

exhibited potent toxicity against all the three cancer cell lines tested.

Keywords: *Croton tonkinensis*; ent-Kaurane; Diterpenoid; Cytotoxicity

Tài liệu tham khảo

1. Phan Tổng Sơn, Trần Bạch Dương, Phan Minh Giang, Nguyễn Thị Minh, Hoàng Thanh Hương, Lê Mai Hương. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật và gây độc tế bào của các alkaloid từ một số loài *Crinum* của Việt Nam, *Tạp chí Dược học* (2003), 43, 18-21 và 24.

2. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của các diterpenoid dãy labdan từ cây thuốc Ích mẫu (*Leonurus heterophyllus* Sweet, Lamiaceae), *Tạp chí Dược học* (2009), 49, 13-15.

3. Phan Minh Giang, Jin H. Z., Phan Tong Son, Lee J. H., Hong Y. S., Lee J. J., ent-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF- κ B activation and NO production, *J. Nat. Prod.* (2003), 66, 1217-1220.

4. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Lee J. J., Otsuka H., Four ent-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep., *Chem. Pharm. Bull.* (2004), 52, 879-882.

5. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Hamada Y., Otsuka H., Cytotoxic diterpenoids from Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* Gagnep., *Chem. Pharm. Bull.* (2005), 53, 296-300.

6. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Thành phố Hồ Chí Minh (1997).

7. Sun H. D., Huang S. X., Han Q. B., Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities, *Nat. Prod. Rep.* (2006), 23, 673-698.

8. Phan Minh Giang, Le Thi Hong Dung, Phan Tong Son, Chemical transformation of ent-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep. I - Hydrolysis, Acetylation and Oxidation of ent-18-acetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one, *Tạp chí Hoá học* (2007), 45, 382-385.

9. Phan Minh Giang, Nguyen Thi Thu Hang, Phan Tong Son, Chemical transformation of ent-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep. II - Epoxidation of ent-18-acetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one, *Tạp chí Hoá học* (2007), 45, 502-504.

10. Likhitwitayawuid K., Angerhoffer C. K., Cordell G. A., Pezutto J. M., Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*, *J. Nat. Prod.* (1993), 56, 30-38.

Góp phần nghiên cứu nicotiflorin trong cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume.)

Nguyễn Quỳnh Hương¹,
Nguyễn Thị Hồng Hương²

¹Khoa Y học cổ truyền,

²Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Đặt vấn đề

Từ cảnh là cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume họ Nhài, Oleaceae), chúng tôi đã phân lập, xác định cấu trúc một số hợp chất phenolic như rutin, astragalín, isoquercitrin, verbascosid, isoverbascosid, oleoverbascosid, apioverbascosid, 6'-O-menthiafolylverbascosid^[2] và cũng đã xác định hàm lượng của năm trong tám hợp chất trên bằng HPLC [1] và điện di mao quản (CE)^[3]. Tiếp tục nghiên cứu chúng tôi xác định sự có mặt của nicotiflorin và hàm lượng của nó trong dược liệu này dựa trên dữ liệu phổ MS và theo kỹ thuật HPLC.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Lấy phần trên mặt đất của cây chè vàng, phơi khô, xay nhỏ thành bột. Mẫu phân lập được thu hái vào tháng 10-2006 tại Nghệ An. Các mẫu định lượng thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Các mẫu chè vàng dùng định lượng trong đề tài

Mẫu	Jass. 1	Jass. 2	Jass. 3
Nơi thu hái	TP. HCM	Nghệ An	Hà Tĩnh
Độ ẩm (%)	9,21	9,35	9,45
Thời gian thu hái	10 - 2006	5 - 2005	5 - 2005

Dung môi và chất chuẩn đối chiếu

Các dung môi MeOH, ACN, TFA,... dùng trong HPLC, LC-MS là loại tinh khiết chuyên dùng cho HPLC. H₂O sử dụng là loại tinh khiết cất từ máy NANO pure bamstead (Dubuque, USA) dùng cho HPLC. Chất chuẩn đối chiếu nicotiflorin mua từ hãng Sigma.

