

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXI CỦA CAO CHIẾT AXETAT ETYL CÂY VÀNG TRÂU *JASMINUM UNDULATUM* KER-GAWL.

Trần Thị Anh⁽¹⁾, Nguyễn Thanh Bình⁽¹⁾, Hồ Thị Cẩm Hoài⁽¹⁾,

Bùi Đặng Thiên Hương⁽²⁾, Nguyễn Thị Thanh Mai⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG Tp HCM

(2) Viện Vệ Sinh Y Tế Công Cộng Tp HCM

(Bài nhận ngày 05 tháng 03 năm 2010, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 25 tháng 10 năm 2011)

TÓM TẮT: Từ cao tổng etanol thu được từ thân và lá của cây vàng trầu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. thu được 5 cao chiết tương ứng bằng phương pháp trích phân bố lần lượt với các dung môi eter dầu hỏa, cloroform, etyl axetat và n-butanol. Các cao chiết sau đó được tiến hành thử hoạt tính kháng oxi hóa bằng phương pháp bẫy gốc tự do DPPH[•] và phương pháp ức chế gốc tự do NO[•]. Ngoài trừ cao chiết eter dầu hỏa, các cao còn lại đều thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa. Trong đó, cao etyl axetat thể hiện hoạt tính cao nhất trên cả hai phương pháp thử nghiệm với giá trị SC₅₀ thu được tương ứng là 5.30 µg/ml và 80.90 µg/ml. Nghiên cứu tiếp theo trên 8 phân đoạn cao TE2-9 phân lập được từ cao etyl axetat cho thấy, phân đoạn TE6 có hoạt tính kháng oxi hóa hiệu quả nhất với giá trị SC₅₀ là 3.15 µg/ml và 61.83 µg/ml trong phương pháp bẫy gốc tự do DPPH[•] và phương pháp ức chế gốc tự do NO[•]. Từ hai phân đoạn có hoạt tính cao TE4 và TE6, chúng tôi đã cô lập được ba hợp chất, bao gồm p-Tyrosol (1), axit Protocatechuic (2) và Hydroxytyrosol (3). Cấu trúc của các hợp chất trên được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại IR, MS, LC-MS, 1D-NMR, và 2D-NMR.

Từ khóa: vàng trầu, *Jasminum undulatum* Ker-Gawl., DPPH, gốc tự do NO[•], cao etyl axetat.

GIỚI THIỆU

Trong số rất nhiều cây thuốc có tác dụng chữa bệnh thì “vàng trầu”, tên khoa học là *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. hoặc *Jasminum amplexicaule* Buch.-Ham, trong dân gian được sử dụng chủ yếu để kháng khuẩn, kháng nấm, trị ghê lở, ung nhọt, làm lành vết thương...

Phương pháp ức chế gốc tự do DPPH[•] là một phương pháp được sử dụng phổ biến trong những nghiên cứu về hoạt tính kháng oxi hóa

của các dược liệu vì tính đơn giản, nhanh chóng, ổn định và khá chính xác. Tuy nhiên, phương pháp này có độ chọn lọc không cao, và hầu như không có ý nghĩa cụ thể trong việc khảo sát khả năng điều trị của dược phẩm trên một bệnh xác định. Ngược lại, phương pháp bẫy gốc tự do NO[•], thông qua khảo sát sự thay đổi nồng độ NO[•] khi có và khi không có mặt của chất chống oxi hóa, lại đặc biệt có độ chọn lọc cao, chỉ cho kết quả đối với các đối tượng có khả năng bắt gốc tự do NO[•]. Vì gốc tự do NO[•] được chứng minh là liên quan đến các

bệnh thoái hóa thần kinh như: Alzheimer, Parkinson,.. Do đó, việc thử hoạt tính bẫy gốc tự do NO^\bullet là một chỉ tiêu quan trọng trong việc xác định khả năng phòng ngừa cũng như điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh của dược liệu khảo sát.

Hiện nay, trong và ngoài nước chưa có nhiều công trình nghiên cứu về vàng trâu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. Vì thế, bằng các phương pháp thử nghiệm hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] và ức chế gốc tự do NO^\bullet , chúng tôi tiến hành nghiên cứu hoạt tính kháng oxy hóa của loài này, đồng thời tìm hiểu luôn thành phần hóa học của các cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa của cây vàng trâu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl.

