

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY RAU MÁ *CENTELLA ASIATICA* (L.) URBAN THU HÁI TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Võ Thị Quỳnh Như¹, Trần Văn Lộc^{2*}, Trần Thị Phương Thảo², Nguyễn Tuấn Thành²
Lê Thị Thu Hà², Trần Văn Sung²

¹Trường Trung học phổ thông Gio Linh, Quảng Trị

²Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đền Tòa soạn 3-6-2016; Chấp nhận đăng 10-6-2016

Abstract

During the screening for biological active compounds from the medicinal plant *Centella asiatica*, a sample from Ho Chi Minh City has been studied. From the ethanol extract of the plant six compounds: stigmasterol, β -sitosterol, asiatic acid, madecassic acid, mixture of stigmasterol glucoside and β -sitosterol glucoside (1:1) and madecassoside have been isolated. Their structures were determined by IR, MS and NMR (1D and 2D) spectroscopy as well as by comparison with the literature data.

Keywords. *Centella asiatica*, triterpene, triterpene glycoside, sterol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây rau má có tên khoa học là *Centella asiatica* (L.) Urban (họ Hoa tán, Apiaceae) là một trong những cây thuốc được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền ở Việt Nam và các nước khác trong khu vực đông Á như: Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia, Sri Lanka. Rau má mọc tự nhiên khắp nơi, thường thành từng đám ở vườn, bãi ven suối, nương rẫy, bờ ruộng cao và ven rừng. Nguồn rau má mọc tự nhiên ở Việt Nam khá dồi dào. Tuy vậy, cây chỉ được khai thác và sử dụng tại chỗ, chưa trở thành mặt hàng thương mại. Trong dân gian rau má được sử dụng cả cây để làm rau ăn, nước uống, chữa lành vết thương, mụn nhọt, bảo vệ gan, sốt vàng da, bệnh phong và một số bệnh khác [1-3]. Tuy đã biết đến từ lâu, song gần đây các nhà khoa học vẫn phát hiện thêm nhiều tác dụng chữa bệnh quý giá của cây rau má [4-6]. Các thành phần hóa học chính của cây rau má gồm các hợp chất triterpen và triterpen glucosid như axit asiatic, axit madecassic, asiaticosid, madecassosid, brahmosid và brahminosid. Ngoài ra, cây rau má còn chứa các hợp chất polyacetylen, flavonoid, alkaloid, oligosaccharid, vitamin C và tinh dầu với mùi thơm đặc trưng [7, 8].

Thành phần và hàm lượng các chất trong cây rau má phụ thuộc nhiều vào vị trí địa lý, môi trường sinh thái, thời gian thu hái cũng như cách bảo quản sau khi thu hái. Trong bài báo này chúng tôi thông báo việc tách và tinh chế các hợp chất chính của cây rau

má thu hái tại thành phố Hồ Chí Minh.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị phân tích

Sắc ký lớp mỏng (SKLM): Bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60GF₂₅₄, độ dày 0,2 mm. Phân lập các chất bằng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel cỡ hạt 0,40-0,63 mm (Merck). Phổ khối ESI-MS được đo trên máy AGILENT, 1100 của hãng Varian (Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H, ¹³C-NMR đo trên máy Bruker Avance - 500, chất nội chuẩn là TMS cho ¹H- và tín hiệu dung môi cho ¹³C-NMR. Phổ hồng ngoại (FTIR) đo dưới dạng viên nén KBr trên máy quang phổ IMPACT410 của hãng Nicolet, Hoa Kỳ.

