

PHÂN LẬP *ECHINOCYSTIC ACID* VÀ *ECLALBASAPONIN II* TỪ CÂY CỎ MỤC *ECLIPTA PROSTRATA L.* HỌ CÚC (*ASTERACEAE*)

Trần Vũ Thiên¹, Phùng Văn Trung² và Nguyễn Ngọc Hạnh²

ABSTRACT

Two Oleanan-triterpenes, *Echinocystic acid* (CMC2) and *Eclalbasaponin II* (CMA3) were isolated from chloroform and ethyl acetate extracts of *Eclipta prostrata L.* by chromatographic methods. Their structures were elucidated by spectrometric methods including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HSQC, HMBC, MS.

Keywords: *Eclipta prostrata L.*, *E. alba Hassk.*, *Echinocystic acid*, *Eclalbasaponin II*

Title: Isolation of *Echinocystic acid* and *Eclalbasaponin II* from *Eclipta prostrata L.* (*Asteraceae*)

TÓM TẮT

Từ dịch chiết chloroform và ethyl acetate của cây Cỏ Mục đã cô lập được hai Oleanan-triterpene là *Echinocystic acid* (CMC2) và *Eclalbasaponin II* (CMA3) bằng các phương pháp sắc ký. Cấu trúc được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HSQC, HMBC, MS.

Từ khóa: *Cỏ Mục*, *Cỏ Nhọ Nồi*, *Echinocystic acid*, *Eclalbasaponin II*

1 MỞ ĐẦU

Cỏ Mục có tên khoa học là *Eclipta prostrata L.* hay *E. alba Hassk* hay còn gọi là Cỏ Nhọ Nồi, Hạn Liên Thảo, Lệ Trường.

Cỏ Mục đã được dùng rất phổ biến trong dân gian tại Việt Nam, Ấn Độ, Pakistan, Trung Hoa và các quốc gia vùng Nam Á. Tại Việt Nam, Cỏ Mục được dùng trị xuất huyết nội tạng như ho ra máu, xuất huyết ruột, chảy máu răng, nướu, lợi; trị sưng gan, sưng bàng quang, sưng đường tiểu, trị mụn nhọt đầu đinh, bó ngoài giúp liền xương.

Các nghiên cứu trong y học hiện đại đã phát hiện thấy trong Cỏ Mục có saponin, tanin, chất đắng, ancaloid, tinh dầu, vitamin E, vitamin A...

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày sự phân lập và nhận danh cấu trúc hai Oleanan-triterpene là *echinocystic acid* (CMC2) và *eclalbasaponin II* (CMA3).

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Cây Cỏ Mục được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu Miền Trung - huyện Đông Hòa, tỉnh Phú Yên.

¹ Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Công nghệ Hóa Học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2.2 Phương pháp chiết xuất, cô lập

Cây Cỏ Mực bỏ rễ (5kg) được trích nóng với cồn loãng theo phương pháp đun hoàn lưu, sau khi loại dung môi, thu được cao tổng. Từ cao tổng, chiết lần lượt với các dung môi chloroform, ethyl acetate, n-butanol, sau khi thu hồi dung môi, lần lượt thu được cao CMC (19,2 g), cao CMA (18 g) và CMB (35 g).

Từ cao CMC (10g), tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly là petroleum ether và chloroform có độ phân cực tăng dần thu được hai chất CMC1 và CMC2.

Từ cao CMA (18 gam), tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly là hỗn hợp ethyl acetate và methanol có độ phân cực tăng dần thu được chất CMA3, CMA4.

2.3 Phương pháp nhận dạng cấu trúc

Điểm chảy được đo trên máy Electrothema 9100(U.K), dùng mao quản không hiệu chỉnh. Các phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMQC, HMBC, COSY được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz (độ dịch chuyển hóa học δ được tính theo ppm, hằng số tương tác J tính bằng Hz) tại Viện Hóa học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản nhôm silica gel Merk 60F₂₅₄ tráng sẵn độ dày 0,2 mm. Sắc ký cột sử dụng cột sắc ký pha thường, đường kính cột là 3,2cm, kích thước hạt silica gel khoảng 0,04- 0,06 mm.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chất CMC2

Tinh thể vảy trắng khi kết tinh trong hỗn hợp dung môi petroleum ether và ethyl acetate, điểm tan chảy ở 274- 274,5°C. Sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi (CHCl₃:CH₃OH = 8:2), hiện vết bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong ethanol cho vết màu nâu có R_f = 0,7.

