

# Góp phần nghiên cứu các flavonoid trong cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume)

Nguyễn Thị Hồng Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Khắc Quỳnh Cứ<sup>1</sup>,  
Trịnh Văn Quý<sup>2</sup>, Markus Ganzera<sup>3</sup>, Hermann Stuppner<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. HCM, Việt Nam

<sup>2</sup> Hội đồng Dược điển Việt Nam

<sup>3</sup> Viện Dược học, Đại học Innsbruck, Austria

## Đặt vấn đề

Chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume, họ Nhài, Oleaceae) là một loài cây mọc khá phổ biến ở nước ta. Trong dân gian chè vàng được dùng làm thuốc trị viêm tắc tuyến sữa, phục hồi sức khỏe cho phụ nữ sau khi sinh và trị ghẻ lở ngoài da [2]. Theo Đỗ Huy Bích chè vàng còn được dùng để trị kinh nguyệt không đều, bế kinh, thống kinh [1]. Những năm gần đây chè vàng còn được dùng như 1 loại thức uống chức năng ở những người lớn tuổi bị đường huyết và huyết áp cao. Theo một số tài liệu đã công bố, chè vàng có chứa alkaloid, saponin, flavonoid và terpenoid. Ngoài trừ sáu terpenoid glycosid được W. Kraus và cộng sự tìm ra năm 2002 [8], những hợp chất còn lại mới chỉ được định tính sự có mặt của từng nhóm chất có trong chè vàng [2], chưa phân lập được từng hợp chất dưới dạng tinh khiết. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc của 3 chất flavonol glycosid có trong cành, lá chè vàng dựa trên dữ liệu phổ MS và phổ NMR của từng hợp chất.

## Nguyên liệu và phương pháp

### Nguyên liệu

Lấy phần trên mặt đất của cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume), phơi khô, xay nhỏ thành bột. Mẫu được thu hái vào tháng 5-2005 tại 2 tỉnh Nghệ An và Hà Tĩnh.

### Phương pháp phân lập các hợp chất:

**Sắc ký lớp mỏng** (TLC): được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck 1.05554) với hệ dung môi khai triển EtOAc : acid formic : acid acetic : H<sub>2</sub>O (13,5 : 0,8 : 1,5 : 2,5). Phát hiện chất bằng thuốc thử natural products – polyethylenglycol (NP/PEG No 28) 1% trong MeOH, FeCl<sub>3</sub> 1% và soi đèn tử ngoại ở 254 & 366 nm.

**Sắc ký lỏng hiệu năng cao** (HPLC): được tiến hành trên máy Hewlett Packard HP 1050 detector PDA, pha động acetonitril : H<sub>2</sub>O, cột Phenomenex

hydro RP 80Å (5µm).

**Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế** (prep-HPLC): được tiến hành trên máy DIONEX; Pump P580; Autosampler ASI – 100 (automated sample injector); Ultimate 3000 column compartment; Detector UV D170U; Fraction collection 2106 GILSON ABIMED; Pha động acetonitril : H<sub>2</sub>O; Cột Phenomenex RP 18 (5µm), 125Å, 250 x 10mm, 50°C; Tốc độ dòng 2,5ml / phút; Inj: 25 µl.

**Sắc ký cột** (CC): sắc ký cột được tiến hành trên silicagel pha đảo Lichroprep RP 18 (Merck), cỡ hạt 40-63µm và Sephadex LH 20.

**Sắc ký ngược dòng tốc độ cao** (High speed counter-current chromatography - HSCCC): được tiến hành trên máy PHARMA-TECH RESEARCH CORP Model CCC 1000; Hệ dung môi EtOAc: EtOH : H<sub>2</sub>O (5 : 1 : 5) và dùng lớp dưới làm pha động; Tốc độ 1000 rpm.

### Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

**Khối phổ** (MS) BRUKER - Esquire 3000 plus tại Viện Dược học, Đại học Innsbruck, Austria.

**Phổ cộng hưởng từ hạt nhân** (NMR): BRUKER Avance 300, 300MHz (<sup>1</sup>H) & 75 MHz (<sup>13</sup>C) tại Viện Hóa học thuộc Đại học Innsbruck, Austria. Các mẫu đều đo trong dung môi CD<sub>3</sub>OD- d4 với thang đo δc (ppm).

