

CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC FLAVONOID TRONG LÁ CÂY DỪ DỄ TRƠN (*MELODORUM FRUTICOSUM* LOUR. ANNONACEAE)

Trương Thị Kiều Hạnh¹, Nguyễn Phan Quỳnh Trúc¹, Bùi Thị Bảo Hân², Huỳnh Lỗi^{3*}

¹Trường Đại học Y Dược TP.HCM, ²Trường Cao Đẳng Y tế Bến Tre, ³Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Dù dễ trơn là dược liệu được dùng trong y học cổ truyền Việt Nam, nhưng nghiên cứu về nó ở Việt Nam còn ít. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập các hợp chất từ lá Dù dễ trơn. Trong nghiên cứu này Tsugafolin, thuộc nhóm flavonoid, được trích ly từ lá Dù dễ trơn bằng dung môi ethanol (EtOH) 96%. Cao chiết bằng EtOH 96% được lọc và hòa tan với Dichloromethane và Tsugafolin được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột cao Dichloromethane với pha tĩnh silicagel. Hiệu suất Tsugafolin đạt 0.004%. Cấu trúc của Tsugafolin thu được xác định qua phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H, ¹³C-NMR.

Từ khóa: Dù dễ trơn, Annonaceae, Tsugafolin.

1. GIỚI THIỆU

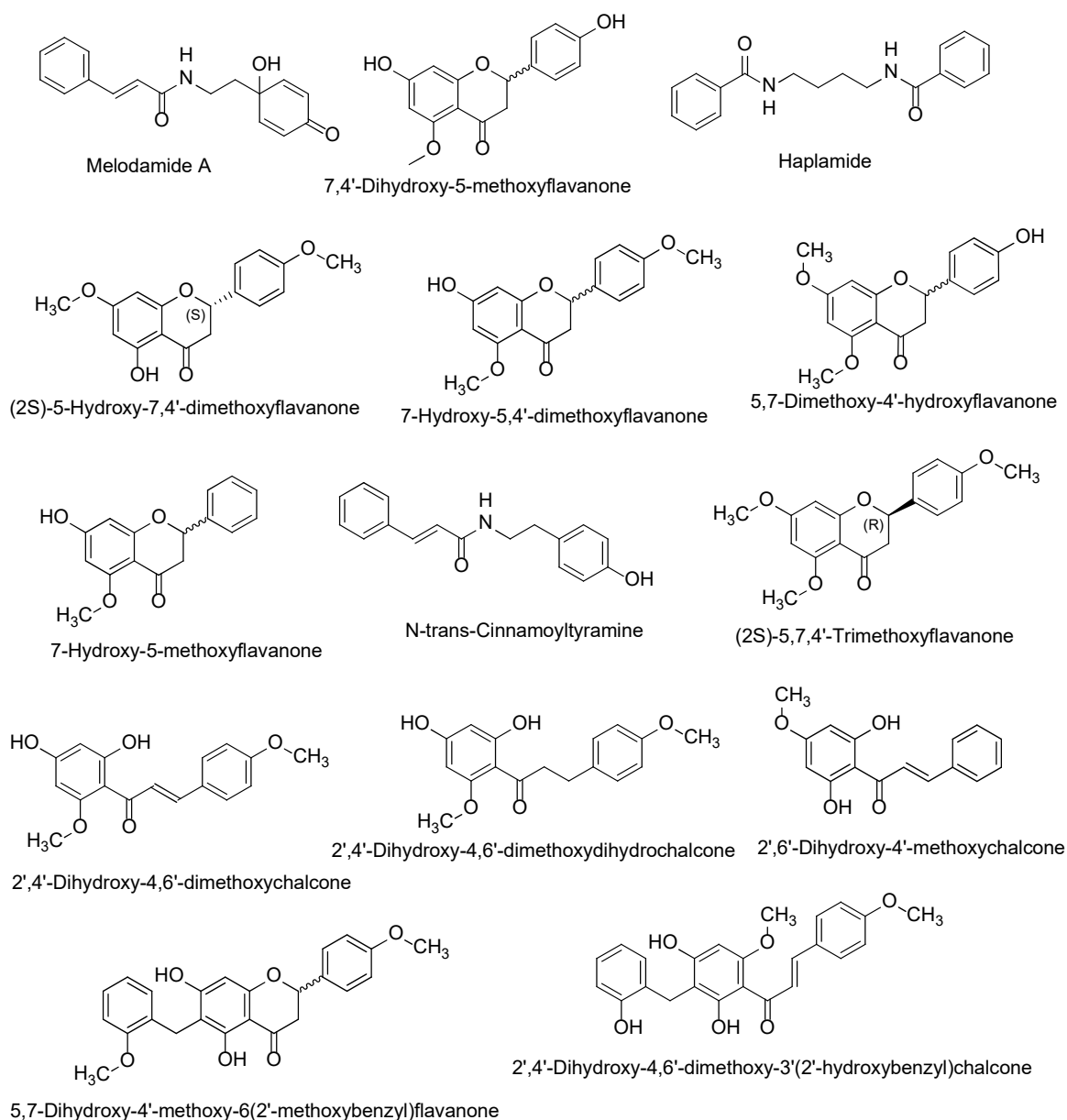
Họ Na (Annonaceae) là họ lớn nhất của bộ Ngọc lan (Magnoliales). Chi *Melodorum* là một trong số các chi quan trọng của họ Na (Annonaceae), với khoảng 10 loài, phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á. Ở Việt Nam, chi *Melodorum* có 5 loài và tập trung chủ yếu ở các tỉnh miền Trung – Tây Nguyên [1]. Lá của loài Dù dễ trơn *Melodorum fruticosum* Lour. được dùng nấu nước uống giúp tiêu hóa, hoa thơm, có thể dùng để sản xuất nước hoa, làm thuốc bổ huyết, tạo huyết [2]. Năm 2013, H. H. Chan và cộng sự [3] đã phân lập được flavokawain-A; melodamide A, (-)-7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavanone; 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone; 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxydihydrochalcone; 4',5-dimethoxy-7-hydroxyflavanone; poncirtetin; oxoanolobine; rutinic axit; 3,3',4-tri-O-metylellagic axit; β -sitosteroyl-3-O- β -D-glucoside; 3-O- β -D-

apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside; β -sitosterol.

