

MỘT SỐ HỢP CHẤT ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RAU MÁ (*Centella asiatica* (L.) Urb.-Apiaceae) THU HÁI Ở THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Thị Hoài, Đặng Thị Thảo Trang
Khoa Dược – Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học một số flavonoid chiết xuất từ rau má *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Rau má được thu hái tại huyện Phong Điền - Tỉnh Thừa Thiên Huế. Chiết xuất phân lập bằng phương pháp chiết rắn lỏng và các phương pháp sắc ký phối hợp. Xác định cấu trúc căn cứ vào tính chất vật lý và các số liệu phổ của các hợp chất phân lập được. **Kết quả:** Từ loài rau má - *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae thu hái ở Phong Điền -Thừa Thiên Huế đã phân lập được 2 chất tinh khiết. Căn cứ vào phổ UV, IR, MS, NMR đã nhận dạng các hợp chất này là Quercetin và Kaempferol.

Abstract

SEVERAL COMPOUNDS ISOLATED FROM *CENTELLA ASIATICA*

Nguyen Thi Hoai, Dang Thi Thao Trang

Objectives: Research on extraction, isolation and structural determination of several chemical flavonoids extracted from *Centella asiatica* (L.) URB. - Apiaceae. **Materials and method:** *Centella asiatica* is collected in Phong Dien district - Thua Thien Hue. Extracts isolated by solid-liquid extraction and chromatography coordination. Structure determination based on the physical properties and spectral data. **Results:** From species *Centella asiatica* (L.) URB. - Apiaceae collected at Phong Dien, Thua Thien Hue has isolated two pure substances. Based on UV spectrum, IR, MS, NMR identified the compound as Quercetin and Kaempferol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam cũng như nhiều nước trên thế giới, việc sử dụng cây cỏ làm thuốc đã trở thành tập quán từ lâu đời. Rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb.) họ Hoa tán (*Apiaceae*) là cây mọc hoang và được trồng khá phổ biến ở Việt Nam để làm rau ăn và làm thuốc. Rau má được sử dụng để phòng và chữa trị rất nhiều căn bệnh như: các bệnh về gan (xơ gan, hạn chế phát triển khối u ở gan, cải thiện chức năng gan), làm lành vết thương, hạ huyết áp, thanh nhiệt, giải độc, thông tiểu, các trường hợp vàng da, sốt nóng, mụn nhọt, sởi, mẩn ngứa, thổ huyết, viêm họng, viêm phế quản, viêm đường tiết niệu... [2], [3], [4]. Ngày nay

không chỉ thu hái từ cây mọc hoang, rau má đã được trồng như một cây nông nghiệp mang lại nhiều giá trị về kinh tế. Hiện nay ở trên địa bàn huyện Phong Điền - tỉnh Thừa Thiên Huế rau má đang là cây trồng nông nghiệp mang lại nguồn lợi thu nhập cho người dân. Thông báo này là kết quả về quá trình chiết xuất, phân lập và nhận dạng cấu trúc các flavonoid từ Rau má - *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae thu hái tại ở Phong Điền -Thừa Thiên Huế.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Rau má thu hái ở huyện Phong

Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế. Rau má được rửa sạch, thái nhỏ, phơi, sấy khô, sau đó nghiền thành bột thô và bảo quản ở nơi khô thoáng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Chiết xuất phân đoạn bằng các phương pháp chiết lỏng - lỏng, rắn - lỏng.

- Phân lập các chất bằng sắc ký cột silicagel pha thường (0,040-0,063mm, Merck), Sephadex LH 20. Theo dõi các phân đoạn bằng SKLM pha thường (DC - Alufolien 60G F₂₅₄ - Merck, ký hiệu 105715). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch AlCl₃ 3%/ethanol và H₂SO₄ 10%/ethanol.

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ bao gồm: điểm chảy, phổ tử ngoại, phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT) và 2 chiều (HMQC và HMBC). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân đo trên máy Bruker Avance AM500 FT-NMR tại Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất chuẩn nội là tetramethyl silan.

