

Nghiên cứu thành phần hóa học hướng tác dụng chống oxy hóa của lá cây vối (*Cleistocalyx operculatus* Roxb.)

Võ Thị Bích Ngọc¹, Phạm Nguyễn Minh Thu^{1*}
Lý Hồng Hương Hạ¹, Võ Văn Lẹo²

¹ Khoa Dược, Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

² Khoa Dược, ĐHY Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

Cleistocalyx operculatus Roxb. (including leaves and buds) have been traditionally used for the treatment of dyspepsia, indigestion, diarrhea, chronic colitis and bacillary dysentery. It's reported that the plant contains essential oil, flavonoids, organic acids such as cinnamic acid, gallic acid and ethylgallat. In foreign countries, the buds have researched on chemical constituents, antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial activities whereas the leaves have been investigated sparingly. In Vietnam, there are not many studies on the chemical compositions and the pharmacological activities of the leaves of this plant. So in this study, we aim to isolate substances for the antioxidant activity on DPPH of the leaves of *C. operculatus*. From the ethyl acetate extract, three substances were obtained and identified: quercetin (81.61 mg), isorhamnetin (56 mg) and kaempferol (62 mg). Based on IC₅₀, antioxidant activities were as follows: quercetin (2.13 µg/ml) > acid ascorbic (2.28 µg/ml) > ethyl acetate extract (2.58 µg/ml) > isorhamnetin (3.22 µg/ml) > kaempferol (3.29 µg/ml). The results can be used to support further chemical and pharmacological studies.

Keywords: *Cleistocalyx operculatus* leaves, bioactive-guided isolation, quercetin, antioxidant, DPPH.

Đặt vấn đề

Vối là một dược liệu (bao gồm lá và nụ vối) được dùng khá phổ biến trong dân gian để làm trà uống thanh nhiệt, giải độc, trợ tiêu hóa, chữa kiết lỵ. Dùng ngoài để rửa mụn nhọt, vết loét. Các nghiên cứu cho thấy cây có thành phần chính là tinh dầu, flavonoid và tannin^[1]. Trên thế giới, về tác dụng nụ vối được nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm nhiễm, kháng vi sinh vật; về hóa học được nghiên cứu về thành phần tinh dầu, flavonoid, terpenoid trong khi đó các công bố về lá vối hầu như còn khá ít^[2]. Ở nước ta hiện cũng rất hiếm công trình nghiên cứu có hệ thống về lá

của cây này. Do đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học hướng tác dụng chống oxy hóa của lá cây vối (*Cleistocalyx operculatus* Roxb.)” để bổ sung các dữ liệu về hóa học và sinh học của cây này, làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Nguyên liệu là lá của cây vối thu hái vào tháng 7/2015 tại Quận Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh. Mẫu dược liệu đã được TS. Võ Văn Chí, nguyên giảng viên Bộ môn Dược liệu, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, xác định tên khoa học là *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry, thuộc họ Sim (Myrtaceae). Mẫu nghiên cứu hiện đang được lưu giữ tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Hóa chất

Ethanol, *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat,

Chịu trách nhiệm: Phạm Nguyễn Minh Thu

Email: phamnguyenminhthud12@gmail.com

Ngày nhận: 18/02/2021

Ngày phản biện: 31/3/2021

Ngày duyệt bài: 22/6/2021

methanol của Hãng Merck, nước cất, DPPH, acid ascorbic (Sigma).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết xuất và phân lập

10 kg lá vối được chiết ngấm kiệt với ethanol 70%, thu được 7 L dịch chiết, cô quay áp suất giảm thu được 1,05 kg cao đậm đặc. Cao được đem pha loãng với nước, chiết phân bố lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat thu được cao *n*-hexan (107,6 g); cao cloroform (118,9 g); cao ethyl acetat (169,1 g).

Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của 4 loại cao chiết: cao *n*-hexan, cao cloroform, cao ethyl acetat và cao nước. Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa giảm dần theo thứ tự là cao ethyl acetat (82,05%) > cloroform (25,38%) > cao nước (24,83%) > cao *n*-hexan (14,63%). Trong số này, cao ethyl acetat là cao có tác dụng mạnh và được chọn để khảo sát tiếp thành phần hóa học.

