexan (Hex), dicloromethan (CH2Cl2), chloroform (CHCl3), ethyl acetat (EtOAc), *n*-Butanol (BuOH) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột là silica gel pha thường (0,040 - 0,063 mm, Nacalai Tesque Inc., Nhật Bản), silica gel pha đảo ODS-A (50μm, YMC Co. Ltd., Nhật Bản). Bản mỏng tráng sẵn trên đế nhôm loại pha thường Kieselgel 60 F254 và pha đảo TLC Silica gel 60 RP-18 F254S (Merck, Damstadt, Đức). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H2SO4 10 % hơ nóng để phát hiện vết chất.

* 1. *Thiết bị, dụng cụ*

Năng suất quay cực đo trên máy Jasco DIP-360 digital polarimeter. Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP3 (Sanyo, Nhật Bản). Phổ khối ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1260 Series LC-MS/MS ion Trap (Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một và hai chiều được đo trên máy JEOL ECX 400 (Jeol, Nhật Bản) và sử dụng dung môi CDCl3/CD3OD, chất nội chuẩn là tetramethylsilan (TMS).

* 1. *Phương pháp nghiên cứu*

*2.4.1. Phương pháp phân tính định tính các nhóm chất*

Các nhóm chất hóa học thường gặp trong dược liệu được định tính bằng các phản ứng hóa học đặc trưng theo các tài liệu [5],[6].

*2.4.2. Phương pháp phân lập các hợp chất*

Dược liệu được chiết hồi lưu bằng dung môi EtOH 70%. Phân đoạn bằng dung môi công nghiệp ê-te, etyl acetat và butanol. Sử dụng sắc ký cột với chất nhồi cột là silica gel pha thường và pha đảo để phân lập các hợp chất. Theo dõi các phân đoạn chất bằng sắc ký lớp mỏng. Phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hoặc dùng thuốc thử. Kiểm tra độ tinh khiết của các chất phân lập bằng sắc ký lớp mỏng.

*2.4.3. Phương pháp phân tích cấu trúc các hợp chất phân lập được*

Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên tính chất cảm quan và các phương pháp phổ bao gồm: phổ khối lượng (ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và so sánh dữ liệu phổ thu được với các dữ liệu phổ đã công bố.

* 1. *Chiết xuất và phân lập*

Mẫu rễ sâm vũ diệp (500 g) sau khi rửa sạch, phơi khô, thái nhỏ được ngâm chiết kỹ bằng dung môi ethanol 70% 3 lần (mỗi lần 1500 ml) sử dụng thiết bị chiết hồi lưu trong 3 giờ. Các dịch chiết ethanol thu được được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 95,9 g cao chiết tổng ethanol. Lấy 95,0 g cao chiết hòa tan trong nước cất (500 ml) và chiết phân bố bằng Ê-te, EtOAc và BuOH (mỗi dung môi 3 lần, mỗi lần 500 ml). Các dịch chiết phân đoạn được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn tương ứng E-te (5,82 g), EtOAc (2,70 g) và BuOH (21,7 g). Tiếp theo, phân đoạn EtOAc được tiến hành phân lập sắc ký sử dụng cột nhồi silica gel (Φ40 mm × 300 mm) với hệ dung môi rửa giải hexane-EtOAc (6:1, v/v, 1800 ml) thu được 5 phân đoạn ký hiệu là E1~E5.

Phân đoạn E1 (320 mg) được tiếp tục phân lập sắc ký cột mở pha đảo C18 (Φ 20 mm × 350 mm) với hệ pha động MeOH-H2O (4:1, v/v, 400 ml) thu được hợp chất số 1 (bột màu trắng, 23 mg). Từ phân đoạn E3 (360 mg), kết hợp chạy sắc ký cột pha đảo C18 (Φ20 mm × 350 mm) với hệ pha động MeOH-H2O (5:1, v/v, 400 ml) và sắc ký cột thuận pha silica gel (Φ 20 mm × 330 mm) với hệ pha động CH2Cl2-EtOAc (20:1, v/v, 300 ml) thu được hợp chất số 2 (bột màu trắng, 31 mg). Cuối cùng, tinh chế phân đoạn E5 (290 mg) bằng sắc ký cột thuận pha silica gel (Φ 20 mm × 300 mm) với hệ pha động CHCl3-MeOH (9:1, v/v, 400 ml) và kết tuả thu được hợp chất số 3 (bột màu trắng ngà, 26 mg).

