

CÁC HỢP CHẤT MEGASTIGMAN VÀ PHENYLPROPANOID PHÂN LẬP TỪ CÂY GỪA (*FICUS MICROCARPA*)

Nguyễn Xuân Cường¹, Phan Văn Kiệm¹, Châu Văn Minh¹, Trương Nam Hải², Nguyễn Xuân Nhiệm¹, Vũ Kim Thư¹, Hoàng Lê Tuấn Anh¹, Phạm Hải Yên¹, Nguyễn Phương Thảo¹, Nguyễn Hoài Nam¹, Ninh Khắc Bản¹

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

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 16-4-2011

Abstract

Three megastigmanes, bridelionoside B (**1**), (3S,5R,6R,7E,9S)-megastigmane-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**2**), and dihydroalangionoside A (**3**), and one phenylpropane glucoside, syringin (**4**) were isolated from the methanol extract of *Ficus microcarpa* leaves. Their structures were elucidated by spectroscopic methods including ESI-MS, 1D- and 2D-NMR in comparison with the literature values.

Keywords: *Ficus microcarpa*, Moraceae, megastigmane.

1. MỞ ĐẦU

Chi Đa - *Ficus* L., gồm có trên 800 loài và là một trong khoảng 40 chi của họ dâu tằm - Moraceae (Woodland, 1997). Loài có giá trị thương mại nhất là sung ngọt (*Ficus carica* L.) (common fig) bao gồm nhiều thứ với sự đa dạng di truyền lớn. Các loài quan trọng khác là: Đề (*Ficus religiosa* L.), đa búp đỏ (*Ficus elastica* Roxb. ex Hornem.), đa lá tròn (*Ficus benghalensis* L.) (banyan tree) và sung (*Ficus racemosa* L.) (tên đồng nghĩa *F. glomerata*). Rất nhiều loài *Ficus* có rễ phụ khí sinh có thể ăn vào đất xuất phát từ thân hoặc cành của chúng. Tất cả các loài trong chi Đa đều chứa nhựa mủ trong hệ thống mạch có tác dụng bảo vệ và tự chữa vết thương của các va chạm vật lý [1]. Nhựa mủ 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 dập, 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 tiểu đường trong y học dân tộc ở một số khu vực [2].

Trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cơ bản về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài *Ficus* của Việt Nam, bài báo này công bố kết quả phân lập và xác định cấu trúc của 3 hợp chất dạng khung megastigman bridelionoside B (**1**), (3S,5R,6R,7E,9S)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol

(**2**), và dihydroalangionoside A (**3**), một hợp chất phenylpropane glucosit, syringin (**4**) từ cặn chiết metanol của lá cây gừa (*Ficus microcarpa*). Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ khối lượng (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1D and 2D-NMR).

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp tách chiết

- Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP₁₈ F₂₅₄ (Merck-Đức). Các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu.

- Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ pha thường (Silica gel 240-430 mesh, Merck) hoặc pha đảo (ODS-60-14/63, Fujisilisa-Nhật Bản).

2.2. Các phương pháp phổ

- Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1200 LC-MSD Trap, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM600 và AM400 FT-NMR Spectrometer, Viện Nghiên cứu Khoa học cơ bản (KBSI), Hàn Quốc.

2.3. Mẫu thực vật

Mẫu cây gừa (*Ficus microcarpa* L.f., Moraceae) được thu hái vào tháng 11 năm 2009 tại Hà Nội. Tên khoa học được TS. Ninh Khắc Bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật giám định. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại phòng mẫu của Viện Hóa sinh Biển.

2.4. Phân lập các hợp chất

Lá gừa khô (3,0 kg) được chiết 3 lần bằng metanol (3 × 10 lít) thu được 280 g cặn chiết. Cặn chiết này được hòa tan vào 5 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với cloroform (3 × 5 lít) và etyl axetat (3 × 5 lít) thu được các cặn chiết tương ứng: cloroform (F1, 68 g), etyl axetat (F2, 90,5 g) và lớp nước (F3). Cặn chiết cloroform (F1) được tiến hành phân tách thô thành 4 phân đoạn, F1A-F1D bằng sắc ký cột silica gel pha thường rửa giải gradient *n*-hexan/axeton (100/1 - 1/1, v/v). Phân đoạn F1C tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải diclometan/metanol 15/1 thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu là FC1C1-FC1C3. Tinh chế phân đoạn FC1C3 bằng sắc ký cột silica gel pha đảo (YMC RP-18) rửa giải bằng metanol/nước (5/1, v/v) thu được hợp chất **2** (7,1 mg).

