

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU VÀ FLAVONOID TRONG CÂY CỎ LÀO

Ngô Quốc Luân¹, Lâm Thanh Phong² và Nguyễn Ngọc Hạnh²

ABSTRACT

The essential oil and ethyl acetate extracts of the aerial parts of *Eupatorium odoratum* L. from Phu Yen province were investigated. The essential oil was analyzed by GC and GC/MS. One of chalcones (Odoratin) and one of flavonols (3,3',5-trihydroxy-4',7-dimethoxyflavone) were isolated from ethyl acetate extracts. Their structures were interpreted from spectra including IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, MS and based on published data. At the first time, these flavonoids were tested on antimicrobial activity. The results showed that both of flavonoids inhibited to *P. aeruginosa*, *ASP. niger* and *F. oxysporum*.

Keywords: *Eupatorium odoratum*, *Chromolaena odorata*

Title: Contribution on a research in the chemical composition of essential oil and flavonoids from *Eupatorium odoratum* L.

TÓM TẮT

Tinh dầu và dịch chiết ethyl acetate của cây Cỏ Lào mọc tại tỉnh Phú Yên được khảo sát bằng phương pháp sắc ký khí và sắc ký khí ghép khối phổ. Từ dịch chiết ethyl acetate, chúng tôi đã cô lập 1 chalcone là Odoratin và 1 flavonol. Cấu trúc được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại và so sánh với tài liệu đã công bố. Lần đầu tiên, các flavonoid trên được thử hoạt tính kháng vi sinh vật.

Từ khóa: Cây Cỏ Lào, Cây Cộng Sản

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Cỏ Lào (*Eupatorium odoratum* L.; *Chromolaena odorata* King & Robinson) thuộc họ Cúc (Asteraceae). Cỏ Lào còn được gọi là cây Cộng sản, Yên bạch, Bóp Bóp, Bù xích, Chùm hôi, Nhả nhật, Muồng mung phía, hay tên tiếng Anh là fragrant thoroughwort, bitter bush và tên tiếng Pháp là langue de chat, eupatoire odorante (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004; Phạm Hoàng Hộ, 2000) ... là loài cây mọc hoang và lan rộng chiếm địa bàn phân bố nhanh ở nhiều vùng trên thế giới. Ở Việt Nam, Cỏ Lào thường gặp ở nhiều nơi từ các tỉnh đồng bằng đến các miền trung du và vùng đồi núi thấp (Hình 1).



Hình 1: Cây Cỏ Lào

¹ Khoa Sư Phạm – Đại học Cần Thơ

² Viện Công Nghệ Hóa Học, Viện KH & CN Việt Nam

Về công dụng trong y học, từ lâu nhân gian đã biết dùng Cỏ Lào để cầm máu, chữa lành các vết thương, vết bỏng và trị một số bệnh do nhiễm khuẩn về đường ruột, ung nhọt, ghẻ lở, viêm đại tràng, đau nhức xương, cảm cúm...

Thành phần hóa học của Cỏ Lào đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu. Học viện Quân y đã nghiên cứu dịch chiết toàn phần từ cây Cỏ Lào để bào chế dạng thuốc trị vết thương, vết bỏng (Thang T. Phan, 2000). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu và các flavonoid cô lập từ cây Cỏ Lào ở Phú Yên.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Cây Cỏ Lào được thu hái toàn bộ phần trên mặt đất khi cây bắt đầu ra hoa vào tháng 12/2005 tại các vùng ven đồi núi thuộc xã Hòa Hiệp Nam, huyện Đông Hòa, tỉnh Phú Yên.

2.2 Phương pháp chiết xuất, cô lập

Nguyên liệu tươi (100 kg) được chung cất lôi cuốn hơi nước thu được tinh dầu (60 ml).

Phần bã sau khi tách tinh dầu được trích nóng với 320 lít cồn 50° trong 3 giờ, sau đó cô đặc đến còn 8 kg dịch chiết sệt. Dịch này được lắ chiết với ethyl acetate (EtOAc) và cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao Ac (139 g).