Từ 70 g cao EtOAc, bằng sắc ký cột với hệ dung môi cloroform – ethyl acetat với tỷ lệ ethyl acetat tăng dần: 100 → (95:5) → (90:10) → (80:20) → ethyl acetat (100%)... thu được 9 phân đoạn:

Từ phân đoạn E8 thu được chất **1**, đặt tên là **CO1** (81,61 mg), là một chất ở dạng bột vô định hình màu vàng đậm. Từ phân đoạn E5 thu được chất **2**, đặt tên là **CO3A** (52 mg), là chất ở dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Từ phân đoạn E3 thu được chất **3**, đặt tên là **CO4** (56 mg), là chất ở dạng bột màu vàng tươi.

Cấu trúc các chất phân lập được xác định bằng phổ **MS** và **NMR** (đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

Khảo sát tác dụng chống oxy hóa

Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa theo cơ chế dập tắt gốc tự do sẽ làm giảm màu của DPPH, xác định khả năng này bằng cách đo quang ở bước sóng 517 nm.

Chuẩn bị

Dung dịch DPPH: Pha dung dịch DPPH 0,5 mM trong methanol; pha xong dùng ngay, đựng trong lọ thủy tinh màu.

Pha dung dịch đối chiếu acid ascorbic nồng độ: 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 µg/ml trong MeOH để xác định IC₅₀ và so sánh kết quả với mẫu thử.

Khảo sát hoạt tính đánh bắt gốc tự do

DPPH của 5 mẫu cao: Toàn phần (TP), *n*-hexan (H), cloroform (C), ethyl acetat (EA), nước (N). Các mẫu cao được pha ở cùng nồng độ 18 µg/ml trong methanol. Nếu mẫu khó tan, trợ tan bằng DMSO với tỷ lệ xác định.

Khảo sát động học: Xác định thời gian phản ứng giữa dung dịch thử và dung dịch DPPH đến khi xảy ra hoàn toàn, độ hấp thụ ổn định.

Mẫu đo: Thực hiện phản ứng trong lọ màu nâu.

Các phản ứng phải thực hiện ở chỗ tối, sau 30 phút đến khi ổn định thì đo quang ở bước sóng 517 nm.

Bảng 1. Cách pha mẫu đo của phương pháp DPPH

Óng	Dung dịch thử (ml)	Dung môi MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)
Trắng	0	4	0
Chứng	0	3,5	0,5
Thử	1	2,5	0,5

Tính toán kết quả: Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của dung dịch thử được tính theo công thức: $HTCO (\%) = [(Abs_{chứng} - Abs_{thử}) / (Abs_{chứng} - Abs_{trắng})] \times 100$

Abs: độ hấp thụ đo được ở 517 nm.

Xác định IC₅₀

IC₅₀ là nồng độ mà tại đó chất thử loại bỏ được 50% gốc tự do DPPH.

Cách tính giá trị IC₅₀: pha một giai mẫu có ít nhất 5 nồng độ, trong đó phải bao hàm nồng độ cho HTCO 50%, vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của HTCO (%) theo nồng độ chất khảo sát bằng phần mềm Excel. Từ đồ thị, suy ra giá trị nồng độ có HTCO 50% tức là IC₅₀ từ phương trình hồi quy tuyến tính có dạng $y = ax + b$ thế $y = 50$ vào để suy ra IC₅₀.

Kết quả thử tác dụng chống oxy hóa của các mẫu theo phương pháp DPPH

Tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các chất tinh khiết phân lập được: cao EtOAc, chất **1**, chất **2**, chất **3**. So sánh IC₅₀ của các mẫu thử với với chất đối chiếu (acid ascorbic).

Kết quả và bàn luận

Xác định cấu trúc các chất phân lập

Chất 1 (CO1)

Phổ **MS**: Phổ **MS** của **CO1** cho mảnh m/z [M-H]⁻ 301, cho biết **CO1** có M = 302 ứng với

công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_7$ ($\Omega = 11$).