THỰC NGHIỆM

Hóa chất – thiết bị

Các dung môi hữu cơ eter dầu hỏa (Ed), etyl axetat (EA), cloroform, axeton (Ac), etanol, n-butanol đều được chưng cất lại trước khi sử dụng; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Merck); quercetin, sodium nitroprusside, sulfanilamide, và N-1-naphthylethylenediamine (Sigma.)

Sắc kí bản mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silicagel (Merck, Silicagel 60F₂₅₄, 250 μm) và silicagel pha đảo RP-18 (Merck RP₁₈, 250 μm).

Sắc kí cột được thực hiện trên silicagel (Scharlau, Silicagel 60A, 40-60 μm).

Phổ NMR, MS và NMR đều được đo tương ứng trên máy Bruker – Advance – 500Hz, LC-MS DIP 395 và Bruker Equinox 55

tại Phòng Phân Tích Trung Tâm, Đại học Khoa Học Tự Nhiên TpHCM.

Sàng lọc hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•]

Chúng tôi tiến hành sàng lọc hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] theo quy trình của Pramote^[1]. Gốc tự do DPPH[•] là một gốc tự do bền, do sự bất định xứ của đơn điện tử chưa liên kết (điện tử này nằm trong hệ thống liên hợp rộng khắp gốc tự do DPPH[•]). Dung dịch gốc tự do DPPH[•] trong ethanol cho phổ hấp thụ cực đại ở bước sóng khoảng 517 nm. Khi dung dịch gốc tự do DPPH[•] được trộn với hợp chất có khả năng cho nguyên tử hydro, tạo ra sản phẩm khử là phân tử DPPH cùng với sự mất màu tím của hỗn hợp phản ứng. Do đó, nguyên tắc thực hiện phương pháp này là cho chất kháng oxy hóa cần khảo sát tác dụng với gốc tự do DPPH[•] như một tác chất, sau đó theo dõi sự thay đổi độ hấp thụ ở 517 nm, hoặc tốc độ mất màu của hỗn hợp, qua đó đánh giá hoạt tính của chất chống oxy hóa đó.

Tiến hành pha dung dịch DPPH[•] 100 μM và dung dịch làm việc của các mẫu cao có nồng độ 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (500 ppm). Sử dụng quercetin làm chất đối chứng dương. Khảo sát trên 5 cao chiết và 8 phân đoạn cao etyl axetat để xem xét hoạt tính kháng oxy hóa của chúng.

Sàng lọc hoạt tính ức chế gốc tự do NO^\bullet (nitric oxide)^[1]:

Mỗi mẫu được thử ở 4 nồng độ 200, 100, 50 và 25 $\mu\text{g/ml}$; mỗi nồng độ được thực hiện 3 lần. Hỗn hợp phản ứng bao gồm V_1 (μl) dung dịch mẫu (test solution), V_2 (μl) đệm phosphat pH=7.4 và 750 μl natri nitroprussid 10 mM sao

cho tổng thể tích có được là 1500 μ l. Hỗn hợp được ủ tại 25⁰C trong 180 phút. Sau đó 1500 μ l thuốc thử Greiss được thêm vào và hỗn hợp tiếp tục được ủ tại 25⁰C trong 15 phút. Mẫu được đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 540 nm.

Khả năng ức chế gốc tự do NO[•] được xác định thông qua phần trăm ức chế I (%) được tính toán theo công thức sau:

$$I(\%) = [(A_c - A_s) / A_c] * 100$$

Với A_c: giá trị mật độ quang của mẫu trắng (không có cao trích – blank control), A_s: giá trị mật độ quang của dung dịch có mẫu cao (sample), mẫu control: thay V₁ (μ l) mẫu cao bằng đệm phosphat pH=7.4.

