

FLAVONOID PHÂN LẬP TỪ CÂY MUA BÀ THU HÁI Ở VIỆT NAM

Trần Thanh Hà^{1*}, Nguyễn Thị Hà¹, Mai Văn Cường²

¹Khoa Hoá Thực vật, Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 19-Lê Thánh Tông, Hà Nội

Đến Tòa soạn 24-6-2013

Abstract

A phytochemical fractionation of the ethyl acetate extract of the stems of *Melastoma candidum* D. Don led to the isolation of two flavonoids. By means of the spectroscopic methods including MS, NMR, the isolated compounds were determined to be quercetin, quercitrin.

Keywords: *Melastoma candidum* D. Don., quercetin, quercitrin, naringenin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, hoá học của nhiều loài thuộc họ Mua (Melastomataceae) đã được nghiên cứu từ lâu, trong đó một số loài đã được sử dụng trong các bài thuốc dân gian để chữa cảm cúm, bong gân, gãy xương... [1]. Thành phần chủ yếu trong các cây thuộc họ Mua là các flavonoid như trúc castalagin, procyanidin B-2, helichryoside, quercetin, kaempferol, quercitrin, isoquercitrin và rutin. Đây là lớp chất có hoạt tính sinh học cao được ứng dụng rộng rãi trong việc điều trị các loại bệnh, bảo vệ tế bào, có thể ngăn ngừa các nguy cơ xơ vữa động mạch, tai biến, lão hóa, giảm thương tổn gan, cải thiện chức năng gan...; đặc biệt là khả năng loại bỏ các gốc tự do hình thành trong quá trình oxi hoá lipid trong cơ thể, chống tăng sinh tế bào ung thư, kìm hãm các enzyme liên quan đến quá trình phát triển các tế bào ung thư và do đó nó có thể dùng để chống ung thư [2, 6].

Ở Việt Nam, cho đến nay đã phát hiện một số loài mọc hoang ở nhiều vùng từ bắc tới nam, hầu hết chúng đều được sử dụng trong y học dân gian để chữa bệnh và có nhiều tác dụng như: sinh nhiệt giải độc, hoạt huyết tán ú, giảm đau, cầm máu, tiêu viêm [1].

Tuy nhiên, chúng ta chưa có một nghiên cứu đầy đủ nào về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các loài mua. Vì vậy, việc tìm hiểu, đánh giá so sánh thành phần hóa học và cao hơn nữa là chiết xuất, phân lập, thử hoạt tính sinh học của các hợp chất có trong cây mua là một việc làm cần thiết, tạo cơ sở cho việc tận thu, ứng dụng một nguồn dược liệu sẵn có ở nước ta làm thuốc hỗ trợ điều trị ung thư, tai biến. Trong chương trình nghiên cứu

điều tra thu thập mẫu, khảo sát về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi Mua ở Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành phân lập các hợp chất từ các phân đoạn chiết khác nhau của cây mua bà. Bài báo này công bố kết quả phân lập ba flavonoid từ cặn chiết etyl axetat phần trên mặt đất của cây mua bà (*Melastoma candidum* D. Don) thu hái ở Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là phần trên mặt đất cây mua bà thu hái tại Bắc Giang vào tháng 7/2012, mẫu tiêu bản được lưu tại Khoa Hóa Thực vật - Viện dược liệu. Mẫu sau khi thu hái được sấy khô ở nhiệt độ 50 °C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 và 366 nm hoặc dùng thuốc thử hiện màu là dung dịch H₂SO₄ 10 % được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng trên bếp điện từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 63-200, 40-63 µm, Merck).

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Điểm nóng chảy đo trên máy Stuart SMP3.

Phổ khối lượng (EI-MS, 70 eV) ghi trên máy Hewlett Packard HP 5890, Serie II.

Phổ khối lượng phun bụi điện tử (ESI-MS) được ghi trên thiết bị Agilent 6310 Ion Trap

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC được ghi trên máy Bruker Avance-500 MHz, chuẩn nội TMS (tetrametyl silan).

