

Phân lập thành phần hóa học hướng tác dụng chống oxi hóa trong lá cây Lá đắng (*Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae)

Bùi Hoàng Minh*, Dương Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Thị Mơ, Trịnh Công Thái

Khoa Dược, Đại Học Nguyễn Tất Thành

*bhminh@ntt.edu.vn

Tóm tắt

3kg Lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) được chiết xuất với cồn 96% sau đó lắ phân bố thu được 3 phân đoạn: PE, CHCl₃ và EtOAc; trong đó thông qua sàng lọc khả năng chống oxi hóa (Folin-Ciocalteu và thử nghiệm DPPH), phân đoạn EtOAc được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu tiếp theo. 20g phân đoạn EtOAc thông qua các kĩ thuật sắc kí, tinh chế đã phân lập và xác định cấu trúc 3 chất lần lượt là V₁ (300mg – Cynarosid), V₂ (30mg – Luteolin) và V₃ (41,3mg – Cosmosiin). Cả 3 chất phân lập được đều có khả năng chống oxi hóa tốt trên mô hình DPPH. Trong đó V₁ và V₂ có tác dụng dọn gốc tự do DPPH mạnh hơn cả chứng dương Rutin (IC₅₀ = 9,47μM) với IC₅₀ lần lượt là 5,8μM và 4,8μM

Nhận 05.01.2020

Được duyệt 04.03.2020

Công bố 30.03.2020

Từ khóa

Vernonia amygdalina, Folin-Ciocalteu, DPPH, Cynarosid, Luteolin, Cosmosiin

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Chi *Vernonia*, có khoảng 1.000 loài, được tìm thấy chủ yếu ở vùng nhiệt đới, trong đó *Vernonia amygdalina* Delile là loài được sử dụng nhiều nhất, với đặc tính dễ thích nghi và phát triển nhanh. Có rất nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh được các tác dụng dược lí có giá trị của *V. amygdalina* như trị sốt rét, giúp hạ đường huyết đặc biệt là chống oxi hóa, bảo vệ gan và giải độc tế bào[1,4]. Điều đáng mừng là trong thời gian gần đây, *V. amygdalina* được trồng và thích ứng rất tốt với điều kiện thổ nhưỡng của nước ta và được biết đến với tên gọi là cây Lá đắng - với nhiều tác dụng chữa bệnh và dễ dàng sử dụng bằng cách uống như trà. Mặc dù đã có rất nhiều bài nghiên cứu về *V. amygdalina* trên thế giới nhưng ở Việt Nam hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu định hướng phân lập thành phần hóa học có khả năng chống oxi hóa của loài cây này.

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Lá cây Lá đắng được thu hái tại thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 01/2019. Mẫu dược liệu được định danh thông qua khảo sát thực vật học và so sánh với các tài liệu chuyên ngành tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, ĐH Nguyễn Tất Thành.

Mẫu được sấy khô sau đó xay nhỏ thành bột có kích cỡ phù hợp với từng thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất và phân lập

- Chiết xuất

Dược liệu được ngâm kiệt với cồn 96% sau đó cô thu hồi được cao cồn. Sau đó, cao cồn được phân tán trong MeOH 20% và lần lượt lắ phân bố với ether dầu hỏa (PE), chloroform (CHCl₃), ethyl acetat (EtOAc) rồi cô dưới áp suất giảm, thu được các cao phân đoạn tương ứng. Các phân đoạn này sẽ được đánh giá tác dụng chống oxi hóa thông qua thử nghiệm Folin-Ciocalteu và quét gốc tự do DPPH.

- Đánh giá tác dụng sinh học

+ Thử nghiệm Folin Ciocalteu

Nguyên tắc chung là dựa trên sự khử của tungstate/molybdate trong thuốc thử Folin - Ciocalteu bởi hợp chất phenol trong môi trường kiềm tạo ra sản phẩm có màu xanh dương. Độ hấp thụ ở bước sóng cực đại của sản phẩm thu được. Cường độ của màu tỉ lệ với nồng độ polyphenol bị oxi hóa, từ đó xác định được hàm lượng polyphenol có trong mẫu. Hàm lượng polyphenol trong mẫu được qui về mg acid gallic/g[6].

+ Mô hình quét gốc tự do DPPH

DPPH là gốc tự do có màu tím cho hấp thụ cực đại tại bước sóng 517nm. Dưới tác động của chất chống oxi hóa, DPPH chuyển sang màu vàng. Việc xác định các vết vàng trên bản mỏng khi nhúng với thuốc thử DPPH hoặc đo độ hấp thụ tại bước sóng 517nm giúp xác định được hoạt tính chống oxi hóa của mẫu thử.



Đồng thời, mẫu thử cũng được pha thành giai mẫu với các nồng độ khác nhau, từ đó xây dựng đường tuyến tính $y = ax + b$ để xác định giá trị IC_{50} [3].

- Phân lập

Sử dụng các kỹ thuật sắc ký cột (quá tải, cỡ điện,...) và kết tinh phân đoạn bằng dung môi thích hợp để thu được chất tinh khiết.

Xác định cấu trúc

Dựa vào dữ liệu phổ NMR được đo với các kỹ thuật 1-D, 2-D (1H-, 13C-, DEPT, HSQC, HMBC, COSY). Mẫu được hòa tan trong dung môi thích hợp như MeOD, DMSO với chất chuẩn nội là TMS; thực hiện trên máy ADVANCE 500 (Bruker) tại phòng cấu trúc, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội. Độ dời hóa học tính theo thang δ (ppm) với $\delta TMS = 0,00$.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật

Kết quả khảo sát sơ bộ hóa thực vật (Bảng 1) cho thấy, lá cây Lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) có nhiều alkaloid, caroten, saponin; ngoài ra còn có các polyphenol, triterpen và có thể có flavonoid.

