

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÁC CÂY RAU MÁ LÁ SEN, *HYDROCOTYLE BONARIENSIS* VÀ *HYDROCOTYLE VULGARIS*, (APIACEAE), Ở TỈNH TIỀN GIANG VÀ THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Tôn Nữ Liên Hương, Lê Hoàng Ngoan¹, N.K. Phi Phụng và N. Ngọc Sương²

ABSTRACT

Hydrocotyle bonariensis and *Hydrocotyle vulgaris*, two new species in the Mekong- delta, were first analysed of the chemical composition. From the material collected in Tien Giang and Can Tho, three sterols, sterol glycosides, dibenzylbutyrolactone lignans and flavonol glycosides were isolated and identified. These compounds had some differences in the stereochemical structures. *Hydrocotyle bonariensis* has not been studied in the world and *Hydrocotyle vulgaris* has not been studied in Vietnam. The structures of these compounds were elucidated based on the data of spectroscopic techniques 1D, 2D-NMR and MS. The research has been continued.

Keywords: *Hydrocotyle bonariensis*, *Hydrocotyle vulgaris*, sterol glycoside, hinokinin, quercetin, hesperidin, flavonoid

Title: Chemical composition of *Hydrocotyle bonariensis* and *Hydrocotyle vulgaris* growing in Tien Giang province and Can Tho city

TÓM TẮT

Hai loài rau má lá sen khác nhau: *Hydrocotyle bonariensis* và *Hydrocotyle vulgaris*, được phát hiện trong thời gian gần đây ở đồng bằng sông Cửu Long. Từ nguồn nguyên liệu thu ở 2 địa phương là Tiền Giang và Cần Thơ đã trích ly, nhận danh được các chất sterol, sterol glycoside và các dibenzylbutyrolactone lignan với một vài khác biệt về cấu trúc lập thể. Cấu trúc các chất được xác định từ những phân tích phổ nghiệm hiện đại, như NMR 1 chiều, 2 chiều và khối phổ. Nghiên cứu cô lập chất vẫn đang được tiếp tục thực hiện.

Từ khóa: *Hydrocotyle bonariensis*, *Hydrocotyle vulgaris*, sterol glycoside, hinokinin, quercetin, hesperidin, flavonoid

1 MỞ ĐẦU

Rau má được dùng để hạ huyết áp, cải thiện trí nhớ và tăng tuổi thọ, làm máu lưu thông tốt hơn, nhất là ở tĩnh mạch và mao mạch, có tác dụng lợi tiểu nhẹ. Theo tài liệu (V.V. Chi, Trần Hợp, 1999) khi bị viêm tấy hoặc bỏng, đắp rau má nghiền lên da cũng có hiệu quả. Chúng tôi đã tìm hiểu được trong chi rau má có trên 30 loài, mà nhiều nghiên cứu hóa học mới chỉ tập trung trên các loài *Hydrocotyle asatica*, *H. sibthorpioides*, *H. ranunculoides*, *H. umbellata*, *H. vulgaris*.

Trong những năm gần đây có 2 loài rau má lá sen phát triển ở đồng bằng sông Cửu Long, với tên gọi rau má Thái, rau má Nhật... đang được quan tâm. Đó là các cây với tên khoa học là *Hydrocotyle bonariensis* và *Hydrocotyle vulgaris*. Hình dạng của 2 loài cây này có khác biệt cơ bản với các cây rau má kể trên về dạng của lá:

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM

tròn với cuống lá mọc ngay tâm lá, và giữa 2 loài thì khác biệt về kích thước lá, dạng chùm hoa, nơi sinh trưởng. Những nghiên cứu của chúng tôi về hoạt tính sinh học cho thấy 2 loài này có những khả năng nhất định về dược tính. *H. vulgaris* đã được nghiên cứu về saponin, tại Đức, 1980-1983. Riêng loài *H. bonariensis* chưa hề được nghiên cứu hóa học trên thế giới.

Nhiều thử nghiệm sinh học, và các phân tích hóa học đã được tiến hành với các nguyên liệu được trồng từ 2 địa phương là Mỹ Tho (tỉnh Tiền Giang) và thành phố Cần Thơ.

Trong bài báo này chúng tôi đề cập đến những sterol, sterol glycosid, dibenzylbutyrolacton lignan và flavonoid đã được phân lập, định danh từ các nguyên liệu này.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Mẫu nguyên liệu được thu hái sau thời gian trồng (3 tháng), tại vùng đất phù sa thuộc phường 5, thành phố Mỹ Tho, tỉnh Tiền Giang và phường An Khánh, thành phố Cần Thơ. Lượng mẫu cây tươi *H. bonariensis* đã thu vào tháng 12/ 2008 là 21 kg, và với loài *H. vulgaris* tháng 3/2010 thu hoạch 22 kg. Nguyên liệu được trồng trong điều kiện tự nhiên, như rau ăn. Nguyên liệu được Dược sĩ Phan Đức Bình, công tác tại Tòa soạn Tạp chí Thuốc và Sức khỏe Tp. HCM định danh khoa học.



H. bonariensis



H. vulgaris

2.2 Thiết bị, hóa chất

Dung môi: các dung môi hữu cơ tinh khiết: butanol, etanol, metanol, diclorometan, ête dầu hỏa, etyl acetat, aceton của Việt Nam, hiệu Chemsol.