Phổ **UV** của **CO1** đo trong MeOH cho λ_{\max} ở 255,4 và 371,9 nm. Đây chính là dạng phổ **UV** điển hình của phân nhóm flavon/ flavonol.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **CO1** có 15 tín hiệu carbon, có δ_{Cmax} 175,8 < 180 ppm nên định hướng đây là một flavonol aglycon đơn giản. Nhận thấy có tất cả 8 C-IV trong vùng trường thấp 135 – 175 ppm; loại trừ vị trí C2, C4, C9; suy ra, **CO1** có 5 nhóm thế oxy cụ thể là 5 nhóm -OH. Trong đó có một nhóm tại vị trí C3.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có tín hiệu δ_{C} 93,3 ppm và δ_{C} 98,1 ppm lần lượt là tín hiệu của C8 và C6. Do đó, C8 và C6 chưa bị thế. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho 1 tín hiệu của -OH phenol có độ dịch chuyển là 12,95 ppm đặc trưng cho 5-OH. Ngoài ra, quan sát thấy có 2 tín hiệu H là δ_{H} 6,40 d (2 Hz) và 6,18 d (2 Hz) kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**, xác định có 2 nhóm -OH tại vị trí C5 và C7 của vòng A. Phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho thấy bộ tín hiệu δ_{H} 7,67 d (2 Hz); 7,53 dd (8,2 Hz); 6,88 d (8 Hz); kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**; xác định 2 nhóm -OH còn lại tại vị trí C3' và C4'.

Vậy sơ bộ kết luận **CO1** là một flavonol gồm 15C, có 5 nhóm OH ở 5 vị trí C3, C5, C7, C3' và C4'. Từ kết quả này và kết quả **MS**, định hướng đây là quercetin. Các dữ liệu của **CO1** đều rất phù hợp với quercetin trong tài liệu tham khảo [3, 4]. Như vậy, có thể khẳng định **CO1** chính là quercetin (bảng 2).

Chất 2 (CO3A)

Phổ **MS**: phổ **MS** của **CO3A** cho mảnh m/z [M-H]⁻ 315, cho biết **CO3A** có M = 316 ứng với công thức phân tử $C_{16}H_{12}O_7$ ($\Omega = 11$)

Phổ **UV** của **CO3A** đo trong MeOH cho λ_{\max} ở 254,2 và 370,7 nm. Đây chính là dạng phổ **UV** điển hình của phân nhóm flavon/ flavonol.

Phổ **NMR** của **CO3A** có 16 tín hiệu carbon, có δ_{Cmax} 175,8 < 180 ppm nên định hướng đây là một flavonol aglycon có 1 nhóm thế. Nhận thấy có tất cả 8 C-IV trong vùng trường thấp 135–175 ppm; loại trừ vị trí C2, C4, C9; suy ra, **CO3A** có 5 nhóm thế oxy. Trong đó có 1 nhóm tại vị trí C3.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có tín hiệu δ_{C} 93,5 ppm và δ_{C} 98,1 ppm lần lượt là tín hiệu của C8 và C6. Do đó, C8 và C6 chưa bị thế. Phổ ^1H cho 1 tín hiệu của -OH phenol có độ dịch chuyển là 12,45 ppm đặc trưng cho 5-OH. Ngoài ra, quan sát thấy có 2 tín hiệu H là δ_{H} 6,47 d (2 Hz), 1H

và 6,19 d (2 Hz), 1H kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**, xác định có 2 nhóm -OR tại vị trí C5 và C7 của vòng A. Phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho thấy bộ tín hiệu δ_{H} 7,75 d (2 Hz), 1H; 7,68 dd (8,5; 2,0 Hz), 1H; 6,94 d (8,5 Hz), 1H; kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**; xác định 2 nhóm -OR còn lại tại vị trí C3' và C4'.

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có tín hiệu δ_{C} 55,7 ppm và phổ $^1\text{H-NMR}$ cho tín hiệu δ_{H} 3,84s, 3H, đây là tín hiệu của nhóm methoxy -OCH₃; kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**, xác định nhóm -CH₃ gắn vào vị trí C3'.

Vậy, sơ bộ kết luận **CO3A** là một flavonol gồm 16 C, có 4 nhóm OH ở 5 vị trí C3, C5, C7, và C4' và 1 nhóm -OCH₃ ở vị trí C3'. Từ kết quả này và kết quả **MS**, định hướng đây là isoharmnetin. Các dữ liệu của **CO3A** đều rất phù hợp với isoharmnetin trong tài liệu tham khảo [3, 5]. Như vậy, có thể khẳng định **CO3A** là isoharmnetin (bảng 2).

Chất 3 (CO4)

Phổ **MS**: phổ **MS** của **CO4** cho mảnh m/z [M-H]⁻ 285, cho biết **CO4** có M = 286 ứng với công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_6$ ($\Omega = 11$).

