

Khảo sát thành phần hóa học của dịch chiết ethyl acetate từ cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* Linn.)

- Trần Thị Kim Ngân
- Lê Thị Lý

Trường Đại học Quốc Tế, ĐHQG-HCM

- Nguyễn Thị Ý Nhi
- Trần Thị Minh
- Trần Lê Quan

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 12 năm 2016 , nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Xu hướng quay về các thuốc có nguồn gốc thiên nhiên hiện là xu hướng đang được quan tâm và nghiên cứu. Việt Nam là nước có độ đa dạng sinh học cao với khoảng 4000 loài thực vật được sử dụng làm thuốc, trong đó có cỏ sữa lá lớn. Cỏ sữa lá lớn có tên khoa học là *Euphorbia hirta* Linn. thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*). Các nghiên cứu trước đây cho thấy trong cỏ sữa lá lớn chứa hàm lượng lớn các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao. Kết quả nghiên cứu ban đầu về thành phần hóa học từ dịch chiết ethyl acetate

Từ khóa: *Euphorbia hirta* Linn., cỏ sữa lá lớn, quercetin, quercitrin

của cây cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* Linn. thu được 4 hợp chất, bao gồm methyl gallate (1), quercetin (2), myricetin (3), và quercitrin (4). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ nghiệm hiện đại, gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, và DEPT); phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2D-NMR (COSY, HSQC và HMBC) và so sánh với các tài liệu nghiên cứu trước đây.

MỞ ĐẦU

Cây cỏ sữa lá lớn có tên khoa học là *Euphorbia hirta* Linn. thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*). Cỏ sữa lá lớn thuộc loài liên nhiệt đới, tập trung hầu hết ở các nước châu Á [1]. Dân gian Việt Nam gọi là cây cỏ sữa vì bề ngang thân cây ở bất kỳ vị trí nào cũng tiết ra chất nhựa mù màu trắng đục như sữa. Theo các nghiên cứu cổ truyền dân gian, *E. hirta* được sử dụng để điều trị hiệu quả rất nhiều bệnh như rối loạn đường ruột - dạ dày, bệnh về đường hô hấp, trị suyễn, trị sung cuống phổi, bộ máy tiết niệu, bộ máy sinh dục, và các bệnh khác về mắt. Ngoài ra, nó có tác dụng làm lành vết thương cũng như hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ, và đặc biệt là giúp hạ đường huyết [2-5]. Năm 2010, Widharna và các cộng sự công bố nghiên

cứu *in vivo* và *in vitro* khả năng kháng đái tháo đường trên chuột cho thấy dịch chiết của phân đoạn ethanol và ethyl acetate cho kết quả ức chế enzyme *alpha*-glucosidase [6]. Tuy nhiên, dựa trên tất cả các công bố hiện nay của cây cỏ sữa lá lớn, chưa có nghiên cứu về khảo sát thành phần hóa học của các hợp chất có trong *E. hirta* cho hoạt tính sinh học tốt. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát thành phần hóa học từ dịch chiết ethyl acetate.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu là cây cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* Linn.) được thu hái từ thị xã Long Khánh, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam (03/2015) và được

định danh bởi tiến sỹ Đặng Văn Sơn, thuộc Bảo tàng thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới.

Điều kiện thực nghiệm

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), COSY, HMBC, HSQC ghi trên máy BRUKER AV 500 sử dụng acetone- d_6 và methanol- d_4 làm dung môi nội chuẩn, thực hiện tại Phòng Phân tích Trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Sắc ký bản mỏng thực hiện trên silica gel (Merck Kielselgel 60 F254, 250 μm), hiện vết bằng đèn UV và dung dịch sulfuric acid 25 %, và đun nóng khoảng 3-5 phút.

Sắc ký cột được thực hiện trên silica gel pha thường (Merck KGaA 230–400 mesh ASTM-1 kg).