Các chất hấp phụ: silica gel F254, silica gel RP-18, Diaion HP20, Bản mỏng TLC (Merck), Các loại cột hấp phụ kích cỡ từ nhỏ tới lớn: $\varphi = 0,5$ cm tới 8 cm, bình sắc ký lớp mỏng.

Các thiết bị ghi phổ: Phổ khối lượng (ESI-MS) được ghi trên máy MS 5989 B (Hewlett Pakard), phổ NMR được ghi trên máy Bruker Advance 500 MHz của Viện Hóa học, Trung tâm KH-CN Việt Nam, Hà Nội.

2.3 Phương pháp

Nguyên liệu được làm sạch, xay nhuyễn thành bột cây và ngâm chiết với etanol để có cao alcol tổng, sau đó được trích phân bố lỏng – lỏng với các dung môi có tính phân cực tăng dần để phân thành các cao khác nhau. Sau khi cô quay thu hồi dung môi, thu được các cao ête dầu hỏa, diclorometan, etyl acetat và cao butanol.

Các cao được sắc ký cột pha thường và pha đảo nhiều lần để tách rời từng chất hữu cơ có trong cao. Tiến hành song song sắc ký cột với sắc ký lớp mỏng trên từng phân đoạn được giải ly. Tinh chế từng chất và xác định nhiệt độ nóng chảy của chất tinh khiết đã cô lập.

Các chất được xác định cấu trúc dựa vào các dữ liệu quang phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều và 2 chiều (NMR). Việc giải và biện luận phổ được kiểm chứng so sánh với các tài liệu đã công bố.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Caio chiết etanol của hai loại nguyên liệu được phân bố lần lượt trong các dung môi ête dầu hỏa, diclorometan, etyl acetat và *n*-butanol với cùng một qui trình. Các dung dịch sau khi chiết được cô quay thu hồi dung môi cho ra các loại cao tương ứng.

Bên cạnh việc phân lập và xác định cấu trúc của squalen và hỗn hợp có tỷ lệ là 3:2, gồm hinokinin với một butyrolacton khác, có tên là α -[3,4-metylendioxyphenylmetylidene]- β -[3,4-metylendioxyphenylmetylidene]- γ -butyrolacton, mà chúng tôi đã công bố trong một bài báo khác^[2], từ cao eter dầu hỏa của cây *H. bonariensis* đã phân lập và xác định cấu trúc của β -sistosterol (**1**) (0,005% so với nguyên liệu khô). Từ cao diclorometan của cây này đã phân lập được stigmaterol (**2**) (0,002%) và stigmaterol glucosid (**4**) (0,002%). Từ cao etyl acetat của cây này cũng đã cô lập và xác định được cấu trúc của spinasterol (**3**) (0,001%), và spinasterol glucosid (**5**) (0,002%). Từ các cao etyl acetat và butanol của cây, cô lập được các flavonol như quercetin (**7**) (0,002%), quercetin 3-*O*-galactosid (**8**) (0,003%), quercetin 3-*O*-glucosid (**9**) (0,004%).

Đối với cây *H. vulgaris*, từ cao eter dầu hỏa đã phân lập và xác định cấu trúc của stigmaterol (**2**) (0,006% so với nguyên liệu khô), hinokinin (**6**) (0,001%). Từ các cao etyl acetat và butanol, cô lập được quercetin 3-*O*-galactosid (**9**) (0,005%), và một flavanon rutinosid có tên là hesperidin (**10**) (0,003%).

Biện luận cấu trúc của các chất cô lập được

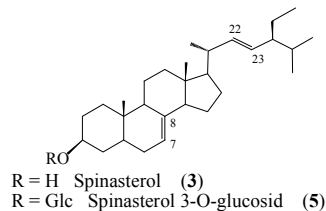
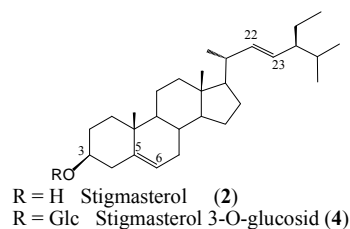
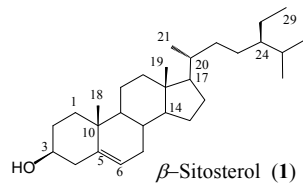
Hợp chất (**1**): tinh thể hình kim, trắng, phổ khối va chạm electron (ESI-MS) cho pic phân tử m/z 414 (90 %) $[M]^+$, ứng với công thức phân tử $C_{29}H_{50}O$, nhiệt độ nóng chảy: 134 °C. Phổ 1H NMR: có 48 H, với các tín hiệu đặc trưng của $>C=CH-$ tại δ ppm 5,36 (1H, *d*, 7,5 Hz); của $CH-OH$ tại δ ppm 3,53 (1H, *m*, 6,5 Hz); các tín hiệu của 6 nhóm $-CH_3$ trong vùng từ trường cao 0,7 – 1,0 ppm. Phổ ^{13}C -NMR có 29 tín hiệu carbon, kết hợp với phổ DEPT NMR giúp nhận diện được 1 nhóm $>C=CH-$ từ hai tín hiệu tại δ_C ppm: 140,7 và 121,7 và 1 nhóm $-CHOH$ với tín hiệu tại 71,8 ppm.