Ly trích và cô lập hợp chất tinh khiết

Cành và lá vằng trâu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. được thu hái tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị vào tháng 9/2005, sau đó phơi khô và xay nhỏ thành bột. Cao tổng (cao EtOH) thu được bằng phương pháp ngâm dầm bột vằng trâu trong etanol tinh khiết. Từ cao tổng tiến hành chiết lỏng-lỏng với các dung có độ phân cực khác nhau để thu được: cao eter dầu hỏa (TP), cao CHCl₃ (TC), cao axetat etyl (TE), cao n-butanol (TB) và nhựa (TN). Việc đuổi dung môi được thực hiện ở áp suất kém, nhiệt độ < 50 °C bằng máy cô quay và bình hút ẩm.

Tiến hành phương pháp sắc kí cột (SKC) silicagel 27g cao TE với hệ dung môi giải ly là CHCl₃:MeOH và tăng dần độ phân cực. Thu được 9 phân đoạn bao gồm TE1 (235 mg), TE2 (75 mg), TE3 (272 mg), TE4 (900 mg), TE5 (703 mg), TE6 (6.20 g), TE7 (5.52 g), TE8

(3.17 g) và TE9 (2.08 g). Tiếp theo, tiến hành khảo sát phân đoạn cao TE4 và TE6. Đối với TE4, dùng SKC với hệ dung môi Ed:EA và tăng dần độ phân cực, thu được 110 mg hợp chất (1) sau khi rửa lại bằng axeton lạnh. Từ phân đoạn TE6, SKC với hệ dung môi như trên, rồi rửa lại phân đoạn TE6.34 bằng CHCl₃ thu được hợp chất (2) (22 mg); gom các phân đoạn TE6.36 → TE6.40 rồi tiến hành SKC 3 lần bằng hệ dung môi giải ly CHCl₃:MeOH, được 21 mg hợp chất (3).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính sinh học

Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH[•]

Các kết quả khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH[•] của năm mẫu cao trích và các phân đoạn được ghi nhận trong bảng 1. Kết quả cho thấy trong số năm cao trích của cây vằng trâu, ngoại trừ cao eter dầu hỏa TP có hoạt tính bắt gốc tự do kém ($SC_{50} > 20 \mu\text{g mL}^{-1}$), các cao trích khác đều thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa mạnh với các giá trị SC_{50} đều nhỏ hơn $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, trong đó cao etyl axetat TE có khả năng bắt gốc tự do DPPH[•] cao nhất với giá trị SC_{50} tương ứng là $5.30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vì vậy, cao TE được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo trên hoạt tính kháng oxy hóa cũng như thành phần hóa học. Trong số 8 phân đoạn của cao axetat etyl TE2-9 được thử nghiệm hoạt tính bắt gốc tự do DPPH[•], ngoại trừ hai phân đoạn TE2 và TE3, sáu phân đoạn TE4-9 đều thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do tương đương hoặc cao hơn cao axetat etyl ban đầu, trong đó phân đoạn cao

TE6 có hoạt tính bẫy gốc tự do cao nhất với giá trị SC_{50} tương ứng là $3.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] của các cao và phân đoạn cao

Cao	SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	Phương pháp bẫy gốc tự do DPPH [•]	Phương pháp ức chế gốc tự do NO [•]
Eter dầu hòa TP	> 100	> 200
Cloroform TC	15.64	>200
Axetat etyl TE	5.30	80.90
n-butanol TB	17.39	165.80
Nhựa TN	6.15	105.30
TE2	30.39	-
TE3	14.05	-
TE4	6.23	92.70
TE5	3.31	82.33
TE6	3.15	61.83
TE7	4.61	89.69
TE8	5.04	82.28
TE9	4.51	>200
Quercetin	1.21	5.86

Hoạt tính ức chế gốc tự do NO[•]

Các kết quả khảo sát khả năng ức chế gốc tự do NO[•] của 5 mẫu cao trích và các phân đoạn (trừ TE2 và TE3 có hoạt tính kém trên test DPPH[•] nên không được khảo sát) được ghi nhận trong bảng 1. Các kết quả thu được cho thấy trong số các cao trích, cao TE có khả năng bẫy gốc tự do NO[•] cao nhất với giá trị SC_{50} tương ứng là $80.90 \mu\text{g mL}^{-1}$. Còn trong số các phân đoạn thì sáu phân đoạn TE4-9 đều thể hiện hoạt tính ức chế gốc tự do NO[•] tương đương hoặc cao hơn cao etyl axetat ban đầu trong đó phân đoạn TE6 là phân đoạn có hoạt tính ức chế mạnh nhất đối với gốc tự do NO[•]

với giá trị SC_{50} tương ứng là $61.83 \mu\text{g mL}^{-1}$ (bảng 1).