Phương pháp nghiên cứu

Cỏ sữa lá lớn sau khi thu hái, được loại bỏ phần dưới đất, rửa sạch bằng nước máy, được làm khô ở điều kiện tự nhiên, và xay nhuyễn, thu được 8 kg bột cây khô. Sau đó, bột cây khô được ngâm dầm với methanol (MeOH) trong 24 giờ và lọc lấy dung dịch (quá trình được lặp lại 3 lần). Tiến hành cô quay dung dịch sau ngâm ở áp suất thấp, thu được cao thô MeOH (638 g). Hoà tan cao thô MeOH vào nước và trích lần lượt với các dung môi ether dầu hòa (PE), chloroform (Ch), ethyl acetate (EA), và butanol (Bu) thu được các cao phân đoạn tương ứng, gồm cao PE (80 g), cao Ch (46 g), cao EA (92 g), cao Bu (58 g), và pha nước.

Thực hiện sắc ký cột silica gel trên cao ethyl acetate (15 gam) với hệ dung môi giải ly PE:EA có độ phân cực tăng dần thu được 15 phân đoạn thành phần (E1–E15). Phân đoạn E1 (8 g) được sắc ký cột silica gel và giải li với hệ dung môi Ch/MeOH (từ 50:1 đến 0:1 theo thể tích) thu được sáu phân đoạn nhỏ E1A–E1F. Phân đoạn nhỏ E1C (0,5 g) được tiếp tục sắc ký cột và giải li với hệ dung môi Ch/EA/MeOH (từ 40:5:1 đến 10:10:1 theo tỉ lệ thể tích) thu được hợp chất **1** (22 mg) và hợp chất **2** (48 mg). Tương tự, phân đoạn E3 (12 g) cũng được sắc ký

cột silica gel và giải li với hệ dung môi Ch/MeOH (từ 40:1 đến 0:1 theo thể tích) thu được tám phân đoạn nhỏ E3A–E3H. Phân đoạn nhỏ E3E (0.68 g) được tiếp tục sắc ký cột và giải li với hệ dung môi Ch/MeOH/ H_2O (từ 60:5:0.1 đến 10:2:0.1 theo tỉ lệ thể tích) thu được hợp chất **3** (18 mg). Cuối cùng, phân đoạn E7 (5 g) cũng được sắc ký cột silica gel và giải li với hệ dung môi EA/MeOH (từ 30:1 đến 0:1 theo thể tích) thu được năm phân đoạn nhỏ E7A–E7E. Phân đoạn nhỏ E7A (0,18 g) được tiếp tục sắc ký cột và giải li với hệ dung môi EA/MeOH/ H_2O (từ 50:5:0.1 đến 5:2:0.1 theo tỉ lệ thể tích) thu được hợp chất **4** (12 mg).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

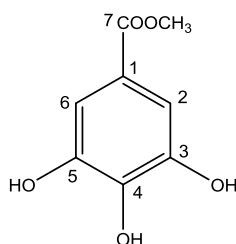
Hợp chất **1** thu được là tinh thể hình kim, màu trắng, tan trong methanol, acetone. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có sự hiện diện hai tín hiệu cộng hưởng của proton, một tín hiệu mũi đơn ở δ_{H} 3,73 (3H, s, OCH_3) của proton nhóm methoxy và một tín hiệu mũi đơn của proton thơm tại δ_{H} 7,06 (2H, s) (H-2 và H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **1** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng ở δ_{C} 51,92 và 167,13, tương ứng với carbon của nhóm methoxy và carbon carbonyl. Ngoài ra, hợp chất **1** cũng có hai tín hiệu của carbon tứ cấp tại δ_{C} 138,69 và 146,06 và một tín hiệu carbon tam cấp của nhân thơm tại δ_{C} 109.59. Từ đó có thể thấy hợp chất **1** chứa một nhân thơm tứ hoán.

Từ dữ liệu tương quan của phổ HSQC cho thấy hai proton thơm nối trực tiếp với carbon δ_{C} 109.59, nên có thể dự đoán hợp chất **1** chứa nhân thơm đối xứng. Từ kết quả của phổ HMBC cho thấy có sự tương quan của proton methoxy với carbon của nhóm carbonyl, nên có thể kết luận đây là ester của acid gallic.

So sánh dữ liệu phổ của hợp chất **1** với hợp chất methyl gallate [7] thì thấy có sự tương đồng. Do đó, cấu trúc của hợp chất **1** được đề nghị là methyl gallate (Hình 1).