3. KẾT QUẢ

3.1. Quy trình chiết xuất

100g bột Rau má khô được thấm ẩm bằng

100ml cồn 90° trong 1 giờ cho trương nở hoàn toàn, sau đó cho vào bình cầu thể tích 2000ml với ống sinh hàn hồi lưu. Thêm 1000ml cồn 90° (ngập được liệu), đun sôi trong 1 giờ. Lọc nóng, lấy dịch chiết trong, bã còn lại được tiếp tục chiết thêm 2 lần nữa. Gộp toàn bộ dịch chiết, đem thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Phân tán cân bằng nước cất rồi chuyển vào bình chiết. Chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi: Cloroform, Ethylacetat, n-Butanol. Đối với mỗi dung môi tiến hành lắc nhiều lần (khoảng 5 lần) cho đến khi dịch chiết không màu.

Từ phân đoạn Ethylacetat sau khi cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được hỗn hợp cân A.

Phân tích cân A bằng SKLM:

* Dịch chấm sắc ký: Hoà tan hoàn toàn một ít cân A trong Metanol.

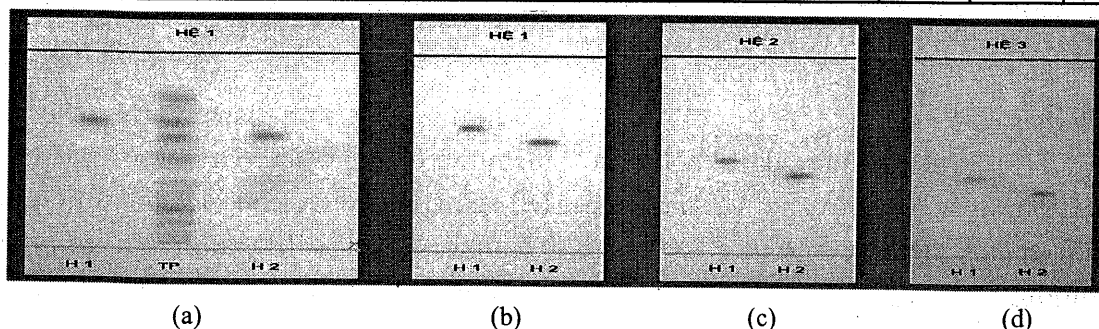
* Tiến hành sắc ký:

Dùng bản mỏng trắng sẵn Silicagel 60 F₂₅₄ của hãng Merck được hoạt hoá ở 110°C trong 1 giờ. Sắc ký được triển khai với hệ dung môi: Toluene- Ethylacetat- Acid formic (5: 7: 1). Hiện màu các vết chất bằng dung dịch AlCl₃ 3% / ethanol và soi huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại với λ=254 nm.

Kết quả cho thấy hỗn hợp cân A có 11 vết trong hệ sắc ký phân tích

Bảng 1: Kết quả phân tích hỗn hợp cân A bằng SKLM

Vết số	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Đậm độ	++	+	+	+++	+	+	+	+++	+++	+	++
R _f	0.02	0.07	0.13	0.20	0.27	0.32	0.45	0.55	0.63	0.70	0.75
Màu sắc	vàng đậm	vàng nhạt	vàng nhạt	vàng đậm	vàng nhạt	vàng nhạt	vàng nhạt	vàng đậm	vàng đậm	vàng nhạt	vàng đậm



Hình 1: Sắc ký đồ phân tích

Ghi chú: H1, H1: là ký hiệu 2 hợp chất đã phân lập được

TP: là cao chiết toàn phần

Phân lập flavonoid:

Cẩn A được triển khai qua sắc ký cột silicagel pha thường hệ dung môi khai triển $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (5:1) thu được 5 phân đoạn kí hiệu A₁-A₅. Phân đoạn A₃ được lựa chọn để tiếp tục phân tích. Hoà tan hoàn toàn A₃ trong 1 lượng tối thiểu Metanol tuyệt đối. Dung dịch đậm đặc này được khai triển qua cột Sephadex LH20, với dung môi đẩy là Metanol 80%. Hứng lần lượt vào 100 ống nghiệm, mỗi ống khoảng 2 ml. Kiểm tra thành phần flavonoid trong các ống bằng sắc ký lớp mỏng, với thuốc thử hiện màu là dung dịch AlCl_3 3%/ Ethanol. Gộp dịch rửa giải ở các ống nghiệm có số vết chất giống nhau. Bốc hơi dung môi.