Hợp chất (**2**): tinh thể hình kim, trắng, nhiệt độ nóng chảy: 163 – 164 °C, được phân lập từ cây *H. bonariensis* và cả trong cây *H. vulgaris*. Ngoài các tín hiệu đặc trưng của khung sterol như trên còn có thêm tín hiệu của 1 nối đôi khác, trong phổ 1H NMR là $-CH=CH-$ tại δ ppm: 5,16 (1H, *dd*, 9,0 Hz) và 5,01 (1H, *dd*, 9,0 Hz); trong phổ ^{13}C NMR là $-CH=CH-$ tại 138,3 và 129,3 ppm. Các phổ NMR cho thấy hợp chất có 29 C và 48 H, với 1 nhóm $>CH-OH$, suy ra sterol này có CTPT $C_{29}H_{48}O$, có thêm liên kết đôi dạng $-CH=CH-$ trong phân tử.

Hợp chất (**3**): tinh thể dạng bột mịn, trắng, cũng có những tính chất hóa, lý tương tự chất (**2**), tín hiệu phổ NMR cho thấy khung sườn sterol với 29 C và 48 H. Tuy nhiên trong chất (**3**) ngoài nối $-CH=CH-$ trên mạch hở, có nhóm $>C=CH-$ ở vị trí khác β -sistosterol. Những khác biệt cơ bản giữa (**1**), (**2**) và (**3**) không chỉ dựa vào

các tín hiệu của ^{13}C -NMR mà còn căn cứ vào phổ COSY và HSQC, HMBC của (2) và (3). Các kết quả gán giá trị cho (1), (2) và (3) chúng tôi trình bày trong bảng 1.

So với tài liệu đã được công bố, (John Goad et al., 1993), nhận thấy số liệu phổ trùng khớp hoàn toàn nên các chất (1), (2) và (3) được đề nghị lần lượt là β -sitosterol, stigmasterol và spinasterol.



Các chất (4) và (5) lần lượt là glucosid của chất (2) và (3), tồn tại với tỷ lệ mol 1:1, trong hỗn hợp có ký hiệu ghi phổ là Ea1.2-Hb, với phổ HMBC được trình bày trong hình 1. Carbon anomer được xác định dựa vào tín hiệu giao giữa C-3 ($\delta_{\text{C}} \approx 101,5$) và H-1' ($\delta_{\text{C}} \approx 4,45$, d , 7,5 Hz) trong phổ HMBC. Các tín hiệu COSY giúp xác nhận tương quan của các proton trong phần đường glucopyranose. Do vậy, Ea1.2-Hb được đề nghị là hỗn hợp đẳng mol của stigmasterol 3-*O*-glucosid và spinasterol 3-*O*-glucosid, có cùng CTPT là $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$.

Hợp chất (6) là hợp chất dạng dầu sệt, sắc ký cho vết màu nâu đen khi hiện hình vết bằng 20% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$. IR, KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$: 3600 – 3150 (O-H), 2974 – 2805 (C-H), 1764 – 1744 (C=O lacton), 1034 (C-O). Trong phổ ^1H -NMR của (6) có 16H, với 6 tín hiệu proton trong 2 vòng phenyl có nhóm thế tại δ ppm: 6,60 (1H, dd , 2,5; 8,0 Hz); 6,62 (1H, d , 2,0 Hz); 6,69 (1H, t , 8,0 Hz) và 6,44 (1H, d , 2,0 Hz); 6,46 (1H, m); 6,73 (1H, d , 7,5 Hz). Phổ ^{13}C -NMR của chất (6) có 20 carbon, kết hợp với DEPT-NMR xác định được có 1 carbon tứ cấp dạng $>\underline{\text{C}}=\text{O}$ và 4 carbon tứ cấp nối đơn với oxy, 2 carbon tứ cấp khác có dạng $>\underline{\text{C}}=$, 6 carbon tam cấp dạng $=\underline{\text{C}}\text{H}-$, 2 carbon dạng $>\underline{\text{C}}\text{H}-$, và 5 nhóm $-\text{CH}_2-$

Trong phổ HSQC, 2 tín hiệu giao giữa proton tại δ_{H} ppm 5,93 (2H, m) và 5,92 (2H, m) với tín hiệu của carbon tại δ_{C} ppm 101,9 và 102,1 đã chứng minh sự hiện diện của 2 nhóm $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ trong phân tử. Dựa vào phổ HMBC, các tín hiệu này có liên hệ trực tiếp với các vòng thơm. Từ phổ HSQC, các tín hiệu giao giữa δ_{H} 4,12 (1H, dd , 7,0; 2,0 Hz) và 3,85 (1H, dd , 7,5; 2,0 Hz) với δ_{C} 70,1 giúp nhận ra $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$; ngoài ra, nhận diện một nhóm $>\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}$ dựa vào tín hiệu giao giữa δ_{H} 2,53 (1H, dd , 5,5; 2,0 Hz) với δ_{C} 46,4; và một nhóm $>\underline{\text{C}}\text{H}-$ khác của bộ khung butyrolacton nhờ vào tín hiệu giao giữa δ_{H} 2,46 (1H, m) với δ_{C} 41,2. Các tín hiệu giao giữa δ_{H} 2,83 (1H, dd , 7,5; 6,5 Hz) và 2,98 (1H, dd , 5,0; 6,0 Hz) với δ_{C} 34,8 chứng nhận có các nhóm metylen nối với 2 vòng thơm và khung lacton.