Từ cao Ac (129 g), tiến hành sắc ký nhanh trên cột silicagel với hệ dung môi giải ly (Xăng dung môi, EtOAc) có độ phân cực tăng dần. Kết quả thu được 15 phân đoạn (LA1, LA2, ..., LA15).

Phân đoạn LA5 (11 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột silicagel lần 2 cũng với hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần là (Xăng dung môi, EtOAc). Kết quả thu được 30 phân đoạn (LA5-1, LA5-2, ..., LA5-30).

Tại phân đoạn LA5-3 (dung môi giải ly Xăng dung môi: EtOAc = 9:1) thu được cặn màu vàng cam có vết chính với $R_f = 0,60$ [Petroleum ether (PE):EtOAc = 1:1]. Kết tinh lại trong EtOAc thu được tinh thể hình kim màu da cam, ký hiệu là LA5-3 (30 mg).

Tại phân đoạn LA5-14 (dung môi giải ly Xăng dung môi: EtOAc = 9:1) thu được cặn màu vàng có vết chính với $R_f = 0,37$ (PE:EtOAc = 1:1). Kết tinh lại trong EtOAc thu được tinh thể hình vẩy màu vàng chanh, ký hiệu là LA5-14 (28 mg).

2.3 Phương pháp nhận dạng cấu trúc

2.3.1 Tinh dầu

Thành phần hóa học của tinh dầu được xác định bằng phương pháp sắc ký khí và sắc ký khí ghép khối phổ:

- Phương pháp sắc ký khí (GC) thực hiện trên máy Hewlett-Packard 6890 Series II (USA), cột HP5 (dài 30 m; đường kính trong 0,32 mm; lớp phim dày 0,25 μ m). Khí mang nitơ (1 ml/phút), detector FID. Chương trình nhiệt độ: 40°C

(giữ 2 phút), tăng 6°C/phút cho đến 200°C (giữ 2 phút), tăng 10°C/phút đến 280°C (giữ 10 phút). Nhiệt độ injector: 280°C, nhiệt độ detector: 300°C.

- Phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) thực hiện trên máy Agilent Technologies 6890N (USA), cột HP5-MS (dài 30 m; đường kính trong 0,25 mm; lớp phim dày 0,25 μ m) liên hợp với máy khối phổ Agilent Technologies 5973 inert (USA), khí mang Heli (0,9 ml/phút). Chương trình nhiệt độ: 40°C (giữ 2 phút), tăng 3°C/phút cho đến 200°C (giữ 2 phút), tăng 20°C/phút đến 250°C (giữ 10 phút). Nhiệt độ inlet: 250°C, nhiệt độ MSD: 350°C. Thư viện phổ NIST-MS search 2.0a-2002.

2.3.2 Flavonoid

Điểm chảy được đo trên máy Electrothemat 9100 (U.K), mao quản không hiệu chỉnh. Phổ hồng ngoại được đo trên máy VECTOR 22, dùng viên nén KBr. Phổ UV-VIS được đo trên máy UV-2450 (Japan). Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz, độ dịch chuyển hóa học được tính theo δ ppm, hằng số tương tác (J) tính bằng Hz. Phổ khối lượng được đo trên máy 1100 series LC/MS Trap Agilent, sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silicagel 60F₂₅₄ (Merck) tráng sẵn độ dày 0,2 mm.

2.4 Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện ở Phòng thử nghiệm hoạt tính sinh học thuộc Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên-Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam tại Hà Nội theo phương pháp hiện đại của Vanden Benergher và Vlietlinck.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học của tinh dầu

Tinh dầu Cỏ Lào màu vàng đậm, có mùi đặc trưng, nhẹ hơn nước, tỷ trọng là 0,90 g/ml (30°C); độ quay cực riêng ở 20°C với nguồn Na: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14,34^\circ$ (CHCl_3); chiết suất: $n_{\text{D}} = 1,51$ (27°C).