2.3. Chiết xuất và phân lập

4 kg dược liệu được ngâm với cồn 95 % ở nhiệt độ phòng (3 lần, mỗi lần 4 ngày). Các dịch chiết được gộp lại và cất loại cồn nước dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tổng. Cặn chiết này được phân bố lại lần lượt trong các dung môi có độ phân cực tăng

dần: *n*-hexan, diclometan, etyl axetat, *n*-butanol; cất loại hết dung môi dưới áp suất giảm thu được các phần cặn chiết tương ứng *n*-hexan (20,19 g), diclometan (17,43 g), etyl axetat (27,90 g).

Phân tách cặn etyl axetat (20 g) bằng sắc ký cột silica gel với dung môi giải hấp diclometan/metanol với tỷ lệ metanol tăng dần từ 0 đến 100 % thu được 10 nhóm phân đoạn kí hiệu từ I-X. Phân đoạn III (0,92 g) sau khi phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexan–EtOAc–MeOH (10:10:1) thu được hợp chất **1** (21 mg). Phân đoạn V (1,1 g) sau khi tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi cloroform–axeton–axit formic (25:2:1) thu được hợp chất **2** (23 mg). Phân đoạn IX cô cho bay hơi hết dung môi rồi tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với dung môi giải hấp cloroform–metanol–nước (73:30:4) và sau đó tinh chế lại bằng cột silicagel pha đảo với hệ dung môi metanol–nước (5:1) thu được hợp chất ký hiệu là **3** (17 mg).

Bảng 1: Dữ kiện phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của ba chất **1**, **2**, **3**

Vị trí	Chất 1 (Naringenin)		Chất 2 (Quercetin)		Chất 3 (Quercitrin)	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$, ppm	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$, ppm	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$, ppm	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$, ppm	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$, ppm	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$, ppm
2	42,0	5,42 (1H, dd, $J = 3,0, 13,0$ Hz)	148,0	-	158,5	-
3	78,4	2,68 (1H, dd, $J = 3,0, 17,5$ Hz) 3,19 (1H, dd, $J = 13,0, 17,5$ Hz)	137,2	-	136,2	-
4	196,3		177,3	-	179,6	-
5	163,5		162,5	-	163,2	-
6	95,8	5,89 (1H, br s)	94,4	6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	99,8	6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	166,6		165,6	-	165,8	-
8	95,0	5,89 (1H, br s)	99,3	6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	94,7	6,36 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	162,9		158,2	-	159,3	-
10	101,8		104,5	-	105,9	-
1'	128,9		124,2	-	122,9	-
2'	128,3	7,31 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	116,0	7,75 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	116,4	7,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
3'	115,2	6,80 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	146,2	-	146,4	-
4'	157,7		148,8	-	149,7	-
5'	115,2	6,80 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	116,2	6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	116,9	6,91 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
6'	128,3	7,31 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	121,7	6,20 (1H, dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz)	122,9	7,30 (1H, dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz)
1''					103,5	5,35 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)
2''					72,0	4,22 (1H, dd, $J = 3,0, 1,5$ Hz)
3''					72,1	3,75 (1H, dd, $J = 9,0, 3,0$ Hz)
4''					73,3	3,41 (1H, dd, $J = 6,0$ Hz)
5''					71,9	3,43 (1H, dq)

Vi trí	Chất 1 (Naringenin)		Chất 2 (Quercetin)		Chất 3 (Quercitrin)	
C	$\delta_C^{a,b}$, ppm	$\delta_H^{a,c}$, ppm	$\delta_C^{a,b}$, ppm	$\delta_H^{a,c}$, ppm	$\delta_C^{a,b}$, ppm	$\delta_H^{a,c}$, ppm
6''					17,6	0,94 (3H, d, $J = 6,0$ Hz)
5-OH		12,1 (1H, s)				
7-OH		10,77 (1H, s)				
4'-OH		9,58 (1H, s)				
	^a đo trong DMSO, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz		^a đo trong MeOH, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz		^a đo trong MeOH, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz	

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất 1: Chất bột màu trắng; nhiệt độ nóng chảy 247-250 °C; Phổ IR (viên nén KBr): ν_{\max} cm^{-1} : 3298 (OH), 1640 (C=O), 1597, 1511 (C=C), 1065 (C-O).