Nghiên cứu gần đây đã phân lập được 14 hợp chất phenol, bao gồm melodamide A; 7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavanone; haplamide; (2S)-5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone; 7-hydroxy-5,4'-dimethoxyflavanone; 5,7-dimethoxy-4'-hydroxyflavanone; 7-hydroxy-5-methoxyflavanone; N-trans-cinnamoyltyramine; (2S)-5,7,4'-trimethoxyflavanone; 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxychalcone; 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxydihydrochalcone, 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone; 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-6(2"-methoxybenzyl)flavanone và 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxy-3'(2"-hydroxybenzyl)chalcone. Trong các hợp chất phân lập, có 3 hợp chất bao gồm melodamide A, 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxychalcone

*Tác giả liên hệ: TS. Huỳnh Lỗi

Email: loi.h@hiu.vn



Hình 1. Các hợp chất phân lập được từ *Dủ dẻ trơn* (*Melodorum fruticosum*) [4]

và 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone, có tác dụng ức chế có ý nghĩa lên sự giải phóng Interleukin-8 ($IC_{50} = 6,6; 8,6$ và $11,6 \mu m$, theo thứ tự) và sự sản xuất yếu tố TNF- α (tumor necrosis factor alpha) ($IC_{50} = 4,5; 13,3$, và $6,2 \mu m$, theo thứ tự) [4].

Bằng kỹ thuật sắc ký phân bố ly tâm (centrifugal partition chromatography), hợp chất melodamide A đã được phân lập với độ tinh khiết > 90% và hàm lượng được xác định là 6.7% (w/w) [5]. Từ cao Dichloromethane và methanol MeOH, có các hợp chất đã được phân lập bao gồm 04 triterpenoid bao gồm β -sitosterol; stigmasterol, polycarpol và lanosta-7,9(11),24-

trien-3-beta-21-diol; 04 heptene, bao gồm acetylmelodorinol; melodorinol; (4Z)-6-benzoyloxy-7-hydroxy-2,4-heptadien-4-olide và (4Z)-6,7-dihydroxy-2,4-heptadien-4-olide; 06 flavonoid, bao gồm chamanetin; chrysin; pinocembrin; isochamanetin; dichamanetin; và catechin, và một terpenoid glycoside là ampelopsisionoside [6]. Tinh dầu từ *Dủ dẻ* (*Melodorum fruticosum*) ở Việt Nam có các thành phần chính là beta-Caryophyllene (12.1%), bicycloelemene (11.2%) và bicyclgermacrene (11.6%) [7].

Năm 2014, trong Luận án tiến sĩ của NCS Bùi Thị Minh Nguyệt [8] đã tiến hành phân lập và

xác định được 01 hợp chất amit thơm mới là Melodamit A, 08 hợp chất flavonoid từ dịch chiết của lá cây Dẻ trôn. Trong số 08 hợp chất flavonoid, Tsugafolin đã được phân lập, nhưng với hiệu suất rất thấp (9,8 kg nguyên liệu phân lập được 58 mg Tsugafolin).

Hiện tại, ở Việt Nam chưa có nhiều tài liệu nghiên cứu về dược liệu Dẻ trôn. Nhưng việc dùng Dẻ trôn như một dược liệu đã được sử dụng từ lâu, thể hiện bằng việc người dân miền Trung dùng như thức uống thay trà. Với mục đích kiểm nghiệm các dược tính của Dẻ trôn, nghiên cứu này được tiến hành để phân lập các hợp chất từ Dẻ trôn và áp dụng chúng trong kiểm nghiệm dược liệu này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu là lá Dẻ trôn được thu hái vào 11/2013 tại xã Tam Thành, huyện Phú Ninh, tỉnh Quảng Nam. Dẻ trôn được định danh bởi tiến sĩ Võ Văn Chi [2] và mẫu được lưu (MF-1) tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Lá được phơi khô với độ ẩm 12%, loại tạp cơ học và xay thành bột thô kích thước khoảng 0.3-0.5 mm để tiến hành chiết xuất, phân lập các hợp chất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất

Lá Dẻ trôn (5 kg) đã qua xử lý được ngâm nóng trong 20 lít EtOH 96% ở 80°C, sau 3 giờ thì chiết lấy dung dịch. Tiến hành lặp lại quá trình ngâm, chiết 3 lần. Dịch chiết sau khi cách thủy, thu được 0,5 kg cao EtOH. Cao EtOH được lắc hòa tan với Dichloromethane (chiết 3 lần, mỗi lần 1,5 lít). Dịch chiết Dichloromethane được cô thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được 88,3 g cao.

