

Khảo sát thành phần flavonoid trong cây Cỏ cứt lợn (*Ageratum conyzoides* L. Asteraceae)

Nguyễn Thị Kim Liên

Đại học Nguyễn Tất Thành
ntklien@ntt.edu.vn

Từ khóa

Cỏ cứt lợn (*Ageratum conyzoides* (L.) Asteraceae), là một dược liệu được dân gian sử dụng phổ biến để chữa bệnh viêm xoang. Trong số các thành phần hóa học đã được công bố của Cỏ cứt lợn, nhóm hoạt chất flavonoid là nhóm thể hiện hoạt tính kháng viêm đáng kể. Đề tài được tiến hành nhằm mục đích cung cấp cơ sở hóa thực vật cho việc sử dụng Cỏ cứt lợn trong điều trị viêm xoang mũi. Bột dược liệu được ngâm kiệt với ethanol 96%. Dịch chiết ethanol toàn phần được phân chia thành ba phân đoạn bằng cách lắc phân bố với ether dầu hỏa 30 – 60°C (PE), dicloromethan (DCM) và ethyl acetat (EA). Các phân đoạn được định tính bằng thuốc thử flavonoid và phân tích bằng sắc ký cột để tìm flavonoid tinh khiết. Các chất được nhận dạng sơ bộ trên TLC và phân tích bằng phổ UV-Vis và MS. Kết quả cho thấy flavonoid tồn tại trong cả ba phân đoạn, trong đó phân đoạn PE và DCM chứa các flavonoid đã methoxy hóa; phân lập được bốn flavonoid AC1, AC2, AC7 và AC8, sơ bộ xác định được AC7 là một trimethoxyflavon và AC8 là một tetramethoxyflavon..

Nhận 20.01.2018
Được duyệt 04.06.2018
Công bố 19.06.2018

Từ khóa

Ageratum conyzoides,
cỏ cứt lợn, flavonoid,
viêm xoang

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

Viêm xoang mũi là một bệnh phổ biến và đang là một thách thức lớn trong việc chăm sóc sức khỏe ở nhiều quốc gia. Theo số liệu nghiên cứu mới đây, ở các nước Bắc Mỹ và Châu Âu, bệnh viêm mũi xoang chiếm từ 4,5 đến 12% dân số trưởng thành. Không kể đến các chi phí y tế, chi tính riêng chi phí tổn thất gián tiếp vì giảm năng suất lao động do mắc bệnh viêm mũi xoang ở Mỹ là 12,8 tỷ USD trong năm 2016 [1]. Ở Việt Nam chưa có thống kê rõ ràng về bệnh này nhưng với đà tăng trưởng kinh tế và cường độ làm việc căng thẳng như hiện nay, nguy cơ mắc bệnh viêm mũi xoang ngày càng gia tăng.

Cỏ cứt lợn (CCL) *Ageratum conyzoides* (L.) Asteraceae, là một dược liệu được sử dụng phổ biến từ lâu để chữa nhiều bệnh, đặc biệt là viêm xoang, một loại bệnh mạn tính khó điều trị dứt điểm bằng các phương pháp Tây y. Loài này có nguồn gốc ở Trung Mỹ và vùng Caribbean, phân bố từ vùng đông nam Bắc Mỹ đến Trung Mỹ. Ở châu Á, cây mọc khá phổ biến ở vùng nam Trung Quốc, Lào, Campuchia, Thái Lan, Ấn Độ và một số nơi khác. Ở Việt Nam, CCL được xem là loài cỏ dại quen thuộc, phân bố khắp nơi từ vùng núi cao trên 1500 m đến các tỉnh vùng trung du và cả ở đồng bằng.

Trữ lượng CCL ở Việt Nam vô cùng phong phú, ước tính có thể khai thác hàng ngàn tấn một năm [2,3,4].