- Phổ ¹H-NMR (MeOD, δ(ppm)) (Bảng 1) cho thấy tín hiệu của:
 - 1 mũi ba ở 5,31 (t, J = 4Hz) (H-12) là proton của liên kết đôi (CH=)
 - Các mũi tín hiệu proton của 2 nhóm CH kề O (CH-O) ở 3,16 (dd, J = 11,5; 4,5) (H-3) và 4,48 (H-16)
 - 7 mũi đơn ở các vị trí 0,99 (H-23); 0,82 (H-24); 0,97 (H-25); 0,80 (H-26); 1,39 (H-27); 0,90 (H-29) và 0,94 (H-30) là tín hiệu proton của 7 nhóm CH₃ trong khung triterpene...
- Phổ ¹³C-NMR kết hợp với DEPT (MeOD, δ(ppm)) (Bảng 1) cho thấy chất CMC2 có 30 carbon (trong đó có 22 carbon liên kết proton), gồm:
 - 1 nhóm CH= ở 123,43 (C-12)
 - 3 nhóm CH ở 56,86 (C-5), 48,18 (C-9), 42,08 (C-18)
 - 2 nhóm CH kề O ở 79,73 (C-3) và 75,27 (C-16)
 - 7 nhóm CH₃ ở các vị trí 28,75 (C-23), 16,33 (C-24), 16,01 (C-25), 17,76 (C-26), 27,26 (C-27), 33,42 (C-29), 24,92 (C-30)

- 9 nhóm CH₂ ở các vị trí 34,29; 27,89; 19,50; 32,70; 24,46; 39,83; 47,70; 36,55 và 36,22
 - 7 C tứ cấp ở 39,91 (C-4), 40,64 (C-8), 38,17 (C-10), 145,07 (C-13), 42,62 (C-14), 48,49 (C-17), 31,39 (C-20)
 - 1 nhóm C=O ở 181,16 (C-28).
- Phổ HSQC cho thấy sự tương tác giữa H với C tại vị trí C mà H gắn vào.
- Phổ HMBC (Bảng 1) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: H-3→C-24; H-12→C-9, C-11, C-14, C-19; H-16→C-14, C-17, C-18; H-18→C-12, C-13, C-14, C-16, C-28; ...

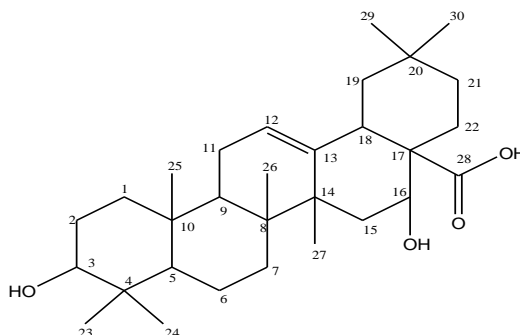
Dữ liệu các phổ ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC và COSY của hợp chất CMC2 được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC và COSY của chất CMC2

