

# PHÂN LẬP, NHẬN DANH CẤU TRÚC VÀ THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA MỘT FLAVONE TỪ DỊCH CHIẾT ETHYL ACETATE CỦA CÂY CỎ LÀO *EUPATORIUM ODORATUM* L.

Ngô Quốc Luân<sup>1</sup>, Đặng Minh Khiêm<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Châu<sup>2</sup> và Nguyễn Ngọc Hạnh<sup>3</sup>

## ABSTRACT

*From the ethyl acetate extracts of the aerial parts of Eupatorium odoratum L. from Phu Yen province, one flavone (5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone) was isolated. Its structure was interpreted based on spectra including 1H-NMR, 13C-NMR, HMBC and on published data. This flavone was tested for antioxidant activity by DPPH method. The result showed that its antioxidant activity was weak.*

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

**Title:** Isolation, structural identification and testing for antioxidant activity of one flavone from ethyl acetate extracts of *Eupatorium odoratum* L.

## TÓM TẮT

*Từ dịch chiết ethyl acetate phân trên mặt đất của cây Cỏ Lào ở Phú Yên, chúng tôi đã cô lập được một flavone là 5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone. Cấu trúc chất này được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC và so sánh với tài liệu đã công bố. Flavone trên được thử hoạt tính kháng oxi hóa bằng phương pháp DPPH. Kết quả cho thấy chất này có tính kháng oxi hóa yếu.*

**Từ khóa:** Cây Cỏ Lào, Cây Công Sơn

## 1 GIỚI THIỆU

Trong ba bài báo trước đây cùng đăng trên Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, (các số 6-2006, 8-2007 và 20a-2011), 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 này, chúng tôi tiếp tục trình bày kết quả khảo sát thành phần hóa học của cao ethyl acetate và thử hoạt tính sinh học của hợp chất cô lập được.

### 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.

### 1.2 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

<sup>1</sup> Khoa Sư Phạm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp

<sup>3</sup> Viện Công nghệ Hóa học - TP. HCM

còn 8 kg dịch chiết sệt. Dịch này được lắ 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).

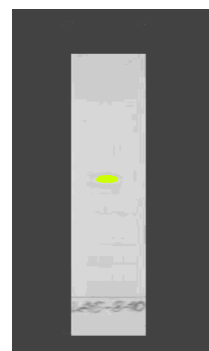
Phân đoạn LA6 (9 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel lần 2 cũng với hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần là (XDM, EtOAc). Kết quả thu được 30 phân đoạn (LA6-1, LA6-2, ... và LA6-30)

Phân đoạn LA6-8 (1,4 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột silica gel lần 3 cũng với hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần là (XDM, EtOAc). Kết quả thu được 14 phân đoạn (LA6-8-1, LA6-8-2, ... và LA6-8-14)

Tại phân đoạn LA6-8-10 (dung môi giải ly XDM : CHCl<sub>3</sub> = 4 : 6) thu được cặn màu vàng có vết chính với R<sub>f</sub> = 0,46 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 95 : 5). Kết tinh lại trong MeOH thu được chất rắn dạng bột màu vàng nhạt (Hình 1, 2), ký hiệu là LA6-8-10 (20 mg).



Hình 1: Tinh thể LA6-8-10



Hình 2: Bản sắc ký của LA6-8-10  
(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 95 : 5)

### 1.3 Phương pháp nhận dạng cấu trúc

Điểm tan chảy được đo trên máy Electrothermal 9100 (U.K), mao quản không hiệu chỉnh.

Các phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, 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, sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silica gel 60F254 (Merck) trắng 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 µg/ml.
- DPPH hòa tan trong dung môi ethanol ở nồng độ 250µM.

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

- Cho 8 ml dung dịch DPPH nồng độ 250 $\mu$ M phản ứng với 2 ml dung dịch chất tinh khiết nồng độ 500  $\mu$ 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  $\lambda = 517$  nm.
- Dây 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

Là chất rắn, kết tinh trong MeOH cho chất rắn dạng bột màu vàng nhạt, tan tốt trong DMSO.

