

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA LOÀI HÀ THỦ Ô ĐỎ (*POLYGONUM MULTIFLORUM*)

ISOLATION AND DETERMINATION OF STRUCTURE OF CHEMICAL COMPOSITION FROM *FALLOPIA MULTIFLORA* (*POLYGONUM MULTIFLORUM*)

Nguyễn Thị Thoạ^{1,2,*},
Nguyễn Hải Đăng², Nguyễn Tiến Đạt³

TÓM TẮT

Phân lập và xác định thành phần hóa học cặn chiết methanol của hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum*) thu được bốn hợp chất bao gồm reveratrol (1), catechine (2), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside (3) và benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (4). Cấu trúc hóa học của các hợp chất được làm sáng tỏ bằng một số phương pháp phổ bao gồm ESI-MS và NMR. Những hợp chất này thuộc nhóm chất phenolic và mang nhiều hoạt tính quý của hà thủ ô đỏ.

Từ khóa: Hà thủ ô đỏ, hợp chất phenolic, *polygonum multiflorum*.

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the methanol fraction of *Polygonum multiflorum* led to the isolation of four compounds, include reveratrol (1), catechine (2), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside (3) và benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (4). The structures were elucidated by spectroscopic methods including ESI-MS and NMR. These compounds belong to the phenolic and carry many precious activities of *Polygonum multiflorum*.

Keywords: *Polygonum multiflorum*, phenolic, *fallopia multiflora*.

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

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

³Trung tâm nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: nguyenthao@hau.edu.vn

Ngày nhận bài: 12/01/2019

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 25/4/2019

Ngày chấp nhận đăng: 10/6/2019

CHỮ VIẾT TẮT

ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectromet
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity

1. GIỚI THIỆU

Hà thủ ô đỏ có tên khoa học là *Fallopia multiflora* (tên đồng nghĩa: *Polygonum multiflorum*) thuộc họ Rau răm (Polygonaceae) [1]. Các nghiên cứu về thành phần hoá học cho thấy trong rễ củ hà thủ ô đỏ có chứa nhiều nhóm chất như polyphenol, anthraquinon, flavonoid, phenolic acid, protocatechuic acid... [2, 3]. Nghiên cứu phân lập rễ hà thủ ô đỏ nhằm giải thích các tác dụng dược lý của loại cây này chúng tôi đã tìm được 4 hợp chất thuộc nhóm hợp chất phenolic. Các hợp chất phân lập được bao gồm resveratrol (1), catechine (2), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside (3) và benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (4) (hình 1). Bài báo này mô tả quy trình phân lập và xác định cấu trúc của 4 hợp chất trên.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ghi bằng máy Bruker AM500 FT-NMR spectrometer với chất nội chuẩn là TMS (Tetramethylsilane). Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) đo trên hệ máy LC/MS Agilent 1260 series, 6120 Single Quadrupole. Các thiết bị trên thuộc Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Mẫu thực vật

Mẫu rễ hà thủ ô đỏ được thu hái tại Hà Giang vào tháng 10/2014 và được giám định tên khoa học bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản (HG03) được lưu trữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Chiết và phân lập chất

Rễ củ hà thủ ô đỏ được phơi khô trong bóng râm, xay nhỏ (3,5kg) và ngâm chiết với dung môi methanol (10 lít x 3 lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết sau đó được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 430,0g cặn chiết methanol. Cặn chiết này được hòa tan với nước (2 lít) rồi chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexane và ethyl acetate (mỗi loại 1 lít x 3 lần) thu được các cặn chiết *n*-hexane (51,7g), ethyl acetate (214,5g) tương ứng và cặn nước.