## Kết quả và thảo luận

### Phân lập các hợp chất

Cành và lá chè vàng (1kg) được phơi khô xay nhỏ thành bột và chiết với EtOH 80% (10 lít). Dịch chiết được cô cạn còn 1/2, để lạnh 24 giờ, lọc loại bỏ tạp (chlorophyll, nhựa,...). Dịch lọc được tiếp tục cô dưới áp suất giảm đến đậm đặc (0,5 lít) rồi lần lượt lọc với chloroform, ethyl acetat, n-butanol. Cô giảm áp các dịch chiết và thu được bột cao tương ứng (2g, 15g và 14g). Thực hiện phản ứng màu với thuốc thử cyanidin và FeCl<sub>3</sub> trên 3 loại cao chiết cho thấy cao ethylacetat có chứa nhiều hợp chất phe-

## ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

nolic nhất nên được dùng để chiết tách các hợp chất flavonoid.

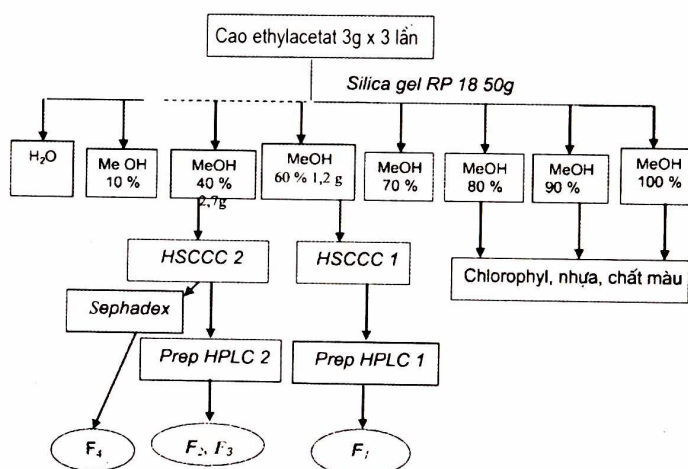
Cao ethylacetat (3g) được hòa với nước cất (2 ml) thành 1 hỗn hợp đồng nhất và tách phân đoạn với silicagel pha đảo Lichroprep RP 18 bằng phương pháp sắc ký chân không (VLC) với dung môi là hỗn hợp MeOH: nước với tỷ lệ MeOH tăng dần (theo sơ đồ), lặp lại quy trình VLC 3 lần và gộp các phân đoạn có cùng tỷ lệ MeOH : H<sub>2</sub>O thu được 11 phân đoạn (1A, 2A,... 11A) Từ 2 phân đoạn 5A (MeOH 40 % 2,7 g) và 7A (MeOH 60 % 1,2 g) tiếp tục phân lập bằng phương pháp sắc ký ngược dòng để thu được những phân đoạn nhỏ tinh khiết hơn:

- Phân đoạn 7A (MeOH 60 % -1,2 g) qua sắc ký ngược dòng thu được 200 phân đoạn nhỏ. Các phân đoạn 45-65 /7A (0,12 g) chứa **F<sub>1</sub>**, sau khi loại dung môi, thu được dạng bột màu vàng đậm. Tinh

chế **F<sub>1</sub>** bằng phương pháp prep-HPLC thu được **F<sub>1</sub>** tinh khiết (7,4 mg);

- Phân đoạn 5A (MeOH 40 % 2,7 g) qua sắc ký ngược dòng thu được 162 phân đoạn nhỏ. Từ các phân đoạn 50-62/5A (0,1g) có chứa **F<sub>2</sub>** và **F<sub>3</sub>**, sau khi loại dung môi, thu được dạng bột màu vàng sáng. Phân lập tiếp qua prep-HPLC thu được **F<sub>3</sub>** (6,2 mg) tinh khiết; nhưng **F<sub>2</sub>** vẫn còn lẫn tạp. Các phân đoạn 81-92 /5A (0,05g) chứa chủ yếu **F<sub>4</sub>**, loại dung môi, thu được dạng bột màu vàng đậm và phổ UV có hình dạng giống như flavonol glycosid. Tinh chế **F<sub>4</sub>** qua cột Sephadex LH 20 với dung môi rửa giải là MeOH – H<sub>2</sub>O tỷ lệ 1:1 thu được **F<sub>4</sub>** tinh khiết (10,5 mg).