Trong số các thành phần hóa học đã được công bố của Cỏ cứt lợn, nhóm hoạt chất flavonoid là nhóm thể hiện hoạt tính kháng viêm đáng kể. Tác dụng chống viêm rõ rệt đối với giai đoạn cấp tính và bán cấp tính của phản ứng viêm thực nghiệm. CCL có tác dụng giảm phù nề thực nghiệm chân chuột, giảm rỉ dịch màng phổi và giảm u hạt thực nghiệm trên chuột cống trắng[5]. Ngoài ra, flavonoid còn có các tác dụng khác như chống oxy hóa, cải thiện tuần hoàn, giải độc gan, kháng khuẩn, hạ đường huyết...[6] CCL rất giàu các flavonoid đã methoxy hóa, có khoảng 21 flavonoid loại này đã được công bố, ví dụ: ageconyflavon A (5,6,7-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon), ageconyflavon B (5,6,7,3'-tetramethoxy-4'-hydroxyflavon), ageconyflavon C (5,6,7,3',5'-pentamethoxy-4'-hydroxyflavon). Ngoài ra còn có các flavonoid khác như: 5'-methoxynobiletin, linderoflavon B, hexamethoxyflavon, eupalestin, nobiletin... Các polyhydroxyflavon: scutellarein-5, 6, 7, 4'-tetrahydroxyflavon, quercetin, quercetin-3-rhamanopiranosid, kaempferol, kaempferol-3-rhamnopyranosid và kaempferol-3,7-diglucopyranosid[5].



2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

CCL tươi được thu hái ở Đức Hòa, Long An (10-2016). Mẫu được xác định bởi Tiến sĩ Bùi Mỹ Linh – Bộ môn Dược liệu, Đại học Y Dược Tp.HCM. Mẫu tươi được loại bỏ rễ, phơi âm can đến khô, cắt khúc khoảng 5cm, xay thành bột thô dùng để nghiên cứu hóa học (thử tinh khiết, phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật, chiết xuất, phân lập các hợp chất). Ethanol 96% công nghiệp, ether dầu hỏa (30-60°C), dichloromethan, ethyl acetat, n-hexan, ether ethylic, methanol, aceton, ... loại AR do Trung Quốc sản xuất. Các thuốc thử đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

Trang thiết bị nghiên cứu gồm có bình ngấm kiệt, máy cô quay Rotavapor R-210 (Buchii) kèm bộ sinh hàn tự động RW-2025G, tủ sấy, bếp cách thủy (Memmert), cân phân tích BP 221S, cân xác định độ ẩm MA 45 (Sartorius), đèn UV 2 bước sóng 254nm, 365 nm (Vilber Lourmat CN – 15 – LC); bản mỏng silica gel F254 trắng sẵn trên nền nhôm (Merck), silica gel cỡ hạt vừa Φ 0,03-0,063mm và cỡ hạt mịn Φ 0,015-0,04mm của Merck, phễu lọc thủy tinh xốp, bình sắc ký, cột sắc ký bằng thủy tinh cùng các dụng cụ thông dụng khác trong phòng thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật

Chiết tách nguyên liệu thành các phân đoạn theo độ phân cực tăng dần với các dung môi: ether ethylic, ethanol và nước. Thực hiện trên 15g dược liệu, chiết phân đoạn thu được 50ml dịch ether, 50ml dịch chiết ethanol, 50ml dịch chiết nước. Xác định các nhóm hoạt chất trong từng dịch chiết bằng các phản ứng hóa học đặc trưng.

2.2.2 Chiết xuất và tách phân đoạn

Chiết xuất dược liệu bằng phương pháp ngấm kiệt với dung môi là cồn 96%. Dịch chiết được xác định sơ bộ thành phần bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), xác định tạp, loại tạp và lacc phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần để chia thành các phân đoạn chất có thành phần đơn giản hơn phục vụ cho quá trình khảo sát thành phần hóa học. Theo dõi quá trình chiết tách phân đoạn bằng phản ứng sắc ký lớp mỏng, tìm phân đoạn giàu flavonoid.