Nhận xét

Từ các kết quả thu được trên cả hai phương pháp bẫy gốc tự do DPPH[•] và ức chế gốc tự do NO[•], chúng tôi nhận thấy độ mạnh tương đối của hoạt tính kháng oxy hóa của các cao trích từ cây *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. là khá thống nhất trên cả hai test hoạt tính. Ví dụ xếp theo độ mạnh giảm dần trên hoạt tính kháng oxy hóa của cả hai phương pháp đều theo thứ tự cao etyl axetat TE > cao nhựa TN > cao n-butanol TB; hay sáu phân đoạn TE4-9 đều thể hiện hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] và ức chế

gốc tự do NO[•] tương đương hoặc cao hơn cao axetat etyl ban đầu, trong đó phân đoạn TE6 luôn là phân đoạn có hoạt tính mạnh nhất trong cả hai phương pháp test đã sử dụng.

Chúng tôi cũng nhận thấy, những cao nào không có hoặc có hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] yếu thì cũng thể hiện tương tự trên hoạt tính ức chế gốc tự do NO[•] (các cao TP, TC, TB). Tuy nhiên, những cao trích có hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•] mạnh chưa hẳn có hoạt tính ức chế mạnh đối với gốc tự do NO[•]. Ví dụ phân đoạn TE9, hoạt tính bẫy DPPH[•] rất mạnh ($SC_{50} = 4.51 \mu\text{gmL}^{-1}$), nhưng hoạt tính bẫy NO[•] lại kém ($SC_{50} > 200 \mu\text{gmL}^{-1}$). Điều này cho thấy phương pháp thử trên hoạt tính ức chế gốc tự do NO[•] có độ chọn lọc cao hơn phương pháp thử trên hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH[•].

Ngoài ra, kết quả khảo sát hoạt tính cho thấy, cao axetat etyl TE có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất trong số các cao chiết ban đầu là tương tự với kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi [2] trên các cao chiết của cây vằng sè *Jasminum subtriplinerve* Blume, là cây vẫn được sử dụng lẫn lộn trong dân gian cùng với vằng trầu.

Từ sự tương quan giữa các kết quả có được, chúng tôi mạnh dạn khẳng định rằng các kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa mà

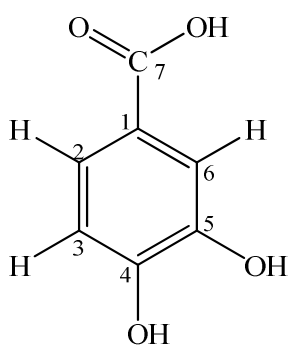
chúng tôi thu được là đáng tin cậy. Do vậy, quy trình sàng lọc sơ bộ dựa trên các phương pháp test này là hợp lý và hiệu quả.

Cấu trúc các hợp chất

Tiến hành phân tích cấu trúc và so sánh với các tài liệu tham khảo, chúng tôi xác định hợp chất (1) là *p*-tyrosol [3], hợp chất (2) là axit protocatechuic [4], và hợp chất (3) là hydroxytyrosol [5].

p-Tyrosol (1)

