

Thành phần hóa học phân đoạn ethylacetat từ lá Mạn kinh tử lá đơn (*Vitex rotundifolia* L.f., Verbenaceae)

Bùi Hoàng Minh^{1,*}, Trần Hùng², Nguyễn Thị Xuân Diệu²

¹Đại học Nguyễn Tất Thành

²Đại học Y Dược Tp. HCM

*buihoangminhgaga@gmail.com

Tóm tắt

35g phân đoạn EtOAc từ lá Mạn kinh tử lá đơn được phân tách thành 17 phân đoạn. Từ các phân đoạn này, bằng các kỹ thuật sắc ký, kết tinh phân đoạn đã phân lập được 5 chất: V₁ (830,56mg), V₂ (23mg), V₃ (30mg), V₄ (45,39mg), V₅ (17mg). Trong đó, đã xác định được cấu trúc các chất V₁ (casticin), V₃ (luteolin-7-O-β-glucopyranosid), V₄ (luteolin-6-C-β-glucopyranosid), V₅ (sitosterol-3-O-β-glucosid). Riêng V₂ đang được xác định cấu trúc. Đồng thời còn nhiều phân đoạn từ sắc ký cột quá tải phân đoạn EtOAc có thể phân lập thêm được những chất khác.

Nhận 13.09.2018
Được duyệt 29.10.2018
Công bố 25.12.2018

Từ khóa
Vitex rotundifolia,
chiết xuất, phân lập,
flavonoid

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Mạn kinh tử lá đơn từ lâu đã được sử dụng trong điều trị, đặc biệt là các bệnh liên quan đến rối loạn nội tiết tố nữ ở các nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Những nghiên cứu khoa học gần đây cho thấy Mạn kinh tử lá đơn không những cho tác động tương tự estrogen mà còn có khả năng chống oxy hoá, kháng viêm, chống lại tế bào ung thư rất hiệu quả, đặc biệt là các hợp chất flavonoid. Chính vì vậy, “Nghiên cứu thành phần hoá học phân đoạn EtOAc trong lá Mạn kinh tử lá đơn” được thực hiện với mục đích chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các chất phân lập được để làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về hóa học, kiểm nghiệm và dược lý của cây Mạn kinh tử lá đơn sau này.

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Lá Mạn kinh tử lá đơn được thu hái tại bờ biển thành phố Tuy Hòa, Phú Yên vào tháng 02/2017.

Dược liệu được xay nhỏ cho phù hợp với yêu cầu của từng thí nghiệm

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thử tinh khiết

- Độ ẩm

Theo qui định của ĐĐVN IV, phụ lục 9.6

- Định lượng

Theo phương pháp xác định hàm lượng chất chiết được theo qui định của ĐĐVN IV, phụ lục 10.12 với 3 độ cồn lần lượt là 96%, 70%, 50% để xác định độ cồn tối ưu cho quá trình ngâm kiệt tiếp theo

2.2.2 Chiết xuất và phân lập

- Chiết xuất

Dược liệu được ngâm kiệt với độ cồn đã khảo sát, cô thu được cao cồn. Cao cồn sau đó được phân tán trong nước và lần lượt lắc phân bố với CHCl₃, EtOAc sau đó cô dưới áp suất giảm, thu được các cao phân đoạn tương ứng. Chọn cao EtOAc tiếp tục là đối tượng nghiên cứu tiếp theo.

- Phân lập

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

- Kiểm tinh khiết

Chất phân lập được sắc ký trên 3 bản mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Chất cần xác định độ tinh khiết được phát hiện trên UV 254nm, UV 365nm và hiện màu với thuốc thử vanillin-sulfuric. Chất được xem là tinh khiết khi chỉ cho 1 vết gọn với R_f trong khoảng từ 0,25- 0,75.