2.2.2. Phân lập bằng sắc ký cột

Cột sắc ký là cột thủy tinh có khóa (60 x 6 cm), pha tĩnh là silicagel cỡ hạt trung bình 40-63 μm . Mẫu nạp là 40 g cao Dichloromethane. Pha động

là n-hexane:EtOAc với tỷ lệ EtOAc tăng dần: (10:0), (9:1), (8:2), (5:5), (0:10) và EtOAc:MeOH (5:5) (Mỗi phân đoạn dùng 3 lít dung môi). Thể tích hứng 500 mL, các phân đoạn hứng được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi n-hexane:EtOAc (8:2). Phát hiện bằng UV 254 nm, UV 365 nm, thuốc thử vanillin-sulfuric. Các tỷ lệ dung môi trong pha động là thể tích:thể tích (V:V).

2.2.3. Tinh chế

Các phân đoạn được bốc hơi dưới áp suất thấp đến cạn, sau đó được hòa tan vào methanol nóng, để cạn tan hoàn toàn, sau đó để dung môi bay hơi tự nhiên trong 24 giờ, kết tinh bám trên thành hoặc lắng xuống. Đem phần kết tinh này rửa bằng methanol lạnh nhiều lần, thu kết tinh sạch.

2.2.3. Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc hóa học

Các hợp chất được kiểm tra sơ bộ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) với hệ dung môi chloroform:EtOAc:HCOOH (90:10:1), sau khi khai triển quan sát bằng mắt thường, soi đèn UV 254 nm, UV 365 nm và phun thuốc thử vanillin-sulfuric. Hợp chất tinh khiết khi hiện một vết trên sắc ký đồ.

Sau đó các hợp chất này được kiểm tra lại độ tinh khiết bằng cách đo HPLC. Điều kiện HPLC bao gồm máy Waters Alliance, cột C18 (15 cm x 4.6 cm), 5 μm , PDA 200-600 nm, pha động: ACN- H_2O gradient 10:90 $\rightarrow$ 90:10.

Các hợp chất được xác định cấu trúc hóa học bằng cách đo phổ MS (*Mass Spectrometry: phương pháp khối phổ*) và NMR (*Nuclear Magnetic Resonance: cộng hưởng từ hạt nhân*). Phương pháp đo phổ MS được thực hiện trên máy đo khối phổ Micromass Quattro microTM API tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Tín hiệu được ghi nhận theo số khối (m/z) và cường độ tương đối (*relative intensity*).

Phổ NMR được đo với các kỹ thuật 1-D (^1H -, ^{13}C -). Mẫu được hòa trong DMSO-*d*₆ với chất chuẩn nội TMS; thực hiện trên máy BRUKER-

AVANCE 500 (500 MHz). Độ dời hóa học tính theo thang δ (ppm) với $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm và tín hiệu do dung môi DMSO- d_6 [$\delta_{\text{H}} = 2,5$ ppm (s); $\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm].

Từ các dữ liệu ghi nhận được, kết hợp với các dữ liệu trong các tài liệu tham khảo, có thể định hướng, biện giải, xác định cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập được.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

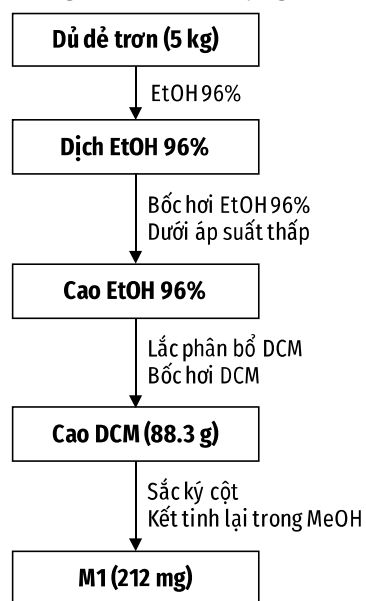
3.1. Chiết xuất

Lá Dẻ trôn (5 kg) được chiết bằng phương pháp ngâm nóng với EtOH 96%, dung môi được bốc hơi dưới áp suất thấp thu được cao EtOH 96%. Cao này được lắc và hòa tan bằng Dichloromethane và cô thu hồi dung môi ta thu được cao Dichloromethane (88.3 g), tỷ lệ cao chiết 1,7%.

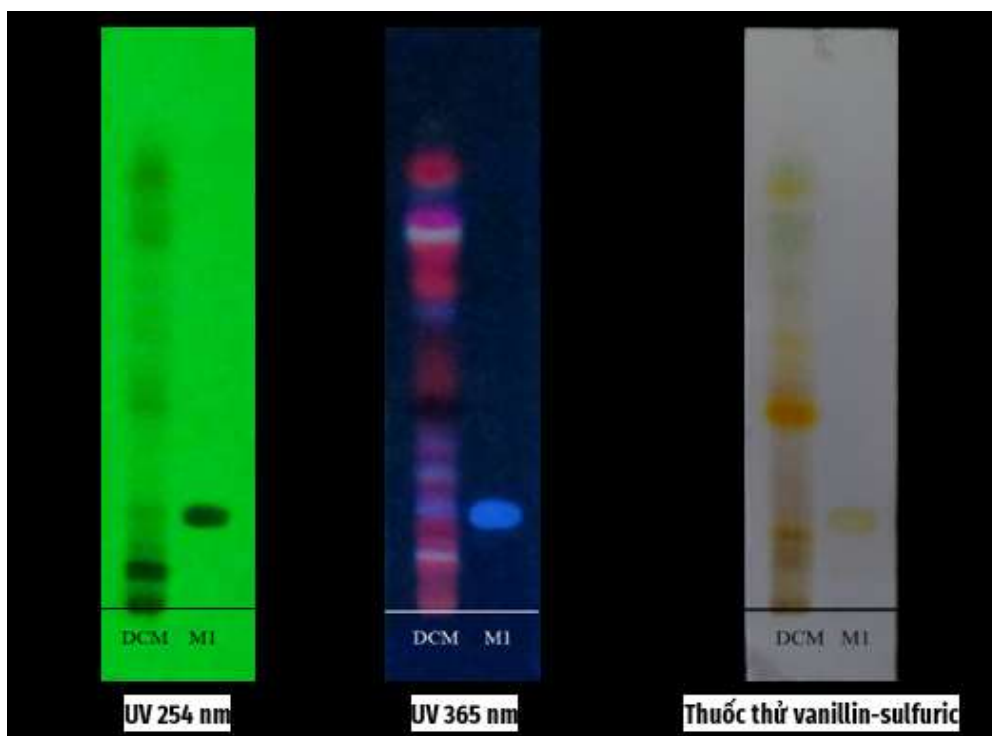
3.2. Phân lập hợp chất từ cao Dichloromethane (DCM)