***Hình 1*.** Tóm tắt quy trình phân lập sắc ký 3 hợp chất từ phân đoạn EtOAc

**3. Kết quả và bàn luận**

*3.1. Kết quả phân tích định tính các nhóm chất*

Sử dụng phân tích định tính với các thuốc thử đặc hiệu cho kết quả như trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ thường gặp trong thân rễ sâm vũ diệp

bằng phản ứng hóa học

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **TT** | **Nhóm chất** | **Phản ứng** | **Kết quả** | **Nhận xét** |
| 1 | Flavonoid | Phản ứng Cyanidin | - | Không |
| Phản ứng với [FeCl3](http://phuongtrinhhoahoc.com/chat-hoa-hoc/FeCl3) | - |
| Phản ứng với kiềm | - |
| 2 | Saponin | Phản ứng tạo bọt | ++ | Có |
| 3 | Tanin | Phản ứng Braemer’s | - | Không |
| 4 | Steroid | Phản ứng Libermann-Burchardt | + | Có |
| 5 | Volatile oil | Phản ứng với kiềm | + | Có |
| 6 | Glycosid tim | Phản ứng Keller-Kiliani | - | Không |
| 7 | Đường khử | Phản ứng với thuốc thử Fehling | + | Có |
| 8 | Terpenoid | Phản ứng Libermann-Burchardt | + | Có |
| Phản ứng Salkowski | + |
| 9 | Alcaloid | Thuốc thử Mayer | - | Không |
| Thuốc thử Bouchardat | - |
| 10 | Anthraquinon | Phản ứng với amoniac | - | Không |

Ghi chú:(-) âm tính, (+) dương tính, (++) dương tính rõ

*Nhận xét*: sơ bộ kết luận trong thân rễ sâm vũ diệp có chứa các nhóm chất: Saponin, steroid, terpenoid, dầu béo và đường khử; không thấy sự có mặt của các nhóm chất: flavonoid, tanin, glycosid tim, alcaloid, anthraquinon.

*3.2. Tính chất vật lý và dữ liệu phổ 3 hợp chất tinh khiết phân lập được từ phân đoạn EtOAc*

**Chất số 1** (*β*-sitosterol): Chất bột màu trắng; Mp 136-137o; = -35 (*c* 0,5, CDCl3); ESI-MS: *m/z* 415,2 [M + H]+; 13C NMR (100 Hz, CDCl3): *δ* 37,4 (C-1), 31,9 (C-2), 71,8 (C-3), 42,2 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 31,7 (C-7), 31.9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,8 (C-14), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 56,1 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 36,2 (C-20), 18,8 (C-21), 34,0 (C-22), 26,1 (C-23), 45,8 (C-24), 29,2 (C-25), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27), 23,1 (C-28), 12,0 (C-29).

**Chất số 2** (Acid oleanolic): Chất bột màu trắng; Mp 306oC; = 77o (*c* 0,9, CDCl3); ESI-MS: *m/z* 457 [M + H]+; 13C NMR (100 Hz, CDCl3): *δ* 39,4 (C-1), 26,9 (C-2), 78,9 (C-3), 39,1 (C-4), 55,8 (C-5), 18,8 (C-6), 33,2 (C-7), 39,7 (C-8), 48,0 (C-9), 39,5 (C-10), 24,6 (C-11), 123,1 (C-12), 144,1 (C-13), 41,9 (C-14), 28,4 (C-15), 24,6 (C-16), 48,3 (C-17), 53,3 (C-18), 39,4 (C-19), 39,0 (C-20), 31,0 (C-21), 37,3 (C-22), 28,4 (C-23), 15,6 (C-24), 15,8 (C-25), 17,1 (C-26), 23,7 (C-27), 181,1 (C-28), 17,3 (C-29), 21,4 (C-30).

**Chất số 3** (Daucosterol): Chất bột màu trắng; Mp 284-285o; = -41 (*c* 0,5, CDCl3); ESI-MS: *m/z* 577 [M + H]+; 13C NMR (100 Hz, CD3OD-CDCl3): *δ* 37,4 (C-1), 28,4 (C-2), 79,3 (C-3), 42,2 (C-4), 140,4 (C-5), 122,3 (C-6), 32,0 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,8 (C-14), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 56,1 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 36,2 (C-20), 18,8 (C-21), 34,0 (C-22), 26,1 (C-23), 45,8 (C-24), 29,2 (C-25), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27), 23,1 (C-28), 12,0 (C-29), 101,2 (Glc-1), 75,9 (Glc-2), 77,3 (Glc-3), 70,2 (Glc-4), 77,7 (Glc-5), 61,9 (Glc-6).

*3.3. Biện giải cấu trúc của 3 chất đã phân lập được*

Cấu trúc hóa học của 3 hợp chất (**1**-**3**) được xác định trên cơ sở phân tích phổ và so sánh với chất tham khảo (***Hình 2***).



***Hình 2***. Cấu trúc hóa học của 3 hợp chất phân lập được từ sâm vũ diệp (**1**-**3**)

Chất **1** thu được dưới dạng bột mịn, màu trắng, tonc=136oC, trên TLC khai triển với hệ dung môi *n*-hexan - ethyl acetat (4:1), vết có màu hồng đến tím sau khi phun H2SO4 10% trong ethanol và hơ nóng trên bếp gia nhiệt. Chấm đối chiếu **1** với *β*-sitosterol trên TLC, dung môi khai triển là CH2Cl2-MeOH (10:1), 2 chất cho kết quả Rf tương đồng, từ đó dự đoán **1** là Stigmast-5-en-3-ol hay còn gọi là *β*-sitosterol. Hơn nữa kết quả đo phổ 1H và 13C NMR và sự tương đồng hoàn toàn với số liệu công bố trong tài liệu tham khảo [7] giúp khẳng định cấu trúc của hợp chất **1**.