* Kết quả cho thấy phân đoạn từ 50-55 (phân đoạn I) và phân đoạn từ 75-85 (phân đoạn II) chỉ có một vết chất trên sắc ký đồ trong các hệ dung môi khai triển (hình 1b,c,d):

Hệ 1: Toluen : Ethylacetat : Acid formic (5 : 7 : 1)

Hệ 2: Toluen : Ethylacetat : Aceton : Acid formic (5 : 2 : 2 : 1)

Hệ 3: Ete dầu : Etanol : Acid formic (16 : 7 : 2)

Chất thu được từ phần đoạn I ký hiệu H2. H2 có giá trị R_f và màu sắc tương tự vết số 8 trong hỗn hợp flavonoid (Hình 1a).

Chất thu được từ phần đoạn II ký hiệu H1. H1 có giá trị R_f và màu sắc tương tự vết số 9 trong hỗn hợp flavonoid (Hình 1a).

Kết quả thu được trên đây sơ bộ chứng tỏ H1 và H2 là 2 thành phần tinh khiết.

3.2. Nhận dạng các hợp chất phân lập được: ***- Nhận dạng H1:***

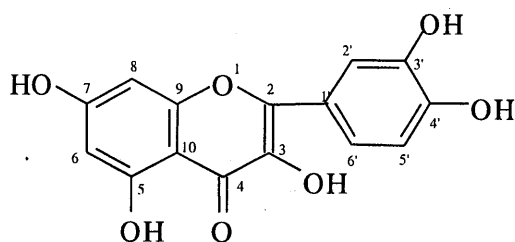
Chất H1 thu được dưới dạng bột, màu vàng, không mùi, vị hơi đắng, dễ tan trong metanol, etanol, diethyl ether, rất ít tan trong chloroform.

Phổ tử ngoại (UV) đo trong metanol cho 2 đỉnh hấp thụ cực đại λ_{max} : 255.5 nm và 371.1 nm đặc trưng cho cấu trúc dẫn chất

flavonoid thuộc nhóm flavonol. Phổ hồng ngoại (IR) đo dưới dạng viên nén KBr cho các đỉnh hấp thụ mạnh ở 3283.3 cm^{-1} ($\sim \nu \text{ OH}$); 1600.7 cm^{-1} ; 1613 cm^{-1} ($\sim \nu \text{ C=O}$ của vòng γ -pyron); 1513.8 cm^{-1} ; 1361.0 cm^{-1} ; 1314.0 cm^{-1} ($\sim \nu \text{ -C=C-}$ của nhân thơm). Phổ khối (MS) của H1 được ghi bằng phương pháp bắn phá electron với lượng 70ev đã chỉ ra pic $[\text{M}]^+$ có số khối 302. Như vậy khối lượng phân tử của H1 là 302 mu. Việc tra cứu, so sánh với thư viện phổ đã cho thấy H1 có khả năng lớn là Quercetin với độ trùng lặp 95%. Trên các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của H1 cho thấy: dữ kiện phổ ^{13}C -1D-NMR và phổ DEPT xác định được H1 có 15C gồm: 5 nhóm CH đều ở vùng nhân thơm và 10 nhóm $>\text{C}<$, trong đó có 1 nhóm $>\text{C=O}$ đặc trưng. Trên phổ ^1H -NMR căn cứ vào cường độ các pic, độ dịch-chuyển hoá học nhận ra 2 proton thơm có tương quan với khoảng cách 4 liên kết và 3 proton khác có tương quan với 2 proton cách nhau 3 liên kết, proton còn lại chỉ có tương tác với 1 trong 2 proton kia với khoảng cách 4 liên kết. Như vậy H1 có chứa 2 nhân thơm, trong đó 1 nhân thơm đã bị thế 4 vị trí và nhân thơm còn lại bị thế tại 3 vị trí. Dữ kiện phổ ^1H -NMR còn cho thấy tồn tại các nhóm OH trong phân tử H1. Kết hợp sự phân tích phổ MS (với khối lượng phân tử được xác định là 302 m.u) và phổ NMR có thể rút ra phân tử H1 có chứa 5 nhóm OH. Trên cơ sở đó xác định được công thức cộng của phân tử là $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. Trên dữ liệu phổ HMQC, HMBC kết hợp với các tính toán dựa trên các phần mềm mô phỏng Chem-Draw và ACD/NMR DB v7.05 để hỗ trợ cho việc phân tích phổ, kết quả giải phổ NMR được đưa ra ở bảng 1. Như vậy căn cứ vào phổ UV, IR, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HMQC và HMBC đã nhận dạng được flavonoid H1 là Quercetin.

