

Nghiên cứu thành phần hóa học phân đoạn chloroform từ lá Cỏ lào (*Chromolaena odorata* L., Asteraceae)

Đoàn Thành Luân¹, Nguyễn Đăng Huy¹, Bùi Hoàng Minh^{1,*}, Lưu Huỳnh Ngọc Dũng²

¹ Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Khoa Dược, Đại học Quốc gia Tp. HCM

*bhminh@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Từ 3kg lá cỏ lào (*Chromolaena odorata* L.) thu hái tại quận 2, Tp. Hồ Chí Minh, bằng kỹ thuật chiết tách đã thu được 90,22g phân đoạn CHCl₃. Phân đoạn này được tách thành 7 phân đoạn phụ bằng sắc ký cột nhanh, trong đó có 3 phân đoạn xuất hiện kết tủa. Bằng kỹ thuật kết tinh phân đoạn thu được 3 chất C₁ (144,2mg), C₂ (40,0mg), C₃ (129,3mg). Dựa vào các dữ liệu phổ (Mass spectrum - MS, Nuclear Magnetic Resonance- 1D-NMR và 2D-NMR), cấu trúc của các chất này được xác định lần lượt là C₁ (Quercetin 7,4' – dimethylether hay Ombuin), C₃ (5, 7 – dihydroxy 3', 4' – dimethoxyflavon). Riêng C₂ vẫn tiếp tục được xác định cấu trúc. Đồng thời, vẫn còn nhiều phân đoạn phụ tiềm năng từ sắc ký cột nhanh phân đoạn CHCl₃

Nhận 12.09.2019

Được duyệt 18.06.2020

Công bố 29.06.2020

Từ khóa

Chromolaena odorata, CHCl₃, flavonoid, ombuin, 5, 7 – dihydroxy 3', 4' – dimethoxyflavon

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Cỏ lào (*Chromolaena odorata* L.) là loài cỏ dại được du nhập vào Việt Nam những năm 1930, được dùng chủ yếu để cầm máu và trị tiêu chảy [1]. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy loài *Chromolaena odorata* L. có nhiều công dụng, nổi bật với khả năng cầm máu, làm lành vết thương, trị tiêu chảy,...[2-4]. Ở trong nước đã có các công trình nghiên cứu về loài *Chromolaena odorata* L. hướng tác dụng chống oxi hóa tập trung chủ yếu là các polyphenol từ phân đoạn ethyl acetat...[5-8]. Tuy nhiên, các polymethoxy-flavonoid trong loài *Chromolaena odorata* L. vẫn chưa có nhiều nghiên cứu mặc dù được chứng minh là có khả năng cầm máu và giải độc tế bào [2,3,9]. Chính vì vậy, đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học phân đoạn chloroform từ lá Cỏ lào (*Chromolaena odorata* L., Asteraceae)” được thực hiện nhằm mục đích chiết xuất, phân lập các hợp chất polymethoxy-flavonoid, làm tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn về kiểm nghiệm, hóa học, dược lý sau này.

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Lá Cỏ lào được thu hái vào khoảng tháng 7-8/2018 tại quận 2, Tp. HCM. Mẫu dược liệu được định danh thông qua khảo sát thực vật học và so sánh với các tài liệu chuyên ngành tại

Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành. Lá thu hái về được loại bỏ tạp chất, sấy và xay thành bột theo yêu cầu của thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết xuất và phân lập

- Chiết xuất

3 kg lá Cỏ lào được ngâm kiệt với cồn 96% sau đó cô thu hồi được cao cồn. Cao cồn được phân tán trong MeOH 20% và lần lượt lắc phân bố với PE, CHCl₃, EtOAc sau đó cô dưới áp suất giảm thu được các cao phân đoạn tương ứng. Phân đoạn CHCl₃ được lựa chọn là đối tượng nghiên cứu tiếp theo.

- Phân lập

Sử dụng các kỹ thuật sắc ký cột (nhanh, cô điển,...) và kết tinh phân đoạn bằng dung môi thích hợp để thu được chất tinh khiết.