Bảng 1 Kết quả khảo sát hóa thực vật lá cây Lá đắng

| Nhóm hợp chất | Dịch chiết ether | Dịch chiết cồn 96% | Dịch chiết nước |
|---------------|------------------|--------------------|-----------------|
| Caroteen | ++ | - | - |
| Alkaloid | - | ++ | ++ |
| Triterpen | +/- | ++ | - |
| Polyphenol | - | + | - |
| Flavonoid | - | +/- | - |
| Saponin | - | ++ | ++ |

Ghi chú: (-) Âm tính, (+/-) Nghi ngờ, (+) Có ít, (++) Có nhiều, (+++) Có rất nhiều

3.2 Nghiên cứu hóa học hướng tác dụng chống oxi hóa

Chiết xuất

Từ 3kg lá khô, thông qua kỹ thuật ngâm kiệt và lắc phân bố với các dung môi có độ phân cực tăng dần, thu được các phân đoạn có độ phân cực khác nhau. Kết quả thu được 30g phân đoạn PE, 15g phân đoạn $CHCl_3$ và 20g phân đoạn EtOAc.

Từ các phân đoạn thu được, tiến hành đánh giá hàm lượng polyphenol toàn phần và hoạt tính chống oxi hóa trên mô hình DPPH để lựa chọn đối tượng nghiên cứu tiếp theo.

Đánh giá các phân đoạn hướng chống oxi hóa

- Định lượng polyphenol toàn phần

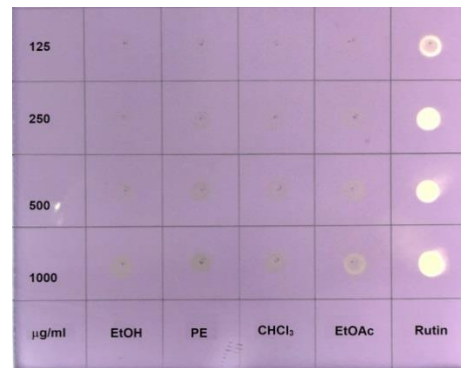
Dựa vào đường chuẩn được thiết lập với chứng dương là acid gallic, kết quả đương lượng acid gallic tương ứng với các mẫu cao được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 1 Kết quả đương lượng acid gallic của các phân đoạn

| STT | Mẫu cao | Đương lượng acid gallic mg/g |
|-----|----------|------------------------------|
| 1 | Cồn | 231,25 |
| 2 | PE | 181,25 |
| 3 | $CHCl_3$ | 259,375 |
| 4 | EtOAc | 314,065 |

Nhận xét: qua thử nghiệm, phân đoạn EtOAc cho hàm lượng polyphenol cao nhất

-Mô hình DPPH



Hình 1 Kết quả hoạt tính chống oxi hóa trên mô hình DPPH trên các phân đoạn

Nhận xét: chỉ có phân đoạn EtOAc có hoạt tính chống oxi hóa trên bảng mỏng ở nồng độ thử nghiệm 1000µg/ml và 500µg/ml.

Kết luận: qua 2 thử nghiệm trên, phân đoạn EtOAc (20g) được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu tiếp theo của đề tài hướng phân lập các hoạt chất có hoạt tính chống oxi hóa.

3.3 Phân lập

3.3.1 Phân đoạn EtOAc

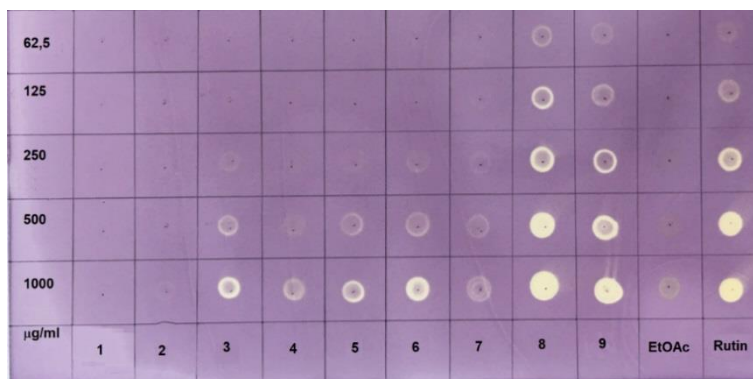
Phân đoạn EtOAc (20g) được phân tách thành những phân đoạn đơn giản hơn bằng kỹ thuật sắc ký cột quá tải với các thông số cơ bản sau:

- Cột thủy tinh trung tính, thành dày, kích thước cột 8cm x 50cm, rửa sạch, sấy khô.
- Pha tĩnh: 200g Silica gel, cỡ hạt trung bình (40 - 63µm).
- Nhồi cột khô, có bơm hút chân không cho ổn định,
- Mẫu: 20g phân đoạn EtOAc, nạp mẫu khô.
- Pha động: Chạy gradient với dung môi nền là n-Hex, tăng dần tỉ lệ n-Hex- $CHCl_3$ đến 1:9 rồi tăng đến 100% $CHCl_3$; sau đó dùng hệ $CHCl_3$ -MeOH, tăng dần tỉ lệ MeOH, cuối cùng là 100% MeOH.