Kết quả phân tích cho thấy:

Trong thành phần của tinh dầu Cỏ Lào Phú Yên có khoảng 30 hợp chất. Trong đó có 28 hợp chất được xác định với 4 thành phần chính là: Cyclohexene-5,6-diethyl-1-methyl (23,1%); Beta cubebene (14,3%); Tetracyclo [5.2.1.0(2,6).0(3,5)] decane, 4,4-dimethyl- (12,5%) và Beta caryophyllene (10,1%).

Trong khi đó:

- Thành phần chính của tinh dầu Cỏ Lào ở Bờ Biển Ngà là: Alpha pinene (18,8%); Pregeijerene (14,3%); Beta pinene (10,5%) và Germacrene-D (8,2%) [Diénéba Bamba, 1993].
- Thành phần chính của tinh dầu Cỏ Lào ở Nghệ An và Hà Tĩnh lần lượt là: Geijerene (20,7%; 15,5%); Germacren-D (20,5%; 16,8%); Alpha pinene (11%; 11,1%) và Beta caryophyllene (9,1%; 7,3%) (Lê Văn Hạc, 2004) (Bảng 1).

Bảng 1: So sánh các thành phần hóa học chính của tinh dầu Cỏ Lào ở Phú Yên với Bờ Biển Ngà, Nghệ An và Hà Tĩnh

TT	Thời gian lưu	Tên hợp chất	Hàm lượng (%)			
			Phú Yên	Bờ Biển Ngà	Nghệ An	Hà Tĩnh
1	8.70	Alpha Pinene	8,5	18,8	11,0	11,1
2	10.46	Beta Pinene	5,8	10,5	5,1	5,3
3	12.98	D-Limonene	0,7	1,4	0,8	0,7
4	14.04	ΣBeta Ocimene	1,1	3,7	3,2	2,4
5	17.72	Cyclohexene-3,4-diethyl-3-Methyl-	2,4	-	-	-
6	18.07	Cyclohexene-5,6-diethyl-1-methyl	23,1	-	-	-
7	24.59	Benzene, hexamethyl-	1,0	-	-	-
8	24.74	Tetracyclo[5.2.1.0(2,6).0(3,5)]decane,4,4-dimethyl-	12,5	-	-	-
9	27.00	Delta Elemene	0,4	-	0,2	0,2
10	28.58	Alpha Copaene (Ylangene)	1,9	-	-	-
11	29.32	Beta Elemene	1,4	0,3	0,5	0,6
12	30.35	Beta Caryophyllene (L-Caryophyllene)	10,1	0,7	9,1	7,3
13	31.20	Chưa xác định	1,3	-	-	-
14	31.76	Alpha Caryophyllene	3,1	-	-	-
15	32.77	Gamma Muurolene	0,4	-	-	-
16	32.92	Beta Cubebene	14,3	-	0,2	0,1
17	33.53	Gamma Elemene	2,4	1,3	-	-
18	33.76	Alpha Muurolene	0,5	-	0,4	0,5
19	34.27	Gamma Cadinene	0,3	0,3	0,3	0,5
20	34.67	Beta Cadinene	4,5	-	-	-
21	35.88	Elemol	0,9	1,0	0,4	0,8
22	37.40	Epiglobulol	0,3	-	0,1	0,1
23	39.81	Alpha Cadinol	0,9	-	0,3	0,4
24	5.44	Myrcene	-	2,3	1,3	1,2
25	9.62	Geijerene	-	4,7	20,7	15,5
26	13.88	Pregeijerene	-	14,3	-	-
27	19.54	Germacrene-D	-	8,2	20,5	16,8
28	20.72	Delta Cadinene	-	3,8	3,7	4,0

3.2 Nhận danh cấu trúc các flavonoid

3.2.1 Chất LA5-3

Kết tinh trong EtOAc thu được tinh thể hình kim to, màu da cam, điểm tan

chảy mp = 136-137°C, sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (PE: EtOAc = 1:1), hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong cồn cho vết màu da cam có R_f = 0,60.