* Kiểm tra độ tinh khiết

Chất phân lập được khai triển sắc ký trên 3 bản mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Chất cần xác định độ tinh khiết được phát hiện trên UV 254 nm, UV 365 nm và hiện màu với thuốc thử vanillin-sulfuric. Chất được xem là tinh khiết khi chỉ cho 1 vết gọn với R_f trong khoảng từ 0,25 - 0,75.

2.2.2 Xác định cấu trúc

Phối hợp dữ liệu phổ MS và NMR để xác định cấu trúc phân lập được, trong đó:

+ Phổ MS được dùng để xác định công thức phân tử dựa vào khối lượng phân tử.



+ Phổ NMR được đo với các kỹ thuật 1-D, 2-D (1H-, 13C-, DEPT, HSQC, HMBC, COSY). Mẫu được hòa tan trong dung môi thích hợp như MeOD, DMSO-*d*₆... với chất chuẩn nội là TMS; thực hiện trên máy ADVANCE 500 (Bruker) tại phòng cấu trúc, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội. Độ dời hóa học tính theo thang δ (ppm) với δTMS = 0,00.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Chiết xuất và phân lập

3.1.1 Chiết xuất

3 kg bột lá Cỏ lào sau khi ngâm kiệt với cồn 96 % được cô cạn, phân tán và lắc phân bố với các dung môi có độ phân cực tăng dần: PE, CHCl₃, EtOAc. Sau khi cô dưới áp suất giảm, các phân đoạn thu được khối lượng lần lượt là 228,10 g (PE); 90,22 g (CHCl₃); 10,87 g (EtOAc).

3.1.2 Phân lập

- Sắc kí cột phân đoạn CHCl₃

Phân đoạn CHCl₃ tiếp tục được phân tách bằng kỹ thuật sắc kí cột nhanh với các thông số sau:

- Cột thủy tinh trung tính, thành dày, kích thức 8 x 60 cm, rửa sạch, sấy khô.
- Pha tĩnh: 600 g silica gel, cỡ hạt trung bình 40 – 63 μm.
- Nhồi cột khô, dùng bơm chân không hút cho ổn định
- Mẫu: 90,22 g phân đoạn CHCl₃, nạp mẫu khô.
- Pha động: chạy gradient với dung môi nền là PE, tăng dần tỉ lệ PE-CHCl₃ rồi CHCl₃ 100%, cuối cùng là CHCl₃-MeOH (98:2).
- Thể tích hứng phân đoạn: 250 ml
- Kiểm tra phân đoạn bằng sắc kí lớp mỏng với hệ dung môi CHCl₃ – EtOAc – HCOOH (3:7:0,05), phát hiện bằng

cách soi UV 254 nm, UV 365 nm, nhúng thuốc thử VS. Theo dõi sắc kí đồ và gộp các phân đoạn hứng có sắc kí đồ giống nhau, cô quay để thu được các phân đoạn.

Kết quả: Từ 90,22 g phân đoạn CHCl₃, bằng kỹ thuật sắc kí cột nhanh thu được 7 phân đoạn phụ. Trong đó có 3 phân đoạn có tủa kết tinh màu vàng và vàng nâu, 4 phân đoạn khác ở dạng rắn. Các phân đoạn có tủa được tiếp tục tinh chế để thu được chất tinh khiết.

- Phân lập C₁ từ phân đoạn III – CHCl₃

Từ 209,2 mg kết tủa màu vàng trong phân đoạn III – CHCl₃, sau khi được rửa nhiều lần với PE, CHCl₃, EtOAc, MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xốp, dùng phương pháp kết tinh phân đoạn với dung môi MeOH thu được 144,2 mg bột vi tinh thể màu vàng.

- Phân lập C₂ từ phân đoạn V – CHCl₃

Từ 251,1 mg kết tủa màu vàng trong phân đoạn V – CHCl₃, sau khi được rửa nhiều lần với PE, CHCl₃, EtOAc, MeOH lạnh trên phễu thủy tinh xốp, dùng phương pháp kết tinh phân đoạn với dung môi MeOH thu được 40,0 mg bột vi tinh thể màu vàng sáng.