2.2.3 Phân tích các phân đoạn

Dựa trên tính chất hấp phụ khác nhau của các cấu tử trong hỗn hợp cần tách với chất hấp phụ (pha tĩnh), dùng dung môi thích hợp (pha động) chạy qua pha tĩnh để giải hấp phụ, từ đó tách ra từng phần các cấu tử trong hỗn hợp. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để dò tìm hệ dung môi cho sắc ký cột và kiểm tra các phân đoạn cũng như các chất tinh khiết, các vết được phát hiện bằng ánh sáng thường, UV 365nm, UV 254nm, thuốc thử Vanilin – sulfuric (V-S) sấy hiện màu ở 110°C. Sắc ký cột được dùng để tách hỗn hợp phức tạp thành các phần đơn giản hơn phục vụ cho tinh chế chất tinh khiết. Các chất tinh khiết được đo phổ UV để tìm các chất cho phổ đặc trưng của flavonoid và phân tích khối phổ (MS) để sơ bộ xác định cấu trúc các flavonoid đã phân lập.

3. Kết quả và bàn luận

3.1 Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học cho thấy dược liệu *Herba Agerati* chứa nhiều nhóm hợp chất: tinh dầu, flavonoid, coumarin, triterpenoid, alkaloid, tannin, saponin, chất khử và các hợp chất polyuronic. Flavonoid có mặt trong dịch chiết ether và dịch chiết cồn, không tìm thấy trong dịch chiết nước. Trên cơ sở đó, cồn 96% được lựa chọn làm dung môi chiết xuất flavonoid từ dược liệu CCL.

Bảng 1. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học cỏ cúrt lợn

Nhóm hợp chất	Thuốc thử (TT) Cách thực hiện	Phản ứng dương tính	Kết quả định tính trên các dịch chiết			Kết quả định tính chung
			Dịch chiết ether	Dịch chiết cồn	Dịch chiết nước	
Chất béo	Nhỏ dung dịch lên giấy, hơi nóng	Vết trong mờ	–			Không
Carotenoid	TT Carr-Price	Xanh chuyển sang đỏ	–			Không
	H ₂ SO ₄	Xanh lục ngả sang xanh dương	–			Không
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm	+++			Có
Triterpenoid tự do	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu - tím, lớp trên có màu lục	++			Có
Alkaloid	Các TT chung	Kết tủa	++	++	+	Có
Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang mạnh hơn	++	++		Có
Anthraglycosid	KOH 10%	Dd kiềm có màu đỏ	±			±

Flavonoid	Mg/HCl _{dd}	Dd có màu hồng tới đỏ	++	+	-	Có
Glycosid tim	TT vòng lacton	Tím		-	-	Không
	TT đường 2-desoxy	Đỏ mật		-	-	
Anthocyanosid	HCl / KOH	Đỏ / Xanh		±	-	±
Proanthocyanin	HCl/t ^o	Đỏ		±	±	±
Tanin	Dd FeCl ₃	Xanh rêu /xanh đen (Polyphenol)		+	++	Có
	Dd gelatin muối	Tủa bông trắng (Tannin)		+	-	
Saponin	TT Liebermann-Burchard	Có vòng tím nâu		+	-	Có
	Lắc mạnh dung dịch nước	Bọt bền		-	-	
Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃	Sủi bọt		+	-	Có
Chất khử	TT Fehling	Tủa đỏ gạch		+++	++	Có
Hợp chất polyuronic	Pha loãng với cồn 90%	Tủa bông trắng - vàng nâu			++	Có

Ghi chú:

(-) : không có

(±) : không rõ

(+) : có ít

(++) : có

(+++): có nhiều

(++++): có rất nhiều



Có thể có phản ứng nhưng không thực hiện

Không có mặt của nhóm hợp chất trong dịch chiết

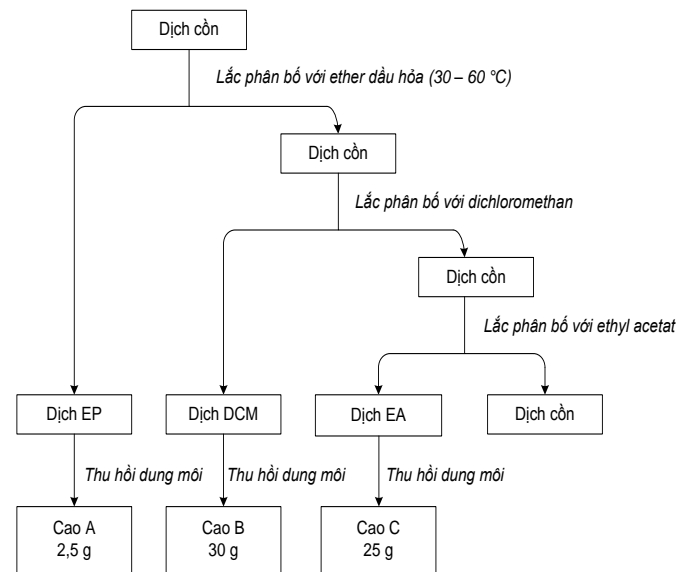
3.2 Chiết xuất và tách phân đoạn

3.2.1 Chiết xuất

Cân 2,5 kg dược liệu đã xay thành bột thô, tiến hành ngâm kiệt thu được 25 lít dịch chiết màu xanh đậm, mùi thơm. Tỷ lệ dịch chiết và dược liệu là 10:1. Khảo sát sơ bộ thành phần dịch chiết bằng TLC cho thấy trong dịch chiết còn chứa rất nhiều diệp lục, là chất không có tác dụng kháng viêm mà đề tài hướng tới nên tiến hành loại tạp diệp lục ra khỏi dịch chiết bằng cách sử dụng 450g than hoạt. Dịch chiết được cô thu hồi dung môi thu được 700g cao và tách được 13 g tinh thể muối vô cơ.

3.2.2 Tách phân đoạn

Khảo sát tìm phân đoạn chứa flavonoid từ cao cồn thu được ở trên bằng cách lắc phân bố lỏng-lỏng cao cồn với các dung môi có độ phân cực tăng dần: ether dầu hỏa (30-60°C), dichloromethan, ethyl acetat. Các phân đoạn được cô quay thu hồi dung môi thu được 2,5g cao A (hiệu suất 0,1%), 30g cao B (hiệu suất 1,2%) và 25g cao C (hiệu suất 1,0%). Các cao thu được đều cho phản ứng dương tính với thuốc thử định tính flavonoid, phần dịch cồn sau chiết không cho các phản ứng này.



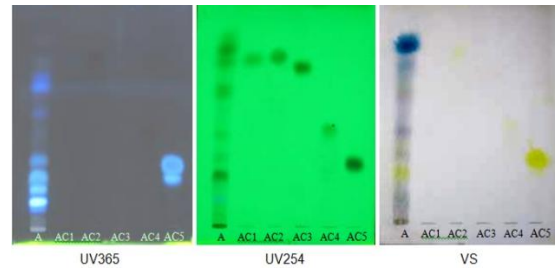
Sơ đồ 1. Sơ đồ tách phân đoạn cao cồn với các dung môi có độ phân cực tăng dần

3.2.3 Phân tích các phân đoạn

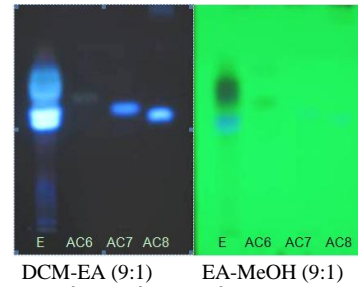
Tiến hành sắc ký cột cổ điển (CC) cao A với pha động là DCM – EA; step gradient với tỷ lệ EA tăng dần thu được 19 phân đoạn (PĐ), tinh chế các phân đoạn thu được các

trình thể AC1, AC2, AC3, AC4, AC5 với khối lượng lần lượt là 2, 5, 2, 1, 12 mg, trong đó AC2 có màu vàng nhạt, còn các trình thể khác đều màu trắng. Cao B được sắc ký cột với điều kiện tương tự cho ra 17 phân đoạn, trình chế các phân đoạn thu được các trình thể gồm AC6 màu vàng nâu và AC7, AC8 có màu trắng với khối lượng lần lượt là 2, 12, 15 mg. Quét phổ UV-Vis của các trình thể thu được (AC1 đến AC8) cho thấy phổ hấp thụ của AC1, AC2, AC7, AC8 có dạng điển hình của flavonoid[7], từ đó sơ bộ kết luận AC1, AC2, AC7, AC8 là các flavonoid. Tiến hành phân tích khối phổ (MS) của hai trình thể có khối lượng lớn là AC7 và AC8 cho thấy phân tử khối lần lượt là 312 đvC và 342 đvC, có thể dự đoán AC7 là một trimethoxyflavon ($C_{18}H_{16}O_5$) và AC8 là một tetramethoxy flavon $C_{19}H_{18}O_6$. Cao C cho phản ứng rất rõ với thuốc thử $FeCl_3$, dự đoán trong cao C có chứa nhiều thành phần flavonoid chưa bị methoxy hóa nên phân cực hơn cao A và cao B.