So sánh phổ ¹³C-NMR, DEPT của hợp chất (6) với hinokinin trong tài liệu thấy kết quả trùng khớp, nên đề nghị (6) là hinokinin.

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của các sterol (1), (2), (3), (4), (5) và các chất ghi trong tài liệu ^[9]

Vị trí	Hợp chất (1)		β -sisto sterol	Hợp chất (2), (4)		Stigma sterol	Hợp chất (3), (5)		Spina-sterol
	δ_C	δ_H (J, Hz)		δ_C	δ_H (J, Hz)		δ_C	δ_H (J, Hz)	
1	37,2		37,2	37,2		37,2	37,2		37,2
2	31,6		31,6	31,7		31,7	31,5		31,6
3	71,8	3,52 m	71,7	71,8	3,59 m	71,8	71,0	3,59 m	71,1
4	42,8		42,9	42,3		42,3	38,1		38,1
5	140,7		140,7	140,7		140,7	40,3		40,4
6	121,7	5,63 d	121,6	121,7		121,7	29,7		29,7
7	31,9		31,9	31,9	5,16 brs	31,9	117,5	5,16 brs	117,5
8	31,6		31,9	31,8		31,9	138,9		139,6
9	50,1		50,1	50,1		50,1	49,5		49,6
10	36,5		36,5	36,5		36,5	34,3		34,3
11	21,0		21,1	21,2		21,1	21,6		21,6
12	39,8		39,9	39,7		39,7	39,5		39,6
13	42,3		42,3	42,2		42,2	43,7		43,3
14	56,7		56,7	56,8		56,8	55,2		55,2
15	24,3		24,3	24,3		24,3	23,0		23,1
16	28,2		28,2	28,9		28,9	28,4		28,5
17	56,0		56,0	55,9		55,9	56,0		56,0
18	12,0	0,58	11,9	12,0	0,89	12,0	12,1	0,55	12,1
19	19,3	0,92	19,3	19,4	1,01	19,4	13,0	0,90	13,1
20	36,1		36,1	40,4		40,5	40,7		40,8
21	18,8	0,92 d	18,8	21,2		21,2	21,3		21,3
22	33,9		33,9	138,3	5,15 dd	138,3	138,4	5,16 dd	138,1
23	26,1		26,1	129,3	5,01 dd	129,3	129,6	5,03 dd	129,5
24	45,8		45,8	51,2	1,53 brd	51,2	51,3		51,3
25	29,1		29,2	31,9		31,9	31,9		32,0
26	19,0	0,81 d	19,0	19,0	0,79 d	19,0	19,0	0,79 d	19,0
27	19,8	0,83 d	19,8	21,1	0,81 d	21,1	21,0	0,85 d	21,1
28	23,0		23,1	25,4		25,4	25,3		25,5
29	12,2	0,84 t	12,0	12,2	0,80 t	12,2	12,2	0,80 t	12,3
Trong chất Ea1.2-Hb bao gồm (4) và (5) với tỷ lệ mol 1:1			Hợp chất (4) có khung genin như chất (2) chỉ khác ở C-3			Hợp chất (5) có khung genin như chất (3) chỉ khác ở C-3			
3			79,0	3,44 m		78,4	3,42 m		
1'			101,5	4,45 d (7,5)		101,5	4,45 d (7,5)		
2'			76,8	3,52 d (5,5)		76,8	3,52 d (5,5)		
3'			73,4	3,42 m		73,4	3,42 m		
4'			70,0	3,64 d (5,5)		70,0	3,64 d (5,5)		
5'			76,7	3,73 d (3,0)		76,7	3,73 d (3,0)		
6'			61,0	3,66 m; 3,54		61,0	3,66 m; 3,54 m		

Hợp chất (7), kết tinh vô định hình, màu vàng, nhiệt độ nóng chảy: 300 °C, được phân lập từ cao etyl acetat của cây *H. bonariensis* khi giải ly cột sắc ký bằng hệ dung môi PE:Et (2:8). Phổ ESI-MS cho pic ion phân tử giả tại m/z 303 $[M+H]^+$, ứng với công thức phân tử C₁₅H₁₀O₇. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO, δ ppm): 7,68 (*d*, 2,0 Hz, H-2'); 7,52 (*dd*, 8,5 Hz; 2,0 Hz, H-6'), 6,82 (*d*, 2,0 Hz, H-5'); 6,40 (*d*, 2,0 Hz, H-8), 6,20 (*d*, 2,0 Hz, H-6) và 12,48 (*s*, proton của liên kết hydro kiềm nối giữa -OH tại C-5 và nhóm carbonyl của C-4) cho thấy khung sườn cơ bản của flavonol với 2 nhóm thế -OH kề nhau trên vòng thơm thứ hai. Các tín hiệu trong phổ ¹³C-NMR phù hợp với 15 tín hiệu trong hợp chất quercetin. Do vậy, hợp chất (7) được đề nghị là quercetin.