Kết quả:

Từ 20g cao phân đoạn EtOAc, sắc ký cột quá tải thu được 9 phân đoạn khác nhau. Tiếp tục để bay hơi tự nhiên có 2 phân đoạn có tủa kết tinh màu vàng nâu, 7 phân đoạn khác ở dạng dầu hoặc dạng rắn. Các phân đoạn được đánh giá hoạt tính chống oxi hóa trên bản mỏng với DPPH để định hướng phân đoạn sẽ phân tách tiếp theo.

Đánh giá hoạt tính chống oxi hóa của các phân đoạn từ phân đoạn EtOAc:



Hình 2 Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các phân đoạn từ cột sắc kí phân đoạn EtOAc

Nhận xét: Phần lớn các phân đoạn con đều có hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn so với phân đoạn EtOAc. Trong đó, phân đoạn 8 và 9 có hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất, khi cho khả năng dọn gốc tự do trên bản mỏng ở nồng độ thấp nhất của thử nghiệm là 62,5µg/ml. Ngoài ra, phân đoạn 3, 5, 6 cũng có khả năng chống oxy hóa khá tốt.

3.3.2 Phân đoạn 5

Từ 256,8mg kết tủa màu vàng nâu của phân đoạn 5, sau khi tinh chế qua cột Sephadex LH-20 kết hợp với kết tinh phân đoạn với MeOH, thu được 30mg bột vi tinh thể V_2 màu vàng tươi

3.3.3 Phân đoạn 8

Phân đoạn 8 (2,2g) được phân tách thành những phân đoạn đơn giản hơn bằng kỹ thuật sắc kí cột cổ điển với các thông số cơ bản sau:

- Cột thủy tinh trung tính, thành dày, kích thước cột 3cm x 60cm, rửa sạch, sấy khô;
- Pha tĩnh: 120g Silica gel, cỡ hạt mịn (15-40µm);
- Nhồi cột hỗn dịch;
- Mẫu: 2,2g phân đoạn 8, nạp mẫu khô;
- Pha động: Chạy isocratic với dung môi là EtOAc bão hòa nước.

Kết quả:

Từ 2,2g phân đoạn 8, sắc kí cột cổ điển thu được 9 phân đoạn khác nhau (8.1→8.9). Từ phân đoạn 8.2, sau khi tinh chế qua cột Sephadex LH-20 kết hợp với kết tinh phân đoạn với MeOH, thu được 41,3mg bột vi tinh thể V_3 màu vàng tươi.

3.3.4 Phân đoạn 9

Từ 510,5mg kết tủa màu vàng thu được từ phân đoạn 9, sau khi được rửa nhiều lần với n-hexan, EtOAc, MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xộp và được tái kết tinh trong MeOH thu được 300mg bột vi tinh thể V_1 màu vàng xanh.

3.4 Xác định cấu trúc các chất phân lập được

3.4.1 Chất V_1

V_1 (300mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu vàng xanh, ít tan trong MeOH, khó tan trong EtOAc, không tan trong n-Hexan, $CHCl_3$. V_1 tắt quang ở UV 254nm, 365nm, phản ứng với thuốc thử $FeCl_3$, vết cho màu vàng khi phun thuốc thử Vanilin – sulfuric.

Bảng 1 Bảng dữ liệu phổ NMR của V_1

| C | DEPT | ^{13}C (δ_{ppm}) | 1H + HSQC (nH, δ_{ppm} , J) | HMBC (H → C_n) |
|-----|---------------------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 4 | C_{IV} | 181,9 | - | - |
| 2 | C_{IV} | 164,5 | - | - |
| 7 | C_{IV} | 162,9 | - | - |
| 5 | C_{IV} | 161,1 | - | - |
| 9 | C_{IV} | 156,9 | - | - |
| 4' | C_{IV} | 149,9 | - | - |
| 3' | C_{IV} | 145,8 | - | - |
| 1' | C_{IV} | 121,4 | - | - |
| 6' | =CH- | 119,1 | 7,44 <i>dd</i> (1H; 7,5Hz, 2,0Hz) | 113,5; 149,9 |
| 5' | =CH- | 115,9 | 6,91 <i>d</i> (1H; 8,5Hz) | 121,4; 145,8; 149,9 |
| 2' | =CH- | 113,5 | 7,41 <i>s</i> (1H) | 119,1; 145,8; 164,5 |
| 10 | C_{IV} | 105,3 | - | - |
| 3 | =CH- | 103,2 | 6,73 <i>s</i> (1H) | 105,3; 121,4; 164,5; 181,9 |
| 1'' | O-CH-O | 99,9 | 5,07 <i>d</i> (1H; 7,5Hz) | 162,9 |
| 6 | =CH- | 99,5 | 6,44 <i>d</i> (1H; 2,0Hz) | 94,7; 105,3; 161,1; 162,9 |
| 8 | =CH- | 94,7 | 6,78 <i>d</i> (1H; 2,0Hz) | 99,5; 105,3; 156,9; 162,9; 181,9 |
| 5'' | =CH- | 77,2 | - | - |
| 3'' | =CH- | 76,4 | - | - |
| 2'' | =CH- | 73,1 | - | - |
| 4'' | =CH- | 69,6 | - | - |
| 6'' | -CH ₂ -O | 60,6 | - | - |
| | - OH | | 12,97 <i>s</i> (1H) | - |

