Phân lập flavonoid trong diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.)

Phan Nguyễn Trường Thắng, Lê Tiến Khang, Trần Việt Hùng*
Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

*From Houttuynia cordata Thunb. which were collected in Ha Noi City, three compounds were isolated by chromatography and identified as: hyperosid (**1**), quercitrin (**2**) and afzelin (**3**) by UV, IR, MS and NMR.*

Keywords: *Houttuynia cordata, hyperosid, quercitrin, afzelin.*

Đặt vấn đề

Diếp cá (Herba *Houttuyniae cordatae* Thunb.), bộ phận trên mặt đất còn tươi hay đã sấy khô của cây diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.) họ Lá giấp (Saururaceae), là một vị thuốc phổ biến trong Y học cổ truyền Việt Nam và Trung Quốc, thường được sử dụng tươi hay dưới dạng bột để trị ho, trĩ, viêm nhiễm đường tiết niệu, nhiễm trùng, táo bón [1]… Bên cạnh đó, diếp cá còn được sử dụng như một thực phẩm thông thường tại nhiều vùng miền. Diếp cá là đối tượng nghiên cứu của nhiều tác giả khác nhau và đã được báo cáo là có khả năng kháng khuẩn, kháng viêm, tăng cường đáp ứng miễn dịch do chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học cao, đặc biệt là các hợp chất thuộc nhóm flavonoid như rutin, quercetin [2]... Bài báo này thông báo quy trình phân lập và xác định 3 hợp chất flavonoid gồm có hyperosid, quercitrin, afzelin từ phân đoạn dịch chiết ethylacetat của diếp cá.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Diếp cá đạt yêu cầu kiểm tra chất lượng theo Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ Năm (Dược điển Việt Nam V) và Tiêu chuẩn dược liệu Hồng Kông (Hong Kong Chinse Materia Medica Standards, HKCMMS) [3]; mẫu được thu hái tại Hà Nội vào năm 2019.

Chịu trách nhiệm: Trần Việt Hùng
Email: tran.viethung168@gmail.com
Ngày nhận: 01/7/2020
Ngày phản biện: 05/8/2020
Ngày duyệt bài: 29/10/2020

Hoá chất, thuốc thử, thiết bị và dụng cụ

Bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60 F_{254} Merck, thuốc thử hiện màu $AlCl_3$ 3% trong ethanol và H_2SO_4 10% trong ethanol; Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 40 – 63 µm (Davisil); Máy sắc ký lỏng điều chế Shimadzu LC20A và máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-2030C 3D, đầu dò PDA (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh); Máy quét nhiệt vi sai TA Instrument DSC Q20 (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh); Thiết bị quang phổ hồng ngoại Themo Scientific Mode iS50FT-IR (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh); Thiết bị đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) Bruker Ascend TM 400 MHz (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh); Máy sắc ký lỏng khối phổ Shimadzu LC-MS IT-TOF (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh).

Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc

Dược liệu được chiết bằng phương pháp ngâm lạnh với dung môi ethanol 80% ở nhiệt độ phòng. Từ cao tổng chiết với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat. Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường, sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế. Theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng pha thuận, phát hiện chất bằng đèn tử ngoại hoặc dùng thuốc thử, hơ nóng để phát hiện. Cấu trúc các hợp chất phân lập được xác định dựa trên kết quả phân tích phổ ***IR***, phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh các dữ liệu thu được từ thực nghiệm với các tài liệu đã công bố.

Kiểm tra độ tinh khiết

Sắc ký lớp mỏng

Sử dụng các hệ dung môi: A: Dung môi

khai triển EA - n-butanol - acid formic - nước (24: 3,6:1,5:0,9); B: Dung môi khai triển EA – acid formic (9,5:0,5) và C: Dung môi khai triển EA – methanol – acid formic (30:10:1). Soi trực tiếp dưới đèn UV 365 nm, và phun thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10% trong cồn.

Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký: Gemini NX-C18 (250 mm x 4,6 mm); Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng; Thể tích tiêm: 20 µL; Tốc độ dòng: 1 mL/phút; Bước sóng phát hiện: 210 nm; Pha động: acetonitril – acid acetic tỉ lệ dung môi tham khảo HKCMS [3] được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. *Chương trình gradien dung môi kiểm tra độ tinh khiết hợp chất*

Thời gian	*Acid acetic 0,1% (%)*	*Acetonitril (%)*
0	95	5
20	80	20
40	80	20
60	65	35
65	95	5

Kết quả và bàn luận

Kết quả chiết xuất phân lập

Diếp cá tươi được phơi khô, nghiền thành bột (4,8 kg), sau đó chiết trong ethanol 70 % (3 x 20 lít). Gộp dịch chiết thu được và cất loại dung môi ở áp suất giảm thu được 168,7 g cặn chiết ethanol. Lấy 75 g cặn chiết phân tán vào 300 ml nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexan, cloroform và ethylacetat (mỗi loại 3 lần x 300 ml). Các dịch chiết *n*-hexan, cloroform và ethylacetat được cất thu hồi thu được các cặn tương ứng *n*-hexan (H: 28,8 g), chloroform (C: 0,6 g), ethylacetat (E:15,1 g) và cặn của lớp nước (N: 15,5 g).

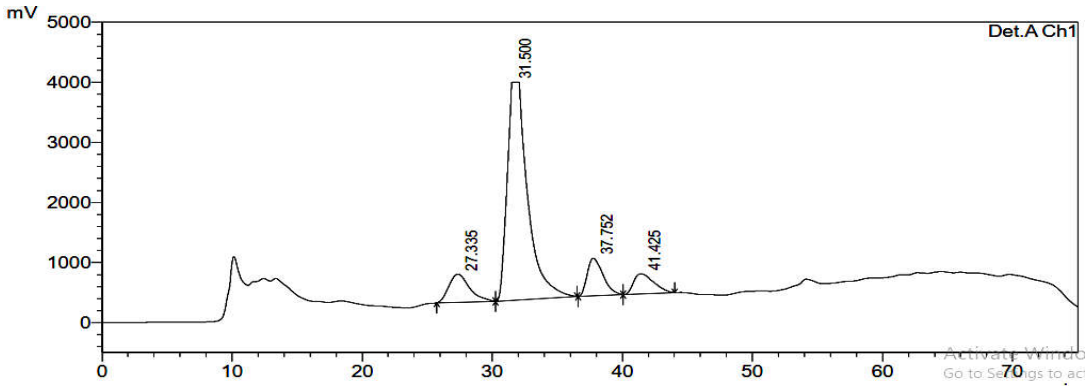
Cặn ethyl acetat được sắc ký cột với silica gel (tỉ lệ 1:20) cột sắc ký có đường kính 60 mm, rửa giải với hệ dung môi hexan- EA (9:1 – 3:7) thu được 8 phân đoạn nhỏ (I-VIII).

Phân đoạn VIII được xử lý bằng than hoạt còn lại 1050 mg, tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế với hệ dung môi methanol – nước, chương trinh ghi trong bảng 2.

Bảng 2. *Chương trình sắc ký tinh chế*

Bước sóng	*Thời gian (phút)*	*Methanol (%)*	*Nước (%)*	*Thể tích tiêm*	*Tốc độ dòng*
210 nm	0 - 40	40 -70	60 -30	900 µL	5 ml/phút
	40-50	70-80	30-20		
	50-65	80	20		
	65-75	80-40	20-60		

Thu dịch rửa giải theo sắc ký đồ hình 1 thu được các hợp chất tương ứng với pic ở thời gian 27,3 phút; 31,5 phút; 37,7 phút và 41,4 phút; cô quay đến cặn thu được lần lượt 55,3 mg **Q1**; 171 mg chất **Q2**; 30 mg hợp chất **Q3** và 22,5 mg hợp chất **Q4**.



Hình 1. *Sắc ký đồ tinh chế phân đoạn VIII*

Nhận xét: **Q1, Q2, Q3** tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng, tiến hành phân tích các phổ tiếp theo. **Q4** không đủ tinh khiết để phân tích các bước tiếp theo.