Phổ ESI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 271 $[\text{M-H}]^+$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Phổ hồng ngoại cho các dải sóng hấp thụ ở ν_{\max} (cm^{-1}): 3298 (OH), 1640 (C=O), 1597, 1511 (C=C), 1065 (C-O).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 1 cho các tín hiệu cộng hưởng ứng với sự có mặt của ba nhóm-OH ở δ_H 12,1 (1H, s, OH-5), 10,77 (1H, s, OH-7), 9,58 (1H, s, OH-4'), cho tín hiệu của 6 proton trong hai vòng thơm trong đó hai proton ghép cặp meta ở δ_H 5,89 (2H, br s, H-6 & H-8) thuộc về một vòng thơm (vòng A), bốn tín hiệu đôi một tương tác ortho thuộc về vòng thơm thế 1,4 còn lại δ_H 6,80 (2H, d $J = 8,5$ Hz, H-3' & H-5'), 7,31 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2' & H-6'). Tín hiệu cộng hưởng của nhóm OH ở δ_H 12,1 đặc trưng cho tín hiệu của nhóm OH có liên kết cầu hydro nội phân tử, như vậy vị trí của nhóm OH này ở vị trí số 5, còn nhóm OH kia ở vị trí số 7. Đáng chú ý là các tín hiệu của một nhóm metin δ_H 5,42 (1H, dd, $J = 3,0, 13,0$ Hz) và một nhóm metylen ở δ_H 2,68 (1H, dd, $J = 3,0, 17,5$ Hz, H-3 α) 3,19 (1H, dd $J = 13,0, 17,5$ Hz, H-3 β) cho ta dự đoán về cấu trúc một flavanon trong công thức cấu tạo của chất 1.

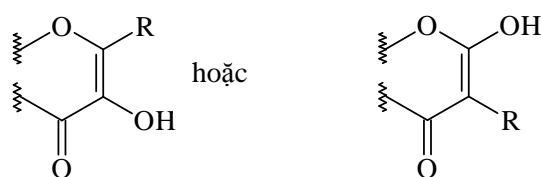
Khảo sát phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho thấy chất 1 bao gồm 15 cacbon trong đó có một nhóm carbonyl liên hợp cho tín hiệu cộng hưởng đặc trưng ở δ_C 196,3 (C-4), một nhóm metylen ở δ_C 78,4 (C-3), một nhóm metin ở δ_C 42,0 (C-2) các tín hiệu cacbon của hai vòng thơm nằm trong khoảng δ_C 95,0 đến 163,5.

Từ việc phân tích các dữ kiện phổ, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [4] cho phép khẳng định hợp chất 1 là một flavonoid khung flavanon có tên gọi là 4',5,7-trihydroxy flavanon hay tên khác là **naringenin**.

Chất 2: Hợp chất 2 nhận được dưới dạng tinh thể màu vàng, có điểm nóng chảy 313-314 °C.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho thấy chất 2 gồm 5 nhóm CH đặc trưng cho các CH nhân thơm ở δ_C 94,4 (C-6), 99,3 (C-8), 116,0 (C-2'), 116,2 (C-5') và 121,7 (C-6') ppm, 10 cacbon bậc trong đó tín hiệu δ_C 177,336 ppm đặc trưng cho nhóm C=O liên kết với hai nối đôi, bốn cacbon bậc bốn có độ chuyển dịch δ_C 146,2, 148,0, 162,5, 165,6 ppm đặc trưng cho dạng liên kết của nhân thơm với nhóm OH của các cacbon C-3', C-2, C-5, C-7. Ngoài ra, tín hiệu của cacbon ở δ_C 137,2 đặc trưng cho cacbon nối đôi liên kết với một nhóm OH. Từ các phân tích trên cho thấy trong phân tử của 2 có chứa 5 nhóm OH, và do đó nó chứa 15C, 10H và 6O; những thành phần này ứng với số khối $(15 \times 12 + 10 + 6 \times 16) = 286$. Trong khi đó kết quả phổ khối cho thấy chất 2 có khối lượng phân tử $M = 302$, như vậy 2 còn phải chứa thêm một nguyên tử O nữa và công thức phân tử dự đoán của 2 là $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

