

PHÂN LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT FLAVONOID TỪ LÁ CÂY CHANH THÁI (CITRUS HYSTRIX) THU HÁI TẠI TỈNH CHAMPASACK, MIỀN NAM LÀO

Đến tòa soạn 13-12-2019

Mai Thanh Nga, Sathapana Khamphila, Nguyễn Thị Thanh Hương

Khoa Hóa học - Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Phan Minh Tân

Khoa Công nghệ Kỹ thuật Hóa học - Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

SUMMARY

FLAVONOIDS ISOLATED FROM THE LEAF OF CITRUS HYSTRIX COLLECTED IN CHAMPASACK, SOUTH LAOS

From ethyl acetate extracts of the ethanol extract Citrus Hystrix collected in Champasack, South Laos, we described here the isolation and structure elucidation of two compounds flavonoids: quercetin (KS1), myricetin (KS2). According to the research results show both compound exhibits a wide range of activities that include strong anti-oxidant, anticancer, antidiabetic and anti-inflammatory activities.

Key words: Citrus Hystrix, flavonoids, quercetin, myricetin, anti-oxidant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Chanh Thái, còn được gọi là trúc, chanh nãi người, chanh số 8, ... Tên khoa học là *Citrus Hystrix* được trồng rất phổ biến ở một số nước như Indonesia, Lào, Malaysia và Thái Lan, hiện nay loài cây này được trồng rộng rãi trên Thế Giới. Do có hương vị đặc biệt nên lá chanh được dùng làm gia vị đặc trưng không thể thiếu trong ẩm thực Thái Lan, một trong những món ăn nổi tiếng khắp toàn cầu đó là Tom Yum. Trong đông y lá chanh Thái cũng là một vị thuốc trị sốt rét, chữa ho gà, giải cảm, thanh nhiệt mát gan ... [5]. Trong lá chanh Thái chứa chủ yếu các hợp chất flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, dịch chiết xuất từ lá có tác dụng bảo vệ gan do paracetamol gây ra, tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, chống ung thư cổ tử cung và các dòng tế bào u nguyên bào thần kinh [1], [3], [8]. Tuy nhiên cho tới nay chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần, cấu trúc hóa học của các hợp chất trong cây chanh Thái. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất có trong dịch

chiết ethyl acetate của mẫu lá khô cây chanh Thái được thu hái tại tỉnh Champasack, miền Nam Lào.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất: Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như ethanol (EtOH), n-hexan, ethyl acetate (EtOAc), methanol.. đều đạt tiêu chuẩn phân tích. Bản mỏng tráng sẵn trên đế nhôm loại pha thường silica gel 60 F₂₅₄. (Merck, Damstadt, Đức). Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột silica gel pha thường (0,040-0,063mm, YMC Co. Ltd., Nhật Bản).

Thiết bị: Phổ NMR được đo trong dung môi CDCl₃ trên máy Bruker Avance 500 MHz tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Chiết, phân lập các chất

Mẫu lá chanh Thái được thu hái vào thời điểm tháng 6 năm 2019. Lá chanh Thái tươi được rửa sạch, phơi và sấy khô ở 50°C, nghiền nhỏ thành bột. Lấy 2,5 kg bột đem ngâm chiết với 5 lít ethanol (70%), quá trình chiết được lặp lại 3

lần ở nhiệt độ phòng, thời gian cho mỗi lần chiết 48 giờ. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 210 g cao thô ethanol. Cao thô ethanol được phân bố vào nước cất vừa đủ và tiến hành chiết lần lượt với n-hexan, ethyl acetate, cất loại dung môi thu được cặn n-hexan (30 gam), ethyl acetate (55 g).

Cặn ethyl acetate (55 g) tiến hành sắc kí cột với chất hấp phụ silica gel, kích thước cột 60 cm x 6 cm (chiều dài x đường kính cột), dung môi rửa giải n-hexan: ethyl acetate với độ phân cực của dung môi tăng dần (n-hexane từ 100% - 0%) thu được 6 phân đoạn ET1- ET6.

Phân đoạn ET4 (6,0 g) được sắc kí trên cột silica gel, kích thước cột 50 cm x 3 cm; hệ dung môi giải ly n-hexan: methanol 95:5; 85:15; 75:25; 65:35; 55:45 thu được 4 phân đoạn ET4.1 - ET4.4.

Phân đoạn ET4.2 được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi rửa giải ethyl acetate thu được 1 hợp chất màu vàng kí hiệu **KS1** (45 mg).