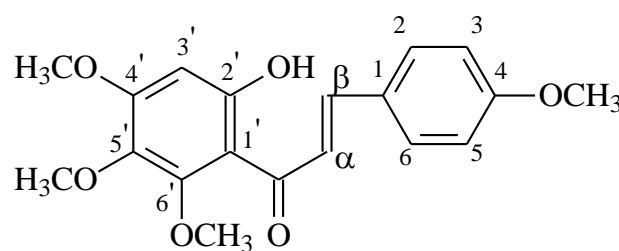
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} (nm): 218; **363**.
- Phổ IR (KBr) ν^{cm-1}: 2933; 1621; 1546; 1449; 1096; 1016.
- Phổ khối cho pic ion phân tử m/z [M+H]⁺ = 345

- Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm) (Bảng 2) cho các tín hiệu proton của 4 nhóm OCH₃ (3,84; 3,86; 3,90; 3,93); 7 CH ở các vị trí C₃ và 5 (6,93; 6,95), C₂ và 6 (7,59; 7,60), C_α và β (7,84; 7,84) và 1OH ở vị trí C_{2'} (13,76).
- Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm) (Bảng 2) cho thấy chất LA5-3 có tất cả 19 Carbon trong đó gồm 4 nhóm OCH₃ (55,4; 56,1; 61,3; 61,9), 7 nhóm CH tại các vị trí C₂ và 6 (130,2), C₃ và 5 (114,5), C_α (124,1), C_β (143,4), C_{3'} (96,6), 1 nhóm C=O (192,9) và 7 C tứ cấp ở các vị trí C 1, 4, 1', 2', 4', 5', 6' (128,2; 161,6; 108,8; 162,7; 155,0; 135,3; 160,0).
- Phổ HSQC cho thấy sự tương tác giữa H với C tại vị trí C mà H gắn vào.
- Phổ HMBC (Bảng 2) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: H_{3'}→C_{3'}, C_{1'}, C_{5'}, C_{6'}, C_{2'}; H₃ và 5→C₃ và 5, C₁, C₄; H₂ và 6→C₂ và 6, C₄, C_β; H_α và β→C₁, C₂ và 6; HOH→C_{3'}, C_{1'}, C_{2'}.

Bảng 2: Dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, và HMBC của chất LA5-3

Vị trí C/H	Phổ ¹ H δppm, J=Hz	Phổ ¹³ C δppm	Phổ HMBC ¹ H→ ¹³ C
1		128,2	
2	7,59 (dd, J = 2,0; 7,0)	130,2	H ₂ →C ₂ và 6, C _β , C ₄
3	6,94 (dd, J = 2,0; 7,0)	114,5	H ₃ →C ₃ và 5, C ₁ , C ₄
4		161,6	
5	6,94 (dd, J = 2,0; 7,0)	114,5	H ₅ →C ₃ và 5, C ₁ , C ₄
6	7,59 (dd, J = 2,0; 7,0)	130,2	H ₆ →C ₂ và 6, C _β , C ₄
1'		108,8	
2'		162,6	
3'	6,29	96,6	H _{3'} →C _{3'} , C _{1'} , C _{5'} , C _{6'} , C _{2'}
4'		160,0	
5'		135,3	
6'		155,0	
α	7,84 (d, J = 2,0)	124,1	H _α →C _α , C ₂ và 6, C ₁
β	7,84 (d, J = 2,0)	143,4	H _β →C _β , C ₂ và 6, C ₁
C=O		192,9	
4OCH ₃	3,84	55,4	4OCH ₃ →C ₄
4'OCH ₃	3,86	56,1	4'OCH ₃ →C _{4'}
5'OCH ₃	3,90	61,3	5'OCH ₃ →C _{5'}
6'OCH ₃	3,93	61,9	6'OCH ₃ →C _{6'}
OH	13,76		OH→C _{1'} , C _{2'} , C _{3'}

Từ những kết quả trên và so sánh với tài liệu đã công bố (Nguyễn Thị Diễm Trang, Lê Việt Ngọc Phương, Nguyễn Xuân Dũng, 1993) chất LA5-3 được nhận danh là Odoratin (2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetramethylchalcone) có công thức phân tử là C₁₉H₂₀O₆ (M = 344 đvC) và công thức cấu tạo như Hình 2.



