

method for determination of hydroxymethylfurfural in crude palm oil, *Food Chemistry*, 154, 102-107. 23. Xu X. B., Liu D. B., Yu S. J., Yu P., Zhao Z. G. (2015), Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection, *Food Chemistry*, 169, 224-229. 24. Tan X. L., Zhang Y. H., Cai J. P., Zhu L. H., Ge W. J., Zhang X. (2014), 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde inhibits adipogenic and enhances osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells, *Natural Product Communications*, 9(4), 529-532. 25. Zhao L., Chen J., Su J., Li L., Hu S., Li B., Zhang X., Xu Z., Chen T. (2013), *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10604-10611. 26. Gu H., Jiang Y. B., Jiang H. Y., Xu D. Q., Yu J. T., Ding X., Zhao F. M., Zhan Z., Wang M. Y. (2011), Effect of 5-hydroxymethyl furfural on BCL-2 and NF-kappaB gene expression of apoptotic rat hippocampal neurons injured by H₂O₂, *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 34(11), 1753-1756.

Tạp chí Dược liệu, tập 19, số 6/2014 (Trang 348 - 351)

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC HAI HỢP CHẤT POLYPHENOL TỪ CŨ GẤU BIỂN

Phạm Thanh Bình¹, Nguyễn Minh Châu^{1,2}, Trần Thượng Quảng²,
Nguyễn Hải Đăng¹, Nguyễn Tiến Đạt^{1*}

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Kỹ thuật Hoá học, Trường ĐH Bách Khoa Hà Nội

*Email: ngtiend@imb.vast.vn

(Nhận bài ngày 08 tháng 10 năm 2014)

Tóm tắt

Hai hợp chất *trans*-scirpusin B (1) và (+)-catechin (2) đã được phân lập từ cao chiết phần đoạn nước của củ gấu biển *Cyperus stoloniferus* Retz. Cấu trúc của chúng được xác định dựa trên số liệu phổ khối phun mù điện tử ESI-MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều 1D-NMR. Đây là lần đầu tiên hai hợp chất này được phân lập từ củ gấu biển *Cyperus stoloniferus*.

Từ khóa: Củ gấu biển, *Cyperus stoloniferus*, *Trans*-scirpusin B, (+)-Catechin.

Summary

Isolation and Structure Determination of two Polyphenols from the Rhizome of *Cyperus stoloniferus* Retz

A phytochemical investigation of the water-soluble extract of *Cyperus stoloniferus* Retz. led to the isolation of two compounds *trans*-scirpusin B (1) and (+)-catechin (2). Their structures were elucidated by spectroscopic methods including ESI-MS and 1D-NMR. These compounds were isolated for the first time from *Cyperus stoloniferus*.

Keywords: *Cyperus stoloniferus* Retz, *Trans*-scirpusin B, (+)-Catechin.

1. Đặt vấn đề

Củ gấu biển có tên khoa học *Cyperus stoloniferus* Retz. Họ cói (Cyperaceae). Đây là một dược liệu được sử dụng rất rộng rãi trong các bài thuốc y học dân tộc dưới tên hương phụ (trong đông y vị thuốc hương phụ sử dụng cả hai loài củ gấu biển *C. stoloniferus* và củ gấu vườn *C. rotundus*) để điều trị đau bụng kinh, viêm cổ tử cung mãn tính, bệnh phụ nữ trước và sau sinh, đau bụng, đau dạ dày và bệnh tiêu hóa... [1]. Mặc dù vậy cho đến nay vẫn có rất ít công trình công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây này. Các nghiên cứu về thành phần hoá

học cũng như hoạt tính sinh học của củ gấu biển còn rất hạn chế. Theo công bố của tác giả Nguyễn Xuân Dũng (1995) và mới đây nhất của tác giả Trần Huy Thái, kết quả phân tích sắc ký khí kết nối khối phổ GC-MS cho thấy củ gấu biển có chứa hàm lượng tinh dầu khá cao chiếm tới 0,62% trong đó thành phần chính là α -cyperon (32,37%), β -selinen (7,34%), 1,4 methanoazulen-7-on-octahydro-4-8-tetramethyl (6,1%), 2-cyclohexen-1-ol-2-methyl (5,95%), caryophyllenoxid (3,68%) [2, 3]. Về hoạt tính sinh học, tác giả Vũ Văn Điền cùng cộng sự đã chứng minh dịch chiết nước, alcaloid tổng và tinh dầu củ gấu biển có tác dụng

giảm đau rõ rệt trên chuột gây đau bằng acid acetic. Đặc biệt độc cấp tính của tinh dầu củ gấu biển đã được nghiên cứu và liều độc đã được xác định LD₅₀ 12,1 ml/kg thể trọng chuột. Củ gấu biển cũng có tác dụng kháng khuẩn tốt trên một số chủng Gram (-) và (+) [4, 5]. Trong khuôn khổ chương trình nghiên cứu thành phần hoá học của các dược liệu thiên nhiên, chúng tôi đã công bố 4 hợp chất gồm 5,5',7-trihydroxy-2',4'-dimethoxy-6-methylflavanon, eriodictyol, piceatannol và resveratrol từ cao chiết phân đoạn cloroform và ethyl acetat củ gấu biển [6]. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục mô tả quá trình phân lập và xác định cấu trúc của hai hợp chất *trans*-scirpusin B (1) và (+)-catechin (2) từ phân đoạn nước củ gấu biển.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết bị và hóa chất

