

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DANH CẤU TRÚC HAI FLAVONOL TỪ DỊCH CHIẾT ETHYL ACETATE CỦA CÂY CỎ LÀO-*EUPATORIUM ODORATUM* L.

Ngô Quốc Luân¹, Nguyễn Ngọc Châu² và Nguyễn Ngọc Hạnh³

ABSTRACT

From the ethyl acetate extracts of the aerial parts of *Eupatorium odoratum* L. from Phu Yen province, two of flavonols (rhamnocitrin and rhamnetin) were isolated. Their structures were interpreted from spectra including IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, MS and based on published data. These flavonols were tested for antioxidant activity by DPPH method. The result showed that their antioxidant activity is similarly strong.

Keywords: *Eupatorium odoratum* L., *Chromolaena odorata* L.

Title: Isolation and identification of two flavonols from ethyl acetate extracts of *Eupatorium odoratum* L.

TÓM TẮT

Từ dịch chiết ethyl acetate phần trên mặt đất của cây Cỏ Lào ở Phú Yên, chúng tôi đã cô lập được hai flavonol là rhamnocitrin và rhamnetin. Cấu trúc các chất này được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, MS và so sánh với tài liệu đã công bố. Các flavonol trên được thử hoạt tính kháng oxi hóa bằng phương pháp DPPH. Kết quả cho thấy hai chất này có tính kháng oxi hóa mạnh tương đương nhau.

Từ khóa: *Cây Cỏ Lào*, *Cây Công Sơn*

1 GIỚI THIỆU

Trong hai bài báo *Một số kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu và flavonoid trong cây Cỏ Lào* (Ngô Quốc Luân, Lâm Thanh Phong, Nguyễn Ngọc Hạnh, Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Số 6, 2006) và *Phân lập và nhận danh cấu trúc một chalcone từ dịch chiết ethyl acetat của cây Cỏ Lào* (Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Ngọc Hạnh, Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Số 08, 2007), chúng tôi đã báo cáo một số kết quả nghiên cứu bước đầu về thành phần hóa học của tinh dầu và flavonoid từ cây Cỏ Lào mọc ở Phú Yên. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục trình bày một số kết quả khảo sát thành phần hóa học và thử hoạt tính sinh học của hai flavonol cô lập từ dịch chiết ethyl acetate.

1.1 Nguyên liệu

Toàn bộ phần trên mặt đất của cây Cỏ Lào được thu hái khi cây bắt đầu ra hoa vào tháng 12-2005 tại các vùng ven đồi núi thuộc xã Hòa Hiệp Nam, huyện Đông Hòa, tỉnh Phú Yên.

¹ Khoa Sư Phạm, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Khoa học cơ bản, Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp

³ Viện Công nghệ Hóa học, Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam

1.2 Phương pháp chiết xuất, cô lập

Nguyên liệu tươi (100 kg) sau khi tách tinh dầu bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước được tiếp tục trích nóng với 320 lít EtOH 50° trong 3 giờ, sau đó cô đặc đến còn 8 kg dịch chiết sệt. Dịch này được lọc chiết với ethyl acetate (EtOAc) và cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao EtOAc (139 g).

Từ cao EtOAc (129 g), tiến hành sắc ký nhanh trên cột silica gel với hệ dung môi giải ly (XDM*, EtOAc) có độ phân cực tăng dần. Kết quả thu được 15 phân đoạn (LA1, LA2, ... và LA15).

Phân đoạn LA2 (8 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel lần 2 cũng với hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần là (XDM, EtOAc). Kết quả thu được 30 phân đoạn (LA2-1, LA2-2, ... và LA2-30)

Tại phân đoạn LA2-2 (dung môi giải ly XDM: EtOAc = 9:1) thu được cặn màu vàng có vết chính với $R_f = 0,39$ (PE:EtOAc = 1:1). Kết tinh lại trong EtOAc thu được chất rắn dạng bột màu vàng rom (hình 1, 2), ký hiệu là LA2-2 (20 mg).