Hợp chất (8), kết tinh vô định hình, màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy: 240-241 °C, được phân lập từ cao etyl acetat của cây *H. bonariensis* khi giải ly cột bằng hệ dung môi cloroform-metanol (9:1), (khối lượng 34 mg) và trong cao butanol cũng thu được chất này thêm (khối lượng 9 mg, đã kiểm tra với phổ 1H-NMR) khi giải ly cột sắc ký thứ hai trên một phân đoạn cao butanol với hệ dung môi etyl acetat-metanol-nước (4:1:0,1).

Bảng 2: Số liệu phổ NMR của hợp chất (6) và Hinokinin theo tài liệu đã công bố

TT	Hợp chất (6)		Hinokinin	TT	Hợp chất (6)		Hinokinin
	δ_C	δ_H (J, Hz)	δ_C		δ_C	δ_H (J, Hz)	δ_C
1	178,4	-	178,0	11	71,1	3,85 dd (2,0; 7,5) 4,12 dd (2,0; 7,0)	70,9
2	46,4	2,55 m	46,2	12	41,2	2,52 m	41,1
3	34,8	2,98 dd (5,0; 9,0) 2,84 dd (6,5; 7,5)	34,6	13	38,3	2,57 dd (7,5; 9,0) 2,44 dd (8,0; 8,5)	38,1
4	131,3	-	131,3	14	131,3	-	131,1
5	108,3	6,45 d (2,0)	108,3	15	109,4	6,62 d (1,5)	109,1
6	147,8	-	147,5	16	147,9	-	147,5
7	146,3	-	146,0	17	146,4	-	146,1
8	108,2	6,73 d (7,5)	108,2	18	108,8	6,69 t (4,0)	108,2
9	121,5	6,46 dd (2,5; 3,0)	121,2	19	122,2	6,60 dd (1,5; 6,5)	121,9
10	102,1	5,92 m	100,9	20	101,9	5,93 m	100,9

Bảng 3: Dữ liệu phổ NMR của hợp chất (8) và (9) cô lập được so với chất đã công bố^[4, 12]

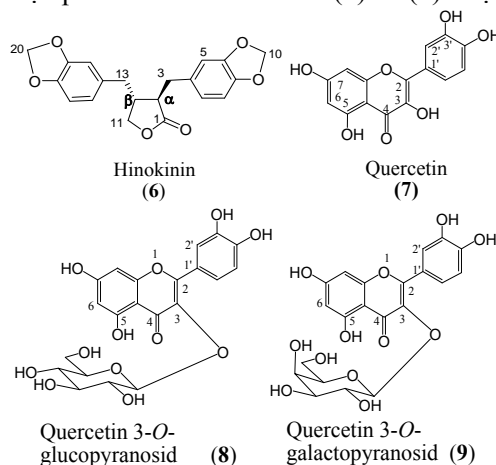
Vị trí C	Quercetin 3-O-glucopyranosid, δ_C	Hợp chất (8)		Vị trí C	Quercetin 3-O-galactopyranosid, δ_C	Hợp chất (9)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)			δ_C	δ_H (J, Hz)
2	156,4	158,5		2	156,4	156,2	
3	135,1	135,8		3	133,2	133,4	
4	178,2	179,6		4	177,2	177,4	
5	163,8	163,1		5	161,1	161,2	
6	98,3	99,9	6,22 d (1,5)	6	98,5	98,6	6,27 d (2,0)
7	166,4	166,1		7	163,9	164,1	
8	94,4	94,7	6,42 d (2,0)	8	93,4	93,4	6,47 d (2,0)
9	158,8	158,9		9	156,3	156,2	
10	104,5	105,7		10	103,9	103,9	
1'	122,8	123,0		1'	121,1	121,1	
2'	115,3	116,1	7,84 d (2,5)	2'	116,2	115,2	7,74 d (2,0)
3'	145,9	145,8		3'	144,6	144,8	
4'	148,5	149,9		4'	148,2	148,4	
5'	117,2	117,8	6,88 d (8,5)	5'	115,1	115,9	6,90 d (7,5)
6'	122,8	123,0	7,60 dd (2,5; 8,5)	6'	121,4	121,9	7,62 dd (2,0; 7,5)
1''	101,1	100,9	5,16 d (7,5)	1''	101,2	101,8	5,54 d (7,5)
2''	71,6	73,2	3,68 d (6,0)	2''	71,6	71,2	3,64 d (3,0)
3''	73,8	76,9	3,49 d (6,0)	3''	73,8	73,1	3,52 d (5,5)
4''	69,7	71,5	3,85 (d, 7,5)	4''	69,7	67,9	3,73 d (3,0)
5''	75,4	77,3	3,65 (dd, 6,0; 6,0)	5''	75,4	75,8	3,41 dd (4,0; 3,0)
6''	62,0	62,2	3,86; 3,57	6''	62,2	60,1	3,66 m; 3,54 m

Phổ EI-MS của chất (9) cho pic phân tử m/z 464 $[M]^+$, ứng với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_{12}$. Các chất (8) và (9) đều có proton anomer ở khoảng 5,2 ppm và các tín hiệu proton của đường trong vùng 3,6 – 4,0 ppm, chứng tỏ chúng là những hợp chất flavonol glycosid. Phổ ^{13}C và DEPT-NMR đều cho 21 tín hiệu, với 15 tín hiệu đặc trưng của khung flavonol là $>C=O$ khoảng 179 ppm, 9 carbon tứ cấp dạng

=C< trong đó có 7 tín hiệu ở vùng 130 – 165 ppm dạng =C-O, cùng 5 carbon dạng >CH= và 1 carbon anomer ở vùng 95 – 125 ppm.