Phân đoạn ET4.3 được tinh chế bằng cách kết tinh lại thu được 1 hợp chất màu vàng kí hiệu **KS2** (30 mg).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc hợp chất **KS1**, **KS2** được xác định dựa vào dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NRM, HSQC, HMBC, DEPT và so sánh tài liệu tham khảo.

Chất **KS1** được phân lập có dạng bột, màu vàng nhạt đặc trưng cho nhóm chất flavonoid, $R_f = 0,45$ (CHCl₃-MeOH 85:15).

Phổ ¹H-NMR (500 MHz, Acetone D6) δ_H (ppm): Xuất hiện 5 tín hiệu của proton ở vùng thơm δ_H 6,26 (1H; *d*, 2Hz); δ_H 6,51 (1H; *d*; 2Hz); δ_H 6,98 (1H; *d*; 8,5Hz); δ_H 7,69 (1H; *d*; 8Hz); δ_H 7,82 (1H; *d*; 2Hz); một tín hiệu proton của nhóm -OH với độ dịch chuyển δ_H 12,15 (1H; *s*).

Phổ ¹³C-RMN (500 MHz, Acetone D6) δ_C (ppm) và phổ DEPT cho thấy hợp chất **KS1** gồm 15 carbon thuộc nhân thơm bao gồm 5 carbon nhóm *metin* (>CH-) và 10 nhóm carbon

tứ cấp (>C<), trong đó tín hiệu carbon tại δ_C 176,5 đặc trưng cho nhóm carbonyl (>C=O). Từ các số liệu phổ cho phép dự đoán hợp chất **KS1** thuộc loại hợp chất flavonoid.

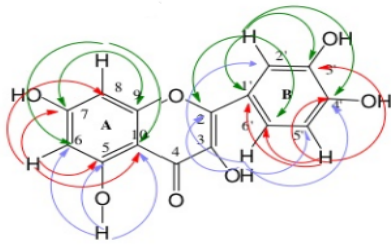
Trên vòng A: Carbon của nhóm carbonyl có δ_C 176,5 (C-4) nên C-3 gắn với nhóm (-OH kiềm) và có 1 nhóm hydroxy (-OH) gắn với C-5 vì có tín hiệu proton của nhóm -OH kiềm nổi δ_H 12,15 (1H; *s*).

Trên phổ HSQC thể hiện sự tương quan: δ_H 6,26 (1H; *d*; 2Hz) với δ_C 99,1; δ_H 6,51 (1H; *d*; 2Hz) với δ_C 94,4; δ_H 6,98 (1H; *d*; 8,5Hz) với δ_C 116,2; δ_H 7,69 (1H; *dd*; 8Hz; 2Hz) với δ_C 123,7; δ_H 7,82 (1H; *d*; 2Hz) với δ_C 115,7.

Phổ HMBC, hai proton δ_H 6,26 (1H; *d*; 2Hz) và δ_H 6,51 (1H; *d*; 2Hz) lần lượt tương quan với δ_C 94,4 và δ_C 99,1 mà không có tương quan với carbon còn lại do đó 2 proton này sẽ ở vị trí H-6 và H-8. Vì δ_C 99,1 tương quan với δ_H 12,1 nên δ_C 99,1 là C-6 và δ_H 6,26 là H-6; δ_C 94,4 là C-8; δ_H 6,51 là H-8. Proton H-8 tương quan với δ_C 157,7 không tương quan với δ_C 162,3 còn H-6 tương quan với δ_C 162,3 không tương quan với δ_C 157,7 nên δ_C 157,7 là C-9 và δ_C 162,2 là C-5. Hai carbon C-5; C-6 và δ_C 104,1 cùng tương quan với δ_H 12,1 nên δ_C 104,1 là C-10. Hai proton H-6, H-8 cùng tương quan với δ_C 164,9 nên đây là C-7.

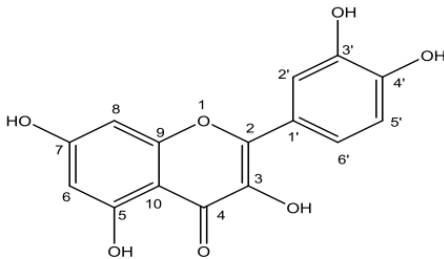
Trên vòng B: Từ phổ ¹H-NMR và phổ HMBC ta có thể thấy lần lượt các proton δ_H 6,98 (1H; *d*; 8,5Hz, H-5'); δ_H 7,69 (1H; *dd*; 8Hz; 2Hz, H-6'); δ_H 7,82 (1H; *d*; 2Hz, H-2') và carbon tương ứng là δ_C 116,2 (C-5'), δ_C 121,4 (C-6'), δ_C 115,7 (C-2').