Hình 1



Hình 2

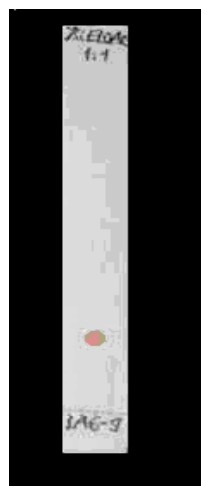
Phân đoạn LA6 (9 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel lần 2 cũng với hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần là (XDM, EtOAc). Kết quả thu được 30 phân đoạn (LA6-1, LA6-2, ... và LA6-30)

Tại phân đoạn LA6-9 (dung môi giải ly XDM: EtOAc = 7:3) thu được cặn màu vàng có vết chính với $R_f = 0,21$ (PE:EtOAc = 1:1). Kết tinh lại trong MeOH thu được chất rắn dạng bột màu vàng nghệ (hình 3, 4), ký hiệu là LA6-9 (25 mg).

* Xăng dung môi hay dung môi cao su, một loại petroleum ether có khoảng sôi 79-96°C



Hình 3



Hình 4

1.3 Phương pháp nhận dạng cấu trúc

Điểm tan chảy được đo trên máy Electrothermal 9100 (U.K), mao quản không hiệu chỉnh. Phổ hồng ngoại được đo trên máy VECTOR 22, dùng viên nén KBr. Phổ UV-VIS được đo trên máy UV-2450 (Japan).

Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz, độ dịch chuyển hóa học (δ) được tính theo ppm, hằng số tương tác (J) tính bằng Hz. Phổ khối lượng được đo trên máy 1100 series LC/MS Trap Agilent, sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silica gel 60F254 (Merck) tráng sẵn độ dày 0,2 mm.

1.4 Phương pháp thử hoạt tính kháng oxi hóa

Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn phương pháp gốc tự do bền DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) như sau:

- Hòa tan chất tinh khiết trong DMSO ở nồng độ: 500 $\mu\text{g/ml}$.
- DPPH hòa tan trong dung môi ethanol ở nồng độ 250 μM .
- Cho 8 ml dung dịch DPPH nồng độ 250 μM phản ứng với 2 ml dung dịch chất tinh khiết nồng độ 500 $\mu\text{g/ml}$.
- Dung dịch được lắc đều, thực hiện phản ứng ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút, rồi đem mẫu đo độ hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$.
- Dãy chuẩn và mẫu trắng được thực hiện trong điều kiện tương tự như trên.

2 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

2.1 Nhận danh cấu trúc flavonoid

2.1.1 LA2-2

LA2-2 kết tinh trong EtOAc thu được chất rắn dạng bột, màu vàng rom, có nhiệt độ nóng chảy $\text{mp} = 217\text{-}218^\circ\text{C}$ (EtOAc), sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (PE:

EtOAc = 1:1), hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong EtOH cho vết màu da cam có R_f = 0,39.

- Phổ ¹H-NMR, (DMSO, δ ppm) cho 8 mũi tín hiệu proton:
 - + 1 mũi đơn tại 3,86: 3 proton của 1 nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
 - + 4 mũi trong khoảng 6,34-8,09 là tín hiệu của các proton của nhóm CH kề nối đôi, cho thấy có 2 vòng benzene, trong đó:
 - * Vòng A: 2 proton ghép cặp meta tại 6,35 (1H, d, J= 2,0 Hz) và 6,74 (1H, d, J= 2,0 Hz).
 - * Vòng B: 2 mũi đôi là 4 proton cho biết có 2 cặp proton ở vị trí đối xứng nhau trên vòng benzene nên 2 cặp proton đó tương đương độ dời hóa học, chúng ghép cặp orto tại 8,08 (1H, d, J= 8,5 Hz) và 6,92 (1H, d, J= 9,0 Hz).
 - + 1 mũi đơn tại 12,47: 1 proton của nhóm OH.
 - + 2 mũi đơn còn lại tại 9,49 và 10,11 có thể là 2 proton của 2 nhóm OH.

Vậy LA2-2 có tất cả 12 proton.

- Các phổ ¹³C-NMR (DMSO, δ ppm) cho thấy chất LA2-2 có 14 mũi tín hiệu carbon.
 - + 8 mũi trong khoảng 104,01-164,88: 8 carbon tứ cấp (104,01; 121,56; 135,94; 147,23; 156,07; 157,27; 160,35; 164,88).
 - + 1 mũi tại 55,99: 1 carbon của nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
 - + 1 mũi tại 176,00: 1 carbon của nhóm C=O đặc trưng của hợp chất flavone.
 - + 4 mũi trong khoảng 91,99-129,55: 6 carbon loại CH kề nối đôi (91,99; 97,43; 115,43; 129,55).