Tiến hành sắc kí cột silicagel đối với phần cặn chiết ethyl acetate, rửa giải bằng hệ dung môi gradient *n*-hexane-acetone (100:0:100, v/v) thu được 3 phân đoạn E1-E3. Phân đoạn E3 (5,0g) được đưa lên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexane-acetone (4:1, v/v) thu được 2 phân đoạn E3.1-E3.2. Tiếp tục phân lập đối với phân đoạn E3.1 trên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là diclomethane-methanol (16:1, v/v) thu được hợp chất **1** (3,4mg). Phân đoạn E3.2 được tiến hành tương tự E3.1, sau đó qua cột sephadex với hệ dung môi rửa giải là methanol-nước (1:1, v/v) rồi tiếp tục sắc kí cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexane-acetone (1:1, v/v) thu được hợp chất **2** (90,8mg).

Triển khai sắc kí cột Diaion HP-20 với phần cặn nước và rửa giải lần lượt bằng các hệ dung môi methanol-nước (0:100; 25:75; và 100:0, v/v) thu được các phân đoạn W1-W3 tương ứng. Tiến hành sắc kí cột silicagel đối với phân đoạn W3 (62,9g), rửa giải bằng hệ dung môi gradient diclomethane-methanol (100:0:100, v/v) thu được 5 phân đoạn W3.1-W3.5. Phân đoạn W3.2 (1,2g) được giải hấp lần lượt trên sắc kí cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là diclomethane-methanol (7:1, v/v), cột silicagel pha đảo YMC RP-18 với dung môi rửa giải là acetone:nước (1/1,5, v/v), tiếp tục qua cột LH-20 với hệ dung môi rửa giải là methanol-nước (1:1, v/v) thu được hợp chất **3** (370 mg). Tương tự, phân đoạn W3.5 (8,0g) được đưa qua cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là diclomethane-methanol (6:1, v/v), qua cột silicagel pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi rửa giải là acetone:nước (1:3, v/v), cột sephadex với dung môi rửa giải là methanol-nước (1:1, v/v), cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là diclomethane-methanol-nước (5:1:0,01, v/v/v) thu được hợp chất **4** (6,0mg).

(E)-3',4,5'-trihydroxystilbene (Reveratrol) (**1**): chất bột vô định hình màu vàng cam. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD).

Catechine (**2**): chất bột màu vàng nhạt. ^1H NMR (500MHz, CD_3OD), ^{13}C NMR (125MHz, CD_3OD).

2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside (**3**): chất bột vô định hình màu nâu. ^1H NMR (500MHz, CD_3OD), ^{13}C NMR (125MHz, CD_3OD).

Benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (Benzyl gentiobioside) (**4**): ^1H NMR (500MHz, CD_3OD), ^{13}C NMR (125MHz, CD_3OD).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

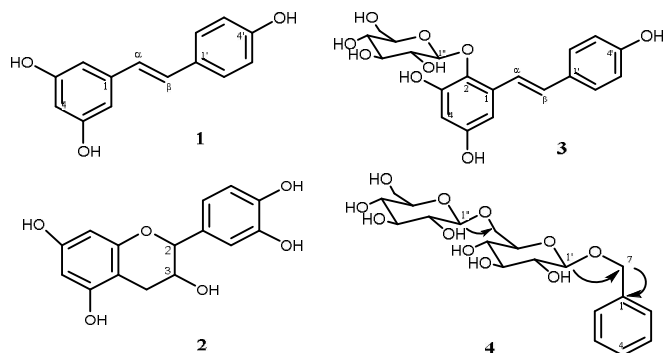
Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu vàng cam. Trên phổ ^1H -NMR tại vùng trường yếu xuất hiện tín hiệu của các proton vòng thơm, bao gồm cặp proton ở hai vị trí ortho tại δ_{H} 6,47 (2H, d, $J = 2,0\text{Hz}$, H-2, 6) và một proton ở vị trí para tại δ_{H} 6,18 (1H, d, $J = 2,0\text{Hz}$, H-4), 4 proton đặc trưng của hệ vòng thơm A_2B_2 tại δ_{H} 6,77 (2H, d, $J = 8,5\text{Hz}$, H-3', 5'), 7,37 (2H, d, $J = 8,5\text{Hz}$, H-2', 6'). Bên cạnh đó còn xuất hiện hai proton olefin của liên kết đôi tại δ_{H} 6,83 (1H, d, $J = 16,5\text{Hz}$, H- β), 6,99 (1H, d, $J = 16,5\text{Hz}$, H- α), hai proton này có hằng số tương tác rất lớn ($J = 16,5\text{Hz}$) nên khẳng định được liên kết đôi này có cấu hình dạng *trans*. Trên phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho thấy hợp chất có tín