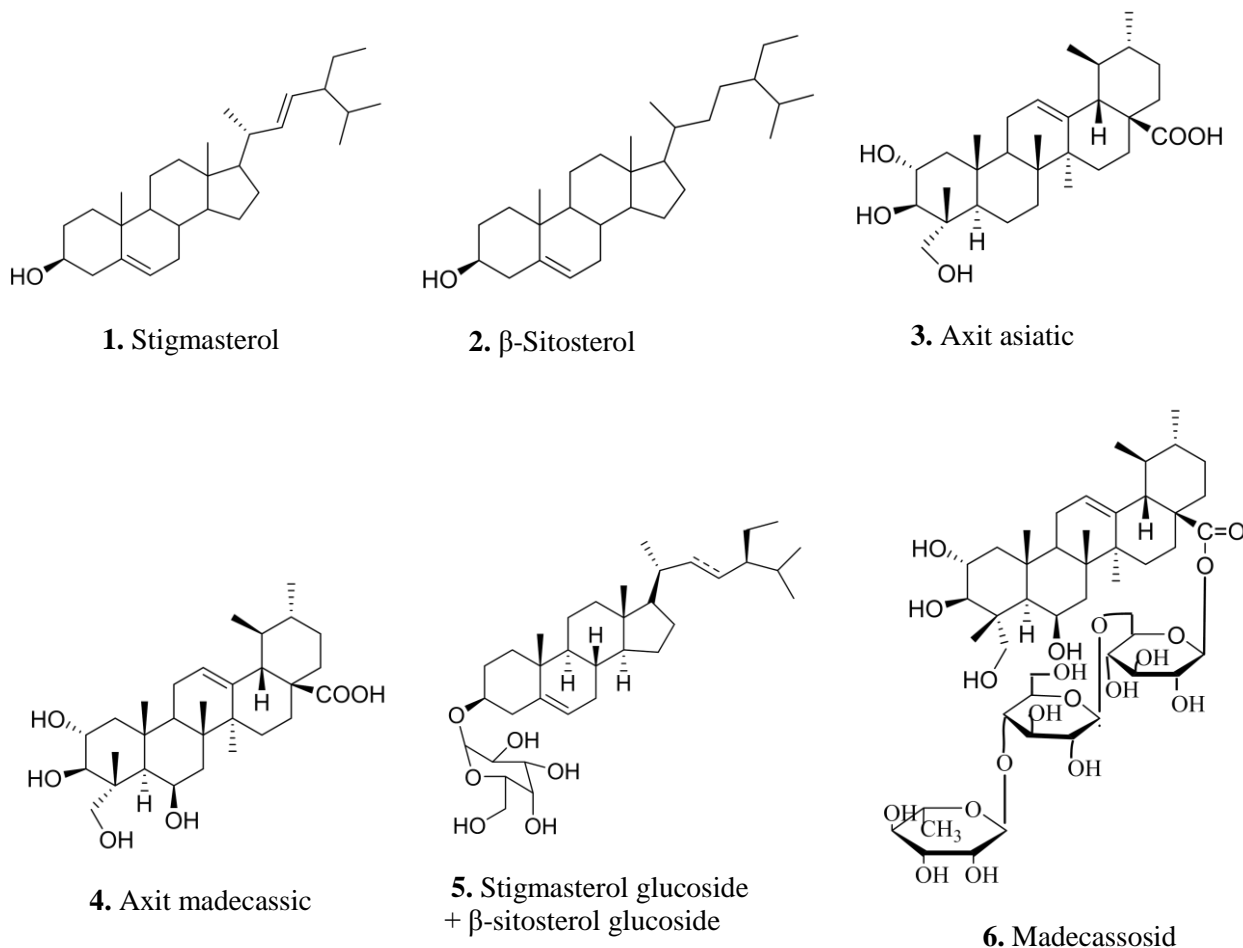
2.2. Tách và tinh chế các chất

Mẫu cây rau má được thu hái tại Thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 5 năm 2013. 1,2 kg rau má khô, được xay nhỏ và ngâm chiết lần một với 5 lít etanol 90 % ở nhiệt độ 80 °C trong 2 giờ, lọc qua phễu lọc thu được 3 lít dịch chiết. Bã được chiết thêm 2 lần nữa với etanol (2 lần × 3 lít). Thời gian rút dịch chiết là 2 giờ/lần. Gộp dịch chiết lại, quay cất dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50 °C, thu được 158 gam cặn chiết EtOH. Cặn này được chế thêm nước cất. Sau đó chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform và

n-butanol. Các dịch chiết được cất loại dung môi cho đến khi khô, thu được 29 gam cặn *n*-hexan, 33 gam cặn chloroform và 50 gam cặn chiết *n*-butanol.