Phân đoạn F2 được tách thành 4 phân đoạn nhỏ hơn, F2A-F2D, bằng sắc ký cột silica gel pha thường, gradient dung môi rửa giải cloroform/metanol (50/1-1/1, v/v). Tiếp tục phân tách phân đoạn F2D bằng sắc ký cột silica gel pha

thường rửa giải bằng diclometan/metanol/nước (6/1/0,07, v/v/v) thu được hợp chất **4** (6,0 mg).

Lớp nước (F3) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký trao đổi ion Dianion HP-20 rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong nước (0, 25, 50, 70 và 100%) thu được 4 phân đoạn ký hiệu là F3A-F3D. Phân tách phân đoạn F3D bằng sắc ký cột silica gel pha thường rửa giải bằng cloroform/metanol/nước 6/1/0,05 thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu là F3D1-F3D4. Các hợp chất **1** (5,0 mg) và **3** (8,0 mg) được tinh chế từ phân đoạn F3D2 bằng sắc ký cột silica gel pha đảo (YMC RP-18) rửa giải bằng axeton/metanol/nước (1/1/2, v/v/v).

Bridelionoside B (1): Chất bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{25} + 30^\circ$ (*c*, 0,5 MeOH).

ESI-MS m/z 407 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{19}H_{34}O_9$ ($M = 406$).

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD), xem bảng 1.

(3S,5R,6R,7E,9S)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (2): Chất bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{25} - 15^\circ$ (*c*, 0,5 MeOH).

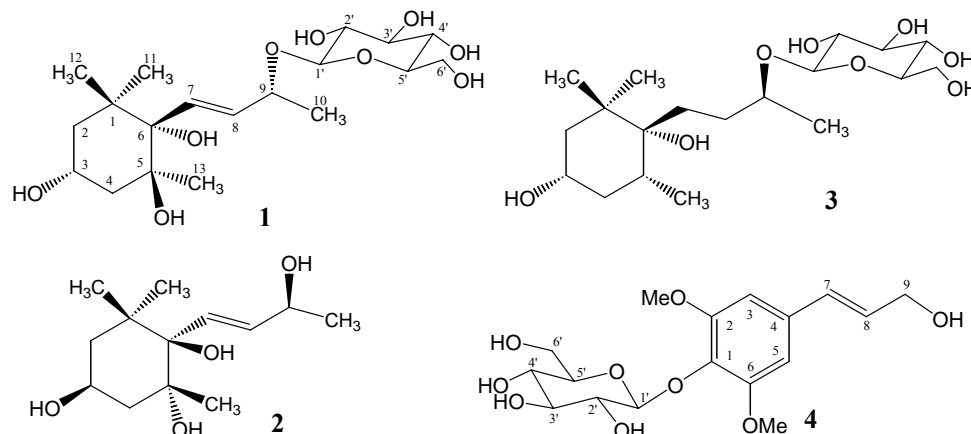
ESI-MS m/z 245 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{13}H_{24}O_4$ ($M = 244$).

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD), xem bảng 1.

Dihydroalangionoside A (3): Chất bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{25} - 25^\circ$ (*c*, 0,5 MeOH).

ESI-MS: m/z 393 $[M+Na]^+$, công thức phân tử $C_{19}H_{36}O_8$ ($M = 392$).

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD), xem bảng 1.



Hình 1: Cấu trúc hoá học của 1 - 4

Syringin (4): Chất bột màu trắng, $[\alpha]_D^{25} - 35^\circ$ (*c*, 0,5 MeOH).

ESI-MS m/z 373 $[M+H]^+$, công thức phân tử $C_{17}H_{24}O_9$ ($M = 372$).

