

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN FLAVONOIT VÀ MEGASTIGMAN GLUCOSIT CỦA CÂY GÀO (*FICUS CALLOSA*)

Phan Văn Kiệm¹, Châu Văn Minh¹, Nguyễn Xuân Cường¹, Đan Thị Thúy Hằng¹, Nguyễn Phương Thảo¹, Nguyễn Hoài Nam¹, Ninh Khắc Bản², Trương Nam Hải³

¹Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 29-0-2010

Abstract.

Chromatographic separation led to the isolation of two flavonoid glycosides, glucotricin (**1**) and rhoifolin (**2**), and one megastigmane glycoside, corchoionoside C (**3**), from the leaves of *Ficus callosa*. Their structures were elucidated by ESI-MS and NMR experiments. This is the first report of these compounds from *F. callosa*.

Key words: *Ficus callosa*, Moraceae, glucotricin, rhoifolin.

1. MỞ ĐẦU

Chi Đa (*Ficus* L.) là một chi lớn trong họ Dâu tằm (Moraceae), gồm khoảng 1000 loài và hầu hết phân bố ở các khu vực thuộc vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới. Chi gặp rất ít loài sinh trưởng ở vùng ôn đới. Đông Nam Á là trung tâm đa dạng nhất của chi Đa. Tại đây có thể gặp tới hơn nửa số loài của cả chi [1]. Nước ta cũng là nơi tập trung về sự đa dạng cao của chi này trong khu vực và trên thế giới. Theo thống kê của các nhà khoa học thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đến năm 2003, có 98 loài và 36 thứ của chi này được ghi nhận tại Việt Nam [2]. Tất cả các loài trong chi Đa đều chứa nhựa mủ. Đây là nguồn nguyên liệu được sử dụng để làm thuốc có giá trị. Cư dân tại một số nước trong vùng đã dùng nhựa của nhiều loài (*Ficus* spp.) để đắp và điều trị vết thương, các chỗ bầm giập, mụn nhọt có kết quả tốt. Nhựa của một số loài còn được dùng làm thuốc chữa thấp khớp, ho và tiêu chảy. Vỏ của nhiều loài lại chứa tanin với hàm lượng rất cao nên đã được sử dụng để sát trùng hoặc làm thuốc nhuộm quần áo. Vỏ của các loài đa lá tròn (*F. benghalensis* L.) và đề (*F. religiosa* L.) đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh tiêu đường trong y học dân tộc ở một số khu vực [1].

Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học trên thế giới đã công bố sự phân lập và xác định cấu trúc của trên 100 hợp chất từ các loài thuộc chi *Ficus*, với các nhóm chất chính là flavonoit, tritepenoit, coumarin và phenanthroindolizidine ancaloit [3]. Nhiều hợp chất đã được phân lập thể hiện hoạt tính sinh học quý báu như: hoạt tính chống ung thư, kháng viêm, chống

ôxy hóa, kháng vi sinh vật, chống co giật ... [3 - 6]. Các nghiên cứu trong nước về chi này cũng thu được một số kết quả đáng quan tâm. Năm 2002, một hợp chất sesquiterpen, verrucaric acid acetate, được xác định từ cây sung đất *F. fistulosa* có tác dụng kháng ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* rất cao với giá trị $IC_{50} < 1$ ng/ml. Hoạt tính của hợp chất này cao hơn cả chloroquine, artemisinin và quinine [7]. Cặn ancanoit tổng của cây ngái (*F. hispida*) và hợp chất hispidin phân lập từ cặn chiết này được công bố thể hiện hoạt tính gây độc tế bào cao trên các dòng tế bào ung thư người gồm ung thư gan (Hep-2), ung thư màng tim (RD) và ung thư tử cung (FI) [8].

Nghiên cứu gần đây của chúng tôi cho thấy, dịch chiết metanol của lá cây đề *F. religiosa* thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh. Dịch chiết loài này có thể có tác dụng bảo vệ thần kinh chống lại sự viêm, kim hãm sự sản sinh tác nhân điều tiết viêm như NO và các cytokine tiền viêm trong tế bào thần kinh đệm (macroglia) chuột hoạt hóa. Các kết quả trên gợi mở cho các nghiên cứu phát triển các dược phẩm có tác dụng phòng ngừa một số bệnh thoái hóa thần kinh chẳng hạn như bệnh Parkinson [9]. Tiếp theo các nghiên cứu về chi *Ficus*, chúng tôi công bố trong công trình này sự phân lập và xác định cấu trúc của hai flavonoit glycosit, glucotricin (**1**) và rhoifolin (**2**), và một megastigmane glycosit, corchoionoside C (**3**), từ lá cây gào *Ficus callosa*.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