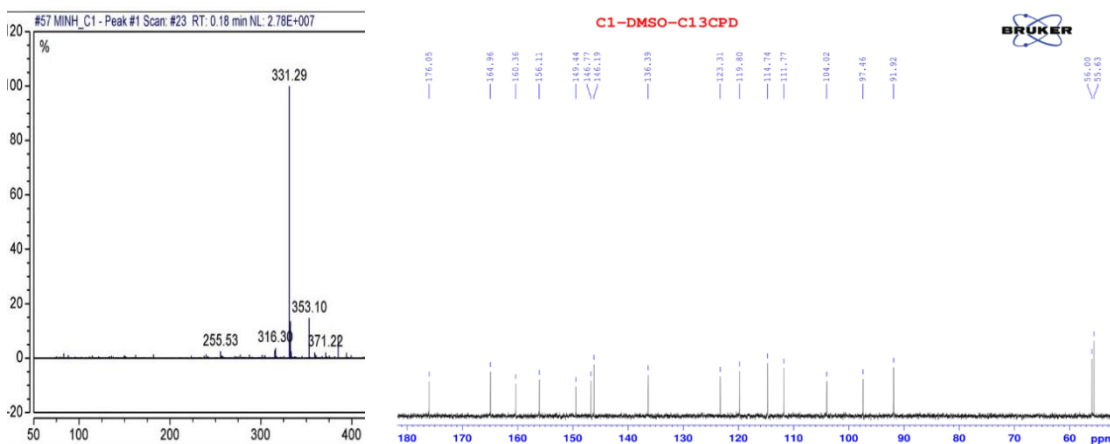
- Phân lập C₃ từ phân đoạn VI – CHCl₃

Từ 133,4 mg kết tủa màu vàng nâu trong phân đoạn VI – CHCl₃, sau khi được rửa nhiều lần với PE, CHCl₃, EtOAc và MeOH lạnh thu được 129,3 mg bột vi tinh thể màu vàng nâu.

3.2 Xác định cấu trúc

- Cấu trúc C₁

C₁ (144,2 mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu vàng, kém tan trong CHCl₃, EtOAc, MeOH; tinh khiết trên bản mỏng. Dữ liệu EI-MS cho phân mảnh [M+H]⁺ m/z 331,29 và phổ ¹³C-NMR của C₁ ứng với công thức phân tử C₁₇H₁₄O₇, Hình 1.



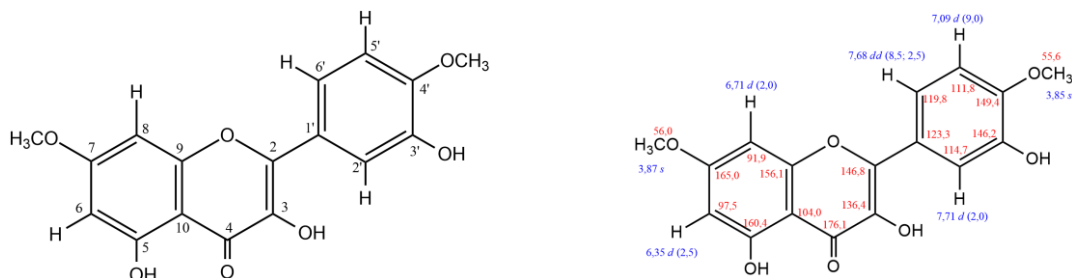
Hình 1 Trích xuất phổ MS và ¹³C-NMR của C₁

C₁ nằm trong phân đoạn III kém phân cực, có màu vàng, tắt quang ở UV 254 nm và UV 365 nm, cho màu vàng cam với thuốc thử VS. Trên phổ ¹³C-NMR xuất hiện 17 tín hiệu carbon, trong đó có 15 tín hiệu carbon cộng hưởng vùng trường thấp (δ_C 91,9 – 176,1) đặc trưng cho 1 flavonoid với 5 nhóm thế -OR. 2 carbon còn lại được xác định là -OCH₃