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{ppm} 6,72 (2H, s, H-3 và H-5), 6,51 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-7), 6,30 (1H, dt, $J = 5,4, 15,6$ Hz, H-8), 4,20 (2H, dd, $J =$

1,5, 5,4 Hz, H-9), 4,84 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 3,45 (1H, dd, $J = 7,5, 9,0$ Hz, H-2'), 3,38 (1H, H-3'), 3,40 (1H, H-4'), 3,18 (1H, m, H-5'), 3,64 (1H, dd, $J = 5,4, 12,0$ Hz, H_a-6') và 3,75 (1H, dd, $J = 2,4, 12,0$ Hz, H_b-6').

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{ppm} 135,81 (C-1), 154,32 (C-2 và C-6), 105,39 (C-3 và C-5),

135,23 (C-4), 131,24 (C-7), 130,01 (C-8), 63,56 (C-9), 105,29 (C-1'), 75,69 (C-2'), 77,88 (C-3'), 71,29 (C-4'), 78,32 (C-5') và 62,52 (C-6').

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai proton olefin [δ_{H} 6,00 (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H-7) và 5,75 (1H, dd, $J = 7,5, 15,8$ Hz, H-8)], hai proton oximetin [δ_{H} 3,95 (1H, m, H-3) và 4,31 (1H, m, H-9)] và một proton anome [δ_{H} 4,25 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1')]. Giá trị hằng số tương tác lớn của proton anome cho phép dự đoán liên kết đường có cấu hình β . Ngoài ra sự xuất hiện của một nhóm methyl bậc hai dưới dạng doublet tại δ_{H} 1,23 (3H, d, $J = 6,2$ Hz, H-10) và ba nhóm methyl gắn với các nguyên tử cacbon không còn hydro tại δ_{H} 1,06 (6H, s, H-11 và H-12) và 0,75 (3H, s, H-13) dưới dạng các tín hiệu singlet cũng được xác định trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **1**. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện 19 tín hiệu cacbon, trong đó có 6 tín hiệu cacbon của một đơn vị đường glucose [δ_{C} 102,55 (CH, C-1'), 75,23 (CH, C-2'), 78,05 (CH, C-3'), 71,71 (CH, C-4'),

77,90 (CH, C-5'), 62,72 (CH₂, C-6')] cho phép dự đoán phần aglycon của **1** có cấu trúc khung megastigman với 13 nguyên tử cacbon. Các tín hiệu cacbon tại δ_{C} 132,87 (CH, C-7) và 134,65 (CH, C-8) xác định sự tồn tại của một liên kết đôi bị thế hai vị trí. Ngoài ra, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai nhóm oximetin [δ_{C} 65,23 (C-3) và 78,78 (C-9)], hai cacbon bậc bốn nối trực tiếp với nguyên tử oxi [δ_{C} 77,71 (C-5) và 78,86 (C-6)] và 4 nhóm methyl [δ_{C} 21,81 (C-10), 27,58 (C-11), 26,21 (C-12) và 27,47 (C-13)].

Như vậy, từ các dữ kiện phổ đã nêu có thể sơ bộ dự đoán hợp chất **1** là một megastigman glucosit có chứa 4 nhóm OH và một liên kết đôi bị thế hai vị trí và công thức phân tử là C₁₉H₃₄O₉. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 407 [M+H]⁺ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử nêu trên. So sánh số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **1** với các số liệu tương ứng đã được công bố của bridelionoside B [3] cho thấy sự phù hợp hoàn toàn ở tất cả các vị trí tương ứng (bảng 1). Để xác định chính xác cấu trúc hóa học của **1**, phổ HMBC đã được đo. Tương tác xa HMBC nhận được giữa các proton methyl H-11 và H-12 (δ_{C} 1,06) và các cacbon C-1 (δ_{C} 40,60)/C-2 (δ_{C}