Bảng 1. So sánh số liệu phổ NMR của (1) với methyl gallate

Vị trí	1 (Acetone- <i>d</i> ₆)		Methyl gallate (CDCl ₃ , 400 MHz)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1		121,87		118,82
2	7,06 (2H, s)	109,92	7,26 (2H, s)	107,86
3		146,06		144,10
4		138,69		136,99
5		146,06		144,10
6	7,06 (2H, s)	109,59	7,26 (2H, s)	107,86
7		167,13		165,67
OCH ₃	3,73 (3H, s)	51,92	4,01 (3H, s)	50,36

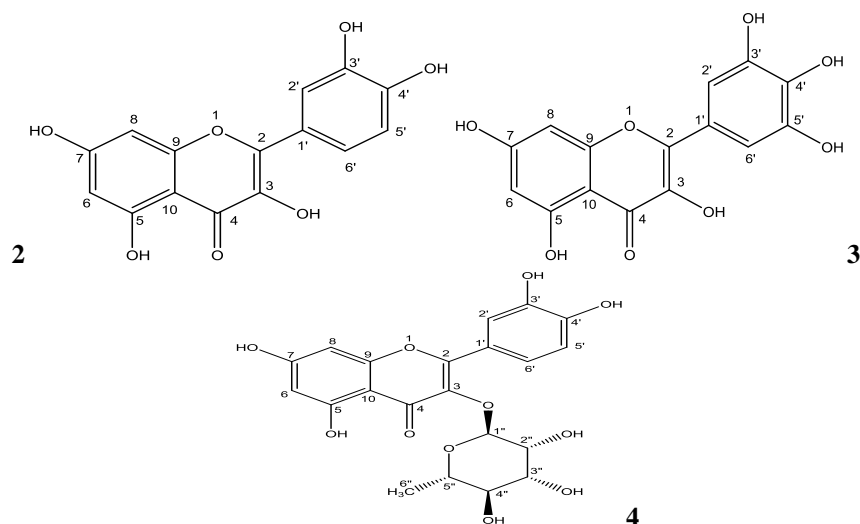
**Hình 1.** Cấu trúc của methyl gallate

Hợp chất **2** cô lập được là chất rắn, dạng bột, màu vàng, tan trong methanol, acetone. Dữ liệu phổ ¹³C-NMR và DEPT cho thấy có các tín hiệu của năm carbon tam cấp (tất cả đều thuộc nhân thơm) và mười tín hiệu carbon tứ cấp, trong đó có một carbon carbonyl, năm carbon nối trực tiếp với nguyên tử oxygen, và bốn carbon còn lại đều có tín hiệu ở vùng từ trường thấp.

Trong phổ ¹H-NMR, có sự xuất hiện của sáu tín hiệu cộng hưởng, một proton của nhóm -OH kiềm nổi δ_H 12,13 (1H, s), và năm proton thơm [δ_H 6,23 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6); δ_H 6,49 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); δ_H 7,78 (1H, d, 2,15 Hz, H-2'); δ_H 7,66 (1H, dd, 8,5 Hz, 2,15 Hz, H-6'); và δ_H 6,97 (1H, d, 8,5 Hz, H-5')]. Trong đó, proton δ_H 6,49 (d) ghép *meta* với proton δ_H 6,23 (d) với hằng số ghép $J = 2,0$ Hz, nên hợp chất **2** có chứa nhân thơm 1,2,3,5 tứ hoá. Bên cạnh đó, proton δ_H 7,66 (dd) ghép cặp *ortho* với proton δ_H 6,97(d) và ghép *meta* với proton δ_H 7,78 (dd) với hằng số ghép lần lượt là $J=8,5$ Hz và $J=2,15$ Hz, chứng tỏ hợp chất **2** có chứa nhân thơm 1,3,4 tam

hoán. Kết hợp dữ liệu phổ hai chiều và tiến hành so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **2** với hợp chất quercetin [8] thì thấy có sự tương đồng. Vì vậy, hợp chất **2** được đề nghị là quercetin (Hình 2).