Quá trình tách các flavonoid trong chè vàng được thể hiện trong sơ đồ dưới đây:



Sơ đồ quá trình phân lập các flavonoid glycosid trong *Jasminum subtriplinerve* Blume.

Từng phân đoạn nhỏ trong các quá trình sắc ký (VLC, CC sephadex, HSCCC, prep-HPLC) đều được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng và HPLC với các điều kiện tương ứng nêu trên.

**Xác định các chất phân lập được bằng phổ MS và NMR:**

- Hợp chất **F<sub>1</sub>** thu được ở dạng bột tinh thể hình kim có màu vàng cam và phổ UV-Vis có 2 cực đại hấp thụ tại 257 nm và 354 nm (trong acetonitril). Phổ MS của **F<sub>1</sub>** có  $m/z = 608,9$  [ $M-H$ ]<sup>-</sup> và  $m/z = 632,9$  [ $M+Na$ ]<sup>+</sup> như vậy  $M = 610$  với công thức phân tử C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD – d<sub>4</sub>, 300 MHz) của **F<sub>1</sub>** cho các tín hiệu cộng hưởng của 2 proton nhân thơm với hằng số tương tác  $J$  đặc trưng của proton ở vị trí *meta* (H-6, H-8) ở vòng A của 5,7-flavonol tại 6,21 (1H d  $J = 2,0$  Hz) và 6,40 (1H d  $J = 2,0$  Hz). Ngoài ra còn có các tín hiệu cộng hưởng của 3

proton nhân thơm với các hằng số tương tác  $J$  đặc trưng cho proton ở vị trí *ortho* và *meta* của vòng B của flavonol oxy hóa ở 3' & 4' có  $\delta$  7,63 (1H dd  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 2,1$  Hz); 7,67 (1H d  $J = 2,1$  Hz) và 6,88 (1H d  $J = 8,4$  Hz). Các dữ kiện này chứng tỏ **F<sub>1</sub>** có cấu trúc của quercetin [4]. Các tín hiệu cộng hưởng của nhiều proton anomer trong vùng 3,26 – 5,12 ppm và phổ MS cho thấy **F<sub>1</sub>** có 2 đường. Tại 1,10 ppm tín hiệu cộng hưởng proton doublet rất mạnh (d 3H  $J = 6,2$  Hz) của nhóm CH<sub>3</sub>. Đây là tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của rhamnose. Các dữ kiện phổ COSY, HSQC và proton cho thấy glucose (H<sub>1</sub>" 5,12 d  $J = 7,0$  Hz) gắn trực tiếp vào quercetin tại OH ở vị trí C<sub>3</sub> và nối với rhamnose (H<sub>1</sub>" 4,52 d  $J = 1,0$  Hz). So sánh các dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR của **F<sub>1</sub>** với phổ <sup>1</sup>H-NMR của rutin [7] cho kết quả tương đồng. Như vậy **F<sub>1</sub>** là **Rutin**.

**Bảng 1:** So sánh dữ liệu phổ MS của **F<sub>1</sub>**, **F<sub>3</sub>** và **F<sub>4</sub>** với phổ MS của rutin, astragalín, isoquercitrin

## ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

	F <sub>1</sub>	Rutin [6]	F <sub>3</sub>	Astragalinalin [5]	F <sub>4</sub>	Isoquercitrin [5]
M	610	610	448,4		464,8	
[M-H] <sup>-</sup>	608,9	609	447,4	448	463,8	464
[M-glucosyl]				286		
[M+Na] <sup>+</sup>	632,9	633	470,8		486,8	