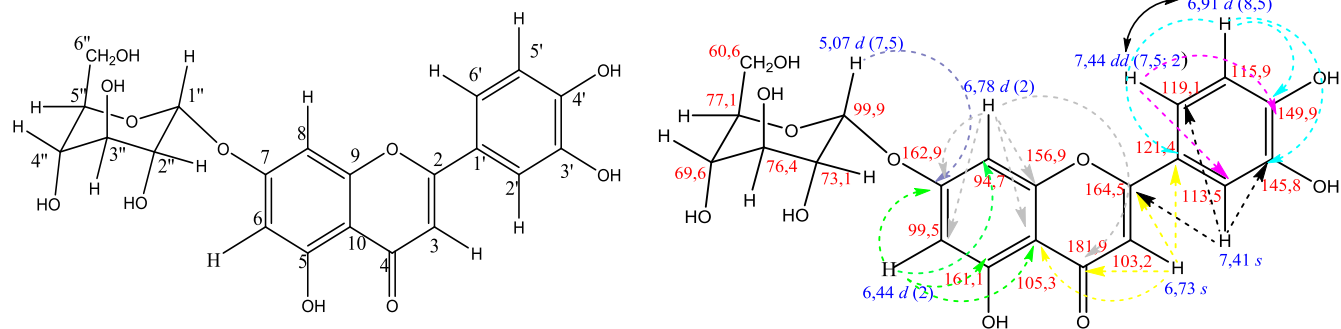
Trên phổ ^{13}C NMR xuất hiện 21 tín hiệu Carbon, trong đó có 15 tín hiệu Carbon cộng hưởng ở vùng từ trường thấp (δ_C 99,5-181,9) đặc trưng cho 1 flavon với 4 nhóm thế -OR và 6 tín hiệu Carbon còn lại cộng hưởng trong vùng δ_C 60,6 – 94,7 đặc trưng của 1 đường hexose. Trong vùng 60

- 80ppm có sự cộng hưởng của 5 carbon (77,2ppm; 76,4ppm; 73,1ppm; 69,6ppm; 60,6ppm), đồng thời có 1 tín hiệu carbon ở δ_C 99,9 của carbon anomer nên đây có thể là *O*-glycosid.

Cấu trúc flavon của V_1 được xác nhận bởi chuyển dịch hóa học của carbon carbonyl với δ_C 181,9 và sự hiện diện của carbon =CH- được gán cho C3 với δ_C 103,2 và δ_H 6,73 (1H, s). Trong 4 nhóm thế oxy của V_1 , 2 nhóm được dành cho C5 và C7 - 2 vị trí thường gặp trong flavonoid; 2 nhóm còn lại là của vòng B và được cho là ở vị trí C3' và C4'. Sự hiện diện của nhóm thế oxy ở C3' và C4' còn được chứng minh bởi không có các tín hiệu của carbon đối xứng trong phổ ^{13}C NMR của V_1 , trong khi đó lại có 2 proton của 2 carbon thơm =CH- [δ_C 115,9, δ_H 6,91 (1H, *d*); δ_C 119,1, δ_H 7,44 (1H, *dd*)] có $J=7,5$ Hz của ghép ortho và 2 proton

thơm =CH- [δ_C 119,1, δ_H 7,44 (1H, *dd*); δ_C 113,5, δ_H 7,41 (1H, *s*)] có $J=2$ Hz đặc trưng cho ghép meta của các proton thơm. Hằng số ghép còn lại khoảng 2Hz đặc trưng cho ghép meta thuộc về 2 proton của C6 [δ_C 99,5, δ_H 6,44 (1H, *d*)] và C8 [δ_C 94,7, δ_H 6,78 (1H, *d*)]. Như vậy phần aglycon của V_1 được xác định là luteolin.

Vị trí gắn của phần đường vào aglycon được xác định ở C7 dựa vào tương tác quan sát được trong phổ HMBC giữa proton anomer [δ_C 5,07 (1H; 7,5 Hz)] và carbon của aglycon (δ_C 162,9) cũng như thông qua so sánh với các giá trị tương ứng của các chất được đã công bố, phần đường của V_1 được xác định là glucose (Bảng 4). Như vậy, cấu trúc của V_1 được xác định là luteolin-7-*O*- β -glucopyranosid (cynarosid).



CTPT: $C_{21}H_{20}O_{11}$ (PTK: 448 đvC)

Hình 1 Cấu trúc hóa học và những tương tác hóa học trong V_1

Cấu trúc này được khẳng định khi so sánh với phổ ^{13}C NMR và 1H NMR với Cynarosid được công bố trước đây[7], kết quả so sánh được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 2 Bảng so sánh dữ liệu phổ NMR của V_1 và Cynarosid