15 gam cặn chiết *n*-butanol được tách bằng sắc ký cột silica gel Merck (cỡ hạt 0,043-0,063 mm), rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH với tỉ lệ

MeOH tăng dần: 95:5, 90:10, 80:20 và 70:30, đã phân lập được 6 chất: stigmasterol (1), β-sitosterol (2), axit asiatic (3), axit madecassic (4), stigmasterol glucosid + β-sitosterol glucosid (1:1) (5) và madecassosid (6).



Hình 1: Các chất phân lập từ cây rau má thu tại Thành phố Hồ Chí Minh

Chất 1: Stigmasterol

Phổ khối ESI-MS ion dương m/z 395 (100, [M+1-H₂O]⁺). Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm), *J* (Hz): 0,70 (3H, s, H-18); 0,79 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, H-26); 0,80 (3H, t, *J* = 7,5 Hz, H-29); 0,84 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, H-27); 1,01 (3H, s, H-19); 1,02 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-21); 3,51 (1H, m, H-3α); 5,02 (1H, dd, *J* = 8,7; 15,2 Hz, H-22); 5,16 (1H, dd, *J* = 8,6, 15,2 Hz, H-23); 5,35 (d, *J* = 5,4 Hz, H-6). Phổ ¹³C-NMR (CD₃Cl, 125 MHz) δ (ppm): 37,3 (C-1); 31,7 (C-2); 71,8 (C-3); 42,4 (C-4); 140,8 (C-5); 121,7 (C-6); 31,9 (C-7); 31,9 (C-8); 50,2 (C-9); 36,6 (C-10); 21,1 (C-11); 39,7 (C-12); 42,3 (C-13); 56,9 (C-14); 25,4 (C-15); 28,9 (C-16); 56,0 (C-17); 12,2 (C-18); 19,0 (C-19); 40,5 (C-20); 19,4 (C-21); 138,3 (C-22); 129,3 (C-23); 51,3 (C-24); 31,9 (C-25); 19,0 (C-26); 21,1 (C-27); 25,4 (C-28); 12,2 (C-29).

Chất 2: β-sitosterol

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm), *J* (Hz): 0,68 (3H, s, CH₃-18); 0,77 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, CH₃-27); 0,84 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, CH₃-26); 0,85 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃-21); 0,91 (3H, t, *J* = 6,4 Hz, CH₃-29); 1,01 (3H, s, CH₃-19); 3,52 (1H, m, H-3α); 5,35 (1H, m, H-6).

Chất 3: Axit asiatic

Phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm): 0,72 (3H, s, CH₃); 0,87 (3H, s, CH₃); 0,92 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, CH₃); 0,99 (3H, br.s, CH₃); 1,07 (3H, s, CH₃); 1,16 (3H, s, CH₃); 2,24 (1H, d, *J* = 11,5 Hz, H-18); 3,30 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-23a); 3,39 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-3α); 3,54 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-23b); 3,72 (1H, m, H-2β); 5,26 (1H, br.s, H-12). Phổ khối ESI-MS ion âm m/z 487 [M-H]⁻.

Chất 4: Axit madecassic

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm): 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 0,99 (3H, s, CH_3); 1,07 (3H, s, CH_3); 1,10 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,30 (3H, s, CH_3); 1,40 (3H, s, CH_3); 3,31 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3 α); 3,46 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); 3,61 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 3,78 (1H, m, H-2 β); 4,40 (1H, m, H-6); 5,31 (1H, m, H-12). Phổ khối (ESI-MS) cho pic ion giả phân tử tại m/z 505 $[\text{M}+1]^+$.