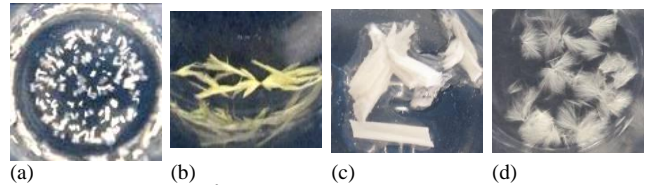
Riêng cao C chưa tìm được hệ dung môi cho khả năng tách tốt nhất để tiến hành sắc ký cột nên chưa tiến hành phân tích. Tuy nhiên kết quả phân tích cao C bằng sắc ký lớp mỏng với thuốc thử $FeCl_3$ cho rất nhiều vết đậm màu chứng tỏ trong cao C có chứa nhiều flavonoid dạng chưa methoxy hóa.



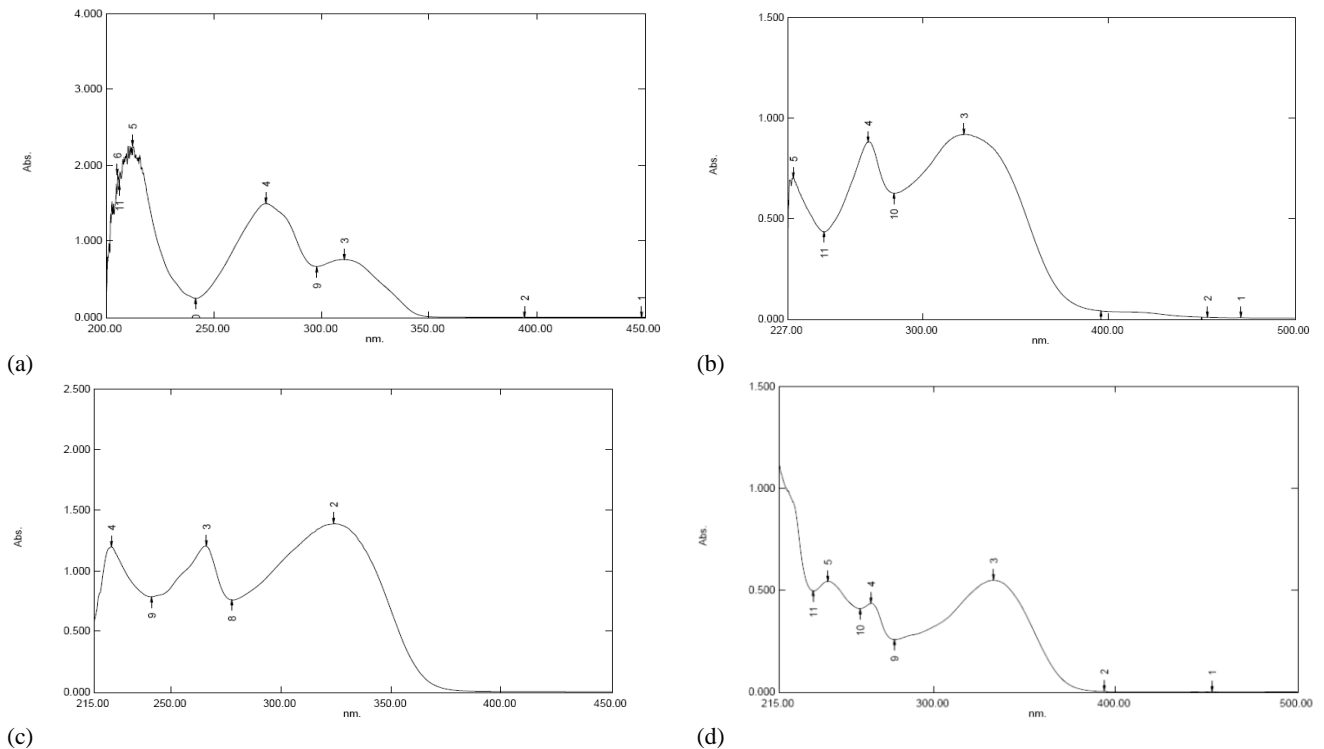
Hình 1. Sắc ký đồ các chất phân lập từ cao A