Hợp chất **3** cô lập được là chất rắn, dạng tinh thể hình kim, màu vàng, tan trong methanol, acetone. Dữ liệu phổ ¹³C-NMR và DEPT cho thấy có mười lăm tín hiệu carbon thơm tương tự như hợp chất **2**. Trên phổ ¹H-NMR, có sự xuất hiện của ba tín hiệu cộng hưởng của bốn proton hương phương [δ_H 6,18 (1H, d, 2,0 Hz); δ_H 6,43 (1H, d, 2,0 Hz); δ_H 7,34 (2H, s)]. Trong đó proton δ_H 6,18 (d) ghép *meta* với proton δ_H 6,43(d) với hằng số ghép $J = 2,0$ Hz tương ứng với H-6 và H-8, nên hợp chất **3** có chứa nhân thơm 1,2,3,5 tứ hoá, thuộc vòng A của khung flavone. Thêm nữa, proton δ_H 7,34 (2H, s) được dự đoán là H-2' và H-6' của vòng B. So sánh các dữ liệu từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều và tài liệu tham khảo trước đây [9], cấu trúc của hợp chất **3** được dự đoán là myricetin (Hình 2).



Hình 2. Cấu trúc của hợp chất 2, 3 và 4

Bảng 2. Số liệu phổ NMR của các hợp chất 2, 3 và 4

Vị trí	2 (Acetone- d_6 , 500 MHz)		3 (Acetone- d_6 , 500MHz)		4 (Acetone- d_6 , 500MHz)	
	δ_H , J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_C , J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H , J (Hz)	δ_C (ppm)
2		147,02		146,32		158,54
3		136,80		136,27		136,25
4		176,61		176,47		179,67
5		162,20		162,07		159,43
6	6,23 (1H, <i>d</i> , 2,0)	99,17	6,18 (1H, <i>d</i> , 2,0)	99,05	6,22 (1H, <i>d</i> , 2,0)	99,82
7		165,02		164,95		165,88
8	6,49 (1H, <i>d</i> , 2,0)	94,55	6,43 (1H, <i>d</i> , 2,0)	94,41	6,38 (1H, <i>d</i> , 2,0)	94,71
9		157,90		157,78		163,34
10		104,21		104,03		105,91
1'		123,87		122,79		122,87
2'	7,78 (1H, <i>d</i> , 2,15)	115,82	7,34 (2H, <i>s</i>)	108,29	7,35 (1H, <i>d</i> , 2,15)	116,38
3'		145,85		146,91		146,43
4'		148,37		136,85		149,81
5'	6,97 (1H, <i>d</i> , 8,5)	116,28		146,91	6,92 (1H, <i>d</i> , 8,5)	116,95
6'	7,66 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,15)	121,56	7,34 (2H, <i>s</i>)	108,29	7,32 (1H, <i>dd</i> , 8,5 Hz, 2,15)	122,99
1''	-	-	-	-	5,36 (1H, <i>d</i> , 1,6)	103,56
2''	-	-	-	-	4,23 (1H, <i>m</i>)	72,07
3''	-	-	-	-	3,76 (1H, <i>m</i>)	72,30
4''	-	-	-	-	3,35 (1H, <i>m</i>)	73,44
5''	-	-	-	-	3,43 (1H, <i>m</i>)	72,20
6''	-	-	-	-	0,96 (3H, <i>d</i> , 6,15)	17,82

Hợp chất **4** cô lập được là chất rắn, dạng bột, màu vàng, tan trong methanol, DMSO. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy hợp chất **4** có các tín hiệu tương tự các tín hiệu của hợp chất **2**. Tuy nhiên, trên phổ ^1H -NMR của hợp chất **4** còn thấy xuất hiện của một gốc đường rhamnose thông qua sự xuất hiện của một tín hiệu proton doublet của nhóm methyl có độ dịch chuyển hóa học δH 0,96 (3H, d, 6,15 Hz), nằm tín hiệu ở trong khoảng độ dịch chuyển hóa học từ 3,35–4,23 ppm và một tín hiệu của proton anomer tại

KẾT LUẬN

Từ cao methanol của cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* Linn., chúng tôi ly trích được bốn cao phân đoạn, gồm cao ether dầu hòa, cao chloroform, cao ethyl acetate và cao *n*-butanol. Bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển kết hợp với các phương pháp phổ nghiệm hiện đại, bốn hợp chất methyl gallate (hợp chất **1**), quercetin (hợp chất **2**), myrecitin (hợp chất