| STT | V_1 (500 MHz, DMSO- d_6) | | Cynarosid (300 MHz, DMSO- d_6) | |
|-----|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | ^{13}C (δ_{ppm}) | 1H (δ_{ppm}) | ^{13}C (δ_{ppm}) | 1H (δ_{ppm}) |
| 2 | 164,5 | - | 164,4 | - |
| 3 | 103,2 | 6,73 s (1H) | 103,1 | 6,74 s (1H) |
| 4 | 181,9 | - | 181,8 | - |
| 5 | 161,1 | - | 161,1 | - |
| 6 | 99,5 | 6,44 d (1H; 2 Hz) | 99,5 | 6,44 d (1H; 2,1 Hz) |
| 7 | 162,9 | - | 162,9 | - |
| 8 | 94,7 | 6,78 d (1H; 2Hz) | 94,7 | 6,78 d (1H; 2,1 Hz) |
| 9 | 156,9 | - | 156,9 | - |
| 10 | 105,3 | - | 105,3 | - |
| 1' | 121,4 | - | 121,3 | - |
| 2' | 113,5 | 7,41 s (1H) | 113,5 | 7,42 d (1H; 1,8 Hz) |
| 3' | 145,8 | - | 145,7 | - |
| 4' | 149,9 | - | 149,9 | - |
| 5' | 115,9 | 6,91 d (1H; 8,5 Hz) | 115,9 | 6,90 d (1H; 8,1 Hz) |
| 6' | 119,1 | 7,44 dd (1H; 7,5 Hz; 2 Hz) | 119,1 | 7,44 dd (2H; 8,1Hz; 1,8 Hz) |
| 1'' | 99,9 | 5,07 d (1H, 2Hz) | 99,9 | 5,08 d (1H; 7,2 Hz) |
| 2'' | 73,1 | - | 73,1 | - |

| | | | | |
|-----|------|---|------|---|
| 3'' | 76,4 | - | 76,3 | - |
| 4'' | 69,6 | - | 69,5 | - |
| 5'' | 77,1 | - | 77,1 | - |
| 6'' | 60,9 | - | 60,6 | - |

3.4.2 Chất V₂

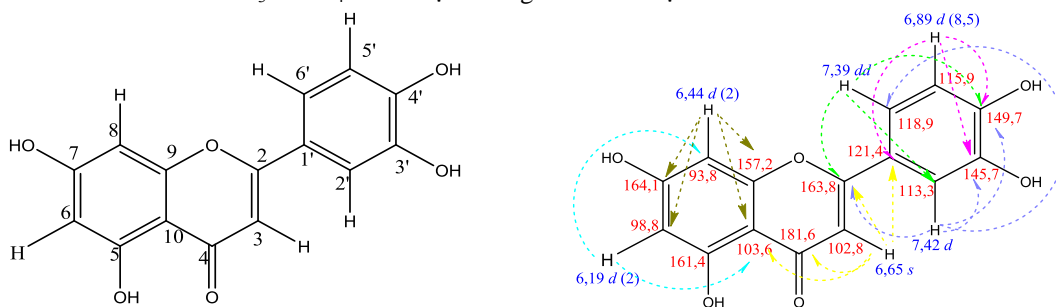
V₂ (30mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu vàng tươi, tan tốt trong MeOH, hơi tan trong EtOAc, không tan trong n-Hexan. V₂ tắt quang ở UV 254nm, 365nm, cho màu xanh đen với thuốc thử FeCl₃, vết cho màu vàng khi nhúng thuốc thử VS.

Bảng 3 Bảng số liệu phổ NMR của V₂

| C | DEPT | ¹³ C (δ_{ppm}) | ¹ H + HSQC (nH, δ_{ppm} , J) | HMBC (H \rightarrow C _n) |
|----|-----------------|---------------------------------------|---|---|
| 4 | C _{IV} | 181,6 | - | - |
| 2 | C _{IV} | 164,1 | - | - |
| 7 | C _{IV} | 163,8 | - | - |
| 5 | C _{IV} | 161,4 | - | - |
| 9 | C _{IV} | 157,2 | - | - |
| 4' | C _{IV} | 149,7 | - | - |
| 3' | C _{IV} | 145,7 | - | - |
| 1' | C _{IV} | 121,4 | - | - |
| 6' | =CH- | 118,9 | 7,39 dd (1H; 7,5 Hz) | 113,3; 149,7; 163,8 |
| 5' | =CH- | 115,9 | 6,89 d (1H; 8,5 Hz) | 121,4; 145,7; 149,7 |
| 2' | =CH- | 113,3 | 7,42 d (1H; 2 Hz) | 118,9; 145,7; 149,7; 163,8 |
| 10 | C _{IV} | 103,6 | - | - |
| 3 | =CH- | 102,8 | 6,65 s (1H) | 103,6; 121,4; 163,8; 181,6 |
| 6 | =CH- | 98,8 | 6,19 d (1H; 2 Hz) | 93,8; 103,6 |
| 8 | =CH- | 93,8 | 6,44 d (1H; 2 Hz) | 98,8; 103,6; 157,2; 164,1 |
| | - OH | | 12,96 s (1H) | - |

Trên phổ ¹³C NMR xuất hiện 15 tín hiệu carbon đặc trưng cho 1 flavonoid với 4 nhóm thế -OR. Cấu trúc flavon của V₂ được xác nhận bởi chuyển dịch hóa học của carbon carbonyl với δ_C 181,6 và sự hiện diện của carbon =CH- được gán cho C₃ với δ_C 102,8 và δ_H 6,65 (1H, s) thông qua tương tác quan sát thấy trên phổ HMBC của H₃ nhìn thấy C₄. Trong 4 nhóm thế oxo của V₂, 2 nhóm được dành cho C₅ và C₇ - 2 vị trí thường gặp trong flavonoid; 2 nhóm còn lại là của vòng B và được cho là ở vị trí C_{3'} và C_{4'}. Sự hiện diện của nhóm thế oxo ở C_{3'} và C_{4'} còn được chứng minh

bởi không có các tín hiệu của carbon đối xứng trong phổ ¹³C NMR của V₂, trong khi đó lại có 2 proton của 2 carbon thơm =CH- [δ_C 115,9, δ_H 6,89 (1H, d)]; δ_C 118,9, δ_H 7,39 (1H, dd) có J = 7,5Hz của ghép ortho và 2 proton thơm =CH- [δ_C 118,9, δ_H 7,39 (1H, dd); δ_C 113,3, δ_H 7,42 (1H, d) có J = 2,0Hz đặc trưng cho ghép meta của các proton thơm. Hằng số ghép còn lại khoảng 2,0Hz đặc trưng cho ghép meta thuộc về 2 proton của C₆ [δ_C 98,8, δ_H 6,19 (1H, d)] và C₈ [δ_C 93,8, δ_H 6,44 (1H, d)]. Như vậy V₂ được xác định là luteolin.