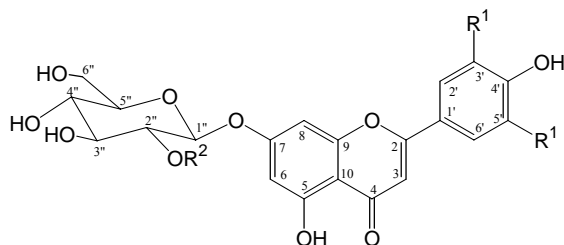
2.1. Mẫu thực vật

Mẫu lá cây gào *Ficus callosa* Willd. (Moraceae)

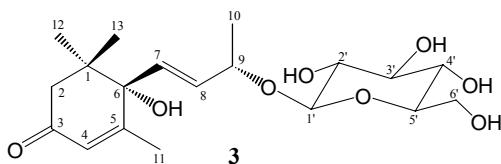
được thu hái tại Bạch Mã, Huế, Việt Nam vào tháng 10 năm 2008. Tên khoa học được TS Ninh Khắc Bản giám định. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phân lập các chất

Lá khô cây gào *F. callosa* (4,0 kg) được chiết ba lần với MeOH bằng thiết bị siêu âm Ultrasonic 2010 ở nhiệt độ 40-50°C (3 × 60 phút). Dịch chiết sau đó được cô đặc bằng máy cất quay với áp suất giảm thu được 200 g cặn chiết MeOH. Cặn này được hòa vào nước và phân bố lần lượt với CHCl₃ và EtOAc thu được các dịch cô CHCl₃ (FC1, 50 g) và EtOAc (FC2, 30 g). Phần dịch nước sau chiết được tiến hành sắc ký qua cột DIANION sử dụng hệ dung môi gradient MeOH-H₂O (từ 0:100 đến 100:0) thu được các dịch cô ký hiệu là FC3A (5 g), FC3B (10 g), FC3C (7 g). Phân đoạn FC3B (10 g) được tiếp tục phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, hệ dung môi rửa giải gradient nồng độ MeOH trong CHCl₃ từ 15 đến 100% thu được 5 phân đoạn ký hiệu từ FC3B1 đến FC3B5. Hợp chất **1** (500 mg) được kết tinh trong MeOH từ phân đoạn FC3B2 (2 g) dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt. Tiếp tục phân tách phân đoạn FC3B3 (3 g) bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải acetone - H₂O 1/8 và tinh chế tiếp bằng sắc ký cột silica gel pha thường rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃ - MeOH 3/1 thu được các hợp chất **2** (15 mg, chất bột màu vàng) và **3** (20 mg, chất bột màu trắng).



1 R¹ = OCH₃, R² = H
2 R¹ = H, R² = α-L-rhamnopyranosyl



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất **1-3**

Glucotricin (**1**): Tinh thể hình kim màu vàng, mp. 247°C, [α]_D +22 (c, 0,25 trong DMSO); ESI-MS *m/z* 493 [M + H]⁺, công thức phân tử C₂₃H₂₄O₁₂ (M = 492); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) và ¹³C-NMR (125MHz, DMSO-*d*₆), xem bảng 1.

Rhoifolin (**2**): Bột màu vàng, mp. 245°C, [α]_D -110 (c, 0.25 trong MeOH); ESI-MS *m/z* 579 [M +

H]⁺ và 601 [M + Na]⁺, công thức phân tử C₂₇H₃₀O₁₄ (M = 578); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) xem Bảng 1.

Corchoionoside C (**3**): Bột màu trắng, [α]_D +25 (c, 0.25 trong MeOH); ESI-MS *m/z* 421 [M + 2H₂O - H]⁺, công thức phân tử C₁₉H₃₀O₈ (M = 386); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{ppm}: 2,62 (1H, d, *J* = 17,0 Hz, H_a-2), 2,19 (1H, d, *J* = 17,0 Hz, H_b-2), 5,89 (1H, s, H-4), 5,98 (1H, d, *J* = 15,5 Hz, H-7), 5,75 (1H, dd, *J* = 15,5, 7,0 Hz, H-8), 4,55 (1H, m, H-9), 1,31 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H-10), 1,96 (3H, d, *J* = 1,0 Hz, H-11), 1,06 (3H, s, H-12), 1,04 (3H, s, H-13), 4,29 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1'), 3,87 (1H, dd, *J* = 12,0, 2,0 Hz, H_a-6') và 3,66 (1H, dd, *J* = 12,0, 6,0 Hz, H_b-6'); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{ppm}: 42,45 (C-1), 50,79 (C-2), 201,33 (C-3), 127,16 (C-4), 167,23 (C-5), 80,06 (C-6), 133,78 (C-7), 133,76 (C-8), 74,71 (C-9), 22,27 (C-10), 19,59 (C-11), 23,51 (C-12), 24,72 (C-13), 101,30 (C-1'), 74,99 (C-2'), 78,22 (C-3'), 71,72 (C-4'), 78,40 (C-5') và 62,87 (C-6').