Điểm tan chảy (mp): 274-275°C (MeOH).

Sắc ký bản mỏng (TLC) hiện màu bằng dd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH.

Giải ly bằng hệ CHCl<sub>3</sub> : MeOH =95:5 cho vết tròn có R<sub>f</sub> = 0,46.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR, (DMSO,  $\delta$  ppm) cho 10 mũi tín hiệu proton.

- 2 mũi đơn tại 3,85 và 3,88 là 6 proton của 2 nhóm OCH<sub>3</sub> gắn vào vòng benzene
- 6 mũi trong khoảng 6,20-7,67 là tín hiệu của 6 proton của nhóm CH kề nối đôi, cho thấy có 2 vòng benzene, trong đó:
  - Vòng A: 2 mũi đơn với 2 proton ghép cặp meta tại 6,20 (1H, d, J= 1,5Hz) và 6,52 (1H, d, J= 1,5 Hz)
  - Vòng B: 2 mũi đôi với 2 proton ghép cặp ortho tại 7,12 (1H, d, J= 7,5 Hz) và 7,67 (1H, dd, J= 1,5 Hz và J= 8,0 Hz); 1 mũi đơn tại 7,56 cho tín hiệu 1 proton không ghép cặp
  - 1 mũi đơn tại 6,95 là 1 proton không ghép cặp
- 2 mũi đơn còn lại tại 10,81 và 12,91 là 2 proton của 2 nhóm OH

**Vậy LA6-8-10 có tất cả 14 proton.**

Phổ <sup>13</sup>C-NMR (DMSO,  $\delta$  ppm) cho thấy chất LA2-2 có 17 mũi tín hiệu carbon, trong đó:

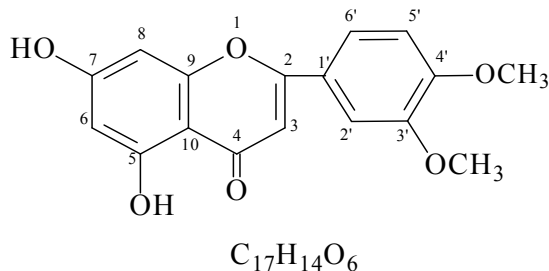
- 8 mũi trong khoảng 103,74 – 164,17 là 8 carbon tứ cấp (103,74; 122,89; 149,00; 152,13; 157,3; 161,40; 163,29; 164,17)
- 2 mũi tại 55,72 và 55,85 là 2 carbon của nhóm OCH<sub>3</sub> gắn vào vòng benzene.
- 1 mũi tại 181,79 là 1 carbon của nhóm C=O đặc trưng của hợp chất flavone
- 6 mũi trong khoảng 94,07-11,69 là 6 carbon loại CH kề nối đôi (94,07; 98,84; 103,83; 109,46; 11,69; 120,01)

**Vậy LA6-8-10 có tất cả 17 nguyên tử carbon.**

Căn cứ vào các đặc tính phổ NMR của LA6-8-10 có thể dự đoán chất này thuộc khung flavone. Và như vậy, ngoài 5 nguyên tử oxy đã xuất hiện theo các nhóm trên phổ NMR, LA6-8-10 còn có thể có thêm 1 nguyên tử oxy.

**Vậy LA6-8-10 có thể có 6 nguyên tử oxy.**

Nếu vậy, **LA6-8-10** có công thức phân tử là  $C_{17}H_{14}O_6$ , phân tử khối là 314 đvC; độ bất bão hòa là 11, trong đó: vòng pyron chiếm 4 độ bất bão hòa, vậy còn 7 độ bất 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 3).