Hình 2: Odoratin

3.2.2 Chất LA5-14

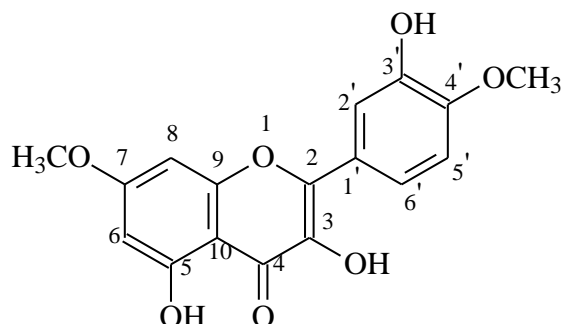
Kết tinh trong EtOAc cho tinh thể hình vẩy màu vàng chanh, điểm tan chảy mp =224-225°C, tan tốt trong MeOH, DMSO; ít tan trong EtOAc, CHCl₃. Sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (PE:EtOAc = 1:1), hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄10%/cồn cho vết màu vàng chanh với R_f = 0,37.

- Phổ UV (MeOH) λ_{max} (nm): 219; 263; **370**.
- Phổ IR (KBr) ν^{cm-1}: 3450; 3277; 1658; 1618; 1586; 1509; 1156; 1034.
- Phổ khối cho pic ion phân tử m/z [M+H]⁺ = 331 và [M-H]⁺ = 329.
- Phổ ¹H-NMR (DMSO, δ ppm) (Bảng 3) cho các tín hiệu proton của: 2 nhóm OCH₃ (3,86; 3,87); 5 CH ở các vị trí C 6, 8, 2', 5', 6' (6,35; 6,71; 7,72; 7,10; 7,68) và 3OH ở các vị trí C 3', 3, 5 (9,53; 12,44; 9,23).
- Phổ ¹³C-NMR (DMSO, δppm) (Bảng 3) cho thấy chất LA5-14 có tất cả 17 Carbon trong đó gồm 2 nhóm OCH₃ (55,6; 56,0), 5 nhóm CH tại các vị trí C 6, 8, 2', 5', 6' (97,4; 91,9; 114,8; 111,7; 119,8), 1 nhóm C=O (176,0) và 9 C tứ cấp ở các vị trí C 2, 3, 5, 7, 9, 10, 1', 3', 4' (146,7; 136,4; 160,3; 164,9; 104,0; 123,3; 146,2; 149,4).
- Phổ HSQC cho thấy sự tương tác giữa H với C tại vị trí C mà H gắn vào.
- Phổ HMBC (Bảng 3) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: H₆→C₆,C₅,C₇,C₈,C₁₀; H₈→C₈, C₆, C₇, C₉, C₁₀; H_{2'}→C_{2'}, C₂, C_{4'}, C_{6'}; H_{5'}→C_{5'}, C_{1'}, C_{3'}, C_{4'}; H_{6'}→C_{6'}, C_{2'}, C_{4'}; 3'-OH→C_{2'},C_{4'}; 3-OH→C₂; 5-OH→C₆,C₁₀,C₅.