Vị trí C/H	Phổ ¹³ C δ(ppm)	Phổ ¹ H δ(ppm), J(Hz)	Phổ HMBC ¹ H→ ¹³ C	Phổ COSY
1	34,29	1,67	H ₁ →C ₃ , C ₂₅	
2	27,89	1,64		
3	79,73	3,16 (dd, 11,5; 4,5)	H ₃ →C ₂₄	H ₃ /H ₂
4	39,91			
5	56,86	0,76	H ₅ →C ₂₄	H ₅ /H ₆
6	19,50	1,43		
7	32,70	1,86 (d, 3,5)		
8	40,64			
9	48,18	1,68	H ₉ → C ₁₀ , C ₁₁ , C ₂₅ , C ₂₆	
10	38,17			
11	24,46	1,91 (d, 3,5)	H ₁₁ →C ₁₂ , C ₁₃	H ₁₁ /H ₉
12	123,43	5,31 (t, 4,0)	H ₁₂ →C ₉ , C ₁₁ , C ₁₄ , C ₁₉	H ₁₂ /H ₁₁
13	145,07			
14	42,62			
15	39,83	1,35 (m)		
16	75,27	4,48	H ₁₆ →C ₁₄ , C ₁₇ , C ₁₈	H ₁₆ /H ₁₅
17	48,49			
18	42,08	3,02 (dd, 14; 4,5)	H ₁₈ →C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₆ , C ₂₈	H ₁₈ /H _{19a} , H ₁₈ /H _{19b}
19	47,70	1,05 (m) 2,30 (t, 14)	H _{19b} →C ₁₈ , C ₂₀ , C ₂₉ , C ₃₀	H _{19a} /H _{19b}
20	31,39			
21	36,55	1,30		
22	36,22	1,17		
23	28,75	0,99 (d, 3,0)	H ₂₃ →C ₃ , C ₅ , C ₂₄	
24	16,33	0,82	H ₂₄ →C ₃ , C ₅ , C ₂₃	
25	16,01	0,97	H ₂₅ →C ₅	
26	17,76	0,80	H ₂₆ →C ₈ , C ₁₄ , C ₂₇	
27	27,26	1,39	H ₂₇ →C ₈ , C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₅	
28	181,16			
29	33,42	0,90	H ₂₉ →C ₁₉ , C ₃₀	
30	24,92	0,94	H ₃₀ →C ₁₉	

Từ các kết quả trên và kết hợp tham khảo tài liệu (Mohammad S. Rahman, Rasheduzzaman Chowdhury, Chowdhury M. Hasan and Mohammad A. Rashid,

2005), chất CMC2 được nhận danh là **echinocystic acid** có công thức phân tử là $C_{30}H_{48}O_4$ và công thức cấu tạo như Hình 1.



Hình 1: Echinocystic acid

3.2 Chất CMA3

Bột màu trắng, vô định hình, điểm tan chảy ở 249 – 250°C, sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi ($CHCl_3:CH_3OH = 8:2$), hiện vết bằng thuốc thử H_2SO_4 10% trong ethanol cho vết màu nâu có $R_f = 0,39$.

- Phổ khối cho peak ion phân tử $m/z [M]^+ = 634$.
- Phổ 1H -NMR (MeOD, δ (ppm)) (Bảng 2) của CMA3 tương tự như của CMC2, chỉ khác là có thêm một gốc đường:
 - 1 mũi ba ở 5,31 (t, $J = 3,5Hz$) (H-12) là tín hiệu proton của liên kết đôi (CH=)
 - Các mũi các proton của 6 nhóm CH kề O (CH-O) ở các vị trí 3,20 (H-3); 4,48 (H-16); 3,20 (H-2'); 3,36 (H-3'); 3,28 (H-4') và 3,27 (H-5')
 - 7 mũi đơn ở 1,08 (H-23); 0,87 (H-24); 0,99 (H-25); 0,81 (H-26); 1,39 (H-27); 0,90 (H-29) và 0,98 (H-30) là tín hiệu proton của 7 nhóm CH_3 trong khung triterpene
 - Các mũi đa chứa các proton của 5 nhóm OH trong gốc đường là HO-2', HO-3', HO-4', HO-5', HO-6' lần lượt ở các vị trí 3,20; 3,36; 3,28; 3,27; 3,69 và 3,85...
- Phổ ^{13}C -NMR (MeOD, δ (ppm)) (Bảng 2) của CMA3 tương tự như của CMC2, nhưng khác ở chỗ là xuất hiện thêm một gốc đường, gồm có 36 carbon, trong đó:
 - +Phổ DEPT chỉ ra có 27 carbon (trong số 36 carbon) liên kết với proton:
 - 1 nhóm CH= ở 123,44 (C-12)
 - 3 nhóm CH ở 57,14 (C-5), 48,15 (C-9), 42,08 (C-18)
 - 6 nhóm CH kề O tại các vị trí 90,83 (C-3), 75,26 (C-16), 75,67 (C-2'), 78,27 (C-3'), 71,65 (C-4') và 77,64 (C-5')
 - 7 nhóm CH_3 ở các vị trí 28,55 (C-23), 17,02 (C-24), 16,07 (C-25), 17,77 (C-26), 27,27 (C-27), 33,41 (C-29), 24,93 (C-30)
 - 10 nhóm CH_2 ở 34,28; 27,04; 19,33; 32,69; 24,48; 40,15; 47,69; 36,55; 36,22 và 62,80.