Độ quay cực được xác định bằng máy JASCO P-2000 polarimeter. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ghi bằng máy Bruker AM500 FT-NMR spectrometer với chất nội chuẩn là TMS. Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) đo trên máy Agilent 1260 Series Single Quadrupole LC/MS Systems.

2.2. Mẫu thực vật

Củ gấu biển được thu hái tại Tiền Hải, Thái Bình vào tháng 6 năm 2011 và được PGS.TS Trần Huy Thái, Viện Sinh thái và tài nguyên Sinh vật giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản (Thai. TN.44) được lưu trữ tại phòng Hoạt chất Sinh học, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phương pháp chiết và phân lập các hợp chất

Củ gấu biển thu về được phơi khô trong bóng râm, nghiền nhỏ thành bột (3,5 kg) và được ngâm chiết với methanol (2L x 3 lần) trong bể siêu âm ở 40 °C trong 30 phút. Dịch chiết được cô cạn dung môi thu được 250 gam cao methanol. Cao chiết này được hòa với nước và chiết phân lớp lần lượt với cloroform và ethyl acetat thu được cao cloroform (80 g), cao ethyl acetat (47 g) và dịch nước còn lại. Dịch nước được lọc qua cột diaion HP-20 và rửa giải bằng hệ dung môi methanol-nước (0:100, 25:75 và 100:0 v/v) thu được tương ứng ba phân đoạn W1, W2 và W3.

Phân đoạn W3 được sắc ký trên cột silica gel và rửa giải bằng dung môi gradient cloroform-methanol (100:0 v/v → 100% methanol) thu được ba phân đoạn W3a, W3b và W3c. Tinh chế phân đoạn W3b lần lượt trên các cột sắc ký YMC-RP18 (methanol-nước 1:3 v/v) và silica gel (cloroform-methanol-nước 4:1:0,1 v/v/v) thu được hợp chất 1 (20 mg). Hợp chất 2 (50 mg) thu được khi sắc ký phân đoạn W3a trên cột YMC-RP18 với hệ dung môi rửa giải methanol-nước (1:1 v/v).

Trans-scirpusin B (1): chất bột màu vàng nâu. $[\alpha]_D^{24} = +3.2$ (c 0,01, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,80 (1H, d, *J* = 16,5 Hz, H-7); 6,78 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2); 6,76 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5); 6,72 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-10); 6,65 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H-13', 14'); 6,64 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-14); 6,60 (1H, dd, *J* = 2,0; 8,0 Hz, H-6); 6,55 (1H, d, *J* = 16,5 Hz, H-8); 6,28 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-12); 6,20 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-4'); 6,18 (2H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2',6'); 5,30 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-8'); 4,36 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-7'). ¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): δ 130,9 (C-1); 114,0 (C-2); 146,4 (C-3); 146,5 (C-4); 116,3 (C-5); 119,8 (C-6); 130,8 (C-7); 123,6 (C-8); 136,9 (C-9); 120,0 (C-10); 162,7 (C-11); 96,8 (C-12); 159,6 (C-13); 104,4 (C-14); 147,6 (C-1'); 107,3 (C-2'); 159,8 (C-3', 5'); 102,2 (C-4'); 107,3 (C-6'); 58,0 (C-7'); 94,8 (C-8'); 134,9 (C-9'); 113,6 (C-10'); 146,2 (C-11'); 146,3 (C-12'); 116,3 (C-13'); 118,4 (C-14'). ESI-MS (positive): *m/z* 487 [M+H]⁺.

(+)-Catechin (2): tinh thể màu trắng. $[\alpha]_D^{24} = +17$ (c 0,01, CH₃COCH₃). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,72 (1H, brs, H-2'); 6,68 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-6'); 6,59 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5'); 5,89 (1H, brs, H-8); 5,70 (1H, brs, H-6); 4,48 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-2); 3,83 (2H, m, H-3); 2,65 (1H, dd, *J* = 5,0; 16,0 Hz, H_a-4); 2,23 (1H, dd, *J* = 8,0; 16,0 Hz, H_b-4). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 81,1 (C-2); 66,5 (C-3); 27,9 (C-4); 156,3 (C-5); 95,3 (C-6); 156,6 (C-7); 94,1 (C-8); 155,5 (C-9); 99,3 (C-10); 130,8 (C-1'); 114,6 (C-2'); 145,0 (C-3'); 145,0 (C-4'); 115,3 (C-5'); 118,6 (C-6'). ESI-MS (positive): *m/z* 291 [M+H]⁺.

3. Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất bột màu vàng nâu. Phổ khối lượng phun mù điện từ xuất hiện tín hiệu tại m/z 487 $[M+H]^+$ kết hợp với phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H , ^{13}C NMR có thể dự đoán hợp chất **1** có công thức phân tử $C_{28}H_{22}O_8$ và khối lượng phân tử là 486. Phổ 1H NMR xuất hiện tín hiệu của vòng hydrobenzofuran tại δ 5,30 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-8'), 4,36 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-7'), hai proton olefin tại δ 6,80 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H-7), 6,55 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H-8). Hằng số tương tác trên hai proton này lớn ($J = 16,5$ Hz) chứng tỏ

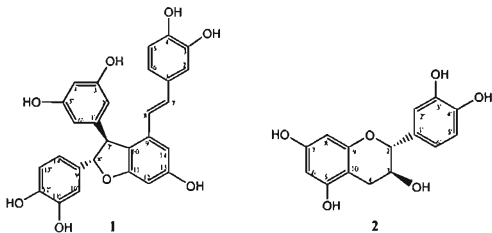
chúng ở dạng *trans* với nhau. Bên cạnh đó cũng xuất hiện tín hiệu của 11 proton thuộc vòng benzen, trong đó: 3 proton dạng A_2B tại [δ 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-4'), 6,18 (2H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2',6'), hai proton *meta* tại [δ 6,64 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-14), 6,28 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-12)], hai cặp proton dạng ABX tại [δ 6,78 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,76 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,60 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-6)] và [6,72 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-10'), 6,65 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-13', 14')]. Như vậy có thể nhận định hợp chất này có 4 vòng benzen, một vòng benzofuran và một nối đôi dạng *trans*.

Bảng 1. Số liệu phổ ^{13}C -NMR ($\delta_C = \text{ppm}$, CD_3OD) của hợp chất **1** và *trans*-scirpusin B

Vị trí	1	<i>trans</i> -scirpusin B	Vị trí	1	<i>trans</i> -scirpusin B	Vị trí	1	<i>trans</i> -scirpusin B
1	130,9	131,0	11	162,7	162,7	6'	107,3	107,4
2	114,0	114,0	12	96,8	96,8	7'	58,0	58,0
3	146,4	146,4	13	159,6	159,8	8'	94,8	94,8
4	146,5	146,5	14	104,4	104,5	9'	134,9	134,9
5	116,3	116,3	1'	147,6	147,6	10'	113,6	113,7
6	119,8	119,8	2'	107,3	107,4	11'	146,2	146,2
7	130,8	130,9	3'	159,8	159,8	12'	146,3	146,3
8	123,6	123,7	4'	102,2	102,3	13'	116,3	116,3
9	136,9	137,0	5'	159,8	159,8	14'	118,4	118,5
10	120,0	120,0						

Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ DEPT cho thấy sự có mặt của 18 vạch tín hiệu trong đó có 15 nhóm CH, 13 nguyên tử carbon bậc bốn. Tín hiệu của nối đôi được xác định tại δ 130,8 (C-7), 123,6 (C-8), tín hiệu hai nhóm methyl thuộc vòng benzofuran tại δ 58,0 (C-7'), 94,8 (C-8') mà sự chuyển dịch về phía trường thấp (94,8) chứng tỏ nhóm methyl này cạnh nhóm hút điện tử mạnh.

So sánh những giá trị này với giá trị phổ trong tài liệu tham khảo đã công bố có thể khẳng định hợp chất **1** chính là *trans*-scirpusin B [7]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phát hiện trong củ gấu biển *C. stoloniferus*. Trước đó *trans*-scirpusin B đã được phân lập từ củ gấu vườn (*C. rotundus*) và thể hiện hoạt tính ức chế mạnh enzym α -glucosidase [8].