CTPT: C₁₅H₁₀O₆ (PTK: 286,32 đvC)

Hình 4 Cấu trúc hóa học và những tương tác chính trong phổ HMBC của V₂

Cấu trúc này được khẳng định khi so sánh với phổ ¹³C NMR và ¹H NMR của Luteolin được công bố trước đây[2], kết quả so sánh được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 4 Bảng so sánh dữ liệu NMR của V₂ và Luteolin

| STT | V ₂ (500 MHz, DMSO-d ₆) | | Luteolin (500 MHz, DMSO-d ₆) | |
|------|--|-----------------------|--|-----------------------|
| | ¹³ C (δppm) | ¹ H (δppm) | ¹³ C (δppm) | ¹ H (δppm) |
| 2 | 163,3 | - | 163,6 | - |
| 3 | 102,8 | 6,65 s (1H) | 102,7 | 6,68 s (1H) |
| 4 | 181,6 | - | 181,2 | - |
| 5 | 161,4 | - | 160,7 | - |
| 6 | 98,8 | 6,19 d (1H; 2Hz) | 98,6 | 6,21 d (1H; 2Hz) |
| 7 | 164,1 | - | 163,6 | - |
| 8 | 93,8 | 6,44 d (1H; 2Hz) | 93,8 | 6,47 d (1H; 2Hz) |
| 9 | 157,2 | - | 157,0 | - |
| 10 | 103,6 | - | 103,4 | - |
| 1' | 121,4 | - | 121,3 | - |
| 2' | 113,3 | 7,42 d (1H; 2Hz) | 112,9 | 7,40 d (1H; 2Hz) |
| 3' | 145,7 | - | 145,2 | - |
| 4' | 149,7 | - | 149,1 | - |
| 5' | 115,9 | 6,89 d (1H; 8,5Hz) | 115,7 | 6,90 d (1H; 9,0Hz) |
| 6' | 118,9 | 7,39 dd (1H; 7,5Hz) | 118,8 | 7,41 dd (1H; 9,2Hz) |
| 5-OH | | 12,96 s (1H) | | 12,93 s (1H) |

Kết quả so sánh phổ đồ của V₂ và Luteolin gần như trùng khớp nên có thể khẳng định rằng biện giải cấu trúc V₂ là đúng.

3.4.3 Chất V₃

V₃ (41,3mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu vàng tươi, tan tốt trong MeOH, hơi tan trong EtOAc, không tan trong n-Hexan. V₃ tắt quang ở UV 254nm, 365nm, cho màu xanh đen với thuốc thử FeCl₃, vết cho màu vàng khi nhúng thuốc thử VS.

Bảng 5 Bảng số liệu phổ NMR của V₃

| C | DEPT | ¹³ C (δppm) | ¹ H + HSQC (nH, δppm, J) | HMBC (H → C _n) |
|--------|-----------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 4 | C _{IV} | 182,0 | - | - |
| 2 | C _{IV} | 164,2 | - | - |
| 7 | C _{IV} | 162,9 | - | - |
| 5 | C _{IV} | 161,1 | - | - |
| 9 | C _{IV} | 156,9 | - | - |
| 4' | C _{IV} | 161,3 | - | - |
| 3', 5' | =CH- | 116,0 | 6,94 d (2H, 9,0Hz) | 161,3; 128,6; 121,0; 116,0 |
| 2', 6' | =CH- | 128,6 | 7,95 d (2H, 9,0Hz) | 164,2; 161,3; 128,6; 116,0 |
| 1' | C _{IV} | 121,0 | - | - |
| 10 | C _{IV} | 105,3 | - | - |
| 3 | =CH- | 103,1 | 6,86 s (1H) | 182,0; 164,2; 121,0; 105,3 |
| 1'' | O-CH-O | 99,9 | 5,07 s (1H; 7,5Hz) | 162,9 |
| 6 | =CH- | 99,5 | 6,44 d (1H; 2,0 Hz) | 162,9; 161,1; 121,0; 105,3 |

| | | | | |
|-----|---------------------|------|--------------------|---------------------------|
| 8 | =CH- | 94,8 | 6,83 d (1H; 2,5Hz) | 162,9; 156,9; 105,3; 99,5 |
| 5'' | =CH- | 77,1 | - | - |
| 3'' | =CH- | 76,4 | - | - |
| 2'' | =CH- | 73,1 | - | - |
| 4'' | =CH- | 69,6 | - | - |
| 6'' | -CH ₂ -O | 60,6 | - | - |
| | - OH | | 12,97 s (1H) | 161,3; 105,3; 99,5 |
| | -OH | | 10,37 s (1H) | - |