Hình 3: Công thức cấu tạo của LA6-8-10

Qui nạp các độ dời hóa học vào các vị trí trên khung flavone (Bảng 1) và kiểm lại bằng phổ hai chiều HMBC (DMSO,  $\delta$  ppm) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác rất phù hợp:  $H_3 \rightarrow C_3, C_{10}, C_{1'}, C_2, C_4$ ;  $H_6 \rightarrow C_6, C_8, C_{10}, C_5, C_7$ ;  $H_8 \rightarrow C_8, C_6, C_{10}, C_9, C_7$ ;  $H_{2'} \rightarrow C_{2'}, C_3', C_4', C_2$ ;  $H_{5'} \rightarrow C_{5'}, C_{1'}, C_{3'}$ ;  $H_{6'} \rightarrow C_{6'}, C_2', C_4', C_2$ ;  $3'OCH_3 \rightarrow C_{3'}$ ;  $4'OCH_3 \rightarrow C_{4'}$ ;  $5-OH \rightarrow C_5, C_6, C_{10}$ .

Bảng 1: Dữ liệu phổ  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, HMBC của LA6-8-10

Vị trí C/H	$^1H$ -NMR ( $\delta$ ppm, J = Hz)	$^{13}C$ -NMR ( $\delta$ ppm)	Loại carbon	HMBC $^1H \rightarrow ^{13}C$
2		163,29	=C<	
3	6,95(1H,s)	103,82	=CH-	$H_3 \rightarrow C_3, C_{10}, C_{1'}, C_2, C_4$
4		181,79	>C=O	
5		161,40	=C<	
6	6,20 (1H; d; J = 1,5)	98,84	=CH-	$H_6 \rightarrow C_6, C_8, C_{10}, C_5, C_7$
7		164,17	=C<	
8	6,52 (1H; d; J = 1.5)	94,07	=CH-	$H_8 \rightarrow C_8, C_6, C_{10}, C_9, C_7$
9		157,33	=C<	
10		103,74	=C<	
1'		122,88	=C<	
2'	7,56(1H,s)	109,45	=CH-	$H_{2'} \rightarrow C_{2'}, C_3', C_4', C_2$
3'		149,00	=C<	
4'		152,12	=C<	
5'	7,12( 1H, d, J=7,5 )	111,68	=CH-	$H_{5'} \rightarrow C_{5'}, C_{1'}, C_{3'}$
6'	7,67 (1H, dd, J= 1,5 và J=8,0)	129,55	=CH-	$H_{6'} \rightarrow C_{6'}, C_2', C_4', C_2$
3'OCH <sub>3</sub>	3,85 (3H, s)		-CH <sub>3</sub>	$3'OCH_3 \rightarrow C_{3'}$
4'OCH <sub>3</sub>	3,88 (3H, s)		-CH <sub>3</sub>	$4'OCH_3 \rightarrow C_{4'}$
5-OH	12,92(1H, s)			$5-OH \rightarrow C_5, C_6, C_{10}$

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 (Yu-Xia Yang, 2005 và Zhang Y.H, 2002), chúng tôi nhận danh chất LA6-8-10 là 5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone. Chất này lần đầu tiên được tìm thấy trong loài eupatorium odoratum L.

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

**Bảng 2: Giá trị % ức chế Q của LA6-8-10**

Ký hiệu	% ức chế Q
LA6-8-10	5,64%

**3 KẾT LUẬN**

Các kết quả nghiên cứu trên đây cho thấy từ Cỏ Lào Phú Yên đã cô lập được thêm một flavone mới trong loài là 5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone. Chất này có hoạt tính kháng oxi hóa yếu.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

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.

Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Ngọc Hạnh, 2011. *Phân lập và nhận danh cấu trúc hai flavonol từ dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ Lào- Eupatorium odoratum L*. Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Số 20a-2011, trang 250-257.

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.

Yu-Xia Yang, Dong-Bao Zhao et al, 2005. *Studies on Flavonoids from Herb of Artemesia ordosica*. Vol. 30, No.18, pages 1430-1432.

Zhang Y.H, Wang T, Lu ZG, Wang HQ, 2002. *Studies on chemical constituents of Galeopsis bifida*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, Vol. 27 (3), pages 206-208.