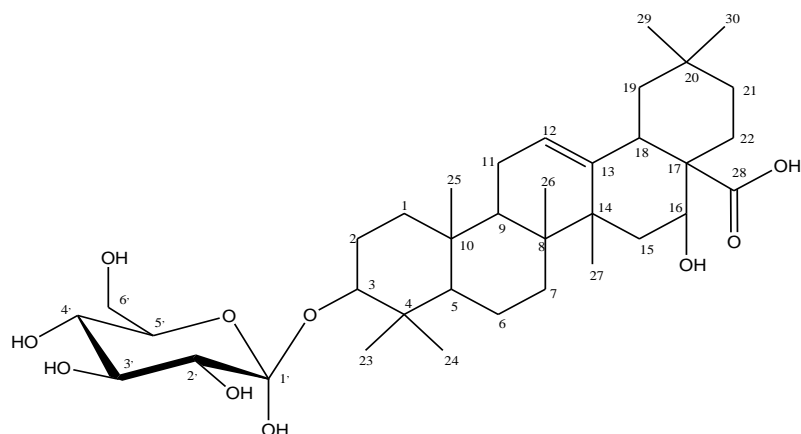
+ Ngoài ra, CMA3 còn có:

- 7 C tứ cấp ở 39,86 (C-4), 40,66 (C-8), 37,89 (C-10), 145,05 (C-13), 42,62 (C-14), 48,48 (C-17), 31,38 (C-20)
 - 1 nhóm acetal (O-C-O) ở 106,70 (C-1')
 - 1 nhóm C=O ở 181,15 (C-28).
- 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-1' điều này cho thấy gốc đường gắn ở vị trí C-3. Ngoài ra, H-12→C-9, C-11, C-14; H-1'→C-2', C-3', C-3;...
- Dữ liệu các phổ ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC và COSY của hợp chất CMA3 được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC và COSY của chất CMA3