Như đã phân tích ở trên, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất 2 có 5 CH thơm đồng thời có 4 nhóm OH thế vào vòng thơm và chỉ chứa tổng cộng 15 C, do đó có thể dự đoán rằng trong phân tử của 2 tồn tại hai nhân thơm, phần còn lại bao gồm một nhóm C=O, một oxi, hai cacbon, trong đó một cacbon chứa liên kết đôi và liên kết với một nhóm OH, một cacbon còn lại là cacbon bậc 4. Như vậy ngoài hai vòng thơm, trong công thức phân tử của chất 2 còn một mảnh cấu trúc có dạng:

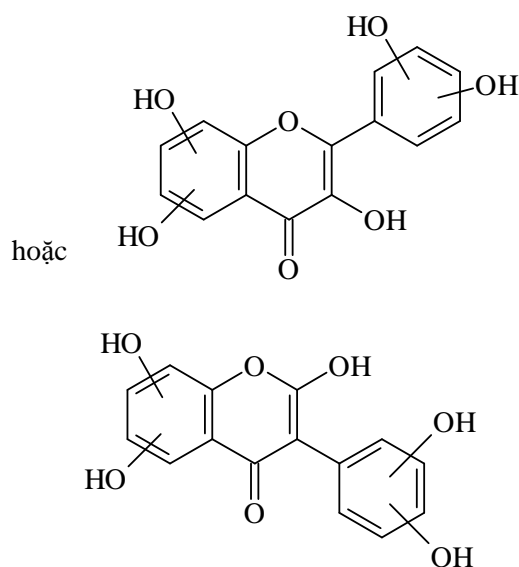


TCHH, T. 52(1), 2014

Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 2 cho tín hiệu của 5 proton vòng thơm trong đó 3 tín hiệu tương tác

ABX ở δ_H 7,75 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,65 (1H, dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6'), 6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5') thuộc về một vòng thơm, còn hai tín hiệu proton tương tác meta ở δ_H 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) và 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6) thuộc về vòng thơm còn lại.

Từ các kết quả phân tích trên đây có thể đưa ra giả thiết về công thức cấu tạo của chất **2** là một flavonoid có cấu trúc vòng B bị thế 1,3,4 như sau:



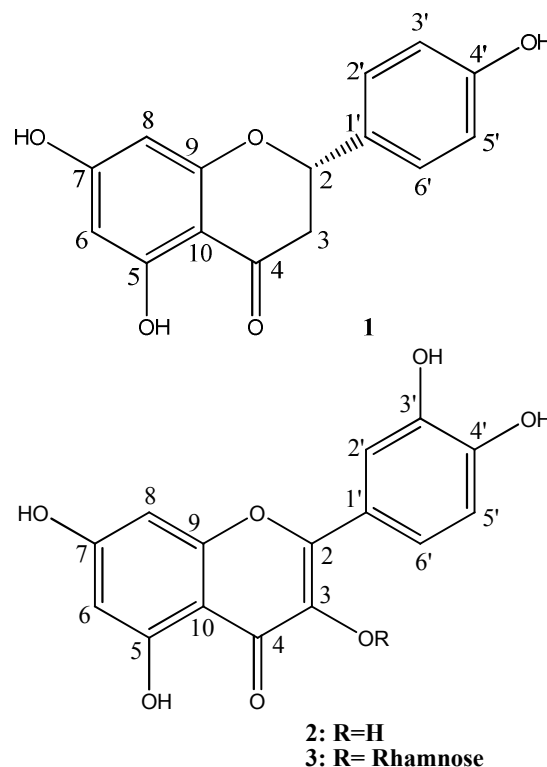
Đây là cấu trúc đồng phân của quercetin, để khẳng định công thức cấu tạo cho **2**, tiếp tục so sánh điểm chảy 313-314 °C và các dữ kiện phổ đã công bố [3] chúng tôi kết luận hợp chất **2** là **quercetin**.