Các hợp chất trong cao Dichloromethane được phân lập bằng kỹ thuật sắc ký cột thu được 9

phân đoạn (H_1-H_9). Phân đoạn H_8 được bốc hơi dưới áp suất thấp đến khi còn dạng cao lỏng thấy xuất hiện tủa màu trắng bám trên thành bình nên được tiến hành tinh chế tiếp bằng cách rửa sạch nhiều lần với MeOH lạnh cho đến khi dịch rửa nhạt màu, hòa tủa trong MeOH nóng cho tan, lọc nóng qua giấy lọc, bốc hơi dưới áp suất thấp cho dung môi còn $\frac{1}{2}$, thu được chất rắn màu trắng (M1) khối lượng 212 mg (**Hình 2**).

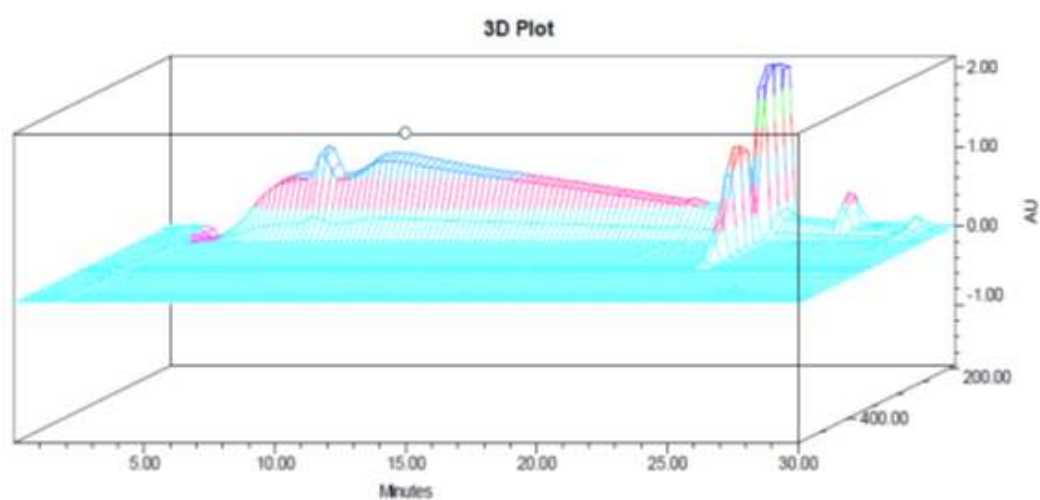
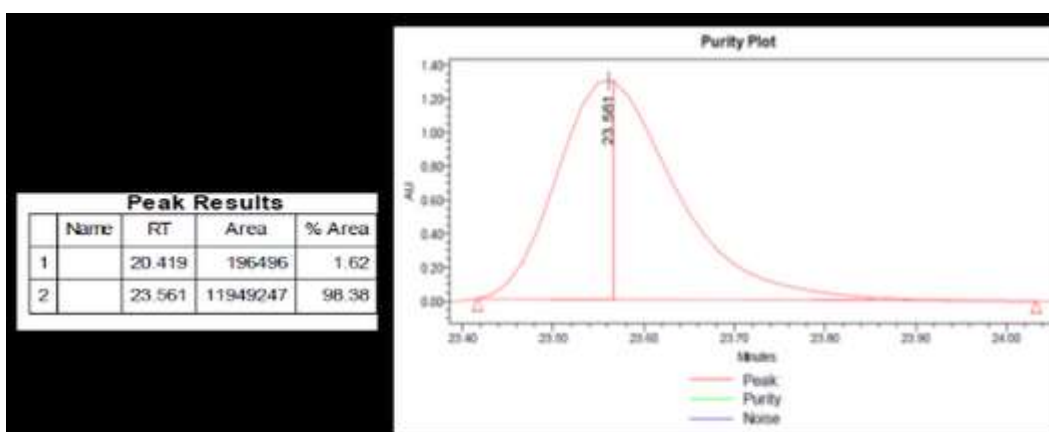
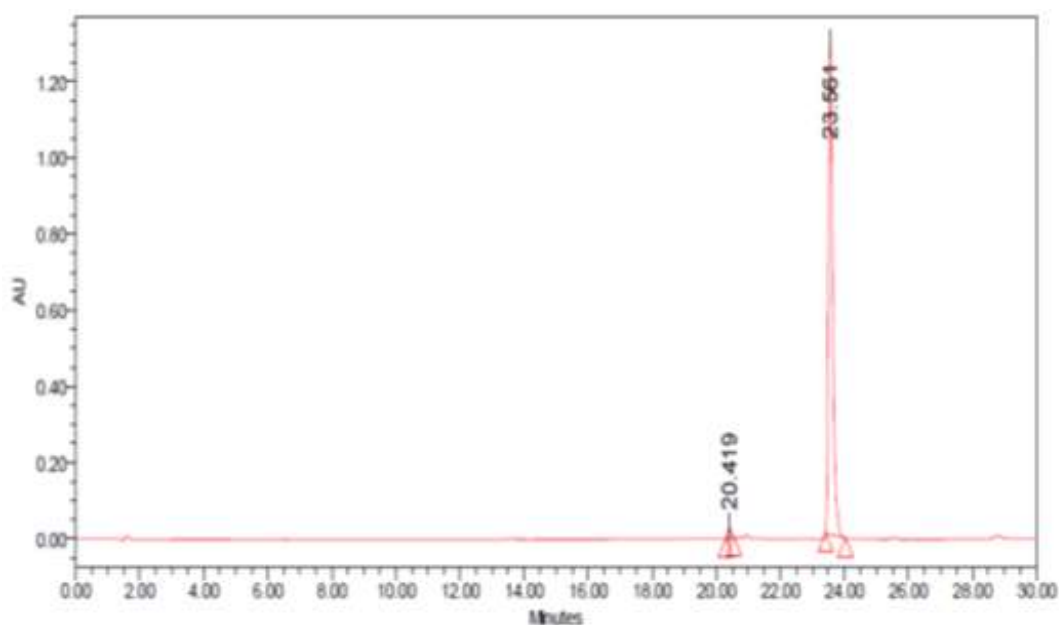