δH 5.36 (1H, d, 1,6 Hz). Từ kết quả của phổ HMBC cho thấy có sự tương quan giữa H-1" (δH 5,36) với C-3 (δC 136.46) xác định đơn vị đường gắn vào vị trí C-3 của khung flavone. Cấu dạng của nhóm –OH gắn vào carbon anomer được xác định dựa vào hằng số ghép JH-1", H-2" = 1,6 Hz. Đối chiếu dữ liệu phổ của hợp chất **4** với hợp chất quercitrin [10] thì thấy có sự tương đồng. Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **4** được dự đoán là quercitrin (Hình 2).

3), và quercitrin (hợp chất **4**) được cô lập từ cao ethyl acetate. Sự cô lập thành công các hợp chất trên tạo cơ sở thúc đẩy cho việc phân lập các hợp chất tự nhiên có tiềm năng trong nghiên cứu y học, là tiền đề cho quá trình nghiên cứu các hoạt tính sinh học của cây cỏ sữa lá lớn trong thời gian tới.

Investigation of bioactive compounds from the ethyl acetate extract of *Euphorbia hirta* Linn.

- Tran Thi Kim Ngan
- Le Thi Ly

International University, VNU–HCM

- Nguyen Thi Y Nhi
- Tran Thi Minh
- Tran Le Quan

University of Science, VNU–HCM

ABSTRACT

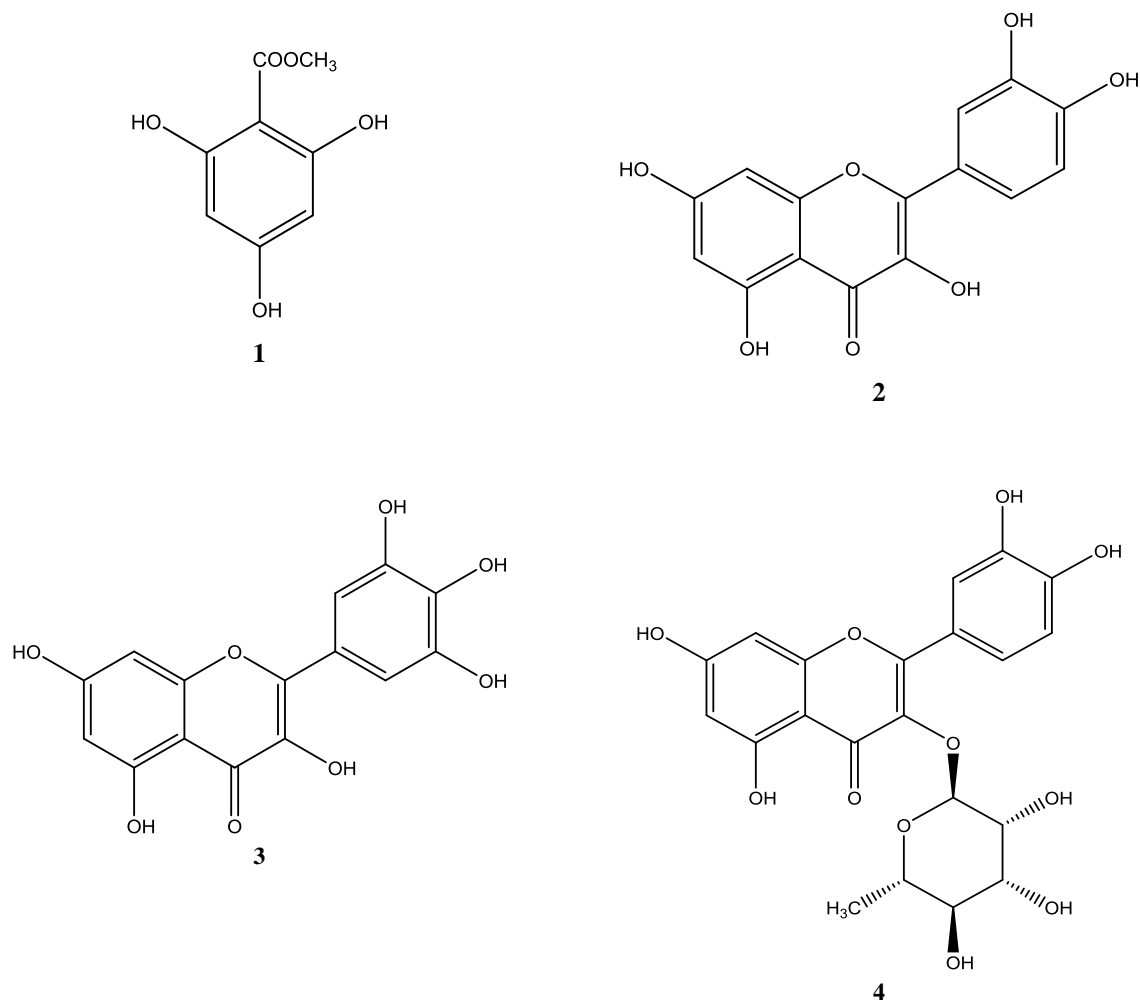
Euphorbia hirta Linn. (cỏ sữa lá lớn in Vietnamese) belongs to Euphorbiaceae family, is a group of small prostrate herbaceous annual weed in Vietnam. It is abundant in waste places and open grasslands and distributes in most Asian countries. *E. hirta* is traditionally used in the treatment of gastrointestinal disorders, bronchial and respiratory.