Chất 5: Hỗn hợp stigmaterol glucosid và β -sitosterol glucosid

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 0,80 (3H, d, $J = 10,0$ Hz, CH_3); 0,90-0,96 (6H, 2 x CH_3); 1,04 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3); 1,11 (3H, s, CH_3); 1,15 (3H, d, $J = 10,0$ Hz, CH_3); 3,03-3,04 (1H, m); 3,14-3,16 (1H, m); 3,18 (1H, d, $J = 4,5$ Hz); 3,24-3,28 (1H, m); 3,55-3,61 (1H, m); 3,76-3,80 (1H, dd, $J = 5,0; 5,5$ Hz); 4,35 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 4,58 (1H, t, $J = 6,0$ Hz); 5,01 (1H, d, $J = 4,0$ Hz); 5,04 (d, $J = 4,5$ Hz); 5,47 (1H, br.s).

Chất 6: Madecassosid

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm): 0,72 (3H, s); 0,86 (3H, s); 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz); 0,99 (3H, br.s); 1,08 (3H, s); 1,15 (3H, s); 1,29 (3H, d, $J = 6,5$ Hz); 2,26 (1H, d, $J = 11,0$ Hz); 3,99 (1H, m); 4,10 (1H, d, $J = 11,0$ Hz); 4,40 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 4,87 (1H, s); 5,27 (1H, br.s); 5,32 (1H, d, $J = 8,0$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): CH_3 : 13,96; 17,65; 17,84; 17,92; 18,06; 21,57; 24,01; CH_2 : 19,08; 24,51; 25,22; 29,26; 31,68; 33,58; 37,58; 61,89; 66,37; 69,64. CH: 40,20; 40,37; 48,20; 54,06; 69,64; 70,62; 70,98; 72,21; 72,39; 73,73 (2CH); 75,24; 76,67; 76,81 (2CH); 77,84; 78,14; 78,22; 79,50; 95,79; 102,83; 104,44; 126,92. C: 38,97; 40,94; 43,38; 44,10; 49,85; 139,32; 177,95. Phổ ESI-MS ion dương: m/z 975 $[\text{M}+1]^+$, $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{20}$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất 1: Được phân lập dưới dạng tinh thể màu trắng, điểm nóng chảy 169-171°C.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có hai nhóm methyl với các tín hiệu singlet tại $\delta_{\text{H}} = 0,70$ (3H, s, H-18) và $\delta_{\text{H}} = 1,01$ (3H, s, H-19), ba nhóm methyl gắn với -CH với các tín hiệu doublet tại: $\delta_{\text{H}} = 0,79$ (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-26), 0,84 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-27), 1,02 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21) và một nhóm methyl gắn với - CH_2 với tín hiệu triplet tại: $\delta_{\text{H}} = 0,80$ (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-29). Ở vùng trường thấp cho tín hiệu cộng hưởng của một olefin proton $\delta = 5,35$ (1H, br.s, H-6) và hai olefin proton $\delta = 5,02$ (1H, dd, $J = 8,7; 15,2$ Hz, H-22) và 5,16 (1H, dd, $J = 8,6; 15,2$ Hz, H-23);

một proton cacbinol: $\delta = 3,51$ (1H, m, H-3 α) chứng minh cho nhóm β -OH ở vị trí C₃. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho tín hiệu cộng hưởng của 29 cacbon, trong đó có 3 cacbon bậc bốn, 11 cacbon bậc ba, 9 cacbon bậc hai và 6 nhóm methyl. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cũng cho tín hiệu cộng hưởng của hai liên kết đôi ở vị trí C₅ = C₆: ($\delta = 140,8$ và 121,7) và vị trí C₂₂ = C₂₃: ($\delta = 138,3$ và 129,3). Phổ khối ESI-MS cho pic ion tại m/z 395 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$. Pic này là pic cơ bản, hình thành do tạo thành dẫn xuất dien liên hợp (3,5-dien) sau khi phân tử **1** bị tách một phân tử nước. Kết hợp các dữ kiện phổ ESI-MS, phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, phổ DEPT và so sánh với số liệu trong tài liệu [9] cho phép xác định cấu trúc của chất **1** là stigmaterol.

Chất 2: được xác định là β -sitosterol qua so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chúng với số liệu trong tài liệu [9].