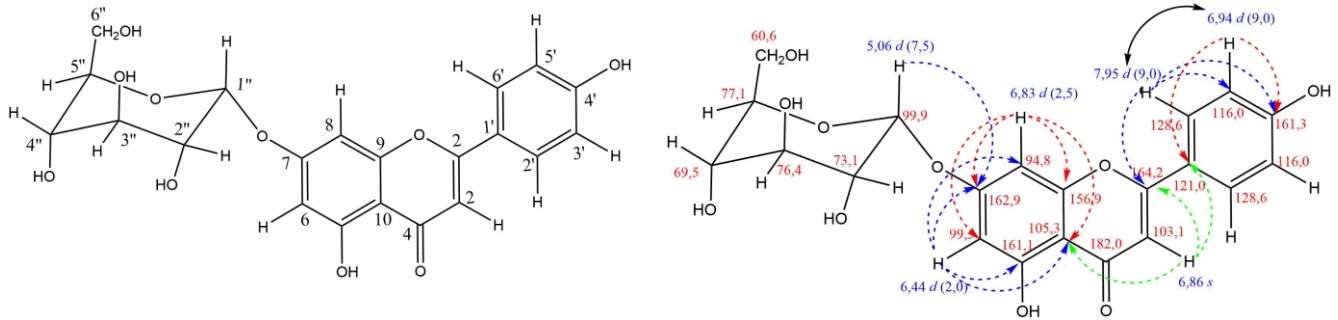
Trên phổ Carbon ¹³C-NMR xuất hiện 21 tín hiệu carbon (2 tín hiệu đối xứng), trong đó có 15 tín hiệu carbon đặc trưng cho cấu trúc flavonoid với 3 nhóm thế -OR, 6 tín hiệu carbon còn lại đặc trưng cho một đường hexose. Trong vùng 60-80ppm xuất hiện 5 tín hiệu carbon δ_C 77,1; 76,4; 73,1; 69,5; 60,6 và tín hiệu carbon anome δ_C 99,9 nên đây có thể là 1 O-glycosid.

Cấu trúc flavon của V₃ được xác định dựa vào tín hiệu carbon carbonyl δ_C 182,0 cùng với sự hiện diện của carbon =CH- được gán cho C₃ δ_C 103,1 và δ_H 6,86 (1H, s). Ngoài ra, trên phổ ¹³C-NMR còn cho 2 tín hiệu cao bất thường δ_C 116,0 và δ_C 128,6 đặc trưng cho cấu trúc vòng B đối xứng 1 nhóm thế ở vị trí C₄'. Trong 3 nhóm thế oxi, 2 nhóm được gán cho C₅ và C₇ - 2 vị trí thường gặp của flavonoid, nhóm thế còn lại được gán cho vòng B ở vị trí C₄'. Hằng số ghép còn lại với J = 2 đặc trưng cho ghép meta thuộc về 2 proton của C₆ [δ_C 99,5, δ_H 6,44 (1H, d, 2,0Hz)] và C₈ [δ_C 94,8, δ_H 6,83 (1H, d, 2,5Hz)]. Vị trí gắn của phần đường vào aglycon được xác định ở C₇ dựa vào tương tác quan sát



được trong phổ HMBC giữa proton anomer [δ_C 5,06 (1H; *d*; 7,5Hz)] và carbon của aglycon δ_C 162,9 cũng như thông qua so sánh với các giá trị tương ứng của các chất được đã

công bố, phần đường của V_1 được xác định là glucose. Như vậy, cấu trúc V_3 được xác định là Apigenin-7-*O*- β -D-glucose (Cosmosiin).



CTPT: $C_{21}H_{20}O_{10}$ (PTK: 432,38)

Hình 5 Cấu trúc và một số tương tác trên phổ của V_3

Cấu trúc này được khẳng định khi so sánh với phổ ^{13}C NMR của Cosmosiin được công bố trước đây[5]. Kết quả được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 6 Kết quả so sánh dữ liệu phổ NMR của V_3 và Cosmosiin

| STT | V_3 (125 MHz, DMSO- d_6) | Cosmosiin (DMSO- d_6) | STT | V_3 (125 MHz, DMSO- d_6) | Cosmosiin (DMSO- d_6) |
|-----|----------------------------------|-----------------------------|--------|----------------------------------|-----------------------------|
| | $^{13}C(\delta ppm)$ | $^{13}C(\delta ppm)$ | | $^{13}C(\delta ppm)$ | $^{13}C(\delta ppm)$ |
| 2 | 164,2 | 164,2 | 1' | 121,0 | 120,9 |
| 3 | 103,1 | 103,0 | 2'; 6' | 128,6 | 128,3 |
| 4 | 182,0 | 181,7 | 3'; 5' | 116,0 | 115,9 |
| 5 | 161,1 | 161,5 | 4' | 161,3 | 161,0 |
| 6 | 99,5 | 99,4 | 1'' | 99,9 | 100,1 |
| 7 | 162,9 | 162,8 | 2'' | 73,1 | 73,1 |
| 8 | 94,8 | 94,9 | 3'' | 76,4 | 76,5 |
| 9 | 156,9 | 156,8 | 4'' | 69,5 | 69,9 |
| 10 | 105,3 | 105,4 | 5'' | 77,1 | 77,2 |
| | | | 6'' | 60,6 | 60,8 |

3.5 Xác định hoạt tính chống oxi hóa các chất phân lập được:

Thực nghiệm được tiến hành bằng phương pháp đo quang, với chứng dương là Rutin. Kết quả được thể hiện qua Bảng 10.