hiệu của 14 nguyên tử carbon bao gồm các nhóm: 5 nhóm nguyên tử carbon không chứa hydro, 9 nhóm methine. Trong đó, hai cặp tín hiệu của liên kết đôi tại δ_{C} 129,4 (C- α), 127,0 (C- β), các nhóm nguyên tử carbon không chứa hydro liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy trên vòng thơm (oxygenated carbon) tại δ_{C} 159,6 (C-3, 5), 158,3 (C-4'), còn lại là những nhóm nguyên tử carbon khác trong vòng thơm tại δ_{C} 105,7 (C-2, 6), 102,6 (C-4), 128,7 (C-2', 6'), 116,4 (C-3', 5'). So sánh dữ liệu phổ hợp chất này với hợp chất (E)-3',4,5'-tryhydroxystilbene, thấy có sự trùng khít các vị trí tương ứng [4]. Trên phổ ESI-MS xuất hiện pic tại m/z 229,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ nên hợp chất **1** có công thức phân tử là $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ ($M = 228$). Từ các dữ kiện trên khẳng định được hợp chất **1** là (E)-3',4,5'-tryhydroxystilbene.

Hợp chất **3** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu nâu, phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **3** có sự tương đồng với hợp chất **1**. Mặt khác, trên phổ ^1H , dịch về vùng trường mạnh hơn xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 7 proton trên phân tử đường trong khoảng 4,53 - 3,44, trong đó một tín hiệu đặc trưng của proton anome tại 4,53 (H-1"), proton này có hằng số tương tác khá cao ($J = 8,0\text{Hz}$) nên dự đoán phân tử đường này có cấu hình dạng β . Trên phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho thấy hợp chất có tín hiệu của 20 nguyên tử carbon bao gồm các nhóm: 6 nhóm nguyên tử carbon không chứa hydro, 13 nhóm methine và một nhóm methylen. Trong đó có 6 nhóm nguyên tử đặc trưng của phân tử đường gluco tại δ_{C} 102,7 (C-1"), 75,4 (C-2"), 77,8 (C-3"), 70,7 (C-4"), 78,1 (C-5"), 62,0 (C-6"), kết hợp với phổ ^1H -NMR dự đoán được đây là phân tử đường β -D-glucopyranoside. So sánh dữ liệu phổ hợp chất này với hợp chất 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside, thấy có sự trùng khít các vị trí tương ứng [5]. Trên phổ ESI-MS xuất hiện pic tại m/z 407,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, dự đoán hợp chất có công thức phân tử $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_9$ ($M = 406$). Kết hợp các dữ kiện phổ trên khẳng định được hợp chất **3** là 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside.