Thiết bị nghiên cứu

Phân lập nicotiflorin trên các máy prep-HPLC DIONEX; Pump P580; Autosampler ASI – 100 (automated sample injector); Ultimate 3000 column compartment; Detector UV D170U; Fraction collection 2106 GILSON ABIMED; Cột Phenomenex RP 18 (5µm), 125Å, 250 x 10mm; Máy PHARMA-TECH RESEARCH CORP Model CCC 1000.

Xác định cấu trúc nicotiflorin trên máy khối phổ BRUKER - Esquire 3000 plus (MS) tại Viện Dược học, Đại học Innsbruck, Austria.

Định lượng nicotiflorin trên máy HPLC Hewlett Packard HP 1050 detector PAD, cột PLRS 300 80Å (5µm).

Phương pháp phân lập các hợp chất

Vì nicotiflorin là một flavonoid glycosid và cũng chiết tách từ cành lá chè vàng nên chúng tôi đã sử dụng các phương pháp chiết tách, kiểm tra với các điều kiện tương tự như khi phân lập các flavonoid glycosid khác^[1,2].

Chiết pha rắn (SPE): tiến hành trên pha tĩnh là Lichrorep RP 18 (Merck), cỡ hạt 40 – 63 µm.

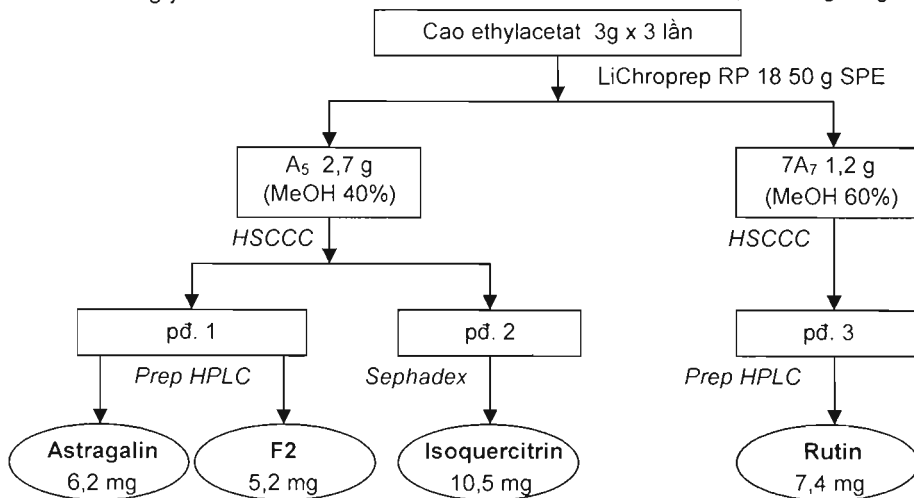
Sắc ký lớp mỏng (TLC): sử dụng bản mỏng DC – Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 1.05554) với hệ dung môi khai triển EtOAc – acid formic – acid acetic – H₂O (13,5 : 0,8 : 1,5 : 2,5). Phát hiện chất bằng thuốc thử Natural Products – Polyethylenglycol (NP/PEG No 28) 1% trong MeOH, FeCl₃ 1% và soi đèn tử ngoại ở 254 & 366 nm.

Sắc ký ngược dòng tốc độ cao (High speed counter-current chromatography - HSCCC): dùng hệ dung môi EtOAc – EtOH – H₂O (5 : 1 : 5) và lớp dưới làm pha động; Tốc độ quay 1000 rpm.

Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (prep-HPLC): tiến hành với pha động acetonitril – H₂O (gradient); Nhiệt độ cột 50°C; Tốc độ dòng 2,5ml/phút; Thể tích mẫu tiêm: 25µl.