2.3. Hóa chất thiết bị

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufoalien 60 F254 (Merck 1,05715), RP18 F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040 - 0,063 mm (240 - 430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30 - 50 μm, FujiSilisa Chemical Ltd.).

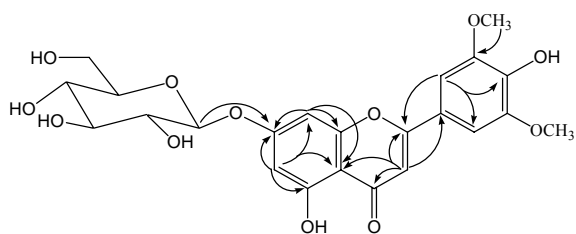
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Được đo trên máy Bruker DRX500 của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ khối lượng (ESI-MS): Đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng. Vết chất của **1** trên TLC hiện màu vàng khi sử dụng thuốc thử H₂SO₄ 10% và hơ nóng từ từ, cho phép dự đoán đây là một hợp chất flavonoid. Phổ ¹H-NMR của **1** xuất hiện tín hiệu của bốn proton vòng thơm tương tác ở vị trí *meta* với nhau tại δ_H 6,46 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,92 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8) và 7,35 (2H, br s, H-2' và H-6'). Cùng với tín hiệu của một proton olefin tại δ_H 7,05 (1H, s, H-3) và hai nhóm metoxi đối xứng tại δ_H 3,88 (6H, s, 3'-OMe và 5'-OMe), cho phép dự đoán

sự có mặt của một hợp chất flavon có cấu trúc khung dạng 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone. Ngoài ra, tín hiệu của một proton anome tại δ_H 5,17 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-1'') gợi ý cho sự có mặt của một liên kết đường cấu hình β .



Hình 2: Các tương tác HMBC chính của **1**

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ DEPT của **1** xuất hiện các tín hiệu của 23 carbon. Trong đó, sự xuất hiện của một tín hiệu metin olefin và bốn metin thơm [δ_C 103,79 (C-3), 99,52 (C-6), 95,30 (C-8) và

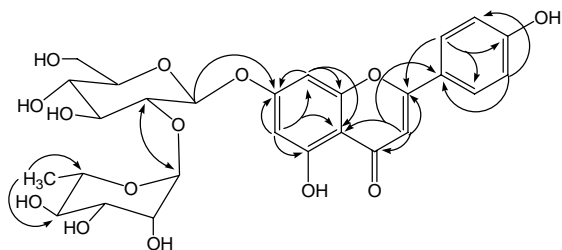
104,56 (C-2' và C-6')], một nhóm keton [δ_C 182,04 (C-4)] và hai nhóm metoxi đối xứng [δ_C 56,38 (3'-OMe và 5'-OMe)], khẳng định sự có mặt của khung 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone [10]. Ngoài ra, các tín hiệu carbon của gốc đường tại δ_C 100,18 (C-1''), 73,15 (C-2''), 76,49 (C-3''), 69,67 (C-4''), 77,35 (C-5'') và 60,66 (C-6''), khẳng định sự có mặt của một đơn vị đường β -D-glucopyranose [11]. Vị trí liên kết của đơn vị đường glucose tại C-7 được xác định bằng tương tác HMBC giữa proton anome (δ_H 5,17) và C-7 (δ_C 163,00). Từ các phân tích nêu trên, số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **1** được so sánh với các số liệu tại các vị trí tương ứng của tricrin 7-O- β -D-glucopyranoside [11] và nhận được sự phù hợp hoàn toàn (bảng 1). Kết quả này, cùng với phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC của **1** (hình 2), cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của **1** là tricrin 7-O- β -D-glucopyranoside hay còn được gọi là glucotricin.