2.2.3 Xác định cấu trúc

Phối hợp song song dữ liệu phổ MS và NMR để xác định cấu trúc chất phân lập được. Trong đó:

+ Phổ MS được đo ở chế độ ion âm (ESI⁻)

+ 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 Thử tinh khiết

3.1.1 Độ ẩm

Bảng 1 Kết quả độ ẩm của lá Mạn kinh từ lá đơn

| 1 | 2 | 3 | Trung bình |
|-------|-------|-------|--------------|
| 9,19% | 9,06% | 8,82% | 9.02% |

Độ ẩm của lá Mạn kinh từ lá đơn qua thực nghiệm là 9.02 (<13%) đạt tiêu chuẩn của ĐCVN IV nên được tiếp tục tiến hành làm các thực nghiệm kế tiếp.

3.1.2 Khảo sát hàm lượng chất chiết được

Bảng 2 Kết quả hàm lượng chất chiết được theo độ cồn

| Độ cồn (%) | 1 (%) | 2 (%) | 3 (%) | Trung bình |
|------------|-------|-------|-------|---------------|
| 96 | 19,07 | 19,23 | 18,97 | 19.09% |
| 70 | 25.56 | 24.15 | 24.67 | 24.79% |
| 50 | 21.57 | 21.02 | 22.58 | 21.72% |

Kết quả hàm lượng chất chiết được cho thấy cồn 70% cho hiệu suất chiết cao nhất, nên cồn 70% được lựa chọn là dung môi cho quá trình ngâm kiệt tiếp theo.

3.2 Chiết xuất và phân lập

3.2.1 Chiết xuất

5kg bột lá Mạn kinh từ lá đơn sau khi ngâm kiệt với cồn 70% được cô cạn, phân tán và lắc phân bố với dung môi có

độ phân cực tăng dần: $CHCl_3$, EtOAc. Sau khi cô dưới áp suất giảm, khối lượng các cao thu được lần lượt là 128,9g ($CHCl_3$) và 39,3g (EtOAc).

3.2.2 Phân lập

Sắc kí cột phân đoạn EtOAc

Cao EtOAc được chọn là đối tượng nghiên cứu tiếp theo với hệ dung môi phân tích là EtOAc – MeOH – HCOOH (8:2:0,1). Vì cao EtOAc còn khá phức tạp nên được phân thành các phân đoạn đơn giản hơn bằng sắc kí cột quá tải với các thông tin:

+ Cột thủy tinh trung tính, thành dày, kích thước cột 7 x 50cm, rửa sạch, sấy khô;

+ Pha tĩnh: 250g silica gel, cỡ hạt trung bình (40-63 μ m), được giảm hoạt với 10% nước cất trong 1 giờ ở 110 $^{\circ}$ C ;

+ Nhồi cột khô, có bơm hút chân không cho ổn định;

+ Mẫu: 35g phân đoạn EtOAc, nạp mẫu khô;

+ Pha động: chạy gradient với dung môi nền là n-Hex, tăng dần tỉ lệ n-Hex-EtOAc đến 3:7 rồi tăng đến 100% EtOAc; sau đó dùng hệ EtOAc-MeOH, tăng dần tỉ lệ MeOH;

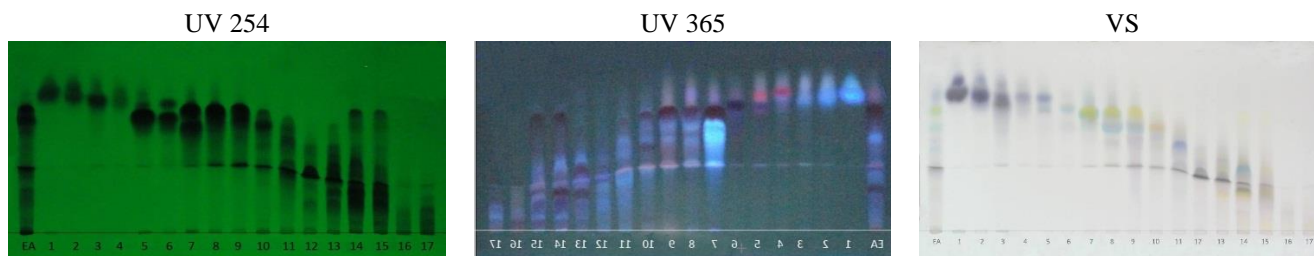
+ Kiểm tra phân đoạn bằng sắc kí lớp mỏng với hệ dung môi EtOAc-MeOH-HCOOH (8:2:0,5), phát hiện bằng cách soi UV 254nm, UV 365nm, phun TT VS. Theo dõi sắc kí đồ và gộp các phân đoạn hứng có sắc kí đồ giống nhau, cô quay để thu được các phân đoạn khác nhau.