Bảng 2: Số liệu phổ NMR của H1/dung môi Metanol

STT	Ký hiệu	^{13}C -NMR dppm	^1H -NMR dppm J (Hz)
1	CH_8	94.431	6.411 d J = 2 H_z
2	CH_6	99.268	6.205 d J = 2 H_z
3	CH_{10}	104.509	
4	$\text{CH}_{2'}$	116.001	7.757 d J = 2 H_z
5	$\text{CH}_{5'}$	116.239	6.907 d J = 8.5 H_z
6	$\text{CH}_{6'}$	121.680	7.657 dd J ₁ = 2 H_z , J ₂ = 8.5 H_z
7	$\text{C}_{1'}$	124.161	
8	C_3	137.233	
9	$\text{C}_{3'}$	146.215	
10	$\text{C}_{4'}$	148.038	
11	C_2	148.761	
12	C_9	158.232	
13	C_5	162.453	
14	C_7	165.608	
15	C_4	177.359	



4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy

Hình 2: Cấu trúc phẳng của phân tử H1 (Quercetin)

- Nhận dạng H2:

Chất H2 thu được có dạng bột, màu vàng, không mùi, vị hơi đắng, dễ tan trong metanol, etanol, diethyl ether, rất ít tan trong chloroform. Phổ tử ngoại (UV) của H2 đo trong metanol cho 2 đỉnh hấp thụ cực đại λ_{max} : 266.6 nm và 366.6 nm đặc trưng cho cấu trúc dẫn chất flavonoid thuộc nhóm flavonol. Phổ hồng ngoại (IR) đo dưới dạng viên nén KBr cho các đỉnh hấp thụ mạnh ở 3321.4 cm^{-1} ($\sim \nu \text{OH}$); 1656.8 cm^{-1} ; 1611.5 cm^{-1} ($\sim \nu \text{C=O}$ của vòng γ -pyron); 1507.3 cm^{-1} ; 1380.2 cm^{-1} ; 1309.1 cm^{-1} ($\sim \nu \text{-C=C-}$ của nhân thơm). Việc xác định cấu trúc của H2 được thực hiện hoàn toàn theo phương pháp đã áp dụng cho H1. Từ phổ khối lượng xác định được khối lượng phân tử của H2 là 286 mu. ($\text{M}^+ = 286 \text{ mu.}$). Có

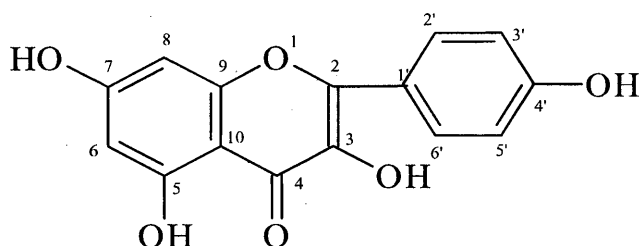
thể thấy qua phổ MS H2 có công thức phân tử khác H1 một nguyên tử oxy, có nghĩa là H2 có công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Dự báo trên được khẳng định qua việc phân tích phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT và HMBC. Qua phổ NMR có thể thấy H2 gồm 15 cacbon, trong đó có 6 CH nhân thơm và 9 cacbon bậc 4 (kém H1 một cacbon bậc 4). Tuy nhiên trong 6 nhóm CH có chứa 2 cặp CH tương đương (2 cặp tín hiệu ^{13}C có sự chập của 2 cacbon thành 1 vạch). Điều này chứng tỏ có một vòng thơm được thế đối xứng (para). Phần còn lại của H1 và H2 giống nhau về cấu trúc.