Chất 3: được phân lập từ cặn chiết BuOH dưới dạng tinh thể màu trắng ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$), điểm nóng chảy 324-326 °C.

Phổ hồng ngoại: cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl (3411 cm^{-1}), nhóm CH_2 , CH_3 (2930 và 2866 cm^{-1}). Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có 6 nhóm methyl trong đó có 4 nhóm methyl gắn với cacbon bậc 4 với các tín hiệu singlet tại: 0,72; 0,87; 1,07; 1,16 và hai nhóm methyl gắn với CH với một tín hiệu doublet tại $\delta_{\text{H}} = 0,92$ ($J = 6,5$ Hz) và một tín hiệu singlet tù tại $\delta_{\text{H}} = 0,99$ ppm. Ngoài ra, trên phổ có tín hiệu một nhóm CH_2 gắn với OH ở $\delta_{\text{H}} = 3,29$ (d, $J = 11,0$ Hz, H-23a); $\delta_{\text{H}} = 3,53$ (d, $J = 11,0$ Hz, H-23b); 2 nhóm hydroxy gắn với CH ở $\delta = 3,38$ (d, $J = 9,5$ Hz, H-3) và 3,71 (m, H-2) và 1 tín hiệu của nối đôi ở $\delta = 5,26$ (br.s, H-12). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của chất **3** có mặt của 30 cacbon trong đó có 6 nhóm methyl, 9 nhóm cacbon bậc 2, 8 nhóm cacbon bậc 3 và 7 nhóm cacbon bậc 4, nhóm cacboxylic với $\delta = 181,6$ ppm và tín hiệu nối đôi C₁₂ = C₁₃ ($\delta = 139,8$, 126,6 ppm). Phổ H-H-COSY cho thấy có sự tương tác giữa hai proton ở δ_{H} : 3, 29 (d, $J = 11$ Hz); 3,53 (d, $J = 11$ Hz) gắn trực tiếp với cacbon ở vị trí C-23, proton ở $\delta = 3,38$ ($J = 9,5$ Hz, H-3) tương tác với proton ở $\delta = 3,71$ (m, H-2). Phổ HSQC cho thấy rõ giữa H-2 (3,72 ppm) và C-2 (69,7 ppm), giữa C-3 (72,2 ppm) và H-3 (3,38 ppm), tương tác giữa C-12 (126,6 ppm) và H-12 (5,26 ppm). Phổ khối (ESI-MS) cho pic ion giả phân tử tại m/z 487,4 $[\text{M}-\text{H}]^-$. So sánh các số liệu phổ MS, ^1H - và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **3** với số liệu của axit asiatic trong tài liệu [10, 11], thấy hoàn toàn trùng khớp. Do vậy có thể kết luận chất **3** chính là axit asiatic.

Chất 4: Phổ hồng ngoại của chất **4** cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl (3416 cm^{-1}), nhóm CH_2 , CH_3 (2930 và 2867 cm^{-1}). Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho

thấy có 4 metyl singlet, hai metyl doublet tại 0,92 và 1,10 ppm. Ngoài ra trên phổ có các tín hiệu của nhóm hydroxymetin (-CHOH) tại δ_H : 3,31 (d, $J = 9,5$ Hz, H-3); 4,40 (m, H-6); tín hiệu ở $\delta_H = 5,31$ ppm đặc trưng cho nhóm metin olephinic (=CH) và 2 tín hiệu doublet đặc trưng cho nhóm CH_2 gắn với OH tại δ_H : 3,46 và 3,61 ppm. Sự có mặt của các nhóm này được củng cố bởi các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR ở δ_C : 69,6 ppm (C-2), 78,2 (C-3), 68,4 (C-6), 126,9 và 139,0 ppm (C_{12} và C_{13}). Phổ 1H và ^{13}C -NMR của chất **4** gợi ý rằng chất **4** có cùng khung carbon với chất **3**.