Chất 3: Có dạng bột vô định hình màu vàng sẫm cho dự đoán về một hợp chất flavon, có điểm nóng chảy 177-179 °C.

Phổ ESI-MS của chất **3** cho pic ion phân tử $[M+H]^+$ ở m/z : 449 tương ứng với khối lượng phân tử $M = 448$. Phổ 1H -NMR cho các tín hiệu proton về cơ bản khá giống với hợp chất **2**. Tuy nhiên sự khác nhau rõ nét là sự xuất hiện thêm các tín hiệu proton vòng đường δ_H 0,94 đến 5,35 ppm. Trong đó tín hiệu doublet tại δ_H 0,94 (3H, d, $J = 6,0$ Hz) đặc trưng cho tín hiệu của nhóm methyl của đường rhamnose. Tín hiệu của proton anome tại δ_H 5,35 (1H, d) với hằng số tương tác khá thấp $J = 1,5$ Hz khẳng định về cấu hình α của đường.

Tiếp tục phân tích phổ ^{13}C -NMR cho thấy ngoài tín hiệu của 15 carbon trong khung flavon còn xuất hiện thêm 6 tín hiệu của hiệu carbon của phân tử đường rhamnose δ_C 103,5 (C-1''), 72,0 (C-2''), 72,1 (C-3''), 73,3 (C-4''), 71,9 (C-5'') và 17,6 (C-6''). Độ chuyển dịch hóa học của C-3 (δ_C 136,2) về phía trường cao hơn so với quercetin chứng tỏ gốc đường dính vào vị trí C-3.

Như vậy có thể dự đoán công thức cấu tạo của hợp chất **3** là quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid hay còn gọi là quercitrin. Các số liệu phổ của **3** được xác định dựa trên sự so sánh với các dữ kiện phổ của **2** và trực tiếp so sánh với các dữ kiện phổ đã công bố cho quercitrin [5]. Sự phù hợp về dữ kiện phổ NMR của chất **3** so với quercitrin cho phép khẳng định hợp chất **3** chính là **quercitrin**.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của chất **1**, **2** và **3**

4. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phổ, đã phân lập và nhận dạng cấu trúc 3 flavonoid là quercetin, quercitrin và naringenin từ phân đoạn chiết etyl axetat của cây mua bà (*Melastoma candidum* D. Don). Đây là những nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học của cây mua bà ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích (chủ biên). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2002. TCHH, T. 52(1), 2014
2. Mei-Hsien Lee, Rong-Dil Lin, Lee-Yen Shen, Ling-Ling Yang, Kun-Ying Yen, Wen-Chi Hou. *Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in Melastoma candidum D. Don*, J. Agric. Food Chem., **49(11)**, 5551-5555 (2001).

3. P. K. Agrawal. *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier Science Publishers B. V., 152-153 (1989).
4. Q. Du, G. Jerz, P. Winterhalter. *Preparation of three flavonoids from the bark of Salix alba by high-speed countercurrent chromatographic separation*, Journal of liquid chromatography & related technologies, **27**, 3257-3264 (2004).
5. C. C. Shen, Y. S. Chang, and L. K. Ho. *Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxy-flavonoids*, Phytochemistry, **34(3)**, 843-845 (1993).
6. Z. A. Zakaria, M. S. Rofiee, A. M. Mohamed, L. K. Teh, M. Z. Salleh. *In vitro antiproliferative and antioxidant activities and total phenolic contents of the extracts of Melastoma malabathricum leaves*, Journal of Acupuncture and Meridian Studies, **4(4)**, 248-256 (2011).

Liên hệ: Trần Thanh Hà

Khoa Hoá Thực vật, Viện Dược liệu,
3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội
Email: thanhha.tran889@gmail.com.