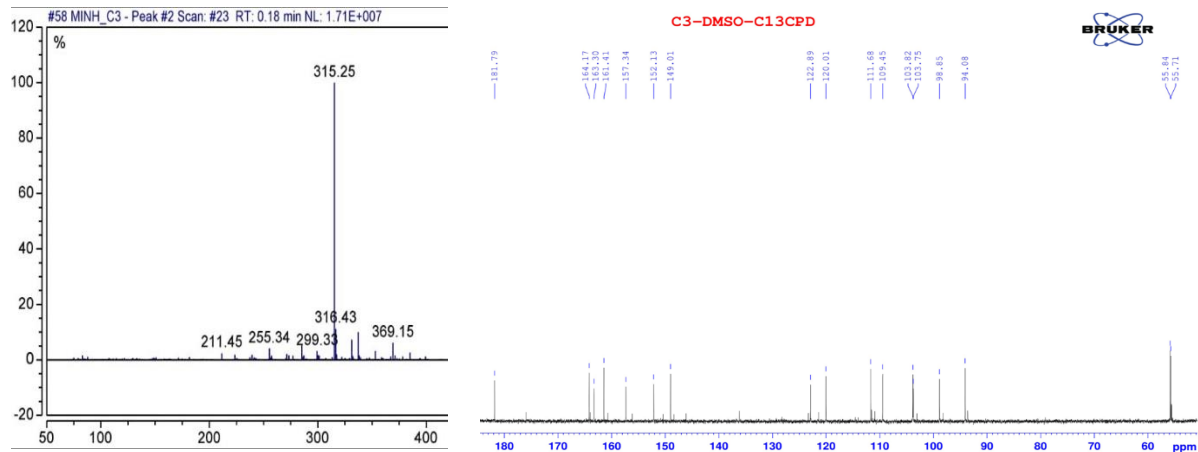
tương ứng với 2 tín hiệu carbon δ_C 56,0 và δ_C 55,6. C₁ được xác định là Quercetin 7,4'-dimethylether (Ombuin). Điều này được khẳng định khi so sánh dữ liệu phổ với tài liệu được công bố trước đây [10]. Dữ liệu phổ NMR của C₁ được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1 Dữ liệu phổ NMR của C_1 (500MHz, DMSO- d_6)

C	DEPT	^{13}C (δppm)	^1H + HSQC (δppm ; nH; J)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}_n$)
2	C_{IV}	146,8	-	-
3	C_{IV}	136,4	-	-
4	C_{IV}	176,1	-	-
5	C_{IV}	160,4	-	-
6	=CH-	97,5	6,35 <i>d</i> (1H; 2,5 Hz)	91,9; 104,0; 160,4; 165,0
7	C_{IV}	165,0	-	-
8	=CH-	91,9	6,71 <i>d</i> (1H; 2,0 Hz)	97,5; 104,0; 156,1; 165,0
9	C_{IV}	156,1	-	-
10	C_{IV}	104,0	-	-
1'	C_{IV}	123,3	-	-
2'	=CH-	114,7	7,71 <i>d</i> (1H; 2,0 Hz)	119,8; 146,2; 149,4
3'	C_{IV}	146,2	-	-
4'	C_{IV}	149,4	-	-
5'	=CH-	111,8	7,09 <i>d</i> (1H; 9,0 Hz)	123,3; 146,2; 149,4
6'	=CH-	119,8	7,68 <i>dd</i> (1H; 2,5 Hz; 8,5 Hz)	114,7; 146,8; 149,4
	-OCH ₃	56,0	3,87 <i>s</i>	165,0
	-OCH ₃	55,6	3,85 <i>s</i>	149,4
	-OH		12,42 <i>s</i> (1H)	97,5; 104,0; 160,4
	-OH		9,51 <i>brs</i> (1H)	-
	-OH		9,28 <i>s</i> (1H)	114,7; 146,2; 149,4

**Hình 2** Cấu trúc hóa học C_1 **- Cấu trúc C_3**

C_3 (129,3mg) thu được dưới dạng bột vi tinh thể màu vàng nâu, kém tan trong CHCl_3 , EtOAc, MeOH; tinh khiết trên bản mỏng. Dữ liệu EI-MS cho phân mảnh m/z 315,25 $[\text{M}+\text{H}]^+$ và phổ ^{13}C -NMR của C_3 ứng với công thức phân tử $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_6$, Hình 3.