Tương tự với chất **1**, chất **3** thu được dưới dạng bột màu trắng, tonc=285oC. Kiểm tra bằng TLC với chất đối chiếu là daucosterol, dung môi khai triển là CH2Cl2 - MeOH (9:1), **3** và daucosterol cho kết quả Rf và màu sắc tương đồng. Dựa vào đó, chất **3** được dự đoán là *β*-sitosterol 3-O-*β*-D-glucopyranosid. Phổ 1H và 13C NMR của **3** được phân tích chi tiết và so sánh với tài liệu tham khảo [7] giúp khẳng định cấu trúc của **3** là daucosterol. Hai hợp chất **1** và **3** là thành phần sterol phổ biến có nhiều cây thuốc tuy nhiên theo tài liệu chúng tôi tra cứu được thì chúng chưa được công bố dưới dạng phân lập từ sâm vũ diệp.

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Trên phổ ESI-MS của **2** xuất hiện peak ion tại 457 [M+H]+ phù hợp với công thức phân tử C30H48O3. Phổ 1H NMR và 13C của **2** mang đặc điểm đặc trưng của hợp chất triterpene khung oleanane với các tín hiệu của 7 nhóm methyl bậc một proton olefin tại *δ* 5,23 (1H, br s, H-12) và 1 proton oxymetin [*δ* 3,45 (1H, m, H-3)] [8]. Phổ 13C NMR của **12** xuất hiện 30 tín hiệu cacbon của khung triterpene oleanane, trong đó có 2 olefin cacbon tại *δ* 123,1 (C-12) và 144,1 (C-13) đặc trưng của nối đôi C-12/C-13 cùng với 1 oxymetin cacbon *δ* 78,9 (C-3). Từ những dữ kiện phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ 1H và 13C NMR của acid oleanolic được công bố trong tài liệu thấy hoàn toàn phù hợp [8],[9]. Theo đó hợp chất **2** được xác định là acid oleanolic, đây là lần đầu tiên được phân lập được từ sâm vũ diệp.

**4. Kết luận**

Kết hợp phương pháp phân tính định tính các nhóm chất và bằng phương pháp sắc ký, 3 hợp chất bao gồm *β*-sitosterol (**1**), acid oleanolic (**2**) và daucosterol (**3**) được phân lập từ phân đoạn cao chiết etyl acetate của cao chiết tổng etanol sâm vũ diệp và được xác định cấu trúc trên cơ sở phân tích phổ (MS và NMR) và so sánh với số liệu công bố. Các hợp chất này lần đầu tiên được công bố phân lập được từ sâm vũ diệp (*P. bipinnatifidius* Seem.) ở Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình Khoa học và Công nghệ trọng điểm Nhà nước phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Bắc trong đề tài “Ứng dụng các giải pháp khoa học công nghệ để phát triển nguồn nguyên liệu và tạo sản phẩm từ hai loài cây thuốc Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.Tsai et K.M.Feng) vùng Tây Bắc”, mã số: KHCN-TB.07C/13-18.

**Tài liệu tham khảo**

1. Nguyễn Tập (2005). Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. *Tạp chí Dược liệu*, tập 10, số 3, tr. 71 - 76.
2. Nguyễn Văn Tập, Phạm Thanh Huyền, Lê Thanh Sơn (2006). Kết quả nghiên cứu về phân bố, sinh thái sâm vũ diệp và tam thất hoang ở Việt Nam. *Tạp chí dược liệu*, tập 11, số 5, tr. 177-180.
3. Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Thanh Hải, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Tiến Vững, Bùi Hồng Cường (2016). Một số hợp chất phân lập từ rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) trồng ở huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai. *Tạp chí Dược học* 56 (4), 43-47.
4. Nguyễn Hữu Tùng, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Lê Quốc Hùng, Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Thanh Hải (2016). Thành phần triterpene năm vòng khung ursane phân lập từ rễ cây Đan sâm trồng ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược* 32 (2), 33-36.
5. Bộ môn Dược liệu (2010), *Thực tập Dược liệu*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
6. Bộ Y tế (2011), *Dược liệu học*, tập 1 và 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
7. Subhadhirasakul S and Pechpongs P. A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*. *Songklanakarin J. Sci. Technol*., 2005, 27(Suppl. 2):555-561.
8. Mahato S, Kundu A (1994).13C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a complication and some salient features. *Phytochemistry* 37:1517-1575.
9. Hà Thị Thoa, Đoàn Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Marc Litaudon, Nguyễn Văn Hùng, Châu Văn Minh (2011). Các triterpen từ thân cây ba soi họ thầu dầu (Euphorbiaceae). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 49, 73-77.