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): tiến hành trên máy Hewlett Packard HP 1050 detector PAD, pha động acetonitril – H₂O (gradient), cột PLRS 300 80Å (5µm).

Tất cả các phân đoạn của các quá trình chiết tách (chiết pha rắn, CC sephadex, HSCCC, prep-HPLC) đều được kiểm tra bằng TLC và HPLC với các điều kiện tương ứng.



Hình 1: Sơ đồ phân lập các flavonoid glycosid trong *Jasminum subtripplinerve* Blume.

Kết quả và thảo luận

Phân lập các hợp chất

Từ 3 g cao ethylacetat của chè vàng qua chiết tách pha rắn (với Lichrorep RP 18) lặp lại 3 lần rồi tiếp tục các kỹ thuật, HSCCC, sắc ký

rây phân tử sephadex và pre-HPLC, chúng tôi thu được 4 flavonoid. Ba trong bốn flavonoid đã được xác định là rutin, astragaline và isoquercitrin. Hợp chất F₂ (5,2 mg) thu được ở dạng bột tinh thể hình kim, màu vàng cam và

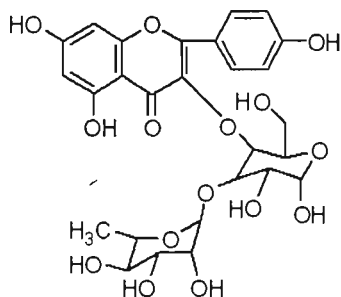
phổ UV-Vis có 2 cực đại hấp thụ λ_{max}^{ACN} tại 265 và 345 nm. Dung dịch F_2 trong cồn ethanol cho kết quả dương tính với các phản ứng màu đặc trưng của flavonoid (tăng màu vàng trong môi trường kiềm, phản ứng cyanidin, $AlCl_3$, ...).

Xác định cấu trúc F_2 bằng phổ MS

F_2 được đo phổ MS để xác định cấu trúc phân tử. Mẫu F_2 pha trong CH_3OH và đo với máy BRUKER – Daltronics, Esquire 3000 plus với các điều kiện như sau: phương pháp ESI, kiểu positive; Nhiệt độ buồng ion hóa $350^\circ C$; Phun mẫu với khí nitrogen 30 L/phút, bay hơi dung môi với khí khô nitrogen 10 L/phút, khoảng quét từ 100 – 1200 m/z .

Bảng 2: So sánh dữ liệu phổ MS của F_2 với phổ MS của nicotiflorin (m/z)

	$[M+Na]^+$	$[M+H]^+$
F_2	616,9	594,9
Nicotiflorin ^[4]	617	595



Hình 1: Cấu trúc hóa học của hợp chất F_2

Phổ ESI MS của F_2 có $[M+H]^+$ 594,9 m/z và $[M+Na]^+$ 616,9 m/z , phù hợp với công thức phân

tử $C_{27}H_{30}O_{15}$ ($M = 594,16$). So sánh phổ MS của F_2 với phổ MS của nicotiflorin^[4] (bảng 2) cho kết quả hoàn toàn phù hợp. Như vậy dựa vào các phản ứng màu đặc trưng, phổ UV và phổ MS cũng có thể kết luận F_2 là nicotiflorin.