The aqueous extract exhibits anxiolytic, analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory activities. Strong anti-diabetic activity of Euphorbiaceae family in general and *E. hirta* in particular was reported in the past investigations. *E. hirta* has been studied by various investigations and several active constituents have been isolated and identified successfully. Most

of those compounds have strong biological activities. At the first step in the processing of the isolation of bioactive compounds from the ethyl acetate extract, we isolated four purified compounds, including methyl gallate (1), quercetin (2), myricetin (3), and

quercitrin (4). The chemical structures of those compounds were elucidated by spectroscopic methods and compared with published data in the literature.

Keywords: *Euphorbia hirta* Linn., quercetin, quercitrin, ethyl acetate extract



Hình 3. Structure of methyl gallate (1), quercetin (2), myricetin (3), and quercitrin (4).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P.H. Hộ, Cây cỏ Việt Nam, Tập 2, Nhà xuất bản trẻ, 291 (2000).
- [2]. C. Ogueke, J. Ogbulie, I. Okoli, B. Anyanwu, Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*., *Journal of American Science*, 3, 3, 11–16 (2007).
- [3]. M. Bnouham, A. Ziyat, H. Mekhfi, A. Tahri, A. Legssyer, Review: Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990–2000), *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 14, 1–25 (2006).
- [4]. S. Kumar, R. Malhotra, D. Kumar, *Euphorbia hirta*: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities, *Pharmacognosy Reviews*, 4, 7, 58–61 (2010).
- [5]. G. Uppal, V. Nigam, A. Kumar, Antidiabetic activity of ethanolic extract of *Euphorbia hirta* Linn., *Der Pharmacia Lettre*, 4, 4, 1155–1161 (2012).
- [6]. R.M. Widharna, A.A. Soemardji, K.R. Wirasutisna, L.B.S. Kardono, Anti diabetes mellitus activity in vivo of ethanolic extract and ethyl acetate fraction of *Euphorbia hirta* L. herb, *International Journal of Pharmacology*, 6, 3, 231–240 (2010).
- [7]. S. Kamatham, N. Kumar, Padmaja Gudipalli, Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cell, *Toxicology Reports*, 2, 520–529 (2015).
- [8]. M. Aderogba, A. Ndhlala, K.Rengasamy, J. Staden, Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*, *Molecules*, 18, 12633–12644(2013).
- [9]. N.H.T. Phan, N.T.D. Thuan, N.V. Duy, P.T.M. Huong, N. X. Cuong, N.H. Nam, N.V. Thanh, C. V. Minh, Flavonoids isolated from *Dipterocarpus obtusifolius*, *Vietnam Journal of Chemistry*, 53(2e), 131–136 (2015).
- [10]. S. Bose, S. Maji, P. Chakraborty, Quercitrin from *Ixora coccinealeaves* and its anti-oxidant activity, *Journal of Pharma SciTech*, 2, 2, 72–74 (2013).