Vậy LA2-2 có tất cả 16 nguyên tử carbon (trong đó có 2 cặp carbon tương đương độ dời hóa học).

Căn cứ vào các đặc tính phổ NMR của LA2-2 có thể dự đoán chất này có khung flavone. Ngoài 5 nguyên tử oxy đã xuất hiện theo các nhóm trên phổ NMR, LA2-2 còn có thêm 1 nguyên tử oxy. **Vậy LA2-2 có 6 nguyên tử oxy.**

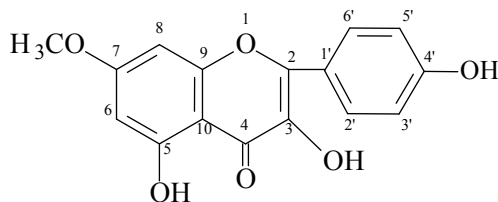
Như vậy, **LA2-2 có công thức phân tử là C₁₆H₁₂O₆**, phân tử khối là 300 đvC; độ bất bão hòa là 11, trong đó: vòng pyron chiếm 4 độ bất bão hòa, vậy còn 7 độ bất bão hòa có thể là của 2 vòng benzene (1 vòng ghép 1 cạnh với vòng pyron và 1 vòng gắn với vòng pyron qua dây nối), phù hợp với cơ cấu khung flavone (Hình 5).

Qui nạp các độ dời hóa học vào các vị trí trên khung flavone (Bảng 1) và kiểm tra lại bằng các phổ hai chiều HMBC (DMSO, δ ppm) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: H₆→C₆, C₈, C₁₀, C₅, C₇; H₈→C₈, C₆, C₁₀, C₉, C₇, H₂→C₂, C₆, C₂, C₄; H₃→C₃, C₅, C₁, C₄; H₅→C₅, C₁, C₃, C₄; H₆→C₆, C₂, C₂, C₄; 7OCH₃→C₇; 5-OH→C₆, C₁₀, C₅.

Bảng 1: Dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, và HMBC của LA2-2

Vị trí C/H	¹ H-NMR (δ ppm, J = Hz)	¹³ C-NMR (δ ppm)	Loại carbon	HMBC ¹ H→ ¹³ C
2		147,23	=C<	
3		135,94	=C<	
4		176,00	>C=O	
5		160,35	=C<	
6	6,35 (1H; d; J = 2,0)	97,43	=CH-	H ₆ →C ₆ , C ₈ , C ₁₀ , C ₅ , C ₇
7		164,88	=C<	
8	6,74 (1H; d; J = 2,0)	91,99	=CH-	H ₈ →C ₈ , C ₆ , C ₁₀ , C ₉ , C ₇
9		156,07	=C<	
10		104,01	=C<	
1'		121,56	=C<	
2'	8,08 (2H, d, J= 8,5 Hz)	129,55	=CH-	H _{2'} →C _{2'} , C _{6'} , C ₂ , C _{4'}
3'	6,92 (2H, d, J= 9,0 Hz)	115,42	=CH-	H _{3'} →C _{3'} , C _{5'} , C _{1'} , C _{4'}
4'		159,27	=C<	
5'	6,92 (2H, d, J= 9,0 Hz)	115,42	=CH-	H _{5'} →C _{5'} , C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}
6'	8,08 (2H, d, J= 8,5 Hz)	129,55	=CH-	H _{6'} →C _{6'} , C _{2'} , C ₂ , C _{4'}
7OCH ₃	3,86 (3H, s)	55,6	-CH ₃	7OCH ₃ →C ₇
5-OH	12,47 (1H, s)			5-OH→C ₆ , C ₁₀ , C ₅

Tóm lại, dựa vào các kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân, các đặc trưng vật lý và so sánh với các tài liệu đã công bố (David S. Seigler and E. Wollenweber, 1983; Maria Rose Jane R. Albuquerque *et al.*, 2006), chúng tôi nhận danh chất LA2-2 là rhamnocitrin (7-O-methylkaempferol hay 3,5,4'- trihydroxy-7-methoxyflavone) có công thức cấu tạo như hình 5.



Rhamnocitrin: C₁₆H₁₂O₆

Hình 5: Công thức cấu tạo của LA2-2

2.1.2 LA6-9

LA6-9 kết tinh trong MeOH thu được chất rắn dạng bột, màu vàng nghệ, có nhiệt độ nóng chảy mp = 263-264°C (MeOH), sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (PE: EtOAc = 1:1), hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong EtOH cho vết màu da cam có R_f = 0,21.