Bảng 1: Dữ kiện phổ NMR của **1** - **3** và các chất tham khảo

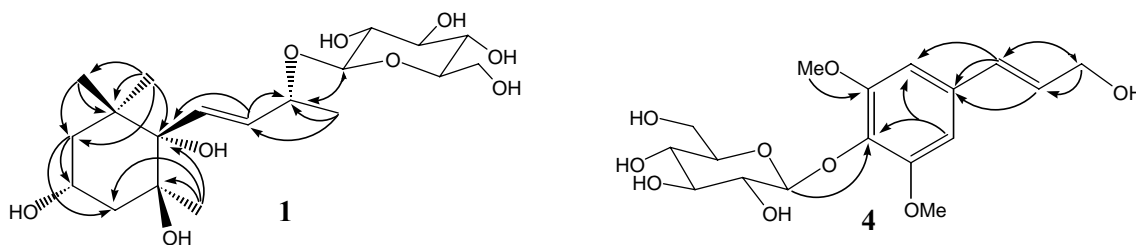
C	1			2			3		
	^a δ_{C}	δ_{C} ^{b,c}	δ_{H} ^{b,d} (J, Hz)	^e δ_{C}	δ_{C} ^{b,c}	δ_{H} ^{b,d} (J, Hz)	^f δ_{C}	δ_{C} ^{b,c}	δ_{H} ^{b,d} (J, Hz)
<i>Aglycon</i>									
1	40,8	40,60	-	40,6	40,61	-	41,5	41,46	-
2	46,4	46,29	1,34 m	46,3	46,32	1,35 m	47,6	47,54	1,27 m
			1,54 t (11,0)			1,55 t (12,0)			1,62 m
3	65,3	65,23	3,95 m	65,1	65,17	3,96 m	67,5	67,43	3,70 m
4	45,7	45,50	1,65 m	45,5	45,58	1,64 t (11,7)	40,9	40,78	1,37 m
			1,67 m			1,70 m			1,56 m
5	77,8	77,71	-	77,7	77,71	-	35,6	35,48	1,86 m
6	78,3	78,86	-	78,8	78,86	-	76,2	76,69	-
7	132,9	132,87	6,00 d (15,8)	130,9	131,08	5,96 d (15,9)	32,4	32,38	1,66 m
8	134,3	134,65	5,75 dd (7,5, 15,8)	135,9	136,02	5,69 dd (6,0, 15,9)	34,3	34,28	1,66 m
9	79,1	78,78	4,31 m	69,4	69,48	4,25 m	76,8	76,69	3,77 m
10	21,5	21,81	1,23 d (6,2)	24,0	24,23	1,17 d (6,0)	20,0	19,97	1,15 d (6,0)
11	27,9	27,58	1,06 s	27,5	27,50	0,74 s	25,3	25,31	0,96 s
12	26,3	26,21	1,06 s	26,1	26,22	1,10 s	26,5	26,42	0,96 s
13	27,1	27,47	0,75 s	27,1	27,08	1,04 s	16,7	16,70	0,92 d (6,0)
<i>Glucose</i>									
1'	102,6	102,55	4,25 d (7,5)				102,2	102,13	4,82 d (7,5)
2'	75,4	75,23	3,09 dd (7,5, 9,0)				75,2	75,13	3,11 dd (7,5, 9,0)
3'	77,9	78,05	3,21 t (9,0)				78,2	78,15	3,32 ^g
4'	71,5	71,71	3,13 ^g				71,9	71,76	3,32 ^g
5'	78,3	77,90	3,13 ^g				77,9	77,82	3,32 ^g
6'	62,6	62,72	3,50 dd (5,5, 12,0)				62,9	62,85	3,61 dd (5,5, 12,0)
			3,75 br d (12,0)						3,83 dd (2,5, 12,0)

^a δ_{C} của bridelionoside B [3], ^bđo trong CD₃OD, ^c150 MHz, ^d600 MHz, ^e δ_{C} của (3S,5R,6R,7E,9S)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol [4], ^f δ_{C} của dihydroalanganoside A [5], ^gtín hiệu bị chồng lấp.

46,29)/C-6 (δ_C 78,86), giữa H-13 (δ_H 0,75) và C-4 (δ_C 45,50)/C-5 (δ_C 77,71)/C-6 (δ_C 78,86) và giữa H-10 (δ_H 1,23) và C-8 (δ_C 134,65)/C-9 (δ_C 78,78), cho phép xác định vị trí của 3 nhóm OH tại C-5, C-6 và C-9. Nhóm OH còn lại được xác định nằm ở vị trí thông thường tại C-3 bằng tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 1,54) và C-3 (δ_C 65,23). Proton anome H-1' (δ_H 4,25) có tương tác HMBC với C-9 (δ_C 78,78) cho phép khẳng định vị trí liên kết của đơn vị đường tại C-9 (hình 2). Như vậy, hợp chất **1** được xác định là bridelionoside B.