- Hợp chất F<sub>3</sub> thu được ở dạng bột tinh thể hình kim có màu vàng sáng và phổ UV-Vis có 2 cực đại hấp thụ tại 260 và 360 nm (trong acetonitril). Phổ MS của F<sub>3</sub> có m/z = 447,4 [M-H]<sup>-</sup> và m/z = 470,8 [M+Na]<sup>+</sup> như vậy M = 448,4 với công thức phân tử C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>11</sub>.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD - d<sub>4</sub>, 300 MHz) của F<sub>3</sub> có các tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của proton ở vị trí *meta* (H-6, H-8) ở vòng A của 5,7-flavonol tại 6,2 (1H d J = 2,1 Hz) và 6,39 (1H d J = 2,1 Hz). Các doublet khác tại các vị trí 6,86 (2H d J = 8,4 Hz, H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>') và 8,05 (2H d J = 8,4 Hz, H<sub>2</sub>', H<sub>6</sub>') đặc trưng cho 4 proton ở vị trí *ortho* và *meta* của vòng B của flavonol oxy hóa ở 4'. Điều này cho thấy F<sub>3</sub> là dẫn chất của kaempferol [4]. Các tín hiệu cộng hưởng proton trong khoảng 3,25 - 5,2 ppm và phổ MS cho thấy F<sub>3</sub> chỉ có một đường glucose. So sánh các dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR của F<sub>3</sub> với phổ <sup>1</sup>H-NMR của

astragalinalin [5] cho kết quả trùng khớp. Như vậy F<sub>3</sub> là *astragalinalin*.

- Hợp chất F<sub>4</sub> thu được ở dạng bột tinh thể hình kim có màu vàng đậm và phổ UV-Vis có 2 cực đại hấp thụ tại 260 nm và 360 nm (trong acetonitril). Phổ MS của F<sub>4</sub> có m/z = 463,8 [M-H]<sup>-</sup> và m/z = 486,8 [M+Na]<sup>+</sup> như vậy M = 464,8 với công thức phân tử C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của F<sub>5</sub> cũng có các tín hiệu đặc trưng giống như F<sub>1</sub> tại 6,2 (1H d J = 2,1 Hz) và 6,39 (1H d J = 2,1 Hz); và 3 doublet khác tại các vị trí 6,86 (1H d J = 8,4 Hz), 7,60 (1H dd J<sub>1</sub> = 8,4 Hz, J<sub>2</sub> = 2,1 Hz) và 7,71 (1H d J = 2,1 Hz). Như vậy F<sub>4</sub> cũng là 1 dẫn chất của quercetin. Các tín hiệu cộng hưởng proton anomer trong khoảng 3,26 - 5,12 ppm và phổ MS cho thấy F<sub>4</sub> có 1 đường glucose. So sánh các dữ liệu phổ <sup>1</sup>H NMR của F<sub>4</sub> với phổ <sup>1</sup>H NMR của isoquercitrin [3,7] cho kết quả phù hợp. Như vậy F<sub>4</sub> là *isoquercitrin*.

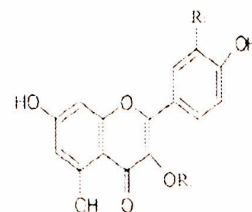
Từ những kết quả phân tích xác định cấu trúc như ở trên, có thể tóm tắt về mặt hoá học các chất F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> và F<sub>4</sub> phân lập được từ chè vàng như trình bày trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Dữ liệu phổ <sup>1</sup>H NMR của F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> và F<sub>4</sub> so sánh với các chất tương ứng