- Phổ ¹H-NMR, (DMSO, δ ppm) cho 8 mũi tín hiệu proton:

- + 1 mũi đơn tại 3,86: 3 proton của 1 nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
- + 5 mũi trong khoảng 6,34-7,72 là tín hiệu của các proton của nhóm CH kề nối đôi, trong đó:
 - * 3 mũi đơn: 3 proton (6,33; 6,68; 7,71).
 - * 2 mũi đôi: 2 proton ghép cặp orto tại 6,88 (1H, d, J= 8,5 Hz) và 7,57 (1H, d, J= 8,0 Hz).
- + 1 mũi đơn tại 12,47: 1 proton của nhóm OH.
- + 1 mũi rộng tại 9,43 có thể là 3 proton của 3 nhóm OH.

Vậy LA6-9 có tất cả 12 proton.

- Phổ ¹³C-NMR (DMSO, δ ppm) cho thấy chất LA6-9 có 16 mũi tín hiệu carbon.
 - + 9 mũi trong khoảng 103,99-164,89: 9 carbon tứ cấp (103,99; 121,87; 136,01; 145,07; 147,29; 147,83; 156,06; 160,37; 164,89).
 - + 1 mũi tại 56,00: 1 carbon của nhóm OCH₃ gắn vào vòng benzene.
 - + 1 mũi tại 175,95: 1 carbon của nhóm C=O đặc trưng của hợp chất flavone.
 - + 5 mũi trong khoảng 91,88-120,04: 5 carbon loại CH kề nối đôi (91,88; 97,42; 115,24; 115,57; 120,04).

Vậy LA6-9 có tất cả 16 nguyên tử carbon

Căn cứ vào các đặc tính phổ NMR của LA6-9 có thể dự đoán chất này có khung flavone. Ngoài 6 nguyên tử oxy đã xuất hiện theo các nhóm trên phổ NMR, LA6-9 còn có thêm 1 nguyên tử oxy. **Vậy LA6-9 có 7 nguyên tử oxy.**

Như vậy, **LA6-9 có công thức phân tử là C₁₆H₁₂O₇**, phân tử khối là 316 đvC; độ bất bão hòa là 11, trong đó vòng pyron chiếm 4 độ bất bão hòa, vậy còn 7 độ bất bão hòa có thể là của 2 vòng benzene (1 vòng ghép 1 cạnh với vòng pyron và 1 vòng gắn với vòng pyron qua dây nối), phù hợp với cơ cấu khung flavone (Hình 6).

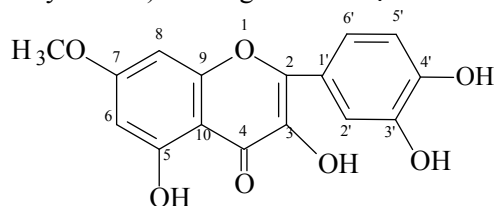
Qui nạp các độ dời hóa học vào các vị trí trên khung flavone (Bảng 2) và kiểm lại bằng các phổ hai chiều HSQC và HMBC:

- Phổ hai chiều HSQC (DMSO, δ ppm) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại vị trí C mà H gắn vào: H₆→C₆; H₈→C₈; H₂→C₂; H₅→C₅; H_{6'}→C₆.
- Phổ hai chiều HMBC (DMSO, δ ppm) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: H₆→C₆, C₈, C₁₀, C₅, C₇; H₈→C₈, C₆, C₁₀, C₂, C₇; H₂→C₂, C₆, C_{3'}, C₄; H₅→C₅, C₁, C_{3'}, C₄; H_{6'}→C₆, C₂, C_{4'}; 7OCH₃→C₇; 5-OH→C₆, C₁₀, C₅.