Phần aglycon của (8) và (9) được đề nghị là quercetin. Các carbon của khung đường đều cho thấy đây là đường có cấu trúc pyranose, với 6 C, trong đó ngoài C-anomer còn có 1 tín hiệu C ở 62 ppm và 4 tín hiệu C ở khoảng 70 -78 ppm, nên chỉ có thể là đường galacto hoặc glucose. Điểm khác biệt cơ bản giữa hai chất (8) và (9), là hằng số *J* của H-4'' trong phân tử đường dựa vào phổ ¹H-NMR. Xác định khác biệt lập thể giữa 2 đường như sau: trong glucose: H-4'' ở vị trí trục, còn trong galactose thì H-4'' ở vị trí xích đạo, với giá trị $J_{aa} > J_{ae} > J_{ee}$. Cụ thể trong chất (8), H-4''-glucose: 3,85 ppm, *d*, (1H, *J* = 7,5Hz) còn đối với H-4''-galactose trong chất (9): 3,73 ppm, *d*, (1H, *J* = 3,0 Hz).

Trong phổ COSY tập hợp các nhóm tín hiệu của các proton có tương tác với nhau trực tiếp giúp nhận diện nhóm aglycon và nhóm đường; trong đó có 2 cụm proton ứng với 2 khung hương phương độc lập của vòng A và B trong flavonol. Ngoài ra xác định được proton anomer là tín hiệu ở 5,2 ppm vì tương tác với đường và cả phần aglycon. Từ phổ HMBC, ghi nhận các tương quan của proton với carbon gần kề, xác định được vị trí nối của đường vào khung aglycon trong các chất (8) và (9) là tại C-3 của khung aglycon, ở vùng 135 ppm. Từ các phân tích trên, các chất (8) và (9) được đề nghị lần lượt là quercetin 3-*O*-galactopyranosid và quercetin 3-*O*-glucopyranosid. Dữ liệu phổ NMR của các chất (8) và (9) được ghi trong bảng 3.



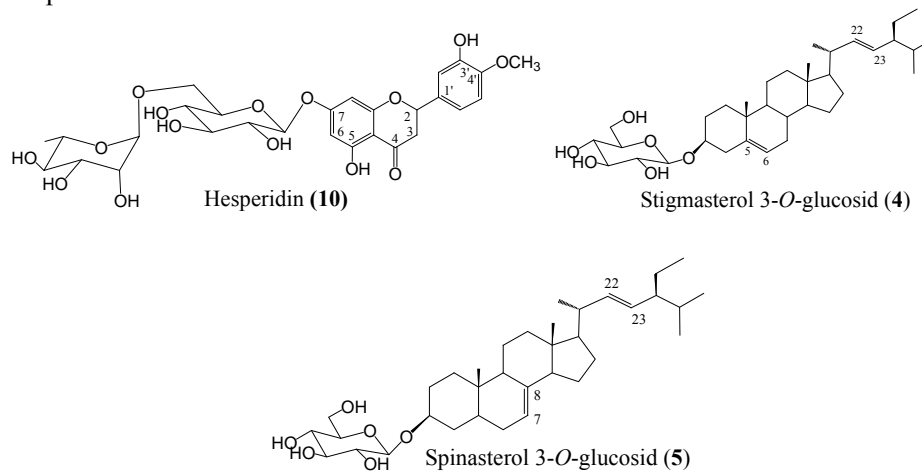
Hợp chất (10) được phân lập từ cao butanol của cây *H. vulgaris* khi giải ly cột bằng hệ dung môi etyl acetat-metanol-nước (4:1:0,1). Chất có dạng bột mịn, màu vàng kem, sắc ký lớp mỏng cho vết hiện hình màu xanh dương đậm khi phun 10% FeCl₃/MeOH, *R_f* = 0,4, giải ly với etyl acetat-metanol-nước (8:1:1). Nhiệt độ nóng chảy 251 -253°C, tan trong metanol. Phổ positive-MS có pic ion *m/z* 611 [M+H]⁺, phổ negative- MS có pic ion *m/z* 609 [M-H]⁺ suy ra pic ion phân tử của hợp chất này là *m/z* 610, phù hợp với công thức phân tử C₂₈H₃₄O₁₅.

Phổ ¹H NMR của chất (10) có 34 H, có những tín hiệu khác các flavonol đã cô lập, ở vùng từ trường thấp, và phần đường có đến 10 tín hiệu proton trong đó có 1 nhóm -CH₃ 1,08 ppm (3H, *s*), và 1 nhóm >CH₂ 2,77 (1H, *dd*, 3,0; 6,5 Hz). Các tín hiệu của proton vòng thơm tại δ ppm: 6,94 (1H, *brs*), 6,93 (1H, *d*, 3,5 Hz), 6,90