Proton	F <sub>1</sub>	Rutin [7]	F <sub>3</sub>	Astragalinalin [5]	F <sub>4</sub>	Isoquercitrin [7]
<i>Aglycon</i>						
H <sub>6</sub>	6,21 d 2,0	6,25 d 2,0	6,2 d 2,1	6,17 d 1,9	6,2 d 2,1	6,25 d 2,0
H <sub>8</sub>	6,40 d 2,0	6,48 d 2,0	6,39 d 2,1	6,36 d 1,9	6,39 d 2,1	6,48 d 2,0
H <sub>2</sub>	7,67 d 2,1	7,57 d 2,2	8,05 d 8,4	8,05 d 8,9	7,71 d 2,1	7,57 d 2,0
H <sub>3</sub>			6,86 d 8,4	6,88 d 8,9	-	-
H <sub>5</sub>	6,88 d 8,4	6,9 d 8,5	6,86 d 8,4	6,88 d 8,9	6,86 d 8,4	6,91 d 8,5
H <sub>6</sub>	7,63dd 8,4 2,1	7,52dd 8,5 2,28,05 d 8,4		8,05 d 8,9	7,6dd 2,1 8,4	7,51 dd 2,0 8,5
<i>Glucosyl</i>						
H <sub>1</sub> "	5,11 d 7,4	4,89 d 7,8	5,2 d 7,5	5,2 d 7,6	5,2 d 7,5	4,94 d 9,1
H <sub>2</sub> "	3,8 d 10,5	3,14 -3,5	3,45	3,44 t 9,2	3,6 d 5,4	3,1 - 3,5
H <sub>3</sub> "	3,54 m	(6H) m	3,41	3,41 t 9,2	3,48	(6H) m
H <sub>4</sub> "	3,26dd 3,48 9,4		3,35	3,31 t 9,8	3,4	
H <sub>5</sub> "	3,54 m		3,25	3,19m	3,25m	
H <sub>6</sub> "	3,81dd 3,2 10		3,69dd	3,68dd 2,4 2,4	3,76 d 2,4	
	3,4 dd 9,39 3,38		2,2 11,8	3,53dd 5,5 11,8	3,73 d 2,4	
<i>Rhamnosyl</i>						
H <sub>1</sub> "	4,25 d 1,0	4,3 d J < 2,0				
H <sub>2</sub> " -H <sub>5</sub> "	3,26 - 3,8 (4H) m	3,14 -3,5 (4H) m				
CH <sub>3</sub>	1,1 (3H)d 6,2	1,0 (3H)d 6,25				

R1	R2		
F1	OH	Rutinosyl	Rutin
F3	H	Glucosyl	Astragalinalin
F4	OH	Glucosyl	Isoquercitrin

Hình cấu trúc hóa học của các hợp chất F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> và F<sub>4</sub>



## Kết luận

Từ phần cao ethylacetat trong dịch chiết ethanol của cành lá cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume, họ Oleaceae) 3 flavonol glycosid là *Rutin* [F<sub>1</sub>], *Astragalin* [F<sub>3</sub>] và *Isoquercitrin* [F<sub>4</sub>] đã được phân lập. Cấu trúc hóa học của chúng đã được xác định dựa trên các dữ liệu phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Các hợp chất này đều được tìm thấy lần đầu tiên từ cây chè vàng trồng tại Hà Tĩnh và Nghệ An. Hợp chất F<sub>2</sub> đã phân lập và 1 số flavonoid glycosid khác đang được tiếp tục nghiên cứu.

## Summary

*From ethanolic extracts of the aerial parts of Jasminum subtriplinerve Blume (Oleaceae) through separation by partition with ethylacetate, chromatography etc. three flavonol glycoside compounds were isolated, which were further identified as Rutin [F1], Astragalin [F3] and Isoquercitrin [F4] based on their MS and 1H-NMR data.*

*This report is the first one of flavonoids from the plant.*

## Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích và tập thể tác giả, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB KHKT Hà Nội (2004), 427- 429
2. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB KHKT Hà Nội (2001), 121-122
3. J.B. Harbonne, Plant phenolic, *Pharmaceutical press* (1989), 218
4. J.Vervoot *et al.*, Building-up a comprehensive database of flavonoids based on NMR data, *Conference of the Hyphenation of LC – NMR spectroscopy, LC – MS spectroscopy and related topics*, Tuebingen Germany, 2006, March 25-29,.
5. Hye Young Kim, Byung Ho Moon, Hak Ju Lee, Don Ha Choi, *J.Ethnopharmacol.* (2004) 93, 227-230
6. Maceij Stobiecki, *Phytochemistry* (2000) 54, 237-256
7. Steen Honore Hansen *et al.*, *Anal. Chem.*, (1999), 71, 5235-5241
8. W. Kraus, Luu Ngoc Hoang, J. Conrad, I. Klaiber S. reeb & B. Vogler, *Phytochemistry Review* 1(2002), 409- 411