Phân tích phổ, xác định cấu trúc

Hợp chất Q1: Phổ ***IR*** ν_{max} (cm^{-1}): 3269,39 cm^{-1} (OH), 1651,90 cm^{-1} (C=O), 1203,01 cm^{-1} (C-O-C). Phổ khối ***ESI – MS***: m/z = 463,0817 $[M-H]^-$ (M = 464 ứng với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_{12}$). Phổ ***^{1}H-NMR*** (DMSO, 400 MHz) và ***^{13}C-NMR*** (DMSO, 100 MHz) của chất **Q1** được trình bày ở bảng 3.

Hợp chất Q2*:** Phổ ***IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3419,79 cm^{-1} (OH), 1656,85 cm^{-1} (C=O), 1201,65 cm^{-1} (C-O-C). Phổ khối ***ESI – MS***: m/z = 447,0910 $[M-H]^-$ (M = 448 ứng với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_{11}$. Phổ ***^{1}H-NMR*** (CD_3OD, 400 MHz) và ***^{13}C-NMR*** (CD_3OD, 100 MHz) của hợp chất **Q2** được trình bày ở bảng 4.

Hợp chất Q3*:** Phổ ***IR ν_{max} (cm^{-1}): 3275,13 cm^{-1} (OH), 1652,13 cm^{-1} (C=O), 1172,93 cm^{-1} (C-O-C). Phổ ***^{1}H-NMR*** (CD_3OD, 400 MHz) và ***^{13}C-NMR*** (CD_3OD, 100 MHz) của chất **Q3** được trình bày ở bảng 4.

Bảng 3. *Số liệu phổ **^{1}H-NMR** và **^{13}C-NMR** của hợp chất **Q1** và chất tham khảo [4]*

C	***Chất hyperosid [4]***		***Q1***	
	C(ppm)	*H(ppm)*	*C(ppm)*	*H(ppm)*
2	156,32	-	157,31	-
3	133,75	-	134,42	-
4	177,56	-	178,11	-
5	161,23	12,60 (1H, s, OH)	161,62	12,64 (1H, s, OH)
6	98,65	6,15 (1H, d, 1,9 Hz)	98,49	6,19 (1 H, d, 2,0 Hz)
7	164,11	-	164,76	-
8	93,53	6,36 (1H, d, 1,9 Hz)	93,29	6,39 (1H, d, 1,6 Hz)
9	156,32	-	157,04	-
10	103,92	-	104,18	-
1'	121,28	-	121,48	-
2'	115,30	7,48 (1H, d, 8,5 Hz)	114,66	7,52 (1H, d, 2,4 Hz)
3'	144,73	-	144,41	-
4'	148,35	-	148,56	-
5'	116,20	6,77 (1H, d, 8,5 Hz)	116,34	6,80 (1H, d, 8,4 Hz)
6'	121,76	7,63 (1H, dd, 2; 8,5 Hz)	121,42	7,66 (1H, dd, 2,4; 8,8 Hz)
1''	98,65	5,3 (1H, d, 7,7 Hz)	103,92	5,16 (1H, d, 8 Hz)
2''	71,28	3,61 – 3,22 (6H, m)	71,76	3,85 – 3,45 (6H, m)
3''	73,42		73,66	
4''	68,07		68,61	
5''	75,74		75,77	
6''	60,56		60,50	

Bảng 4. *Số liệu phổ **^{1}H-NMR** và **^{13}C-NMR** của hợp chất **Q2, Q3** và các chất tham khảo [5, 6]*