(1H, *d*, 4,5 Hz), ứng với 3 proton trong đó có 2 H ở vị trí meta với nhau, 2 H ở vị trí orto với nhau trên khung phenyl có 3 nhóm thế. Ngoài ra, tại δ ppm: 6,14 (1H, *d*, 2,0 Hz), 6,12 (1H, *brs*) cho thấy có 2 proton ở vị trí meta với nhau trên khung phenyl có 4 nhóm thế. Ở vùng từ trường thấp hơn có các tín hiệu của proton >CHOH: 5,49 (1H, *dd*, 12,0; 3,0 Hz), nhóm >CH₂: 3,21 (1H, *d*, 5,0 Hz) và 2,50 (1H, *m*) kết hợp với tín hiệu proton -OH kèm nối với nhóm C=O tại 12,01 ppm, chúng tỏ trong phân tử có cấu trúc vòng flavanon. Nhóm metoxy được xác nhận thông qua phổ HSQC cho thấy tương tác trực tiếp của 3 proton tại 3,77 ppm (3H, *m*) với carbon tại δ_C 55,6 ppm.

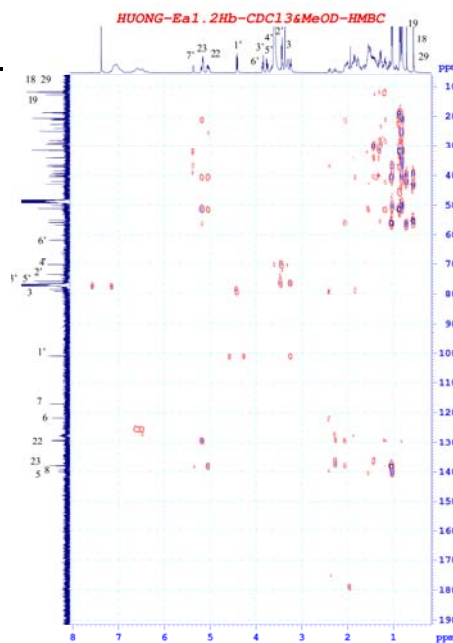
Trong phân tử có một phân tử đường glucose và một phân tử rhamnose, có tín hiệu của 1 nhóm -CH₃ với δ_C 17,1 ppm, mà proton của nó tại δ_H 1,08 ppm cho tương quan với các carbon tại δ_C ppm: 68 và 73. Carbon anomer của rhamnose δ_C 100,5 ppm nối với carbon cuối của glucose, điều này được xác định qua sự hiện diện của tín hiệu carbon cuối mạch glucose tại 66 ppm thay vì 62 ppm như trong glucose tự do. Còn carbon anomer của glucose có tín hiệu tại δ_C 99,4 ppm, δ_H 4,97 ppm. Các dữ liệu trong phổ NMR 1 chiều và 2 chiều đưa đến nhận định hợp chất (10) là một flavanon có 1 nhóm metoxy tại vị trí số 4' và phân tử đường rutin gắn với khung sườn chính tại vị trí số 7.

So sánh các số liệu phổ của chất (10) với chất hesperidin (theo Irina T N *et al.*, 2008) nhận thấy hoàn toàn trùng khớp (bảng 4), nên đề nghị hợp chất (10) là hesperidin.



Bảng 4: Dữ liệu phổ NMR của chất cô lập được (10) và Hesperidin đã được công bố [14]

Vị trí C	Hợp chất (10)			Hesperidin
	δ_c	DEPT	δ_H (J, Hz)	δ_c
2	78,3	>CH-	5,13 (d, 4,5)	78,1
3	42,0	-CH ₂ -	2,80; 3,40	42,0
4	196,9	>C=O		197,3
5	162,4	=CHOH	-	163,4
6	96,3	=CH-	6,10 (d, 3,0)	96,6
7	165,1	=C-O	5,51 (d, 3,0)	165,4
8	95,5	=CH-	6,12 (d, 3,0)	95,7
9	162,4	HO-CH=	-	162,8
10	103,2	=C<	-	103,6
1'	130,8	>C=	-	131,4
2'	114,1	-CH=	6,94	114,5
3'	146,4	HO-CH=	-	146,7
4'	147,9	HO-CH=	-	148,2
5'	112,0	-CH=	6,89	112,3
6'	117,9	-CH=	6,90	118,2
	56,2	-O-CH ₃	3,77	55,9
1''	99,4	-O-CH-O	4,97 d (7,0)	99,5
2''	72,9	HO-CH<	3,28 d (5,0)	72,9
3''	78,3	HO-CH<	5,50 dd (3,0; 3,0)	75,7
4''	72,0	HO-CH<	3,12 d (9,0)	70,2
5''	76,2	HO-CH<	3,22 d (5,0)	75,3
6''	66,0	HO-CH ₂ -	3,38 m; 3,82 m	65,7
1'''	103,2	O-CH-O	4,66 d (5,5)	100,9
2'''	70,6	HO-CH<	3,42 d (6,0)	69,9
3'''	70,2	HO-CH<	3,63 m	69,3
4'''	75,5	HO-CH<	3,53 d (8,0)	71,8
5'''	69,5	HO-CH<	3,15 dd (3,0; 5,0)	68,1
6'''	17,9	-CH ₃	1,07 d (6,0)	18,1



Hình 1: Phổ HMBC của hỗn hợp stigmasterol 3-O-glucosid và spinasterol 3-O-glucosid

4 KẾT LUẬN

Trước đây khi nghiên cứu 2 cây rau má lá sen, chúng tôi nhận thấy loài *H. bonariensis* thu tại Tiền Giang mới có hoạt tính sinh học rõ rệt hơn khi thu mẫu ở Cần Thơ và kháng khuẩn mạnh hơn loài *H. vulgaris*, nên đã trồng và thu hoạch nguyên liệu tại đó để nghiên cứu tách chất. Kết quả cô lập và định danh chất từ 2 loài cây là tương đối giống nhau. Tuy nhiên, ở loài *H. bonariensis* ngoài hinokinin còn có sự hiện diện của 1 (một) butyro lacton khác mà ở loài *H. vulgaris* chưa tìm thấy; các steroid, flavonoid trong loài *H. bonariensis* đa dạng hơn, nhưng không tìm thấy chất hesperidin trong cây này.