Kết quả: Từ 35g phân đoạn EtOAc đã loại tạp, qua sắc kí cột nhanh thu được 17 phân đoạn khác nhau. Tiếp tục để bay hơi tự nhiên có 3 phân đoạn có kết tủa màu vàng, 12 phân đoạn khác ở dạng dầu hoặc rắn. Các phân đoạn có kết tủa được tiếp tục phân lập để thu được các chất tinh khiết. Kết quả được trình bày ở Bảng 3, Hình 1.

Bảng 3 Kết quả các phân đoạn sắc kí cột cao EtOAc

| Phân đoạn | Khối lượng (mg) | Ghi chú | Phân đoạn | Khối lượng (mg) | Ghi chú |
|-----------|-----------------|-------------------------------------|-----------|-----------------|-------------------------------------|
| 1 | 42,98 | Dạng dầu | 10 | 919,56 | Dạng dầu |
| 2 | 85,91 | Dạng dầu | 11 | 2470,00 | Dạng dầu |
| 3 | 93,22 | Dạng dầu | 12 | 4847,80 | Dạng dầu |
| 4 | 446,62 | Dạng rắn | 13 | 2676,78 | Kết tủa màu vàng (43,20mg) |
| 5 | 2290,51 | Dạng rắn | 14 | 727,90 | Kết tủa màu vàng (132,07 mg) |
| 6 | 934,36 | Dạng rắn | 15 | 1086,26 | Dạng rắn |
| 7 | 2632,45 | Kết tủa màu vàng (1,43065 g) | 16 | 390,93 | Dạng rắn |
| 8 | 1408,55 | Dạng rắn | 17 | 1021,33 | Dạng rắn |
| 9 | 1192,47 | Dạng rắn | | | |

EtOAc-MeOH-HCOOH (8:2:0.1)



Hình 1 Sắc kí đồ các phân đoạn sắc kí cột cao EtOAc

+ Phân lập V_1 từ phân đoạn 8

Từ 1430,65mg kết tủa màu vàng từ phân đoạn 7, sau khi rửa nhiều lần bằng MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xốp và tiến hành kết tinh lại trong MeOH thu được 830,56mg bột vi tinh thể màu vàng hơi xanh. V_1 khi chấm sắc kí so sánh với chất chuẩn, được xác định là casticin.

+ Phân lập V_3 từ phân đoạn 13

Từ 43,20mg kết tủa màu vàng thu được từ phân đoạn 13, sau khi rửa nhiều lần bằng MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xốp và tiến hành kết tinh lại trong MeOH thu được 30mg bột vi tinh thể V_3 màu vàng nhạt.

+ Phân lập V_4 từ phân đoạn 14

Từ 132,07mg kết tủa màu vàng thu được từ phân đoạn 14, sau khi rửa nhiều lần bằng MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xốp và tiến hành kết tinh lại trong MeOH thu được 46,29mg bột vi tinh thể V_4 màu vàng tươi.