Bảng 10 Giá trị IC_{50} (mM) trên mô hình DPPH của các chất thử nghiệm

| Mẫu thử | IC_{50} ($\mu g/ml$) | IC_{50} (μM) |
|---------|--------------------------|-----------------------|
| V_1 | 2,6 | 5,8 |
| V_2 | 1,38 | 4,8 |
| V_3 | 17,8 | 41,2 |
| Rutin | 5,78 | 9,47 |

Nhận xét: V_2 cho khả năng dọn gốc tự do tốt nhất khi cho giá trị IC_{50} chỉ bằng $\frac{1}{2}$ so với Rutin, kể đến là V_1 . V_3 cho khả năng chống oxi hóa kém nhất so với 2 chất còn lại.

4 Kết luận và kiến nghị

4.1 Kết luận

Như vậy, đề tài “Phân lập thành phần hóa học hướng tác dụng chống oxi hóa trong lá cây Lá đắng (*Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae) đã thu được các kết quả sau:

+ Sơ bộ thành phần hóa học thực vật lá cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae) cho kết quả của sự hiện diện các nhóm hoạt chất: alkaloid, saponin, polyphenol, triterpen và flavonoid.

+ Sàng lọc hoạt tính chống oxi hóa các phân đoạn bằng phương pháp Folin-Ciocalteu và thử nghiệm DPPH. Kết quả cho thấy phân đoạn EtOAc là phân đoạn tiềm năng trong phân lập các chất có khả năng chống oxi hóa.

+ Từ phân đoạn EtOAc, thông qua kỹ thuật sắc ký cột, đã phân tách thành 9 phân đoạn đơn giản hơn. Trong đó có 7 phân đoạn 3 \rightarrow 9 đều có hoạt tính chống oxi hóa, đặc biệt là 8 và 9.

+ Thông qua kỹ thuật kết tinh phân đoạn kết hợp sắc ký cột Sephadex LH-20, đã phân lập và định danh được 300mg V₁ (Cynarosid) và 30 mg V₂ (Luteolin) lần lượt từ phân đoạn 9 và 5.

+ Bên cạnh đó, đề tài còn tiến hành phân tách phân đoạn 8 và phân lập được 41,3mg V₃, được xác định cấu trúc là Cosmoisin.

+ Các chất đã phân lập được đánh giá hoạt tính chống oxi hóa thông qua việc xác định giá trị IC₅₀. Kết quả cho thấy cả 3 chất đều có hoạt tính chống oxi hóa tốt, đặc biệt V₁ và V₂ có tác dụng dọn gốc tự do DPPH mạnh hơn

cả chứng dương Rutin (IC₅₀ = 9,47μM) với IC₅₀ lần lượt là 5,8μM và 4,8μM.

4.2 Kiến nghị

Đề tài sẽ tiếp tục tiến hành phân lập các chất chống oxi hóa từ các phân đoạn tiềm năng còn lại: 3, 4, 6 và khảo sát thêm trên các mô hình chống oxi hóa khác.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ NTTU, theo hợp đồng số 2019.01.58, thuộc đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ cấp cơ sở năm học 2018-2019.

Tài liệu tham khảo

1. Arhoghro E M, Ekpo K E, Anosike E O, Ibeh G O, (2009), "Effect of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) on Carbon Tetrachloride (CCl₄) induced liver damage in Albino Wistar rats", *European Journal of Scientific Research*, 26 (1), pp. 122-130.
2. E.O. Iwalewa, C.O. Adewunmi, N.O.A. Omisore, O.A. Adebajji, et al, (2005), "Pro- and Antioxidant Effects and Cytoprotective Potentials of Nine Edible Vegetables in Southwest Nigeria", *Journal of Medicinal Food*, 8 (4), pp. 539-544.
3. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M. (2004), "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil", *Food chemistry*, 85 (4), pp. 633-640
4. Mbang A. Owolabi, Smith I Jaja, Oyeniye O Oyekanmi, Opeyemi J. Olatunji, (2008), "Evaluation of the Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation of the Leaves of *Vernonia amygdalina*", *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 5 (1).
5. Nawwar M. A., El-Mousallamy A. M., Barakat H. H., Buddrus J. and Linscheid M. (1989), "Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*", *Phytochemistry*, 28 (11), pp. 3201-3206.
6. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", In *Methods in enzymology*, 299, pp. 152-178
7. Wang M., Simon J.E., Aviles I.F., He K., et al, (2003), "Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.)", *J Agric Food Chem*, 51(3), pp. 601-608.

Bioassay-guided isolation of antioxidants from the leaves of *Vernonia amygdalina* delile, asteraceae

Bui Hoang Minh*, Duong Thi Ngoc Huyen, Nguyen Thi Mo, Trinh Cong Thai
Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

*bhminh@ntt.edu.vn

Abstract 3kg air-dried leaves of *Vernonia amygdalina* was extracted with 96% ethanol to yield 517g extract, which successively portioned with solvents to obtain 30 g PE, 15g CHCl₃ and 20 g EtOAc. Through bioassay-guided of antioxidant activity, EtOAc fraction was chosen to the next steps. 20g EtOAc fraction was separated by column chromatography and was purified by crystallization to obtain 3 compounds: V₁ (300mg), V₂ (30 mg) and V₃ (41,3mg) which were characterized as Cynarosid, Luteolin and Cosmoisin respectively. All isolated compounds possessed antioxidant activity meanwhile V₁ and V₂ had the stronger antioxidant effect than standard (Rutin, IC₅₀ = 9,47μM) with the IC₅₀ = 5,8 μM and 4,8μM.

Keywords *Vernonia amygdalina*, Folin-Ciocalteu, DPPH, Cynarosid, Luteolin, Cosmoisin