Hình 1. Cấu trúc hợp chất **1** và **2**

Hợp chất 2 thu được dưới dạng tinh thể màu trắng. Phổ khối lượng phun mù điện tử xuất hiện tín hiệu tại m/z 291 $[M+H]^+$ kết hợp với phổ 1H và ^{13}C NMR cho dự đoán hợp chất 2 có công thức phân tử $C_{13}H_{14}O_6$ và khối lượng phân tử là $M = 290$. Phổ 1H NMR xuất hiện tín hiệu của hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại δ 5,89 (1H, brs, H-8), 5,70 (1H, brs, H-6), đồng thời cũng xuất hiện hệ vòng thơm kiểu ABX bởi các tín hiệu δ 6,72 (1H, brs, H-2'), 6,68 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 6,59 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methyl nối với oxi tại δ 4,48 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 3,83 (2H, m, H-3) và hai proton của nhóm methylen tại δ 2,65 (1H, dd, $J = 5,0, 16,0$ Hz, H_a-4), 2,23 (1H, dd, $J = 8,0, 16,0$ Hz, H_b-4). Qua phân tích sơ bộ cho nhận định hợp chất 2 có khung flavan. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu

của 15 nguyên tử carbon, kết hợp với phổ DEPT nhận thấy có một nhóm CH_2 , 7 nhóm CH và 7 nguyên tử carbon bậc 4. Hai tín hiệu tại δ 94,1 và 99,3 được xác định tương ứng là hai vị trí C-8 và C-6 của vòng A khung flavan khi hai vị trí C-5 và C-7 bị thế, ba nhóm methyl còn lại được xác định ở vòng B: δ 114,6 (C-2'), 115,3 (C-5'), 118,6 (C-6'). Tín hiệu hai nhóm methyl tại δ 81,1 và 66,5 hoàn toàn phù hợp với vị trí C-2 và C-3 của khung flavan trong đó vị trí C-3 được đính với nhóm thế chứa oxy, nhóm CH_2 duy nhất được xác định tại vị trí C-4. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất 2 với hợp chất (+)-catechin cho thấy sự phù hợp tất cả các vị trí. Như vậy hợp chất 2 chính là (+)-catechin [9]. Mặc dù có mặt khá phổ biến trong thiên nhiên, tuy nhiên đây là lần đầu tiên (+)-catechin được công bố từ *Cyperus stoloniferus*.

Bảng 2. Số liệu phổ ^{13}C -NMR (δ_c =ppm, DMSO- d_6) của hợp chất 2 và (+)-catechin

Vị trí	2	(+)-catechin	Vị trí	2	(+)-catechin
2	81,1	81,0	1'	130,8	130,7
3	66,5	66,4	2'	114,6	114,5
4	27,9	27,7	3'	145,0	144,8
5	156,3	156,1	4'	145,0	144,8
6	95,3	95,3	5'	115,3	115,1
7	156,6	156,4	6'	118,6	118,4
8	94,1	94,0			
9	155,5	155,3			
10	99,3	99,2			

4. Kết luận

Từ cao chiết phân đoạn nước của củ gấu biển (*Cyperus stoloniferus* Retz) hai hợp chất polyphenol đã được phân lập. Dựa vào những dữ liệu phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR, hai hợp chất này được xác định là *trans*-scirpusin B (1) và (+)-catechin (2). Đây là lần đầu tiên hai hợp chất

này được phân lập từ củ gấu biển.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam (VAST04.01/13-14) và Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED 104.01-2011.54) Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Viện Hoá học giúp đỡ phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

Tài liệu tham khảo

- Đỗ Tất Lợi. (2000). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 33-36.
- Nguyễn Xuân Dũng, Vũ Văn Điền, Vũ Ngọc Lô. (1995). Kết quả nghiên cứu tinh dầu hương phụ biển (*Cyperus stoloniferus* Retz) và hương phụ vừng (*Cyperus rotundus* L). *Tạp chí Dược học*, 235, 4-6.
- Trần Huy Thái, Trần Thị Ngọc Diệp. (2012). Thành phần hóa học tinh dầu củ gấu biển (*Cyperus stoloniferus* Retz.) ở Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, 432, 38-40.
- Vũ Văn Điền, Mai Tất Tố. (1994). Góp phần nghiên cứu tác dụng giảm đau của hương phụ biển (*Cyperus stoloniferus* Retz). *Tạp chí Dược học*, 223, 16-17.
- Vũ Văn Điền, Cao Văn Thu. (1994). Một số kết quả thử tác dụng kháng khuẩn của hương phụ biển *Cyperus stoloniferus* Retz. họ Cói Cyperaceae. *Tạp chí Dược học*, 223, 18-20.
- Chau N. M., Hanh T. H., Luyen N. T., Minh V. C., Dat N. T., (2013). Flavanones and stilbenes from *Cyperus stoloniferus* RantZ. *Biochemical Systematics Ecology*, 50, 220-222.
- Sano S., Sugiyama K., Ito T., Katano Y., Ishihata A., (2011). Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of picatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59, 6209-6213.
- Tran H. H., Nguyen M. C., Le H. T., Nguyen T. L., Phạm T. B., Chau V. M., Nguyen H. N., Nguyen T. D., (2014). Inhibitors of α -glucosidase and α -amylase from *Cyperus rotundus*. *Pharmaceutical Biology*, 52, 74-77.
- Chien C. S., Yuan S. C., Li K. H., (1993). Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, 34, 843-845.