C	***Q2***		***Quercitrin [5]***		***Afzelin [6]***		***Q3***	
	Cppm	*H(ppm)*	*C(ppm)*	*H(ppm)*	*C(ppm)*	*H(ppm)*	*C(ppm)*	*H(ppm)*
2	157,9	-	158,1	-	159,20	-	157,8	-
3	134,8	-	136,0	-	136,19	-	134,8	-
4	178,2	-	179,3	-	179,54	-	178,2	-
5	161,8	-	163,0	-	163,11	-	160,2	-
6	98,4	6,20 (1H, d, 2 Hz)	99,5	6,10 (1H, d, 1,8 Hz)	99,81	6,20 (1H, d, 2,1 Hz)	98,6	6,20 (1H, d, 2 Hz)
7	164,6	-	165,8	-	165,74	-	165,1	-
8	93,3	6,37 (1H, d, 1,6 Hz)	94,3	6,29 (1H, d, 1,8 Hz)	94,75	6,37 (1H, d, 2,1 Hz)	93,5	6,37 (1H, d, 2 Hz)
9	157,1	-	158,1	-	158,46	-	157,2	-
10	104,3	-	105,5	-	105,92	-	104,4	-
1'	121,5	-	122,5	-	122,61	-	121,2	-

2'	115,5	7,33 (1H, d, 2 Hz)	116,2	7,57 (1H, d, 1,9 Hz)	131,86	7,76 (2H, dd, 1,9, 8,8 Hz)	130,5	7,75 (2H, dd, 2, 9,2 Hz)
3'	145,0	-	146,2	-	116,47	6,95 (2H, dd, 1,9, 8,8 Hz)	115,1	6,92 (2H, dd, 2, 9,2 Hz)
4'	148,4	-	149,5	-	161,46	-	161,1	-
5'	115,0	6,90 (1H, d, 8 Hz)	116,7	6,77 (1H, d, 8,2 Hz)	116,47	6,95 (2H, dd, 1,9, 8,8 Hz)	115,1	6,92 (2H, dd, 2, 9,2 Hz)
6'	121,4	7,29 (1H, dd, 9,2, 2 Hz)	122,7	7,53 (1H, dd, 8,2 1,9 Hz)	131,86	7,76 (2H, dd, 1,9, 8,8 Hz)	130,5	7,75 (2H, dd, 2, 9,2 Hz)
1''	102,1	5,34 (1H, d, 1,2 Hz)	103,4	5,01 (1H, d, 2 Hz)	103,44	5,39 (1H, d, 1,6 Hz)	102,1	5,36 (1H, d, 1,6 Hz)
2''	70,6	4,22 (1H, q, 1,6 Hz)	71,8	4,22-3,14 (1H, m)	71,96	4,25 (1H, dd, 1,7 3,3 Hz)	70,6	4,21 (1H, dd, 2, 3,2 Hz)
3''	70,7	3,75 (1H, dd, 1,6, 9,2 Hz)	72,0	4,22-3,14 (1H, m)	72,10	3,74 (1H, dd, 9,1, 3,4 Hz)	70,7	3,69 (1H, m)
4''	71,8	3,33 (1H, m)	73,1	4,22-3,14 (1H, m)	73,19	3,37 (1H, br, d 3,3 Hz)	71,8	3,35 (1H, m)
5''	70,5	3,40 (1H, m)	71,7	4,22-3,14 (1H, m)	71,88	3,33 (1H, br, d, 5,0 Hz)	70,5	3,33 (1H, m)
6''	16,3	0,93 (3H, d, 6 Hz)	17,5	1,02 (d, 6,0 Hz)	17,65	0,94 (3H, d, 5,7 Hz)	16,3	0,92 (3H, d, 6 Hz)

Biện giải cấu trúc

Hợp chất Q1

Trên phổ ***^{1}H-NMR*** của hợp chất **Q1** xuất hiện: Tín hiệu proton anome tại δ_H 5,36 (1H,d, J = 8 Hz) gợi ý trong **Q1** có mặt một phần đường; cặp tín hiệu doublet tại 6,19 (d, J = 2,0 Hz) và 6,39 (d, J = 1,6 Hz) điển hình cho hai proton ở vị trí C-6 và C-8 của vòng A của hợp chất flavonol; cặp hai tín hiệu doublet khác tại δ_H 6,80 (d, J = 8,4 Hz) và 7,66 (dd, J = 2,4; 8,8 Hz) đặc trưng cho vòng thơm B thế para.