Hinokinin (6) là hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định như: *E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *C. albicans*. Các chất quercetin 3-O-glucopyranosid (8) và quercetin 3-O-galactopyranosid (9) có trong 2 loài cây, đều có hoạt tính kháng oxy hóa, ngoài ra còn có khả năng kháng một số

dòng tế bào ung thư phổi, gan trong thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* (theo Jun Lu *et al.*, 2006; Piao M.J. *et al.*, 2008; Seyed M.R. *et al.*, 2009). Hợp chất hesperidin (10) còn có tên là vitamin P2, cũng là một chất có hoạt tính sinh học tốt. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất sterol, lignan và flavonoid trong hai cây rau má lá sen vì thế đã mở ra một hướng ứng dụng hai loại cây rau này trong đời sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Della Greca Marina, Fiorentino Antonio, Monaco Pietro, Previtera Lucio, (1994), Oleaneglycosides from *Hydrocotyle ranunculoides*, *Phytochemistry* **36**(6), 1479-1483.
- Hiller K., Voigt Gabriele, Doehner H., (1981), Structure of the main saponin from *Hydrocotyle vulgaris* L., *Pharmazie* **36**(12), 844-846.
- Irina Tsoy Nizamudinova, Jae Ju Jeong, Guang Hua Xu, Seung-Ho Lee, Sam Sik Kang, Yeong Shik Kim, Ki Churl Chang, Hye Jung Kim, (2008), Hesperidin, Hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecule in tumor necrosis factor α -stimulated human umbilical vein endothelial cell, *International Immunopharmacology* (**8**), 670 – 678.
- John Goad, Toshihiro Akihisa, (1993), *Analysis of sterol*, Blankie Academic & Professional Pub.
- Jun Lu, Laura V. Papp, Jianguo Fang, Salvador Rodriguez Nieto, Boris Zhivotovsky, Arne Holmgren, (2006), Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implication for myricetin and quercetin anticancer activity, *Cancer Res.*, **66** (**8**), 4410-4418.
- Li Jiang, Lin Jun, Huang Zhongshi, Lin Xing, Huang Rebin, (2004), Determination of total flavones in *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Guangxi Yike Daxue Xuebao* **21**(4), 491-492.
- M.L. A. Silva, H.S. Coimbra, A.C. Pereira, V.A. Almeida, T.C. Lima, E.S. Costa, A.H.C. Vinholis, V.A. Royo, R. Silva, A.A.S. Filho, W.R. Cunha, N.A.J.C. Furtado, Carlos H.G. Martins, T.C. Carvalho and J.K. Bastos, *Evaluation of Piper cubeba extract, (-)-Cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens*, *Phytotherapy Res.* **21**, 2007, 420-422
- Muslim Tanvir, Chowdhury, Tofail A., Mosihuzzaman M., (1995), Isolation and characterization of a triterpen acid from *Centella asiatica* (thankuni) leaves, *Dhaka University Journal of Science*, **43**(2), 223-228.
- Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, You HJ, Kim HS, Kim JS, Kang SS, Hyun JW, (2008), Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect, *Bio. Chim. Biophys. Acta*, **1780**(12), 1448-1457, Epub. 2008, Aug.15.
- Seyed Medhi Razavi, Saber Zseyed Medhi Razaviahsi, Gholamreza zarrini, Hossein Nazemiyeh, Sariyeh Mohammadi, (2009), Biological activity of Quercetin 3-*O*-glucosid, a known plant flavonoid, *Russian Journal of Bio-organic Chemistry*, **35**(3), 376-378.
- Shigematsu Nobuharu, Kouno Isao, Kawano Nobusuke, (1982), Quercetin 3-(6''-caffeoyl)galactoside) from *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Phytochemistry* **21**(8), 2156-2158.
- Tôn Nữ Liên Hương, Nguyễn Bá Vi, Nguyễn Kim Phi Phụng, Nguyễn Ngọc Sương, (2009), *Chemical constituents of essential oil and organic extract from Hydrocotyle bonariensis*, (*Apiaceae*), *Tap chí Hóa học*, **47**, 542-546.
- Tôn Nữ Liên Hương, Nguyễn Kim Phi Phụng, Nguyễn Ngọc Sương, (2009), *Contribution to the study on chemical constituents of Hydrocotyle vulgaris* (L.), *Apiaceae*, *Tap chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG TP HCM*, ISSN: 1859-0128, **12**, 29-35.
- Võ Văn Chi, Trần Hợp, *Cây cỏ có ích Việt Nam*, tập 1, NXB. Giáo dục, 1999, trang 509