Phân tích phổ HMBC cho các tín hiệu H-2' và H-5' cùng tương quan với δ_C 145,8 nhưng H-6' lại không tương quan nên đó là C-3'. Hai proton H-2', H-6' tương quan với δ_C 146,9 nhưng H-5' lại không tương quan nên đó là C-2. Carbon có độ dịch chuyển δ_C 136,7 không tương quan với proton nào nên carbon này là C-3. Carbon δ_C 123,7 là C-1'; δ_C 148,3 là C-4'.



Hình 2: Tương quan phổ HMBC

Như vậy, từ dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-RMN}$, HSQC, HMBC của hợp chất **KS1** so sánh với dữ liệu của hợp chất đã công bố quercetin [6], chất **KS1** được xác định là quercetin (CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$).



Hình 3: Cấu trúc hợp chất quercetin

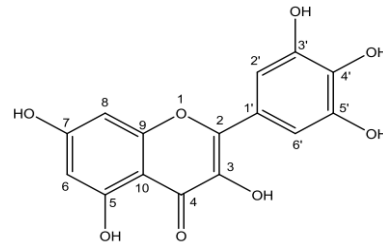
Hợp chất **KS2** phân lập được là chất rắn, dạng tinh thể hình kim, màu vàng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone D_6) δ_{H} (ppm) có sự xuất hiện tín hiệu đặc trưng của một flavonoid, trong đó proton δ_{H} 6,18 (*d*) ghép *meta* với proton δ_{H} 6,43 với hằng số ghép $J = 2,0\text{Hz}$ tương ứng với 2 proton H-6 và H-8; ba tín hiệu cộng hưởng của 4 proton [δ_{H} , 6,18 (1H, *d*, 2Hz); 6,43(1H, *d*, 2Hz); 7,24 (2H, *s*), thuộc vòng A. Proton δ_{H} 7,24 (2H,*s*) là H-2', H-6' của vòng B.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, Acetone D_6) δ_{C} (ppm) cho thấy hợp chất **KS2** có 12 tín hiệu cộng hưởng ứng với 15 carbon tương tự như hợp chất **KS1**, trong đó δ_{C} 175,7 pm đặc trưng cho nhóm carbonyl, tín hiệu δ_{C} 135,8 (C-3) đặc trưng cho carbon nối đôi liên kết với một nhóm hydroxyl.

Các giá trị phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho phép dự đoán **KS2** là hợp chất có khung flavonoid. So sánh các dữ liệu phổ cộng hưởng

từ với các dữ liệu phổ của hợp chất myricetin đã công bố [7]. Từ đó cấu trúc của hợp chất **KS2** được dự đoán là myricetin (CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$).



Hình 3: Cấu trúc hợp chất myricetin

Các kết quả nghiên cứu về hợp chất quercetin, myricetin cho thấy đây là các hợp chất flavonoid có khả năng cải thiện sức khỏe tim mạch, chống loãng xương, chống viêm và là chất chống oxy hóa tự nhiên do có khả năng hấp thụ gốc tự do, ngoài ra myricetin còn được dùng để bảo quản thực phẩm, kéo dài thời gian sử dụng cho những thực phẩm có chứa dầu và chất béo [2],[4]. Việc phân lập 2 hợp chất quercetin, myricetin góp phần khẳng định thêm những tác dụng dân gian đã được sử dụng của lá chanh Thái.

4. KẾT LUẬN

Từ cao chiết ethyl acetate của lá cây chanh Thái, thu hái tại tỉnh tỉnh Champasack, miền Nam Lào, bằng phương pháp sắc kí cột, kết hợp với phương pháp phổ hiện đại, đã phân lập và xác định được cấu trúc 2 hợp chất quercetin (**KS1**) và myricetin (**KS2**). Các kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề cho các (quá trình) nghiên cứu sâu hơn nhằm hướng tới mục tiêu tìm ra các hợp chất có hoạt tính sinh học và có được tính tốt phục vụ ngành y, được đồng thời góp phần định hướng sử dụng cây chanh Thái hiệu quả hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abirami, A., Nagarani G., Siddhuraju P.,(2015), "Hepatoprotective effect of leaf extracts from Citrus hystrix and C. maxima against paracetamol induced liver injury in rats". *Food science and human wellness*, Vol 4(1), pp.35-41.

(Xem tiếp Tr. 115)