Sắc kí cột phân đoạn 10

Phân đoạn 10 được chọn để tiến hành sắc kí cột cổ điển với các thông tin sau:

+ Cột thủy tinh trung tính, thành dày, kích thước cột 1,5 x 80cm, rửa sạch, sấy khô;

+ Pha tĩnh: 70g silica gel Merck, cỡ hạt mịn (15-40 μ m), được giảm hoạt với 10% nước cất trong 1 giờ ở 110 $^{\circ}$ C ;

+ Nhồi cột ướt, cho dung môi nền CHCl_3 chạy tới khi ổn định;

+ Mẫu: phân đoạn 10 (929,56mg), nạp mẫu khô;

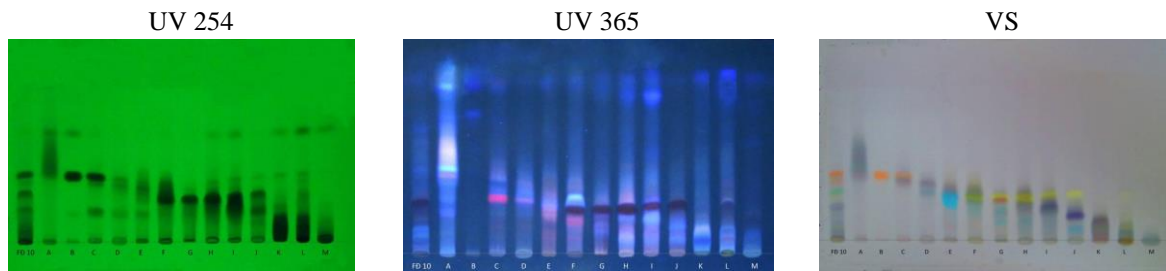
+ Pha động: chạy gradient với dung môi nền là CHCl_3 , tăng dần tỉ lệ CHCl_3 -MeOH đến (95:5) rồi tăng MeOH tới 100%;

+ Kiểm tra phân đoạn bằng sắc kí lớp mỏng với hệ CHCl_3 -MeOH (9:1), phát hiện bằng cách soi UV 254nm, UV 365nm, TT vanillin-sulfuric. Theo dõi sắc kí đồ và gộp các ống hứng có sắc kí đồ giống nhau, cô quay để thu được các phân đoạn.

Kết quả: Từ phân đoạn 10 (929,56mg), qua sắc kí cột, thu được 15 phân đoạn khác nhau. Kết quả được ghi nhận ở Bảng 4, Hình 2.

Bảng 4 Kết quả sắc kí cột phân đoạn 10

| Phân đoạn | Khối lượng (mg) | Ghi chú | Phân đoạn | Khối lượng (mg) | Ghi chú |
|-----------|-----------------|---|-----------|-----------------|--------------------------------|
| A | 105,13 | Dạng rắn | H | 83,15 | Có kết tủa màu vàng (24,52 mg) |
| B | 42,99 | Có tinh thể hình kim, màu trắng (28 mg) | I | 41,80 | Dạng rắn |
| C | 23,20 | Dạng rắn | J | 6,63 | Dạng rắn |
| D | 26,03 | Dạng rắn | K | 36,66 | Dạng rắn |
| E | 7,4 | Dạng rắn | L | 20,98 | Dạng rắn |
| F | 72,12 | Có kết tủa màu vàng (8,53mg) | M | 20,46 | Dạng rắn |
| G | 17,60 | Dạng rắn | | | |



Hình 2 Sắc kí đồ các phân đoạn sắc kí cột phân đoạn 10

+ Phân lập V₂ từ phân đoạn 10B:

Từ 28mg tinh thể không màu thu được từ phân đoạn 10B, sau khi rửa nhiều lần bằng MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xộp và được kết tinh lại trong MeOH thu được 23mg tinh thể V₂ hình kim, có màu trắng hơi hồng.

+ Phân lập V₅ từ phân đoạn 10H:

Từ 24,52mg kết tủa màu vàng thu được từ phân đoạn 10H, sau khi rửa nhiều lần bằng MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xộp và được kết tinh lại trong MeOH thu được 17mg bột vi

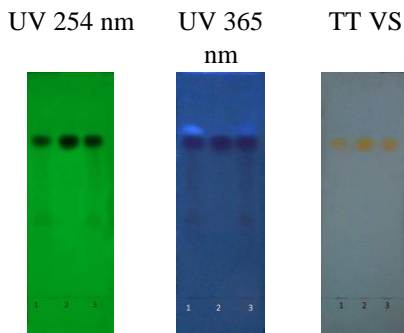
tinh thể V₅, màu trắng hơi vàng. V₅ (17mg) khi chấm so sánh với chất chuẩn đã được xác định là sitosterol-3-O-β-glucosid.