Hình 2. Quy trình phân lập hợp chất từ Dẻ trôn



Hình 3. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh khiết của M1 bằng sắc ký lớp mỏng

Ghi chú: Hệ dung môi chloroform:EtOAc:HCOOH (90:10:1)



Hình 4. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết của M1 trên HPLC

Ghi chú: Cột C18 (15 cm x 4.6 cm), 5 μ m, PDA 200-600 nm, pha động: ACN-H₂O gradient 10:90 $\rightarrow$ 90:10.

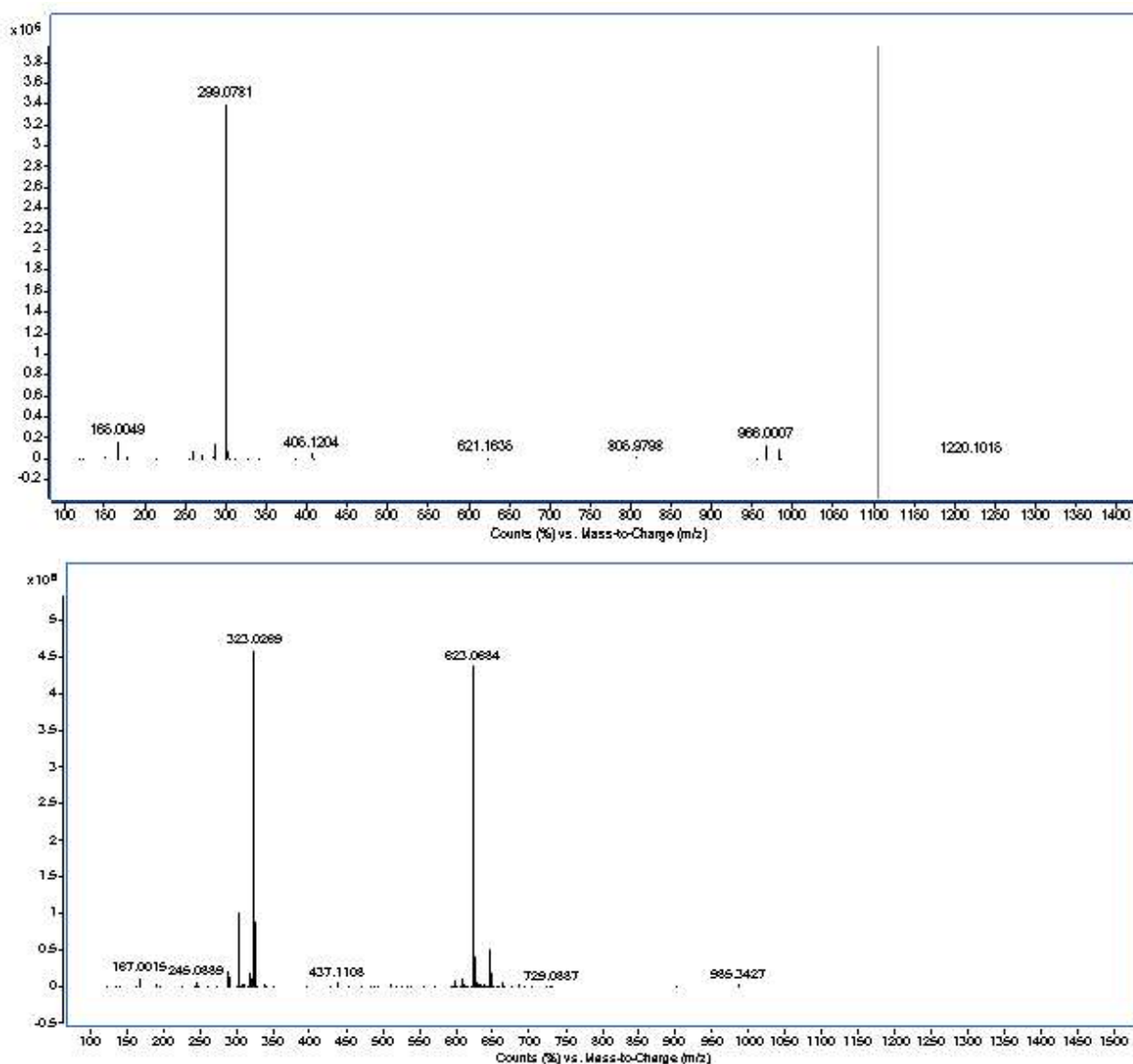


Hình 5. Hợp chất tinh khiết M1

Độ tinh khiết của M1 được kiểm tra bằng HPLC vào khoảng 98.38% và được dự đoán là một flavonoid.

3.3. Xác định cấu trúc hóa học

3.3.1. Phổ MS của M1



Hình 6. Phổ MS của M1 - A: Phổ ES⁻; B: Phổ ES⁺

Phổ ESI-MS của M1 cho thấy ion $[M+Na]^+$ có m/z 323.0; ion $[M-H]^-$ có m/z 299.1 tương ứng với công thức nguyên $C_{17}H_{16}O_5$ với độ bất bão hòa $\Omega = 10$.

3.3.2. Phổ NMR của M1

Đối chiếu so sánh dữ liệu NMR của Tsugafolin

[9] với dữ liệu của M1 cho thấy có sự trùng khớp và được trình bày trong **Bảng 1**.

Bảng 1. So sánh dữ liệu phổ NMR của M1 với Tsugafolin

		M1	Tsugafolin	M1	Tsugafolin
C	CH _n	$\delta_c^{(1)}$	$\delta_c^{(1)}$	$\delta_H^{(2)}$	$\delta_H^{(2)}$