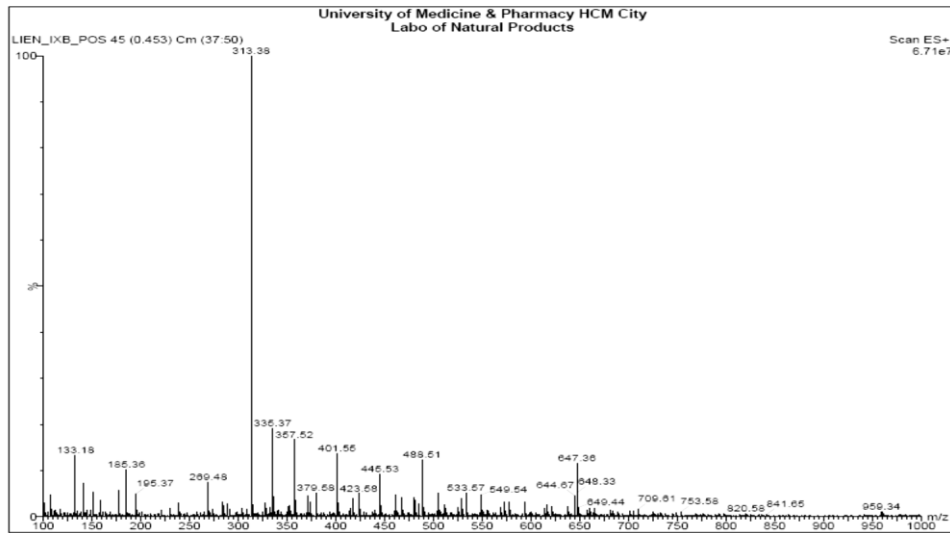
Hình 2. Sắc ký đồ các chất phân lập từ cao B



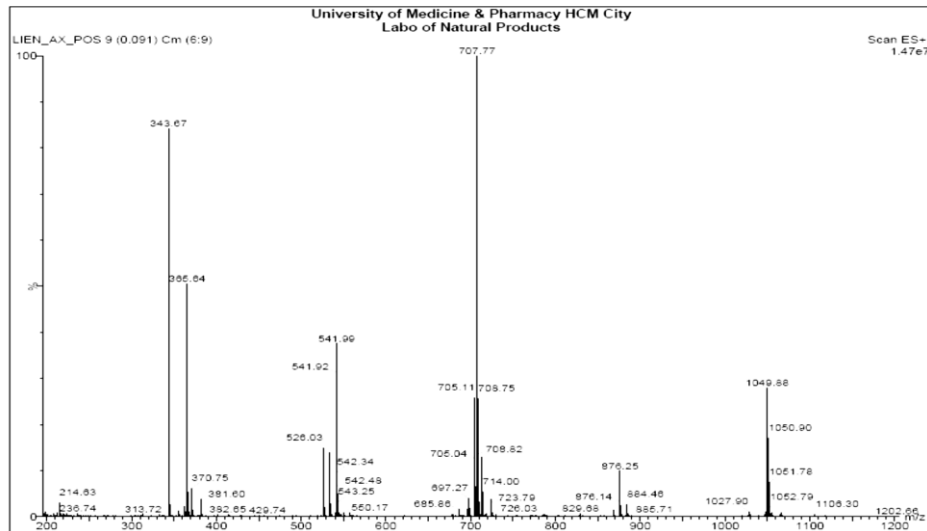
Hình 3. Các trình thể của AC1 (a), AC2 (b), AC7 (c) và AC8 (d)