Dựa vào kết quả phân tích phổ NMR của H1 ta phân tích phổ NMR của H2. Kết quả phân tích phổ NMR của H2 được chỉ ra ở bảng 2. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả tính dựa

vào các phần mềm mô phỏng Chem-Draw và ACD/NMR DB v7.05. Cơ chế phá mảnh trong phổ khối cũng hoàn toàn phù hợp với phổ thực nghiệm. Do đó chất H2 được nhận dạng là Kaempferol.

Bảng 3: Số liệu phổ NMR của H2/dung môi Metanol

STT	Ký hiệu	¹³ C- NMR dppm	¹ H-NMR	
			dppm	J (H _z)
1	CH ₈	94.493	6.422 d	J = 2 H _z
2	CH ₆	99.315	6.208 d	J = 2 H _z
3	C ₁₀	104.531		
4	C _{3'}	116.321	6.930 d	J = 9 H _z
5	C _{5'}	116.321	6.930 d	J = 9 H _z
6	C _{1'}	123.770		
7	C _{2'}	130.679	8.106 d	J = 9 H _z
8	C _{6'}	130.679	8.106 d	J = 9 H _z
9	C ₃	137.146		
10	C ₂	148.096		
11	C ₉	158.286		
12	C _{4'}	160.555		
13	C ₅	162.531		
14	C ₇	165.681		
15	C ₄	177.415		



4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(4'-hydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy

Hình 3: Cấu trúc phẳng của phân tử H2 (Kaempferol)

4. BÀN LUẬN

Rau má được sử dụng trong dân gian với nhiều tác dụng có ích như chữa các bệnh về gan (xơ gan, hạn chế phát triển khối u ở gan, cải thiện chức năng gan), làm lành vết thương, hạ huyết áp, thanh nhiệt, giải độc, thông tiểu, chữa các trường hợp vàng da, sốt nóng, mụn nhọt, sỏi, mẩn ngứa, viêm họng, viêm phế quản... [2], [3], [4]. Hầu hết các tác dụng này có liên quan đến thành phần có hoạt tính sinh học tốt là các flavonoid. Kết quả nghiên cứu của đề tài đã chiết xuất phân lập được 2 flavonoid là Quercetin và Kaempferol. Các hợp chất này đã được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học tốt như khả năng dập tắt các gốc tự do, khả năng chống oxy hoá, thông tiểu, lợi mật, bảo vệ gan, kháng khuẩn, làm bền vững thành

mạch ... [1], [6]. Như vậy việc chiết xuất phân lập và xác định được cấu trúc các flavonoid trong rau má đã bổ sung thêm thành phần hoá học của dược liệu này, đồng thời góp phần làm sáng tỏ kinh nghiệm sử dụng cây thuốc này trong dân gian, đóng góp cơ sở khoa học cho việc khai thác, sử dụng Rau má làm rau ăn, làm thuốc phòng và chữa bệnh trong y học cổ truyền và y học hiện đại.

5. KẾT LUẬN

Từ loài rau má - *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae thu hái tại Phong Điền - Thừa Thiên Huế, các kết quả nghiên cứu của đề tài đã phân lập được 2 chất tinh khiết. Căn cứ vào phổ UV, IR, MS, NMR đã nhận dạng các hợp chất này là Quercetin và Kaempferol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn Dược liệu (1998), Bài giảng Dược liệu, trường Đại học Dược Hà Nội, tập I, 259-323.
2. Phạm Hoàng Hộ (1992), Cây cỏ Việt Nam, Quyển II, NXB Trẻ, 471.
3. Đỗ Tất Lợi (1999), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 631-632.
4. Lã Đình Mối, Dương Đức Huyền (2000), “Cây Rau má”, tài nguyên thực vật Đông Nam Á, Tập 1, 11-14.
5. Viện Dược liệu (2004), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật HN, 582-586.
6. Dictionary of Natural Products on CD-ROM, (1982-2006), Chapman and Hall/CRC.