1	-	-	-	-	-
2	CH	77.8	79.7	5.40 dd (12.4; 2.4)	5.52 dd (12.8; 2.8)
3	CH ₂	44.7	46.6	H-3 _{ax} : 3.00 dd (16.3; 12.6) H-3 _{eq} : 2.55 dd (16.3; 2.7)	H-3 _{ax} : 3.22 dd (16.2; 12.8) H-3 _{eq} : 2.92 dd (16.2; 2.8)
4	C=O	188.0	188.6		
5	C	162.2	163.9		
6	CH	93.2	95.0	5.97 d (1.8)	6.47 d (2.0)
7	C	164.3	166.6	-	-
8	CH	95.6	97.3	6.06 d (1.7)	6.52 d (2.0)
9	C	164.1	165.9		
10	C	104.4	106.2		
1'	C	131.2	132.4		
4'	C	159.3	160.7		
2'/6'	CH	128.0	128.8	7.41 d (8.6)	7.52 d (8.6)
3'/5'	CH	113.8	114.9	6.96 d (8.6)	7.01 d (8.6)
5-OMe	CH ₃	55.6	56.3	3.75 s	3.81 s
4'-OMe	CH ₃	55.1	55.7	3.73 s	3.67 s
7-OH				10.53 s	Không công bố

Ghi chú:

(1): 125 MHz, DMSO-d₆;

(2): 500 MHz, DMSO-d₆

Các phổ NMR của hợp chất M1 được trình bày theo **Hình 7** và **Hình 8**.

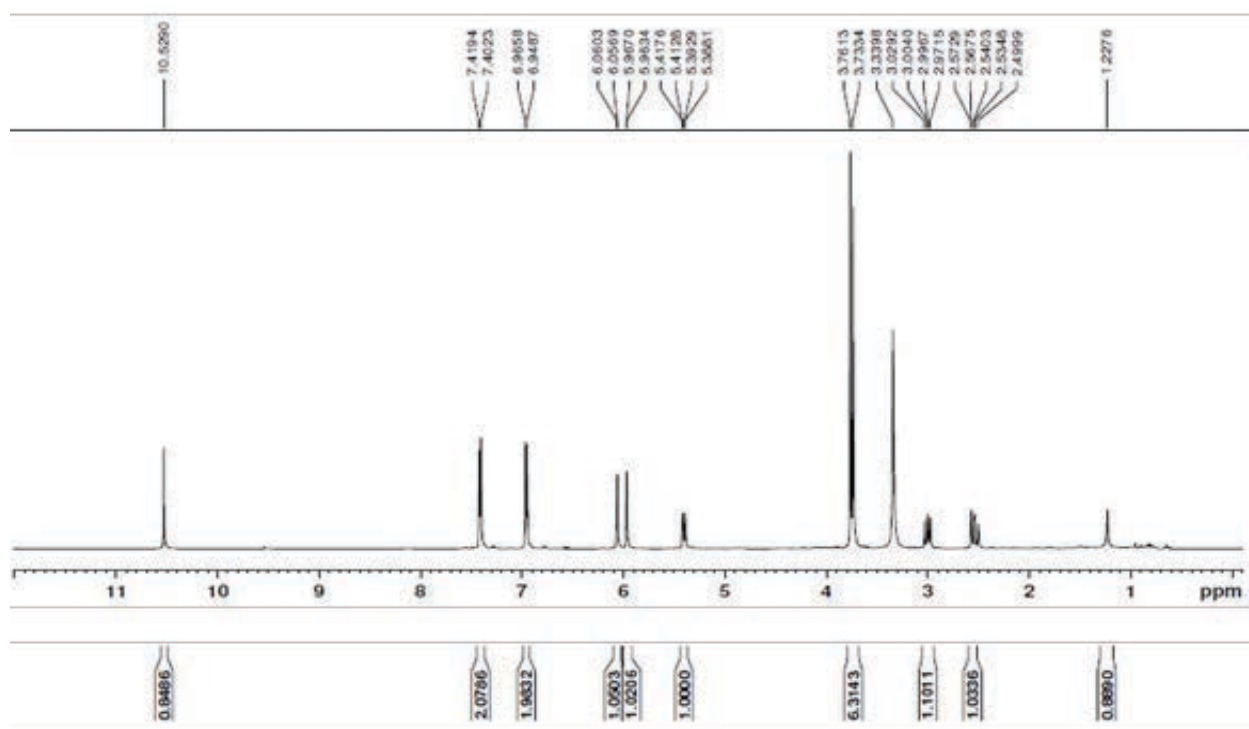
Nhận xét: Phổ NMR của M1 cho thấy chuyển dịch hóa học của ¹³C và ¹H phù hợp với Tsugafolin đã công bố trong tài liệu [3]. Kết hợp với dữ liệu khối phổ, M1 được xác định là Tsugafolin (7-hydroxy-5,4'-dimethoxyflavanone). Với phương pháp sắc ký đơn giản dễ thực hiện, có thể phân lập nhanh được Tsugafolin vì hợp chất này dễ kết tinh.