Phổ **UV** của **CO4** đo trong MeOH cho λ_{\max} ở 264,9 và 367,1 nm. Đây chính là dạng phổ **UV** điển hình của phân nhóm flavon/ flavonol.

Phổ **NMR** của **CO4** có 15 tín hiệu Carbon, có δ_{Cmax} 175,8 < 180 ppm nên định hướng đây là một flavonol aglycon đơn giản. Nhận thấy có tất cả 7 C-IV trong vùng trường thấp 135–175 ppm; loại trừ vị trí C2, C4, C9; suy ra, **CO4** có 4 nhóm thế oxy cụ thể là 4 nhóm -OH. Trong đó có 1 nhóm tại vị trí C3. Ngoài ra tại vùng δ_{C} 100-135 ppm, có 2 tín hiệu C đối xứng, khoảng cách giữa 2 tín hiệu đối xứng này là 14,06 ppm, nên có thể kết luận có 1 nhóm -OH tại vị trí C4'. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có tín hiệu δ_{C} 93,4 ppm và δ_{C} 98,1 ppm lần lượt là tín hiệu của C8 và C6. Do đó, C8 và C6 chưa bị thế. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho 1 tín hiệu của -OH phenol có độ dịch chuyển là 12,47 ppm đặc trưng cho 5-OH. Ngoài ra, quan sát thấy có 2 tín hiệu H là δ_{H} 6,43 d (2 Hz), 1H và 6,19 d (2 Hz), 1H; kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**, xác định có 2 nhóm -OH tại vị trí C5 và C7 của vòng A. Phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho thấy bộ tín hiệu δ_{H} 8,04 d (9 Hz), 2H; 6,92 d (9 Hz), 2H; kết hợp với phân tích dữ liệu **HMBC**; xác định có 2 C đối xứng ở vị trí lần lượt là C2', C6' và C3', C5'.

Vậy sơ bộ kết luận **CO4** là một flavonol

Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của các chất phân lập

Các chất tinh khiết phân lập từ cao ethyl acetat có H₂O₂ giảm dần theo thứ tự quercetin (IC₅₀ = 2,13 µg/ml) > isoharmnetin (IC₅₀ = 3,22 µg/ml) và kaempferol (IC₅₀ = 3,29 µg/ml). Trong đó quercetin có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn cao EA (IC₅₀ = 2,58 µg/ml) và mạnh hơn so với chất đối chiếu acid ascorbic (IC₅₀ = 2,28 µg/ml). Hai chất còn lại isoharmnetin và kaempferol đều có hoạt tính chống oxy hóa kém hơn cao ethyl acetat và acid ascorbic.

Kết luận

Từ phân đoạn cao ethyl acetat từ lá của cây với *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry thu mua tại Quận Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh đã phân lập và xác định được 3 flavonoid là quercetin, isoharmnetin và kaempferol.

Nghiên cứu này cho thấy quercetin có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với IC₅₀ = 2,13 µg/ml; mạnh hơn so với chất đối chiếu acid ascorbic (IC₅₀ = 2,28 µg/ml). Hai chất còn lại isoharmnetin (IC₅₀ = 3,22 µg/ml) và kaempferol (IC₅₀ = 3,29 µg/ml) đều có hoạt tính chống oxy hóa và kém hơn so với chất đối chiếu acid ascorbic.

Tài liệu tham khảo

1. Zang Fengxian and Liu Meifang (1990), "Studies on the chemical constituents from the bud of *Cleistocalyx operculatus*", *Acta Botanica*, 32 (6), pp. 469 – 472.
2. Min B. S., Thu C. V., Dat N. T., Dang N. H., Jang H. S., Hung T. M. (2008), "Antioxidative flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* buds", *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 56 (12), pp. 1725 – 1728.
3. Rune Slimestad (2007), "Reviews on onions: A source of unique dietary flavonoids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 10067 – 10080.
4. Young Hae Choi, Hye Kyong Kim, Huub J. M. Linthorst, Johan G. Hollander, Alfons W. M. Lefeber, Cornelis Erkelens, Jean-Marc Nuzillard, Robert Verpoorte (2006), "NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves", *The American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*, pp. 742 – 748.
5. Eunjung Lee, Byoung-Ho Moon, Younghee Park, Sungwon Hong, Sunhee Lee, Younggiu Lee, and Yoongho Lim (2008), "Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols", *Division of Bioscience and Biotechnology*, pp. 507 – 509.