Phổ ***^{13}C-NMR*** của hợp chất **Q1** xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 15 tín hiệu của khung flavon và 6 tín hiệu của một phân tử đường galactose. Các tín hiệu của vòng B lần lượt tại 121,4 (C-1'); 114,6 (C-2'), 144,4 (C-3'), 148,5 (C-4'), 116,3 (C-5'), 121,4 (C-6'). Nhóm carbonyl xuất hiện tại 178,1 (C-4), hai tín hiệu CH điển hình tương ứng với các vị trí C-6 và C-8 của vòng A tại 98,4 (C-6) và 93,2 (C-8); tín hiệu của carbon anome tại 103,9 (C-1") và năm tín hiệu CH nối với oxi của phân tử đường galactose tại 71,6 (C-2"); 73,6 (C-3"); 68,6 (C-4"); 75,7 (C5"); 60,5 (C6"). Từ các kết quả nêu trên có thể đề xuất **Q1** là quercetin-3-O-galactopyranosid. Đối chiếu với dữ liệu đã công bố [4] hợp chất **Q1** được xác định là hyperosid.

Hợp chất Q2

Phổ ***^{1}H-NMR*** của hợp chất **Q2** xuất hiện hai vùng phổ đặc trưng, một vùng ở trường khá thấp với hai tín hiệu của hai proton nằm ở vị trí meta với nhau thuộc vòng A tại 6,2 và 6,37 (d, J = 2,0 Hz) và ba tín hiệu cộng hưởng với tương tác spin coupling dạng ABX của vòng B thế ở các vị trí 1,3,4 tại 7,33 (1H, d, J = 2 Hz, H2'), 6,90 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-5'); 7,29 (1H, dd, J = 2,0; 9,2; H-6'); Vùng trường cao hơn là các tín hiệu của một phân tử đường. Tín hiệu của proton anome tại 5,34 (1H, d, J = 1,2 Hz; H-1"), tín hiệu điển hình của nhóm methyl bậc một dưới dạng doublet tại 0,93 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-6") và bốn proton của các nhóm oxymethin tại 3,75 (1H, dd, J = 1,6; 9,2; H-3"); 4,22 (1H, q, J = 1,6 Hz; H-2"); 3,33 (1H, m, H4"); 3,40 (1H, m, H-5") cho thấy cấu trúc của **Q2** có một phân tử đường rhamnose.

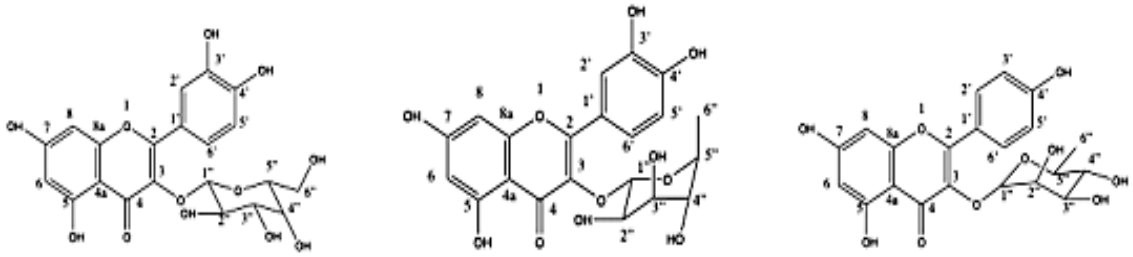
Phổ ***^{13}C-NMR*** của hợp chất **Q2** xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 15 tín hiệu của khung flavon và 6 tín hiệu của một phân tử đường rhamnose. Các tín hiệu của vòng B lần lượt tại 121,5 (C-1'); 115,5 (C-2'); 145,0 (C-3'); 148,4 (C-4'); 115,0 (C-5'); 121,4 (C-6'). Nhóm carbonyl xuất hiện tại 178,2 (C-4), hai tín hiệu CH điển hình tương ứng với các vị trí C-6 và C-8 của vòng A tại 98,4 (C-6) và 93,3 (C-8); tín hiệu của carbon anome tại 102,1 (C-1"), nhóm methyl tại 16,3 (C-6") và bốn tín hiệu CH nối với oxi của phân tử đường rhamnose tại 70,6 (C-2"); 70,7 (C-3"); 71,8 (C-4"); 70,5 (C5"). Từ các kết quả nêu trên có thể

đề xuất **Q2** là quercetin-3-O-rhamnopyranosid. Đối chiếu với dữ liệu đã công bố [5] hợp chất **Q2** được xác định là quercitrin.