Tinh thể màu trắng, $t_{nc}^{\circ} = 91 - 92^{\circ}\text{C}$, tan nhẹ trong nước, tan tốt trong axeton và MeOH. Là hợp chất được tìm thấy nhiều trong dầu ô liu và Giovannini cùng các cộng sự [6] cho thấy hợp chất này có khả năng bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân oxy hóa. Vì tyrosol làm tăng tổng hàm lượng chất kháng oxy hóa trong não nên nó có được sử dụng để điều trị các bệnh về thoái hóa thần kinh như Parkinson và Alzheimer [9]. **ESI/MS:** [M-H]⁻: $m/z = 137$. **IR** (KBr): 3396, 3155, 1599, 1513, 1239, 1053, 819, 556 cm^{-1} . **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃OD-d₄) $\delta(\text{ppm})$: 2.71 (2H, t, $J=7\text{Hz}$, H-2); 3.68 (2H, t, $J=7\text{Hz}$, H-1); 6.70 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-3'); 7.02 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-2'). **¹³C-NMR** (500 MHz, CD₃OD-d₄) $\delta(\text{ppm})$: 64.61 (C-1); 39.43 (C-2); 131.04 (C-1'); 116.14 (C-3', C-5'); 130.89 (C-2', C-6'); 156.78 (C-4').



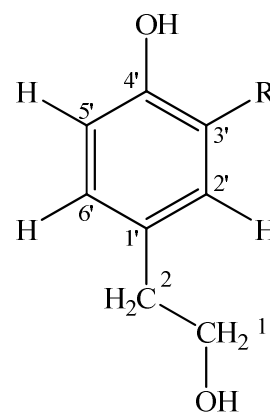
Axit protocatechuic (2)

Axit protocatechuic (2)

Tinh thể hình kim màu trắng, $t_{nc}^{\circ} = 200 - 202^{\circ}\text{C}$, là thành phần có nhiều trong rau quả. Lin và các cộng sự [7] chỉ ra rằng, hợp chất này có khả năng ngăn ngừa ung thư hoặc sự phát triển của khối u trong thử nghiệm *in vivo*. **ESI/MS:** [M-H]⁻: m/z = 153. **IR** (KBr): 3669, 3231, 2927, 1691, 1613, 1345, 1265, 767 cm^{-1} . **¹H-NMR** (500 MHz, Axetone-d₆) δ (ppm): 6.88 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-5); 7.45 (1H, dd, $J = 8; 2\text{Hz}$, H-6); 7.51 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-2). **¹³C-NMR** (500 MHz, Axetone-d₆) δ (ppm): 122.78 (C-1); 117.09 (C-2); 145.30 (C-3); 150.43 (C-4); 115.28 (C-5); 123.11 (C-6); 167.52 (C-7).

Hydroxytyrosol (3)

Chất vô định hình trong suốt, có nhiều trong dầu ô liu và có hoạt tính kháng oxi hóa cao [5]. Nghiên cứu của Visioli F. [8] đã chỉ ra rằng, chỉ với một lượng nhỏ hydroxytyrosol cũng có thể làm giảm quá trình stress oxi hóa trên chuột. Hợp chất này cũng được chứng minh là chất ức chế oxidase monoamin



R
H
OH **p-Tyrosol (1)**
Hydroxytyrosol (3)

(MAOI), là một chất ức chế dùng trong điều trị bệnh Parkinson [9]. **ESI/MS:** [M-H]⁻: m/z = 153. **IR** (KBr): 3336, 2951, 1606, 1284, 1046, 812, 629 cm^{-1} . **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃OD-d₄) δ (ppm): 2.66 (2H, t, $J = 7\text{Hz}$, H-2); 3.67 (2H, t, $J = 7\text{Hz}$, H-1); 6.65 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-2'); 6.67 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-5'); 6.52 (1H, dd, $J = 8; 2\text{Hz}$, H-6'); **¹³C-NMR** (CD₃OD) δ (ppm): 64.74 (C-1); 39.77 (C-2); 131.90 (C-1'); 117.08 (C-2'); 146.26 (C-3'); 144.44 (C-4'); 116.44 (C-5'); 121.36 (C-6').

4. KẾT LUẬN

Trong các cao chiết của cây vàng trâu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl. thì cao etyl axetat là cao chiết có hoạt tính mạnh nhất cả trên đối tượng gốc tự do DPPH[•] lẫn gốc tự do NO[•], với các giá trị SC_{50} lần lượt là 5.30 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ và 80.90 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Trong số 8 phân đoạn cao TE2-9 phân lập được từ cao axetat etyl, phân đoạn TE6 là phân đoạn có hoạt tính kháng oxi hóa hiệu quả nhất với giá trị SC_{50} tương ứng là 3.15 $\mu\text{g/ml}$ và 61.83 $\mu\text{g/ml}$ trên hai phương

pháp bẫy gốc tự do DPPH[•] và ức chế gốc tự do NO[•].