Vị trí C/H	Phổ ¹³ C δ(ppm)	Phổ ¹ H δ(ppm), J(Hz)	Phổ HMBC ¹ H→ ¹³ C	Phổ COSY
1	34,28			
2	27,04	1,68	H ₂ →C ₂₅	
3	90,83	3,20 (m)	H ₃ →C _{1'}	H ₃ /H ₂
4	39,86			
5	57,14	0,78	H ₅ →C ₂₄	
6	19,33	1,42 (dd, 12; 2) 1,60 (dd, 12; 5)		H _{6a} /H ₅ , H _{6b} /H ₅ H _{6a} /H _{6b}
7	32,69			
8	40,66			
9	48,15	1,68	H ₉ → C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₂₅ , C ₂₆	H ₉ /H _{11b}
10	37,89			
11	24,48	1,03 (d, 3) 1,94 (m)	H _{11b} →C ₁₂ , C ₁₃	H _{11a} /H ₉ , H _{11b} /H ₉
12	123,44	5,31 (t, 3,5)	H ₁₂ →C ₉ , C ₁₁ , C ₁₄	H ₁₂ /H _{11a} , H ₁₂ /H _{11b}
13	145,05			
14	42,62			
15	40,15			
16	75,26	4,48	H ₁₆ →C ₁₄	
17	48,48			
18	42,08	3,03 (dd, 14,5; 4)	H ₁₈ →C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₆ , C ₁₉	H ₁₈ /H _{19a} , H ₁₈ /H _{19b}
19	47,69	1,03 (d, 3) 2,30 (t, 8)	H _{19b} →C ₁₈ , C ₂₀ , C ₂₉ , C ₃₀	H _{19a} /H _{19b}
20	31,38			
21	36,55			
22	36,22			
23	28,55	1,08	H ₂₃ →C ₃ , C ₅ , C ₂₄	
24	17,02	0,87	H ₂₄ →C ₃ , C ₄ , C ₅ , C ₂₃	
25	16,07	0,99	H ₂₅ →C ₅ , C ₁₀	
26	17,77	0,81	H ₂₆ →C ₉	
27	27,27	1,39	H ₂₇ →C ₈ , C ₁₃ , C ₁₆	
28	181,15			
29	33,41	0,90	H ₂₉ →C ₁₉ , C ₂₀ , C ₂₁ , C ₂₂ , C ₃₀	
30	24,93	0,98 (d, 4)	H ₃₀ →C ₁₉	
1'	106,70	4,35 (d, 8)	H _{1'} →C _{2'} , C _{3'} , C ₃	H _{1'} /H _{2'}
2'	75,67	3,20 (m)	H _{2'} →C _{1'} , C _{3'}	
3'	78,27	3,36 (m)	H _{3'} →C _{2'} , C _{4'}	
4'	71,65	3,28 (m)	H _{4'} →C _{5'}	
5'	77,64	3,27 (m)	H _{5'} →C _{4'} , C _{6'}	
6'	62,80	3,69 (dd, 12;5); 3,85 (dd, 12; 2)	H _{6'a} →C _{5'} H _{6'b} →C _{4'}	H _{6'a} /H _{6'b}

Từ những kết quả trên và so sánh với tài liệu đã công bố (Mohammad S. Rahman, Rasheduzzaman Chowdhury, Chowdhury M. Hasan and Mohammad A. Rashid, 2005), chất CMA3 được nhận danh là **eclalbasaponin II** có công thức phân tử là $C_{36}H_{58}O_9$ và công thức cấu tạo như Hình 2.



Hình 2: Eclalbasaponin II

4 KẾT LUẬN

Từ cây Cỏ Mực trồng tại Việt Nam, hai hợp chất đã được cô lập là:

- **Echinocystic acid**: Tinh thể vảy trắng, công thức phân tử là $C_{30}H_{48}O_4$, khối lượng phân tử là 472 đvC, mp = 274 – 274,5°C.
- **Eclalbasaponin II**: Chất bột màu trắng, công thức phân tử là $C_{36}H_{58}O_9$, khối lượng phân tử là 634 đvC, mp = 249 – 250°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và các tác giả, 2004. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 462-467.
- Đỗ Tất Lợi, 1995. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 367-368.
- IKan, R. 1991. Natural product: A laboratory guide, 2nd Edition. Academic Press, N.Y., USA.
- Mohammad S. Rahman, Rasheduzzaman Chowdhury, Chowdhury M. Hasan and Mohammad A. Rashid, 2005. Oleanane Glycosides from Eclipta prostrata. The Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 4, Number 2, December.
- Phạm Hoàng Hộ, 2000. Cây Cỏ Việt Nam. Nhà xuất bản Trẻ, quyển 3, trang 272.
- Shoji Yahara, Ning Ding, Toshihiro Nohara, Kazuo Masuda and Hiroyuki Ageta, 1997. Taraxastane Glycosides from Eclipta alba. Phytochemistry, Vol 44, No.1, pp 131-135.
- Yahara, S., Ding, N. and Nohara, T. 1994. Oleanane Glycosides from Eclipta alba. Chem. Pharm. Bull. 42, pp 1336-1338.
- Zou J, Uchiyama M. 1993. Chemical constituents of yerbadetajo (Eclipta prostrata). Chung Ts'ao Yao 24(4):174-176.