**Hình 3** Trích xuất phổ MS và ^{13}C -NMR của C_1

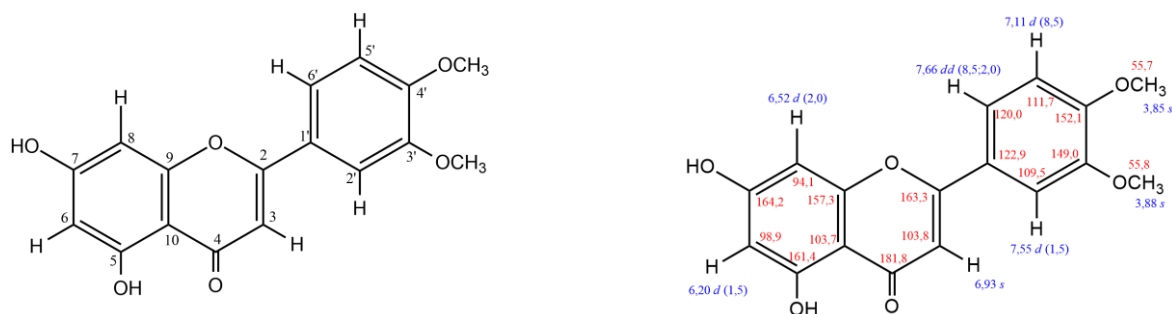
C₃ nằm trong phân đoạn VI khá phân cực, màu vàng nâu, tắt quang UV 254, UV 365 và cho màu vàng cam với thuốc thử VS.

Trên phổ ¹³C NMR xuất hiện 17 tín hiệu carbon, trong đó có 15 tín hiệu carbon cộng hưởng vùng trường thấp (δ_C 94,1 – 181,8) đặc trưng cho 1 flavonoid với 4 nhóm thế -

OR, 2 carbon còn lại được xác định là -OCH₃ tương ứng với 2 tín hiệu carbon δ_C 55,7 và δ_C 55,8. Cấu trúc C₃ được xác định là 5,7 – dihydroxy 3',4' – dimethoxyflavon. Điều này được khẳng định khi so sánh dữ liệu phổ với tài liệu được công bố trước đây [11]. Dữ liệu phổ NMR của C₃ được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 Dữ liệu phổ NMR của C₃

C	DEPT	¹³ C (δppm)	¹ H + HSQC (δppm; nH; J)	HMBC (H → C _n)
2	C _{IV}	163,3	-	-
3	=CH-	103,8	6,93 s	103,7; 122,9; 163,3; 181,8
4	C _{IV}	181,8	-	-
5	C _{IV}	161,4	-	-
6	=CH-	98,9	6,20 d (1H; 1,5 Hz)	94,1; 103,7; 161,4; 164,2
7	C _{IV}	164,2	-	-
8	=CH-	94,1	6,52 d (1H; 2,0 Hz)	98,9; 103,7; 157,3; 164,2
9	C _{IV}	157,3	-	-
10	C _{IV}	103,7	-	-
1'	C _{IV}	122,9	-	-
2'	=CH-	109,5	7,55 d (1H; 1,5 Hz)	120,0; 149,0; 152,1; 163,3
3'	C _{IV}	149,0	-	-
4'	C _{IV}	152,1	-	-
5'	=CH-	111,7	7,11 d (1H; 8,5 Hz)	122,9; 149,0; 152,1
6'	=CH-	120,0	7,66 dd (1H; 2,0 Hz; 8,5 Hz)	109,5; 152,1; 163,3
	-OCH ₃	55,8	3,88 s (3H)	149,0
	-OCH ₃	55,7	3,85 s (3H)	152,1
	-OH		12,91 s (1H)	98,9; 103,7; 103,8; 161,4
	-OH		10,81 s (1H)	-



Hình 4 Cấu trúc hóa học C₃

4 Kết luận và kiến nghị

4.1 Kết luận

Sau 3 tháng thực hiện, đề tài đã đạt được một số kết quả như sau:

- Đã thu thập được tài liệu về thực vật, thành phần hóa học, tác dụng dược lí của Cỏ lào, có thể làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về loài cây này.
- Đã chiết xuất, thu được 90,22 g phân đoạn CHCl₃ từ 3 kg

lá cỏ Lào. Bằng các phương pháp phân tách, tinh chế, kết hợp với các dữ liệu phổ đã phân lập và xác định được cấu trúc của C₁ - Ombuin (144,2 mg) và C₃ - 5,7 – dihydroxy 3',4' – dimethoxyflavon (129,3 mg).