Hợp chất Tsugafolin được Reiko Tanaka và cộng sự phân lập lần đầu tiên từ cây *Tsuga diversifolia* Mast. (*Pinaceae*) và được công bố trên tạp chí *Planta Medica* vào năm 1989 [10]. Trong họ *Annonaceae*, hợp chất này cũng đã được phân lập từ *Goniiothalamus gardneri* và *Goniiothalamus thwaitesii* [9].

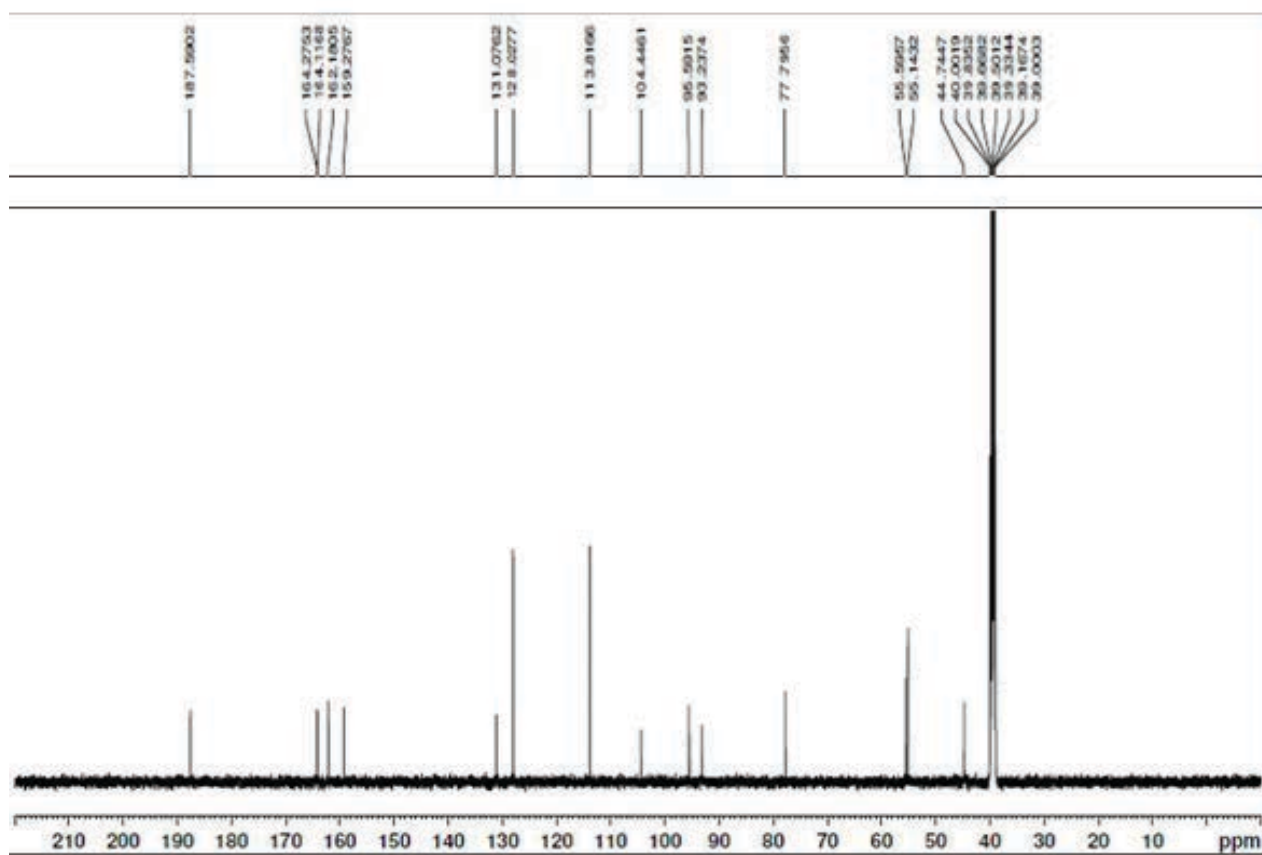
4. KẾT LUẬN

Từ 5 kg lá Dẻ đỏ trơn (với độ ẩm 12%) đã chiết xuất được 88.3 g cao Dichloromethane.