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của **1** và **2**

C	$\delta_C^{\#}$	1		2	
		$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ ($J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{b,d}$	$\delta_H^{c,d}$ ($J = \text{Hz}$)
Aglycon					
2	164,1	164,11	-	166,94	-
3	105,9	103,79	7,05 s	104,05	6,67 s
4	182,0	182,04	-	184,08	-
5	160,8	161,07	-	162,96	-
6	99,5	99,52	6,46 d (2,0)	101,05	6,48 d (2,0)
7	163,0	163,00	-	164,43	-
8	95,4	95,30	6,92 d (2,0)	95,99	6,80 d (2,0)
9	156,9	156,86	-	159,02	-
10	105,4	105,37	-	107,12	-
1'	120,2	120,21	-	122,79	-
2', 6'	104,5	104,56	7,35 br s	129,67	7,89 d (8,5)
3', 5'	148,2	148,22	-	117,27	6,94 d (8,5)
4'	139,9	140,08	-	163,45	-
3',5'-OMe	56,4	56,38	3,88 s		
7-Glc					
1''	101,1	100,18	5,17 d (7,0)	99,90	5,22 d (7,5)
2''	73,1	73,15	3,27*	79,16	3,73*
3''	76,3	76,49	3,31*	79,03	3,66*
4''	69,5	69,67	3,17 dd (8,5, 9,0)	72,25	3,64*
5''	77,3	77,35	3,45*	78,31	3,57 m
6''	60,5	60,66	3,72 dd (5,5, 12,0) 3,47*	62,47	3,74*/3,95*
2''-Rha					
1'''				102,56	5,31 d (1,0)
2'''				71,44	3,44*
3'''				72,25	3,98*
4'''				74,00	3,43*
5'''				70,05	3,96*
6'''				18,24	1,34 d (6,5)

^ađo trong DMSO- d_6 , ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^dđo trong CD₃OD, *tín hiệu bị chồng lấp, [#] δ_C của tricrin 7-O- β -D-glucopyranoside [11].

Hợp chất **2** được tinh chế dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ NMR của nó có dạng tương tự như phổ của **1**. Sự khác biệt dễ nhận thấy nhất là sự mất đi tín hiệu của hai nhóm metoxi và xuất hiện thêm một đơn vị đường rhamnose với các tín hiệu đặc trưng của proton anome (δ_H 5,31, 1H, d, $J = 1,0$ Hz, H-1'') và một nhóm methyl bậc hai (δ_H 1,34, 3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-6'') trong phân tử của **2** so với **1**. Ngoài ra, một tín hiệu chập của hai proton vòng B tương tác ở vị trí *meta* với nhau trên phổ proton của **1** đã chuyển thành hai tín hiệu chập của bốn proton thơm tương tác *ortho* với nhau tại δ_H 7,89 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2' và H-6') và 6,94 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3' và H-5') trên phổ của **2**. Dữ kiện này cho phép xác định hợp chất **2** có cấu trúc khung dạng apigenin. Tín hiệu cacbon C-2'' (δ_C 79,16) thuộc đơn vị đường glucose của **2** bị dịch chuyển mạnh về phía trường thấp so với tín hiệu C-2'' (δ_C 73,15) của **1**, cho phép dự đoán vị trí liên kết của đơn vị đường rhamnose tại C-2''. Dự đoán này được khẳng định bởi tín hiệu HMBC giữa proton anome H-1'' (δ_H 5,31) với C-2'' (δ_C 79,16) và H-2'' (δ_H 3,27) với cacbon anome C-1'' (δ_C 102,56). Từ đó, số liệu phổ ^{13}C -NMR của **2** được so sánh với các số liệu tương ứng của rhoifolin [12] và nhận được sự phù hợp hoàn toàn. Phân tích chi tiết các tương tác nhận được trên phổ HSQC và HMBC cho phép gán chính xác giá trị phổ NMR tại các vị trí trong phân tử của **2** (Hình 3 và Bảng 1). Từ các kết quả đã nêu, cấu trúc hóa học của **2** được xác định là apigenin 7-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside hay còn được gọi là rhoifolin.