3.2.3 Xác định cấu trúc

Cấu trúc V₁

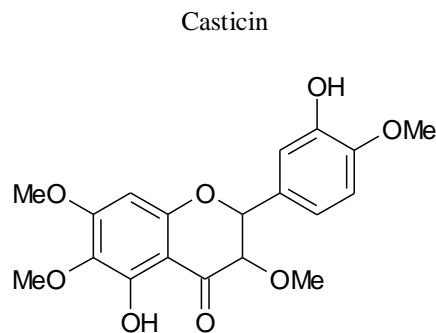
V₁ (830,56mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể, màu vàng hơi xanh; dễ tan trong MeOH, EtOAc, ít tan trong CHCl₃, không tan trong n-Hex. V₁ được chấm đối chiếu và kết luận là casticin (Hình 3)

EtOAc-MeOH-HCOOH (8:2:0,1)



Hình 3 Sắc kí đồ đối chiếu với Casticin

1. V₁; 2. Casticin; 3. Hỗn hợp V₁ và casticin



Cấu trúc V₃

V₃ (30mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể, màu vàng nhạt; ít tan trong MeOH, khó tan trong EtOAc, không tan trong CHCl₃, n-Hex; tinh khiết trên bảng mỏng, dương tính với FeCl₃, cho màu vàng với thuốc thử VS; EIMS, m/z 447,85 [M-H]⁺; NMR (Bảng 5) được định danh là luteolin-7-O-β-glucopyran-oxid (cynarosid) (Hình 4)

Cấu trúc V₄

V₄ (45,39mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể, màu vàng tươi; tan tốt trong MeOH, khó tan trong EtOAc, không tan trong CHCl₃, n-Hex; tinh khiết trên bảng mỏng; dương tính với FeCl₃, cho màu vàng với thuốc thử VS; EIMS, m/z 446,83 [M-H]⁺; NMR (Bảng 5) được định danh là luteolin-6-C-β-glucopyran-oxid (isoorientin) (Hình 4)

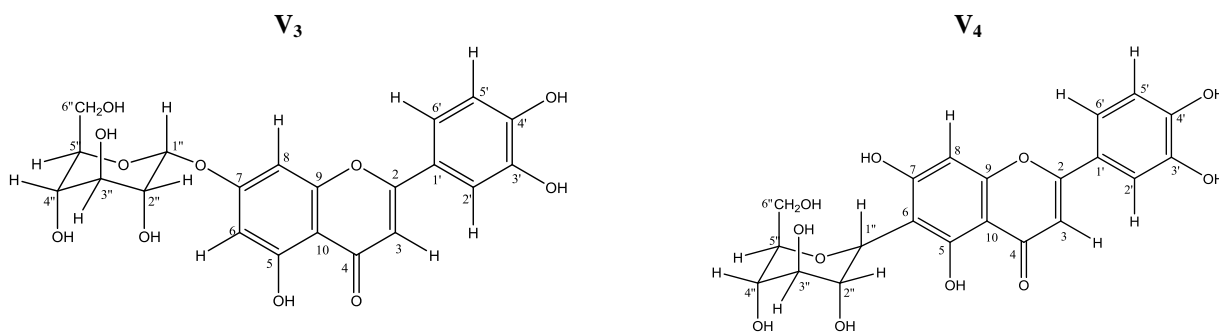
Bảng 5 Dữ liệu phổ NMR của V₃ và V₄

| STT | V ₃ (500 MHz, DMSO-d ₆) | | V ₄ (500 MHz, DMSO-d ₆) | |
|-----|--|---------------------------|--|---------------------------|
| | ¹³ C (δ ppm) | ¹ H (δ ppm) | ¹³ C (δ ppm) | ¹ H (δ ppm) |