Từ 2 phân đoạn TE4 và TE6, 3 hợp chất hữu cơ đã được cô lập và nhận danh là là *p*-

tyrosol(1), axit protocatechuic (2) và hydroxytyrosol(3). Đây là những hợp chất có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh và lần đầu tiên cô lập được từ cây vàng trâu *Jasminum undulatum* Ker-Gawl.

ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES AND CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE ETHYL ACETATE EXTRACT FROM *JASMINUM UNDULATUM* KER-GAWL

Tran Thi Anh⁽¹⁾, Nguyen Thanh Binh⁽¹⁾, Ho Thi Cam Hoai⁽¹⁾,
Bui Dang Thien Huong⁽²⁾, Nguyen Thi Thanh Mai⁽¹⁾

(1) University of Science, VNU-HCM

(2) Institute of Hygiene and Public Health of HCM city

ABSTRACT: From the total crude ethanol extract of *Jasminum undulatum* Ker Gawl.'s leaves and stems, five fractions were obtained by partitioning with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol solvents. These five fractions were investigated for antioxidative activity using the DPPH radical scavenging and nitric oxide-inhibitory assay. All the fractions showed antioxidative activity except the petroleum ether fraction. Among the fractions, the ethyl acetate fraction was the most potent fraction in both assays with the SC_{50} values of 5.30 $\mu\text{g/ml}$ and 80.90 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Further investigation on the eight sub-fractions isolated and extracted from the ethyl acetate fraction showed that one of these sub-fractions, the TE6 sub-fraction, showed the most significant antioxidative activity with the SC_{50} values of 3.15 $\mu\text{g/ml}$ and 61.83 $\mu\text{g/ml}$ respectively in the DPPH radical scavenging and nitric oxide-inhibitory assay. From the TE4 and TE6 sub-fractions, three compounds were isolated, including *p*-tyrosol (1), protocatechuic acid (2) and hydroxytyrosol (3). The structure of those compounds were elucidated by spectrometric methods IR, MS, 1D-NMR, and 2D-NMR.

Keyword: *Jasminum, undulatum, antioxidative, ethyl acetate extract, bioactivity.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Pramote Mahakunakorn. Study on the antioxidant and free radical – scavenging activities of a traditional

Kampo medicine, Choto – san, and its related constituents, PhD Thesis, Osaka Univ., (2003).

[2]. Đái Huệ Ngân. Khảo sát sơ bộ hoạt tính sinh học và thành phần hoá học của cây vàng sè *Jasminum*

- subtriplinerve Blume., Luận văn cao học, ĐH KHTN TPHCM, (2008).
- [3]. Hao Chen, Masaki Fujita, Qinghua Feng, Jon Clardy, and Gerald R. Fink. Tyrosol is a quorum – sensing molecule in *Candida albicans*, *PANS*, **101**, 5048-5052, (2004).
- [4]. Gutzeit D., Wray V., Winterhalter P., Jerz G.. Preparative Isolation and Purification of Flavonoids and Protocatechuic Acid from Sea Buckthorn Juice Concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Chromatographia*, **65**, 1-7, (2007).
- [5]. Stefania D'Angelo, Caterina Manna, Valentia Migliardi, Orazio Mazzoni, Patriziar Morrica, Givanio Capasso, Gabriel Pontoni, Patrizia Galletti, Vincenzo Zappia. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, *Drug Metabol. Dispos.*, **29**, 1492-1498, (2001).
- [6]. Giovannini C., Straface E., Modesti D., Coni E., Cantafora A., De Vincenzi M., Malorni W., Masella R.. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 129 (7), 1269–1277, (1999).
- [7]. Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ.. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *Int J Cancer*, 120 (11), 2306–2316, (2007).
- [8]. Visioli F, Galli C, Plasmati E, *et al.*. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress, *Circulation*, 102 (18), 2169–2171, (2000).
- [9]. Geelings et al.. Natural products and derivatives thereof for protection against neurodegenerative diseases, *SureChem*, (2003).