Hợp chất **2** cũng được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ^1H và ^{13}C -NMR của nó tương tự như các phổ của **1** cho phép xác định đây cũng là một megastigman. Sự khác biệt dễ nhận thấy nhất trên phổ NMR của **2** so với **1** là sự mất đi các tín hiệu của đơn vị đường glucose. Trên phổ ^1H và

^{13}C -NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai nhóm oximetin [δ_C 65,17 (C-3)/ δ_H 3,96 (1H, m, H-3) và δ_C 69,48 (C-9)/ δ_H 4,25 (1H, m, H-9)], hai carbon bậc bốn nối trực tiếp với nguyên tử oxy [δ_C 77,71 (C-5) và 78,86 (C-6)], một liên kết đôi bị thế 2 vị trí [δ_C 131,08 (CH, C-7)/ δ_H 5,96 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-7) và δ_C 136,02 (CH, C-8)/ δ_H 5,69 (1H, dd, $J = 6,0, 15,9$ Hz, H-9)] và bốn nhóm methyl [δ_C 24,23 (C-10)/ δ_H 1,17 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-10), δ_C 27,50 (C-11)/ δ_H 0,74 (3H, s, H-11), δ_C 26,22 (C-12)/ δ_H 1,10 (3H, s, H-12) và δ_C 27,08 (C-13)/ δ_H 1,04 (3H, s, H-13)]. So sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của **2** với các số liệu đã được công bố (bảng 1) cùng với phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMQC, HMBC và kết quả phổ khối lượng cho phép xác định cấu trúc hóa học của hợp chất **2** là (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol [4].



Hình 2: Các tương tác HMBC (H → C) chính của **1** và **4**

Phổ ^1H và ^{13}C -NMR của **3** tương tự như các phổ tương ứng của **1** khẳng định sự tương đồng về cấu trúc hóa học giữa hai hợp chất. Sự thay đổi dễ nhận thấy là sự mất đi các tín hiệu của một carbon bậc bốn nối trực tiếp với nguyên tử ôxi và liên kết đôi trên các phổ của **3** so với các phổ tương ứng của **1**. Tương tác HMBC giữa các proton methyl H-11 và H-12 (δ_H 0,96) với C-6 (δ_C 76,69) cho phép khẳng định vị trí liên kết của một nhóm OH tại C-6. Ngoài ra, tín hiệu methyl bậc ba C-13 trong phân tử của **1** [δ_H 0,75 (3H, s, H-13)] đã được thay thế bằng tín hiệu methyl bậc hai [δ_H 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-13)] trong phân tử của **3** cũng cho phép xác định sự mất đi nhóm OH ở vị trí C-5 trong phân tử của hợp chất **3** so với hợp chất **1**. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC kết hợp với so sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của **3** với các số liệu đã được công bố trong tài liệu tham khảo và kết quả phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất **3** là dihydroalangionoside A [5].

Hợp chất **4** được xác định là syringin [6] bằng cách phân tích chi tiết các số liệu phổ 1D-NMR, 2D-NMR (hình 2), ESI-MS và so sánh các số liệu này với các giá trị tương ứng đã được công bố trong tài liệu tham khảo.

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.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản – NAFOSTED, mã số: 104.01.31.09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD, Newman RA. Journal of Ethnopharmacology, 119(2), 195 - 213 (2008).
- Lã Đình Mỗi, Trần Minh Hợi, 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).
- Etsuko S, Hui L, Katsuyoshi M, Hideaki O, Takakazu S, Mitsunori A, Yoshio T. Phytochemistry, 67(22), 2483 - 2493 (2006).
- Yoshio T, Yoshihiro O, Toshiya M, Eiji H, Takakazu S, Anki T, Qian Y, Hideaki O. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 48(5), 752-754 (2000).
- Otsuka H, Kamada K, Ogimi C, Hirata E, Takushi A, Takeda Y. Phytochemistry, 35(5), 1331 - 1334 (1994).
- Greca MD, Ferrara M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L. Phytochemistry, 49(5), 1299 - 1304 (1998).