Bảng 3 : Dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, và HMBC của chất LA5-14

Vị trí C/H	Phổ ¹ H δppm, J=Hz	Phổ ¹³ C δppm	Phổ HMBC ¹ H→ ¹³ C
2		146,7	
3		136,4	
4		176,0	
5		160,3	
6	6,34 (d, J = 2)	97,4	H ₆ →C ₆ , C ₈ , C ₁₀ , C ₅ , C ₇
7		164,9	
8	6,70 (d, J = 2,5)	91,9	H ₈ →C ₈ , C ₆ , C ₁₀ , C ₉ , C ₇
9		156,1	
10		104,0	
1'		123,3	
2'	7,73 (d, J = 2,5)	114,8	H _{2'} →C _{2'} , C _{6'} , C ₂ , C _{4'}
3'		146,2	
4'		149,4	
5'	7,09 (d, J = 8,5)	111,7	H _{5'} →C _{5'} , C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}
6'	7,68 (dd, J = 8,5; 2,5)	119,8	H _{6'} →C _{6'} , C _{2'} , C _{4'}
4'OCH ₃	3,88	56,0	
7OCH ₃	3,86	55,6	
3'-OH	9,29		3'-OH→C _{2'} , C _{4'}
3-OH	9,53		3-OH→C ₂
5-OH	12,46		5-OH→C ₆ , C ₁₀ , C ₅

Từ các kết quả trên và kết hợp tham khảo các tài liệu, chất LA5-14 được nhận danh là: Ombuin (3,5,3'-trihydroxy-7,4'- dimethoxy flavone) có công thức phân tử là C₁₇H₁₄O₇ (M = 330 đvC) và công thức cấu tạo như Hình 3.



Hình 3: Ombuin

3.3 Thử hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất flavonoid

Kết quả cho thấy chất LA5-3 có hoạt tính kháng được 7 vi sinh vật kiểm định và chất LA5-14 có hoạt tính kháng được 3 vi sinh vật kiểm định (Bảng 4).

Bảng 4: Nồng độ ức chế tối thiểu của các chất đối với các vi sinh vật kiểm định

Tên chất	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC : µg/ml)							
	Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)			Nấm mốc		Nấm men
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>ASP. niger</i>	<i>F. oxyporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
LA5-3	50	50	-	50	25	25	25	25
LA5-14	-	50	-	-	50	50	-	-

4 KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu Cỏ Lào Phú Yên:

- Thành phần hóa học chính của tinh dầu Cỏ Lào ở Phú Yên có khác biệt so với thành phần hóa học của tinh dầu ở Bồ Biển Ngà, Nghệ An và Hà Tĩnh.
- Cô lập được 2 flavonoid: 1 chalcone là odoratin, 1 flavone là ombuin. Cả 2 chất đều có hoạt tính kháng một số vi sinh vật kiểm định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Diénéba Bamba, Jean-Marie Bessière, Chantal Marion, Yves Péliissier, Isabelle Fourasté, 1993. *Essential Oil of Eupatorium odoratum*. *Planta Med.* 59, pages 184-185.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương *et al.*, 2004. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 487-489.
- Lê Văn Hạc, Nguyễn Thị Thanh Hoài, Nguyễn Xuân Dũng, 2004. *Thành phần hóa học của tinh dầu cây Cỏ Lào ở Nghệ An và Hà Tĩnh*. Tạp chí Dược liệu tập 9, số 6, trang 179-182.

- Nguyễn Thị Diễm Trang, Lê Việt Ngọc Phương, Nguyễn Xuân Dũng, 1993. *Chalcones of Eupatorium odoratum L. from Vietnam*. Tạp chí Hóa học tập 31, số 2, trang 79-80.
- Nguyễn Thị Ngọc Tú, Lê Thị Hải Yên, 2000. *Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của một số thành phần trong cao Cỏ Lào*. Tạp chí Dược học, số 7, trang 17-19.
- Phạm Hoàng Hộ, 2000. *Cây Cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản Trẻ, trang 245.
- R.N. Barua, R. P. Sharma, G. Thyagarajan, Werner Hertz, 1978. *Flavonoids of Chromolaena odorata*. *Phytochemistry*, vol 17, pages 1807-1808.
- Thang T. Phan, Jill Allen, Margaret A. Hughes, George Cherrry, Fenella Wojnarowska, 2000. *Upregulation of adhesion complex proteins and fibronectin by human keratinocytes treated with an aqueous extract from the leaves of Chromolaena odorata*. *European Journal of Dermatology*, vol 10, issue 7, pages 522-527.