Phổ khối (ESI-MS) ion dương cho pic ion giả phân tử tại m/z 505 $[M+1]^+$. Các số liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của chất **4** hoàn toàn phù hợp với số liệu của axit madecassic trong [12]. Do đó chất **4** chính là axit madecassic, một trong các triterpen chính có trong cây rau má.

Chất 5: Hỗn hợp stigmasterol glucoside + β -sitosterol glucoside được phân lập dưới dạng tinh thể màu trắng, $R_f = 0,4$ (CH_2Cl_2 :MeOH = 85:15).

So sánh các dữ kiện phổ ESI-MS m/z 575 và 577 $[M+1]^+$, phổ 1H , ^{13}C -NMR và DEPT với tài liệu của hỗn hợp stigmasterol glucoside + β -sitosterol glucoside [13], cho phép xác định đây là hỗn hợp stigmasterol glucoside + β -sitosterol glucoside. Tỷ lệ giữa hai chất này trong hỗn hợp là 1:1, được xác định thông qua tích phân trong phổ 1H -NMR.

Chất 6: Chất **6** được tách ra dưới dạng bột màu trắng, có R_f trùng với R_f của madecassosid chuẩn tách từ cây rau má trong phòng thí nghiệm của chúng tôi. Phổ 1H và ^{13}C -NMR của chất **6** chứa các tín hiệu cộng hưởng như đã đưa trong phần thực nghiệm và hoàn toàn phù hợp với tài liệu tham khảo [12, 14]. Vậy có thể kết luận chất **6** là madecassosid, một triterpen glycosid phổ biến trong cây rau má.

Lời cảm ơn. Chúng tôi chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ kinh phí thông qua đề tài, mã số 104.01-2012.33.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích và cs. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tập II, 582-593 (2003).
2. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam* NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, trang 791(1995).
3. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển II, trang 477, Nxb. Trẻ (2000).
4. Ren L., Cao Q. X., Zhai F. R., Yang S. Q., Zhang H. X. *Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling*, *Pharmaceutical Biology*, 1-4 (2016).
5. Ratz-Lyko A., Arct J., Pytkowska K. *Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing Centella asiatica Extract*, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78(1)**, 27-33 (2016).
6. Hashim P, Sidek H., Helan M. H. M., Sabery A., Palanisamy U. D, Ilham M. *Triterpene Composition and Bioactivities of Centella asiatica*, *Molecules*, **16**, 1310-1322 (2011).
7. Orhan I. E. *Centella asiatica (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8, (2012).
8. Tripathi G, Mishra S, Upadhyay P, Purohit S, Dubey G. P. *Ethnopharmacological Importance of Centella asiatica with Special Reference to Neuroprotective activity*, *Asian Journal of Pharmacology and Toxicology*, **3(10)**, 49-53 (2015).
9. Su K., Gong M., Zhou J., Deng S. *Study on chemical composition of Nauclea officinalis leaves*, *International Journal of Chemistry*, **1(2)**, 77-81 (2009).
10. Jeong B. S., Kyeong M., Kim Y. C., Lee E. S. *Modification of C2 Functional Group on Asiatic Acid and the Evaluation of Hepatoprotective Effects*, *Arch Pharm Res*, **30(3)**, 282-289 (2007).
11. Bisoli E., Garcez W. S., Hamerski L., Tieppo C., Garcez F. R. *Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of Combretum laxum*, *Molecules*, **13**, 2717-2728 (2008).
12. Matsuda H., Morikawa T., Ueda H., Yoshikawakoyoto M. *Structures of New Ursane-and Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Centellasaponins B, C, and D, from Centella asiatica Cultivated in Sri Lanka*, *Chem. Pharm. Bull.*, **49(10)**, 368-1371 (2001).
13. WHO monographs on selected medicinal plants, **(1)**, (1999).
14. Pinhas H., Bondiou J. C. *Sur la constitution chimique de la partie glucidique du madécassoside*, *Bulletin de la Société Chimique de France*, **6**, 1888-1890 (1967).

Liên hệ: **Trần Văn Lộc**

Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Số 18, Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội
E-mail: tvloc@ich.vast.vn; Điện thoại: 0983992498.