| | | | | |
|----|---------|---------------------|---------|-------------------|
| 2 | 164,5 s | - | 163,6 s | - |
| 3 | 103,2 d | 6,75 s (1H) | 102,8 d | 6,67 s (1H) |
| 4 | 181,9 s | - | 181,8 s | - |
| 5 | 161,1 s | - | 160,7 s | - |
| 6 | 99,5 d | 6,44 d (1H; 2,5 Hz) | 108,8 s | - |
| 7 | 163,0 s | - | 163,2 s | - |
| 8 | 94,7 d | 6,79 d (1H; 2 Hz) | 93,5 d | 6,48 s (1H) |
| 9 | 157,0 s | - | 156,2 s | - |
| 10 | 105,3 s | - | 103,4 s | - |
| 1' | 121,4 s | - | 121,4 s | - |
| 2' | 113,6 d | 7,42 d (1H; 2 Hz) | 113,3 d | 7,39 d (1H; 2 Hz) |
| 3' | 145,8 s | - | 145,7 s | - |
| 4' | 149,9 s | - | 149,7 s | - |
| 5' | 116,0 d | 6,83 d (1H; 8 Hz) | 116,0 d | 6,89 d (1H; 8 Hz) |

| | | | | |
|-----|----------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 6' | 119,2 <i>d</i> | 7,46 <i>dd</i> (1H; 8 Hz, 2 Hz) | 119,0 <i>d</i> | 7,42 <i>dd</i> (1H; 8 Hz; 2 Hz) |
| 1'' | 99,9 <i>d</i> | 5,08 <i>d</i> (1H; 7,5 Hz) | 73,0 <i>d</i> | 4,59 <i>d</i> (1H; 10 Hz) |
| 2'' | 73,1 <i>d</i> | - | 70,6 <i>d</i> | - |
| 3'' | 76,4 <i>d</i> | - | 78,9 <i>d</i> | - |

| | | | | |
|-----|---------------|---|---------------|---|
| 4'' | 69,5 <i>d</i> | - | 70,2 <i>d</i> | - |
| 5'' | 77,2 <i>d</i> | - | 81,5 <i>d</i> | - |
| 6'' | 60,9 <i>t</i> | - | 61,5 <i>t</i> | - |



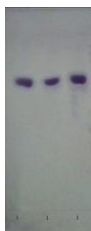
Hình 4 Cấu trúc hóa học V₃ (cynarosid) và V₄ (isoorientin)

Cấu trúc V₅

V₅ (17mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu trắng, hơi vàng; tan tốt trong MeOH, ít tan trong EtOAc, khó tan

CHCl₃-MeOH (9:1)

TT VS

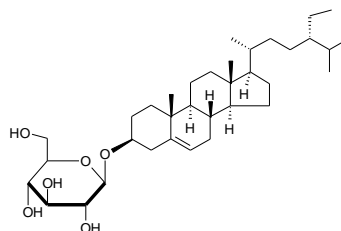


Hình 5 Sắc kí đồ so sánh V₅ với chất chuẩn sitosterol-3-O-β-glucosid.

1. V₅; 2. sitosterol-3-O-β-glucosid; 3. Hỗn hợp V₅ và sitosterol-3-O-β-glucosid

trong CHCl₃, không tan trong n-Hex. V₅ được chấm đổi chiều và kết luận là sitosterol-3-O-β-glucosid (Hình 5)

sitosterol-3-O-β-glucosid



4 Kết luận và kiến nghị

4.1 Kết luận

Sau gần 9 tháng thực hiện đề tài, so với mục tiêu đặt ra, chúng tôi đạt một số kết quả sau:

- Đã thu thập được các tài liệu về thực vật học, hoá học và dược lí của Mạn kinh tử lá đơn, có thể làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về loài cây này.