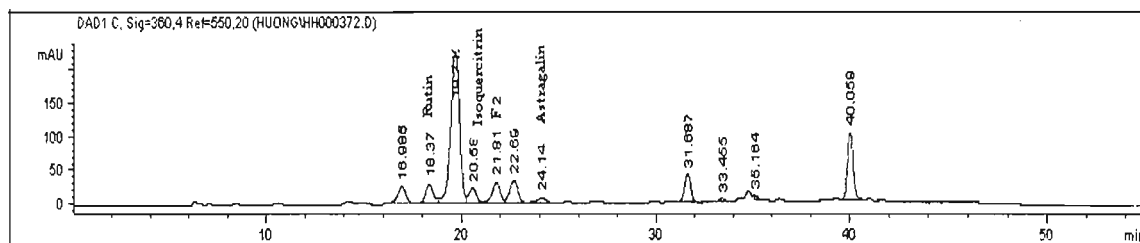
Xác định hàm lượng nicotiflorin

Nicotiflorin là một flavonoid nên chúng tôi áp dụng quy trình định lượng các hợp chất phenolic trong chè vàng^[1] để xác định hàm lượng. Quá trình định lượng được thực hiện trên máy Hewlett Parkard HP-1050, cột PLRP-S 300 Å (5 μm , 250 x 4,6 mm) với pha động acetonitril 0,005% TFA (a) - nước cất 0,005% TFA (b) với chế độ rửa giải gradient^[4]: phút 0,0: 15 (a) / 85 (b); phút 8,0: 18% (a) 82% (b); phút 20,0: 25% (a) 75% (b); phút 28,0: 33% (a) 67% (b); phút 36,0: 44% (a) 56% (b); phút 45,0 duy trì đến phút 55,0: 90% (a) 10% (b). Tốc độ dòng 0,3 ml/phút và nhiệt độ cột $40^\circ C$, phát hiện tại bước sóng 360 nm. Thể tích tiêm mẫu 10 μL .

Chuẩn bị mẫu

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,1g bột cành lá chè vàng thêm vào 2,0 ml methanol 80% siêu âm trong 15 phút (Bandelin) sau đó ly tâm ở tốc độ 3500 rpm trong 7 phút chiết lấy dịch. Lặp lại 4 lần và gộp tất cả dịch chiết vào bình định mức và thêm methanol 80% vừa đủ 10 ml. Các dịch chiết đều lọc qua màng cellulose acetat 0,45 μm (Satorius).

Khảo sát các mẫu Jass. 1, Jass. 2, Jass. 3 trong điều kiện phân tích như trên cho kết quả đỉnh F_2 có t_R 21,8 phút, (hình 2) trùng với t_R của nicotiflorin chuẩn đối chiếu.



Hình 2: Sắc ký đồ HPLC của mẫu Jass. 2

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 1 mg nicotiflorin chuẩn đối chiếu rồi cho vào bình định mức 2 ml pha với MeOH 80%. Từ bình này dung dịch chuẩn đối chiếu được lần lượt pha loãng với MeOH 80% thành 5-7 mức nồng độ (bảng 2).

Đánh giá phương pháp phân tích

Xác định khoảng tuyến tính: Khảo sát trên

các dung dịch chuẩn hỗn hợp với các nồng độ khác nhau (bảng 2).

Trong các khoảng nồng độ của mỗi chuẩn đối chiếu đã khảo sát đều có tương quan tuyến tính với diện tích pic tương ứng. Tất cả các dữ liệu đều được ghi lại và biên tập bởi phần mềm ChemStation.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Bảng 3: Phương trình hồi quy, hệ số R^2 , LOD, LOQ của F_2

Khoảng nồng độ khảo sát ($\mu\text{g/ml}$)	Phương trình hồi quy	R^2	LOD	LOQ
2,0 - 980	$Y = 30,63X - 114,02$	0,9995	2	10

^aX: $\mu\text{g.ml}^{-1}$; Y: diện tích pic ; LOD và LOQ: lượng chất trên cột (ng).