Bảng 2: Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC và HMBC của LA6-9

Vị trí C/H	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J = Hz)	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)	Loại carbon	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
2		156,06	=C<	
3		136,01	=C<	
4		175,95	>C=O	
5		160,37	=C<	
6	6,33 (1H; s)	97,42	=CH-	$\text{H}_6 \rightarrow \text{C}_6, \text{C}_8, \text{C}_{10}, \text{C}_5, \text{C}_7$
7		164,89	=C<	
8	6,68 (1H;s)	91,88	=CH-	$\text{H}_8 \rightarrow \text{C}_8, \text{C}_6, \text{C}_{10}, \text{C}_2, \text{C}_7$
9		147,29	=C<	
10		103,99	=C<	
1'		121,87	=C<	
2'	7,71 (1H, s)	115,24	=CH-	$\text{H}_{2'} \rightarrow \text{C}_{2'}, \text{C}_6, \text{C}_{3'}, \text{C}_{4'}$
3'		145,07	=C<	
4'		147,83	=C<	
5'	6,88 (1H, d, J= 8,5)	115,57	=CH-	$\text{H}_{5'} \rightarrow \text{C}_{5'}, \text{C}_{1'}, \text{C}_{3'}, \text{C}_{4'}$
6'	7,57 (1H, d, J= 8,0)	120,04	=CH-	$\text{H}_{6'} \rightarrow \text{C}_{6'}, \text{C}_2, \text{C}_{4'}$
7OCH ₃	3,86 (3H, s)	56,00	-CH ₃	7OCH ₃ \rightarrow C ₇
5-OH	12,47 (1H, s)			5-OH \rightarrow C ₆ , C ₁₀ , C ₅

Tóm lại, dựa vào các kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân, các đặc trưng vật lý và so sánh với tài liệu đã công bố (Toan Thang Phan, Lingzhi Wang, Patrick See, Renee Jacqueline Grayer, Sui Yung Chan and Seng Teik Lee, 2001), chúng tôi nhận danh chất LA6-9 là rhamnetin (7-methoxyquercetin hoặc 3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxyflavone) có công thức cấu tạo như hình 6.



Rhamnetin: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$

Hình 6: Công thức cấu tạo của LA6-9

2.2 Khảo sát sơ bộ hoạt tính kháng oxi hóa của các chất tinh khiết cô lập được

Bảng 3: Độ hấp thu của hệ phản ứng giữa chất tinh khiết và DPPH

Tên chất	Độ hấp thu			Giá trị trung bình A _c
	Lần đo 1	Lần đo 2	Lần đo 3	
LA2-2	0,211	0,211	0,211	0,211
LA6-9	0,211	0,211	0,211	0,211

Bảng 4: Giá trị % ức chế Q của các cao chiết và các chất tinh khiết

Ký hiệu	% ức chế Q
LA2-2	90,83%
LA6-9	90,83%

3 KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu trên đây cho thấy từ Cỏ Lào Phú Yên đã cô lập được thêm hai flavonol thuộc nhóm hợp chất flavonoid là rhamnocitrin (3,5,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone) và rhamnetin (3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxy-flavone). Hai chất này có tính kháng oxi hóa mạnh tương đương nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Apichart Suksamrarn, Apinya Chotipong, Tananit Suavansri, Somnuk Boongird, Puntip Timsuksai, Saovaluk Vimuttipong and Aporn Chuaynugul, 2004. *Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of Chromolaena odorata*. Arch Pharm Res, Vol. 27, No. 5, pages 507-511.
- David S. Seigler and E. Wollenweber, 1983. *Chemical variation in Notholaena standleyi*. Amer.J.Bot., 70 (5), pages 790-798.
- Maria Rose Jane R. Albuquerque et al., 2006. *Terpenoids, Flavonoids and other constituents of Eupatorium betonicaeforme (Asteraceae)*. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 17, No. 1, pages 68-72.
- Ngô Quốc Luân, Lâm Thanh Phong, Nguyễn Ngọc Hạnh, 2006. *Một số kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu và flavonoid trong cây Cỏ Lào*. Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Số 6-2006, trang 103-110.
- Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Ngọc Hạnh, 2007. *Phân lập và nhận danh cấu trúc một chalcone từ dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ Lào- Eupatorium odoratum L.* Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Số 8-2007, trang 16-20.
- Nguyễn Thị Ngọc Tú, Lê Thị Hải Yến, 2000. *Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của một số thành phần trong cao Cỏ Lào*. Tạp chí Dược học, Số 7, trang 17-19.
- R.N. Barua, R. P. Sharma, G. Thyagarajan, Werner Hertz, 1978. *Flavonoids of Chromolaena odorata*. Phytochemistry, Vol 17, pages 1807-1808.
- Toan Thang Phan, Lingzhi Wang, Patrick See, Renee Jacqueline Grayer, Sui Yung Chan and Seng Teik Lee, 2001. *Phenolic Compounds of Chromolaena odorata Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound healing*. Biol. Pharm. Bull, Vol 24, issue 12, pages 1373-1379.