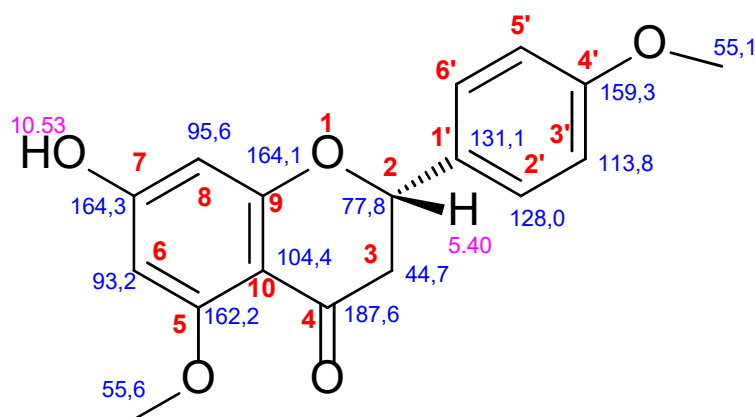
Từ cao Dichloromethane đã phân tách được 9 phân đoạn đơn giản hơn (từ H1 đến H9) bằng sắc ký cột cổ điển và từ phân đoạn H8



Hình 7. Phổ ^1H -NMR của M1 (DMSO- d_6 , 500 MHz)



Hình 8. Phổ ^{13}C -NMR của M1 (DMSO- d_6 , 125 MHz)



Hình 9. Công thức cấu tạo của Tsugafolin

đã phân lập được 212 mg M1. Bằng kỹ thuật phổ bao gồm phổ MS và NMR (^{13}C và ^1H), M1 được xác định là Tsugafolin (7-hydroxy-5,4'-dimethoxyflavanone). Các thành phần khác trong cao sẽ được tiếp tục phân lập, nghiên cứu tác dụng sinh học. Tsugafolin với độ tinh khiết cao có thể dùng để làm chất chuẩn trong phân tích định lượng thành phần này trong lá Dẻ dẻ trơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Tiến Bân, N. T. (2000). *Thực vật chí Việt Nam*. Hà Nội: NXB Khoa Học Kỹ Thuật.
- [2] Chi, V. V. (2012). *Tự điển cây thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Y học.
- [3] Chan, H.-H., Hwang, T.-L., Thang, T. D., Nguyet, B. T., & Wu, T.-S. (2013). *Isolation and Synthesis of Melodamide A, a New Anti-inflammatory Phenolic Amide from the Leaves of Melodorum fruticosum*. *Planta Medica*, 79, 288-294.
- [4] Engels, N. S., Waltenberger, B., Michalak, B., Huynh, L., Tran, H., Kiss, A. K., & Stuppner, H. (2018). *Inhibition of Pro-Inflammatory Functions of Human Neutrophils by Constituents of Melodorum fruticosum Leaves*. *Chem. Biodivers.*, 15, e1800269.
- [5] Nora S, E., B., W., Michalak, B., Huynh, L., Tran, H., Kiss, A. K., & Stuppner, H. (2019).

Melodamide A from Melodorum fruticosum – Quantification using HPLC and one-step-isolation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Separation Science*.

- [6] Siriwat, H., Jongkolnee, J., Suttira, K., Pongpun, S., & Santi, T.-p. (2015). *Chemical Constituents and Derivatization of Melodrinol from the Roots of Melodorum fruticosum*. *Natural Product Communications*, 10(4).
- [7] Tran Dinh Thang, D. N. (2013). *Essential oils from five species of Annonaceae from Vietnam*. *Natural product communications*, 8(2), 239-42.
- [8] <http://phongdaotaosdh.vinhuni.edu.vn/ngnien-cuu-sinh/seo/luan-an-tien-si-cua-ncs-bui-thi-minh-nguyet-50760>. Truy cập ngày 25/02/2020.
- [9] Seidel, V., FrançoisBailieu, & Waterman, P. G. (2000). *Rel)-1β,2α-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3β, 4α-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of Goniothalamus gardneri and Goniothalamus thwaitesii*. *Phytochemistry*, 53(5), 439-446.
- [10] Tanaka, R., Matsunaga, S., & Sasaki, T. (1989). *A New Flavanone Derivative from the Leaves of Tsuga diversifolia*. *Planta Medica*, 55, 570-571.

EXTRACTION, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FLAVONOID FROM *MELODORUM FRUTICOSUM* LEAVES

Truong Thi Kieu Hanh, Nguyen Phan Quynh Truc, Bui Thi Bao Han, Huynh Loi

ABSTRACT

Melodorum fruticosum Lour. Annonaceae is used in Vietnamese traditional medicine but there is a few research related to it in Vietnam. The aim of this study is to isolate the components from leaves of *Melodorum fruticosum*. In this study, Tsugafolin, a flavonoid, was isolated using 96% EtOH as solvent. The 96% EtOH extract was partitioned in dichromethane. Tsugafolin was isolated from Dichloromethane extract by column chromatography using silicagel as stationary phase. The yield is about 0.004%. The chemical structure of Tsugafolin was elucidated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance (^1H , ^{13}C -NMR) spectroscopy.

Keywords: *Melodorum fruticosum*, Annonaceae, Tsugafolin.

Received: 13/10/2019

Revised: 24/02/2020

Accepted for publication: 25/02/2020