Độ chính xác

Bảng 4: Độ chính xác trong ngày và giữa các ngày (RSD trong ngoặc đơn)

Trong ngày (n = 5)						Khác ngày (n = 3)	
Hàm lượng (mg/g)			Thời gian lưu t_R (phút)			Hàm lượng	t_R
ngày 1	ngày 2	ngày 3	ngày 1	ngày 2	ngày 3		
2,1±(2,1)	2,03±(1,6)	2,03±(1,11)	21,2±(0,99)	21,81±(1,02)	21,31±(1,43)	2,05±(1,95)	21,44±(2,49)

Khảo sát trên mẫu chè vàng Jass.3 với các điều kiện xử lý mẫu và sắc ký như đã mô tả ở trên. Lập lại thí nghiệm 5 lần trong 1 ngày (độ chính xác trong ngày) và liên tục trong 3 ngày (độ chính xác giữa các ngày). Kết quả cho thấy độ lặp trong cùng ngày với hàm lượng có RSD từ 1,11 – 2,1%, với thời gian lưu có RSD 0,99 – 1,43%. Với độ lặp giữa các ngày hàm lượng có RSD là 1,95 %, với thời gian lưu có RSD là 2,49 % (bảng 4). Phương pháp xây dựng có độ chính xác trong ngày và độ chính xác trung gian giữa các ngày chấp nhận được đối với việc định lượng các hợp chất tự nhiên từ dược liệu có hàm lượng nhỏ.

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm dung dịch chuẩn vào mẫu Jass. 3 ở 3 mức nồng độ. Lượng chuẩn thêm vào phải đảm bảo sao cho nồng độ của các chất cần phân tích trong mẫu chè vàng sau khi thêm đều nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Lập lại thí nghiệm 3 lần, kết quả ghi trong bảng 5. Chất khảo sát có tỷ lệ phục hồi từ 95 - 98,38% và có RSD < 2%. Như vậy phương pháp xây dựng đạt độ đúng.

Bảng 5: Độ đúng của nicotiflorin trong các mẫu chè vàng

Chất/mẫu chuẩn (μg)	Chuẩn thêm (μg)	Lượng thu hồi (μg)	Tỷ lệ thu hồi (%) n=3
54,66	29,24	28,56	97,67
53,20	14,62	13,89	95,0
53,94	35,1	34,53	98,38
			TB = 97,02
			RSD = 1,84%

Định lượng

Áp dụng phương pháp xây dựng trên vào việc định lượng trong các mẫu Jass (mỗi mẫu lập lại thí nghiệm 3 lần) và thu được kết quả (bảng 6).

Bảng 6: Hàm lượng nicotiflorin (mg/g) trong các mẫu chè vàng

	Jass 1	Jass 2	Jass 3
Lượng mẫu (g)	0,149-1,152	0,151-0,154	0,158-0,162
Hàm lượng (mg/g)	1,92	4,4	2,15
RSD	(1,47)	(1,74)	(1,95)

Hàm lượng nicotiflorin trong 3 mẫu khác nhau có thể do điều kiện thổ nhưỡng nơi mẫu chè vàng mọc khác nhau.

Kết luận

Từ phần cao ethylacetat trong dịch chiết ethanol của cành lá cây chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume, họ Oleaceae) một flavonol glycosid là nicotiflorin đã được phân lập và được xác định dựa trên các dữ liệu khối phổ, phổ UV. Hợp chất này được tìm thấy lần đầu tiên từ cây chè vàng trồng tại Hà Tĩnh Nghệ An và thành phố Hồ Chí Minh. Chúng tôi đã định lượng nicotiflorin bằng phương pháp HPLC với cột PRLP S 300. Phương pháp xây dựng có tương quan tuyến tính giữa nồng độ hoạt chất và diện tích pic tương ứng rất hoàn hảo, độ đúng và độ lặp lại cao. Có thể áp dụng phương pháp này để kiểm soát hàm lượng các flavonoid trong chè vàng và một số chế phẩm có chứa dược liệu này.

Summary

Nicotiflorin of flavonol glycoside nature was isolated from the ethanolic extracts of the aerial parts of *Jasminum subtriplinerve* Blume (Oleaceae) by separation techniques such as partition with ethylacetate, chromatography, etc. The structure was identified based on its MS data. No such study results on the flavonoids of the plant were previously reported. A liquid chromatographic method suitable for determination of nicotiflorin in J.