4.2 Kiến nghị

- Tiếp tục xác định cấu trúc C₂ bằng MS và NMR.
- Tiếp tục phân lập và tinh khiết các chất từ những phân đoạn còn lại của sắc kí cột nhanh.

Tài liệu tham khảo

- Gautier L., Taxonomy and distribution of a tropical weed: *Chromolaena odorata* (L.) R. King and H. Robinson, *Candollea*, 47 (1992) 645.
- Pandith H., Pithayanukul P. and Gritsanapan W., “Development of hemostatic gel preparations from *Chromolaena odorata* leaf extract”, *Planta Medica*, 80 (2014) 2.
- R. N. Barua, R. P. Sharma, G. Thyagarajan and W. Hertz, Flavonoids of *Chromolaena odorata*, *Phytochemistry*, 17 (1978) 1807.
- Sirinthipaporn A., and Jiraungkoorskul W., “Wound healing property review of siam weed, *Chromolaena odorata*”, *Pharmacognosy reviews*, 11 (2017) 35.
- Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Hạnh và Lâm Thanh Phong, “Một số kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu và flavonoid trong cây Cỏ lào”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (2006) 103.
- Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Hạnh và Nguyễn Ngọc Châu, “Phân lập và nhận danh cấu trúc một chalcone từ dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ lào - *eupatorium odoratum* L.”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (2007) 16.
- Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Hạnh, Nguyễn Ngọc Châu, “Phân lập và nhận danh cấu trúc hai flavonol từ dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ lào - *eupatorium odoratum* L.”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (2011) 250.
- Ngô Quốc Luân, Nguyễn Ngọc Hạnh, Nguyễn Ngọc Châu và Đặng Minh Khiêm, “Phân lập, nhận danh cấu trúc và thử hoạt tính kháng oxy hóa một flavone từ dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ lào - *eupatorium odoratum* L.”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (2012) 172.
- Suksamrarn A., Chotipong A., Suavansri T., Boongird S., Timsuksai P., Vimuttipong S. and Chuaynugul A., “Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*”, *Archives of pharmacal research*, 27 (2004) 507.
- Salem M. M., Hussein S. R., El-Sharawy R., El-Khateeb A., Ragab E. A., Dawood K. M., and El Negoumy S. I., “Antioxidant and antiviral activities of the aqueous alcoholic leaf extract of *Boscia angustifolia* A. Rich.(Capparaceae) and its major component 'ombuin' ”, *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 15 (2016) 1.
- Ghavami R., Najafi A., Sajadi M., and Djannaty F., “Genetic algorithm as a variable selection procedure for the simulation of ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of flavonoid derivatives using multiple linear regression”, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27 (2008) 105.

Chemical constituents from chloroform extract of *Chromolaena odorata* L., asteraceae leaves

Doan Thanh Luan¹, Nguyen Dang Huy¹, Bui Hoang Minh^{1,*}, Luu Huynh Ngoc Dung²

¹ Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

² Faculty of Pharmacy, Viet Nam national University – Ho Chi Minh City

bhminh@ntt.edu.vn

Abstract 3kg leaves of *Chromolaena odorata* L. collected in District 2, HCM City was extracted and separated to yield CHCl₃ extract (90,22 g). CHCl₃ extract was further separated via flash column to obtain 7 fractions. Quercetin 7,4' – dimethylether (Ombuin) (C₁; 144,2 mg) and 7 – dihydroxy 3',4' – dimethoxyflavon (C₃; 129,3 mg) were isolated from these fractions through fractional crystallization. The structures of isolated compounds were determined on the basis of spectroscopic analyses (MS and NMR). Additionally, the structure of C₂ (40,0 mg) is being elucidated. Further studies on constituents from another fractions of this plant are in process.

Keywords *Chromolaena odorata*, chloroform, polymethoxy-flavonoid, ombuin, 5, 7 – dihydroxy 3', 4' – dimethoxyflavon