Chất **2** thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt, phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 291,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Kết hợp với phổ ^1H , và ^{13}C -NMR có thể dự đoán công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, khối lượng phân tử $M = 290$. Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại δ_{H} 5,96 (1H, d, $J = 2,5\text{Hz}$, H-6), 5,89 (1H, d, $J = 2,5\text{Hz}$, H-8), đồng thời trên phổ ^1H cũng xác định sự có mặt của vòng thơm thể kiểu ABX bởi các tín hiệu δ_{H} 6,86 (1H, d, $J = 2,0\text{Hz}$, H-2'), 6,79 (1H, d, $J = 8,0\text{Hz}$, H-5'), 6,74 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5\text{Hz}$, H-6'). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methin nối với oxi tại δ_{H} 4,59 (1H, d, $J = 7,5\text{Hz}$, H-2), 4,01 (1H, m, H-3) và hai proton của nhóm methylen tại 2,53 (1H, dd, $J = 8,5, 16,5\text{Hz}$, H_a -4), 2,87 (1H, dd, $J = 5,5, 16,0\text{Hz}$, H_b -4). Như vậy có thể sơ bộ nhận định hợp chất **2** có khung flavan, điều này được khẳng định hơn trên phổ ^{13}C -NMR. Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon. Hai tín hiệu tại δ_{C} 95,5 và 96,3 được xác định là ở hai vị trí C-8, C-6 của vòng A khung flavan khi vị trí C-5 và C-7 bị thế, ba nhóm methin còn lại của vòng benzen được

xác định là thuộc vòng B: δ_c 115,2 (C-2'), 116,1 (C-5'), 120,0 (C-6'). Tín hiệu của hai nhóm methin tại δ_c 82,8 và 68,8 là hoàn toàn phù hợp với vị trí C-2 và C-3 của khung flavan trong đó vị trí C-3 có đính với nhóm thế chứa oxi, nhóm methylen duy nhất δ_c 28,4 được xác định là ở vị trí C-4. Ngoài ra phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cũng không xuất hiện bất kỳ tín hiệu của nhóm thế nào chứng tỏ tất cả các nhóm thế trong phân tử đều là nhóm OH. Điều này được khẳng định thêm dựa vào phổ khối lượng ESI-MS. So sánh các dữ kiện phổ của hợp chất **2** với các dữ kiện phổ của chất (+)-catechin thấy có sự phù hợp hoàn toàn [6]. Như vậy hợp chất **2** là (+)-catechin.



Hình 1. Cấu trúc của hợp chất **1-4** phân lập từ rễ hà thủ ô đỏ

Hợp chất **4** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu nâu. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ tại vùng trường yếu xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm, bao gồm proton ở vị trí para tại δ_H 7,28 (1H, br d, H-4), 4 proton đặc trưng của hệ vòng thơm A_2B_2 tại δ_H 7,34 (2H, br d, H-3, 5), 7,44 (2H, br d, H-2, 6). Dịch về vùng trường mạnh hơn xuất hiện tín hiệu của 14 proton trên phân tử đường trong khoảng 4,44 \rightarrow 3,26, trong đó hai tín hiệu đặc trưng của proton anome tại 4,44 (H-1'') và 4,39 (H-1'), cả hai proton này đều có hằng số tương tác khá cao ($J = 8,0$ Hz) nên dự đoán hai phân tử đường này đều có cấu hình dạng β . Mặt khác phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho tín hiệu proton tại δ_H 4,68 (1H, d, $J = 12,0\text{Hz}$, H_b-7), 4,94 (1H, d, $J = 12,0\text{Hz}$, H_a-7). Giá trị độ chuyển dịch hóa học của hai proton này bị lệch về vùng trường yếu hơn các proton thuộc nhóm methylen thông thường khác do chúng thuộc nhóm methylen liên kết trực tiếp với vòng thơm và nguyên tử oxi. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ HSQC cho thấy hợp chất có tín hiệu của 19 nguyên tử carbon bao gồm: 1 nhóm nguyên tử carbon không chứa hydro, 15 nhóm methine và 3 nhóm methylen. Trong đó có 12 nhóm nguyên tử đặc trưng của phân tử đường tại δ_c 103,3 (C-1'), 75,0 (C-2'), 77,9 (C-3'), 71,4 (C-4'), 77,0 (C-5'), 69,7 (C-6') và δ_c 104,8 (C-1''), 75,0 (C-2''), 77,9 (C-3''), 71,5 (C-4''), 77,9 (C-5''), 62,6 (C-6''), kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ dự đoán được đây là phân tử đường β -D-glucopyranoside. Nhóm nguyên tử carbon không chứa hydro trên vòng thơm tại δ_c 138,9 (C-1), năm nhóm nguyên tử carbon trên vòng thơm còn lại gồm δ_c 129,3 (C-2,4), 129,2 (C-3,5), 128,7 (C-4), một nhóm methylen còn lại liên kết trực tiếp với vòng thơm và nguyên tử oxi tại δ_c 72,0 (C-7). Mặt khác, phổ HMBC cho thấy proton anome ở δ_H 4,44 (H-1'') tương tác với carbon ở 69,7 (C-6') chứng tỏ đơn vị đường thứ