Hình 4. Phổ UV-Vis của AC1 (a), AC2 (b), AC7 (c), AC8 (d)



(a)



(b)

Hình 5. Phổ MS của AC7 (a) và AC8 (b)

4. Kết luận và đề xuất

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học trong CCL thu hái ở tỉnh Long An (Việt Nam) cho thấy trong cây có chứa nhiều nhóm hoạt chất như flavonoid, anthocyanosid, proanthocyanidin, coumarin, tinh dầu, triterpenoid tự do, alkaloid, tanin... Các bằng chứng hóa học và quang phổ đã chứng minh được sự tồn tại của nhóm hoạt chất flavonoid trong cao PE, DCM và cao EA. Hơn nữa, thông qua phân tích khối phổ (MS) có thể dự đoán AC7 là một trimethoxyflavon và AC8 là một tetramethoxyflavon. Như vậy có thể kết luận CCL là một dược liệu chứa flavonoid với hàm lượng tương đối cao và tồn tại ở nhiều dạng, mà đặc biệt là dạng đã được polymethoxy hóa. Điều này hoàn toàn phù hợp với các tài liệu đã công bố ở Việt Nam và trên thế giới. Nguồn CCL này

có thể xem là nguồn cung cấp nguyên liệu phù hợp cho việc sản xuất các chế phẩm từ CCL ở Việt Nam.

Đề tài vẫn chưa phân tích được thành phần flavonoid của cao C do chưa tìm được dung môi thực sự phù hợp để tiến hành sắc ký cột. Do đó, hướng nghiên cứu tiếp theo là tiếp tục tìm phương pháp để phân tích cao C. Bên cạnh đó, tiến hành đo phổ NMR của AC7 và AC8 nhằm xác định chính xác công thức cấu tạo của hai chất này, qua đó có cơ sở để tiến hành định tính, định lượng và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

Lời cảm ơn

Tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Bùi Mỹ Linh và Th.S Nguyễn Thành Triết – ĐH Y dược Tp.HCM cùng tập thể Khoa Dược – ĐH Nguyễn Tất Thành đã hỗ trợ thực hiện đề tài

Tài liệu tham khảo

1. DeConde AS, Soler ZM, Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and burden of disease. *Am J Rhinol Allergy*. 30(2) (2016) 134.
2. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB. Y học, Hà Nội, 2000, tr.43, 495.
3. Đỗ Huy Bích và cs., *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam - tập 1*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2003, tr.375 – 377.
4. Ming L.C. (1999), *Ageratum conyzoides*: A tropical source of medicinal and agricultural products. In: J. Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, 1999, 469.
5. Adewole L. Okunade, *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), *Fitoterapia*, 73 (2002) 1.
6. Ngô Văn Thu, Trần Hùng, *Dược liệu - tập 1*, NXB. Giáo dục, Tp.HCM, 2010, tr. 353.
7. K.R. Markham, *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, New York, 1982.

Flavonoid in goat weed (*Ageratum conyzoides* L. Asteraceae)

Nguyễn Thị Kim Liên

ĐH Nguyễn Tất Thành
ntklien@ntt.edu.vn

Abstract Goat weed (*Ageratum conyzoides* (L.) Asteraceae), a popular folk medicine used to treat sinusitis. Among the published chemical constituents of the goat weed, the flavonoid group is a group that exhibits significant anti-inflammatory activity. The study was conducted to provide chemical evidences for the use of goat weed in the treatment of sinusitis. Dry plant powder was extracted with ethanol 96%. The total ethanol extract was divided into three fractions by shaking with petroleum ether 30-60 °C (PE), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EA). Segments were characterized by flavonoid reagents and analyzed by column chromatography for pure flavonoids. The substances were preliminarily identified on TLC and analyzed by UV-Vis and MS spectra. Results showed that flavonoids exist in all three segments, where PE and DCM segments contain methoxyflavones; The four flavonoids AC1, AC2, AC7 and AC8 were isolated, preliminarily determining that AC7 is a trimethoxyflavone and AC8 is a tetramethoxyflavone.

Keywords *Ageratum conyzoides*, goat weed, flavonoid, sinusitis