- Đã chiết xuất, thu lấy phân đoạn EtOAc từ cao còn lá Mạn kinh tử lá đơn. 35g phân đoạn EtOAc được lên sắc kí cột nhanh ra 17 phân đoạn, trong đó có 3 phân đoạn có kết tủa. Sau khi kết tinh lại nhiều lần trong MeOH, chúng tôi đã phân lập được 3 chất: V₁ (830,56mg), V₃ (30mg), V₄ (45,39mg). V₁ sau khi chấm so sánh với chất chuẩn, đã xác định là casticin. Sau khi kiểm tra độ tinh khiết trên sắc kí

lớp mỏng, V₃ và V₄ đã được đo phổ MS, MNR và định danh lần lượt là luteolin-7-O-β-glucopyranosid (cynarosid) và luteolin-6-C-β-glucopyranosid (isoorientin).

- Đồng thời còn tiến hành sắc kí cột cổ điển với phân đoạn 10 (929,56mg) thu được 15 phân đoạn, trong đó có 1 phân đoạn xuất hiện tinh thể, 2 phân đoạn có kết tủa. Sau khi kết tinh lại nhiều lần trong MeOH, chúng tôi đã phân lập được 3 chất: V₂ (23mg), V₅ (17mg). V₅ sau khi chấm so sánh với chất chuẩn, đã xác định là sitosterol-3-O-β-glucosid.

4.2 Kiến nghị

- Tiếp tục xác định cấu trúc của V₂ bằng MS và NMR
- Khảo sát và tìm phương pháp phân lập và tinh khiết hoá các chất mới từ những phân đoạn còn lại của sắc kí cột nhanh.

Tài liệu tham khảo

1. Chen S., Michael G. (1994), *Flora of China*, 17, pp. 1-49
2. Choi J. K., Cha D. S., Lee Y. J., et al (2010) “Effects of *Vitex rotundifolia* on radical scavenging and nitric oxide production”, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 10 (2), pp. 51-58.
3. Hu Y., Hou T., Zhang Q., et al (2007), “Evaluation of the estrogenic activity of the constituents in the fruits of *Vitex rotundifolia* L.f. for the potential treatment of premenstrual syndrome”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57** (9), pp.1307-1312.
4. Kim Y. A., Oh K., Seo Y. (2013), “Isolation of a New Labdan-type Diterpen from *Vitex rotundifolia*”, *Bulletin Korean Chemical Society*, 34 (12), pp. 3840-3842.
5. Ko W. G., Kang T. H., Lee S. J., et al (2000), “Polymethoxyflavonoid from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human leukemia cells”, *Food and Chemical Toxicology*, **38** (10), pp. 861-865.
6. Tsukasa I., Hiroaki S., Junichi K. (2011), “Flavonoid from the Leaves of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae), and their Qualitative and Quantitative Comparison between Coastal and Inland Populations”, *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, 37 (2), pp. 87-94.

Investigation of the chemical components of *Vitex rotundifolia* L.f., Verbenaceae

Bui Hoang Minh^{1,*}, Tran Hung², Nguyen Thi Xuan Dieu²

¹Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Pharmacy, Ho Chi Minh Medicine and Pharmacy University

*buihoangminhgaga@gmail.com

Abstract 35g EtOAc fraction was separated into 17 fractions. From these fractions, by using techniques remained above, five compounds were isolated: **V**₁ (830,56 mg), **V**₂ (23 mg), **V**₃ (30 mg), **V**₄ (45,39 mg), **V**₅ (17mg). Additionally, some chemical structures were defined as **V**₁ (casticin), **V**₃ (luteolin-7-*O*- β -glucopyranosid), **V**₄ (luteolin-6-*C*- β -glucopyranosid), **V**₅ (sitosterol-3-*O*- β -glucosid). The study is also continuing defining the chemical structure of **V**₄ and enriching **V**₇ from others fractions.

Some fractions collected by using column chromatography are available to be isolated new compounds such as: fraction 11, fraction 17G,...

Key words *Vitex rotundifolia*, extraction, isolation, flavonoid