nhất này gắn trực tiếp vào vị trí C-6' của đơn vị đường thứ hai. Proton anome ở δ_H 4,39 (H-1') tương tác với carbon methylen liên kết với vòng thơm tại δ_c 72,0 (C-7), chứng tỏ đơn vị đường thứ hai liên kết gián tiếp với vòng thơm thông qua nguyên tử carbon C-7. Ngoài ra, phổ HMBC còn cho thấy có sự tương tác đồng thời giữa proton H_a-7 và H_b-7 với các nguyên tử carbon ở δ_c 103,3 (C-1'), 138,9 (C-1). So sánh dữ liệu phổ hợp chất này với hợp chất benzyl gentiobioside, thấy có sự trùng khít các vị trí tương ứng [7]. Vậy khẳng định được hợp chất **4** là benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (benzyl gentiobioside).

4. KẾT LUẬN

Bốn hợp chất thuộc nhóm chất phenolic gồm reveratrol (**1**), catechine (**2**), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- β -D-glucopyranoside (**3**) và benzyl 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (**4**) đã được phân lập và xác định cấu trúc từ hai cận chiết *n*-hexane và ethyl acetate của rễ củ hà thủ ô đỏ Hà Giang. Kết quả này góp phần làm sáng tỏ thành phần hóa học của rễ cây hà thủ ô đỏ thu hái tại Hà Giang, đồng thời tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm giải thích tác dụng chữa bệnh đa dạng của loài này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài trợ kinh phí thông qua đề tài mã số VAST.UDCN.05/14-16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Tất Lợi, 2004. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, 833-836.
- [2]. Longfei Lin, Boran Ni, Hongmei Lin, Miao Zhang, Xuechun Li, Xingbin Yin, Changhai Qu, Jian Ni, 2015. *Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of Polygonum multiflorum Thunb.: a review*. J Ethnopharmacol. **159**:158-183.
- [3]. Bounda GA, Feng YU, 2015. *Review of clinical studies of Polygonum multiflorum Thunb. and its isolated bioactive compounds*. Pharmacognosy Res. **7(3)**:225-236.
- [4]. Francisco Lara-Ochoa, Leticia C. Sandoval-Minero, Georgina Espinosa-Pérez, 2015. *A new synthesis of resveratrol*. Tetrahedron Letters **56**, 5977-5979.
- [5]. Gen-Ichiro Nonaka, Naoko Miwa and Itsu Nishioka, 1982. *Stilbene glucoside gallates proanthocyanidins from Polygonum multiflorum*. Phytochemistry **21(2)**, 429-432.
- [6]. Sang-sup Jew, Doo-yeon Lim, So-young Bae, Hyun-ah Kim, Jeong-hoon Kim, Jihye Lee and Hyeung-geun ParkV, 2002. *(2R,3S)-(+)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol, (+)-catechin*. Tetrahedron Asymmetry **13**, 715-720.
- [7]. Salvatore De Rosa, alfonso de giulio and Giuseppona Tommonaro, 1996. *Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of Lycopersicon esculentum*. Phytochemistry, **42(4)**, 1031-1034.

AUTHORS INFORMATION

Nguyen Thi Thoa^{1,2}, Nguyen Hai Dang², Nguyen Tien Dat³

¹Hanoi University of Industry

²Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

³Centre for Research and Technology Transfer, Vietnam Academy of Science and Technology