Hợp chất Q3

Trên phổ ***^{1}H-NMR*** của hợp chất **Q3** xuất hiện: Tín hiệu proton anome tại δ_H 5,36 (1H,d, J = 1,6 Hz) gợi ý trong **Q3** có mặt 1 phần đường; cặp tín hiệu doublet tại 6,20 (d, J = 2,0 Hz) và 6,37 (d, J = 2,0 Hz) điển hình cho hai proton ở vị trí C-6 và C-8 của vòng A của hợp chất flavonol; cặp hai tín hiệu doublet khác tại δ_H 6,92 (dd, J = 2; 9,2 Hz) và 7,75 (dd, J = 2; 9,2 Hz) đặc trưng cho vòng thơm B thế para.

Phổ ***^{13}C-NMR*** của hợp chất **Q3** xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 15 tín hiệu của khung flavon và 6 tín hiệu của một phân tử đường rhamnose. Các tín hiệu của vòng B lần lượt tại 121,2 (C-1'); 130,5 (C-2', C-6'); 115,1 (C-3', C-5'); 161,1 (C-4'). Nhóm carbonyl xuất hiện tại 178,2 (C-4), hai tín hiệu CH điển hình tương ứng với các vị trí C-6 và C-8 của vòng A tại 98,6 (C-6) và 93,5 (C-8); tín hiệu của carbon anome tại 102,1 (C-1''), nhóm methyl tại 16,3 (C-6'') và bốn tín hiệu CH nối với oxi của phân tử đường rhamnose tại 70,6 (C-2''); 70,7 (C-3''); 71,8 (C-4''); 70,5 (C5''). Từ các kết quả nêu trên có thể đề xuất **Q3** là kaempferol-3-O-rhamnopyranosid. Đối chiếu với dữ liệu đã công bố [6] hợp chất **Q3** được xác định là afzelin.



Q1: Hyperosid **Q2:** Quercitrin **Q3:** Afzelin

Hình 2. *Cấu trúc hợp chất **Q1, Q2, Q3***

Kết luận

Từ diếp cá đã được đánh giá chất lượng đầu vào, bằng phương pháp ngâm lạnh, phương pháp sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế đã phân lập được 3 hợp chất. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được thông qua kết quả đo phổ tử ngoại, phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh với các dữ liệu công bố của các hợp chất liên quan. Ba hợp chất được phân lập được xác định cấu trúc là: hyperosid (**Q1**), quercitrin (**Q2**) và afzelin (**Q3**), là những chất đặc trưng của cây diếp cá. Đây là nghiên cứu công bố lần đầu tiên ở Việt Nam sẽ giúp cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu này cũng như các thành phẩm của chúng, thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu, cao định chuẩn và đề xuất nâng cấp chuyên luận diếp cá trong Dược điển Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ Năm (2017), NXB Y học, tr. 1143.
2. Fu J., Dai L., Lin Z. et al. (2013), "*Houttuynia cordata* Thunb: A review of phytochemistry and pharmacology and quality control", *Chinese Medicine*, 4 (03), pp. 101.
3. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards Office (2012), *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, Vol. 4, pp. 180-191.
4. Olszewska, M. (2005), "Flavonoids from *Prunus serotina* Ehrh", *Acta Pol. Pharm.*, 62 (2), pp. 127-133.
5. Bose S., Maji S., Chakraborty P. (2013), "Quercitrin from *Ixora coccinea* leaves and its antioxidant activity", *J. of Pharma Sci. Tech*. 2 (2), pp. 72-74.
6. Trinh Thi T., Tran Van S., Nguyen Thi H. (2006), "Study on the chemical constituents of *Fissistigma pallens*", *Vietnam J. of Chemistry*, 44 (4), pp. 412-417.