Hình 3: Các tương tác HMBC chính của **2**

Hợp chất **3** được xác định là corchoionoside C [13] bởi sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ NMR của nó so với các số liệu tương ứng đã được công bố. Đây là lần đầu tiên các hợp chất **1** - **3** được công bố từ cây *F. callosa*. Một điều đáng quan tâm là hợp chất **1** được công bố thể hiện tác dụng bảo vệ gan do có khả năng kích thích hoạt lực của enzym GSH-Px (glutathione peroxidase) và SOD (superoxide dismutase), thu dọn gốc tự do sản sinh bởi CCl_4 , giảm độ nhớt của máu và tăng cường vi tuần hoàn máu. Với nguồn cung cấp dồi dào, hợp chất này mở ra hướng nghiên cứu phát triển dược phẩm điều trị bệnh xơ gan [13]. Nghiên cứu mới đây cho thấy, hợp

chất **1** thể hiện hoạt tính chống loét dạ dày trên chuột thí nghiệm rất cao với khả năng phục hồi tới 80,93% ở mức liều 100 mg/kg. Các nghiên cứu cho thấy hợp chất này được sử dụng an toàn trên người và do đó có thể sử dụng theo đường uống để phòng và điều trị bệnh viêm loét dạ dày [14]. Hợp chất này được phân lập với hàm lượng khá cao từ cây gào (*F. callosa*), điều này gợi mở hướng nghiên cứu tiếp theo của hợp chất **1** nói riêng cũng như cây *F. callosa* nói chung theo hướng chống xơ gan và viêm loét dạ dày.

4. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký cột kết hợp với chất hấp phụ là silicagel pha thường và pha đảo, hai flavonoid glycosit, glucotricin (**1**) và rhoifolin (**2**), và một megastigmane glycosit, corchoionoside C (**3**), đã được phân lập từ cặn chiết metanol của lá cây gào *Ficus callosa*. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại như: phổ khối lượng ESI-MS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D-NMR: ^1H , ^{13}C -NMR và các phổ DEPT 90, DEPT 135) và hai chiều (2D-NMR: HSQC và HMBC). Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài *F. callosa*.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Đề tài nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên mã số 104.01.31.09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Mỗi, Trần Minh Hội, Dương Đức Huyền., Trần Huy Thái, Ninh Khắc Bản, Tài nguyên thực vật Việt Nam - Những cây chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học, tập I, Nxb. Nông nghiệp, 117-133 (2005).
2. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập II, NXB Nông nghiệp, 180 - 203 (2003).
3. E. P. Lansky, H. M. Paavilainen, A. D. Pawlus, R. A. Newman. Journal of Ethnopharmacology, 119, 195 - 213 (2008).
4. K. Annan, P. J. Houghton. Journal of Ethnopharmacology, 120, 17 - 24 (2008).
5. B. A. Chindo, J. A. Anuka, L. McNeil, A. H. Yaro, S. S. Adamu, S. Amos, W. K. Connelly, G. Lees, K. S. Gamaniel. Brain Research Bulletin, 78, 276 - 282 (2009).
6. H. J. Zhang, P. A. Tamez, Z. Aydogmus, G. T. Tan, Y. Salkawa, K. Hashimoto, M. Nakata, N. V. Hung, L. T. Xuan, N. M. Cuong, D. D. Soejarto, J. M. Pezzuto, H. H. Fong. Planta Medica, 68, 1088 - 1091 (2002).
7. Văn Ngọc Hương, Vũ Minh Trang. Tạp chí Hóa học, 44(3), 345 - 349 (2006).

8. H. W. Jung, H. Y. Son, C. V. Minh, Y. H. Kim, Y. K. Park. *Phytotherapy Research*, 22, 1064 - 1069 (2008).
9. J. Bhattacharyya, D. Stagg, N. V. Mody, D. H. Miles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(9), 1325 - 1326 (1978).
10. H. Li, C. Zhou, Y. Pan, X. Gao, X. Wu, H. Bai, L. Zhou, Z. Chen, S. Zhang, S. Shi, J. Luo, J. Xu, L. Chen, X. Zheng, Y. Zhao. *Planta Medica*, 71(12), 1128 - 1133 (2005).
11. M. Yoshikawa, H. Shimada, M. Saka, S. Yoshizumi, J. Yamahara, H. Matsuda. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(3), 464 - 469 (1997).
12. D. H. Xu, X. T. Mei, Y. Chen, Y. M. Li, J. Y. Lv, S. B. Xu. *World Journal of Gastroenterology*, 11(12), 1764 - 1768 (2005).
13. A. S. Awaad, N. H. Mohamed, D. J. Maitland, G. A. Soliman. *Records of Natural Products*, 2(3), 76 - 82 (2008).

Liên hệ: **Phan Văn Kiệm**

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.
Email: phankiem@vast.ac.vn