

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC DẦU GAN CÁ NHÁM GÓC *SQUALUS JAPONICUS* ISHIKAWA

Chu Quang Truyền^{1*}, Cầm Thị Ính¹, Hoàng Thanh Hương¹, N. A. Latyshev², S. P. Kasijanov²,
Phạm Quốc Long¹

¹Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh vật biển A.V. Zhirmunsky, Phân viện Viễn Đông, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga

Đền Tòa soạn 10-01-2014

Abstract

A chemical investigation of the liver oil from the shark *Squalus japonicus* Ishikawa, collected in Quy Nhon bay led to the isolation of four compounds. Their structures were determined to be cholesterol (1), cholesteryl palmitate (2), palmitic acid (3) and 1-*O*-hexadecyl glycerol (4) by mean spectroscopic methods including ESI-MS, 1D- and 2D-NMR.

Keywords: *Squalus japonicus*, Shark liver oil, Alkyl glycerols, Sterols.

1. MỞ ĐẦU

Cá nhám góc *Squalus japonicus* Ishikawa có nguồn gốc từ Nhật Bản và phân bố ở vùng biển tây bắc Thái Bình Dương từ nam Nhật Bản, Triều Tiên, Trung Quốc đến Việt Nam. Vùng sinh sống chủ yếu là thềm lục địa, ven các đảo ở độ sâu 52-400 m, thường là 100-150 m [1]. Cho đến nay ngoài những thông tin về sinh học, hầu như chưa có nghiên cứu về hóa học của loài này được công bố. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về sàng lọc lipid sinh vật biển cho thấy dầu gan cá nhám góc *Squalus japonicus* Ishikawa sống ở vịnh Quy Nhơn – Bình Định có hàm lượng alkyl glycerol khá cao (~ 7,6 %). Đây là lớp chất có vai trò quan trọng trong nhiều quá trình của cơ thể sống với hai chức năng sinh học chính là tham gia cấu trúc màng tế bào và đảm nhận vai trò trung gian ở các đáp ứng tế bào [2]. Tác động sinh lý của các chất này rất đa dạng, rõ rệt nhất là để điều trị và phục hồi cho bệnh nhân ung thư, trị liệu sau xạ trị và xử lý trạng thái suy giảm miễn nhiễm. Khả năng nổi trội khác là dễ tạo nhũ tương dạng nano và dẫn thuốc đến nơi cần nhận [3]. Sự hiện diện của 1-*O*-octadecyl-3-*O*-hexadecanoyl glycerol cùng squalene từ phân đoạn lipid ít phân cực của dầu gan cá nhám góc đã được chúng tôi công bố trong một công trình gần đây [4]. Bài báo này tiếp tục mô tả việc phân lập và xác định cấu trúc 4 hợp chất mới tìm thấy là cholesterol (1), cholesteryl palmitat (2), axit palmitic (3) và 1-*O*-hexadecyl glycerol (4).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu

Cá nhám góc *Squalus japonicus* được đánh bắt vào tháng 02 năm 2011 tại vịnh Quy Nhơn, Bình Định. Tên khoa học được TS. Võ Văn Quang, Viện Hải Dương học-Nha Trang giám định. Bảo quản gan tươi ở nhiệt độ -20 °C.

2.2. Thiết bị phân tích

Điểm nóng chảy đo trên máy Mel. Temp. 3. 0 (Thermo scientific). Phổ NMR ghi trên máy Bruker AM 500 FT- NMR Spectrometric. Phổ ESI-MS ghi trên máy Xevo- TQMS, Waters- Mỹ. Sắc ký khí ghi trên máy Thermo Finnigan Italia S.p.A. TRACE GC Ultra series, đã cài đặt phần mềm nhận dạng axit béo chuyên dụng, cột Inowax (30m × 0,25 mm × 0,25 mm) nhiệt độ 210 °C, thời gian 60 phút, Spit flow 15 ml/phút.

2.3. Chiết tách dầu và phân lập các hợp chất

*Chiết suất dầu (lipid tổng) từ gan cá theo phương pháp Bligh & Dyer [5].

*Phân lập các hợp chất 1-4

Cho 5g dầu qua cột nhồi 100g SiO₂ và rửa giải lần lượt với *n*-hexan, clorofoc, clorofoc/etyl axetat 1/1 (v/v) và etyl axetat.

1000 mg cặn rửa với clorofoc (C1) được chạy sắc ký trên cột SiO₂ với hệ dung môi *n*-hexan/etyl

axetat 95/5 (v/v) cho 4 nhóm phân đoạn C1A-C1D. Từ C1C bằng sắc ký nhắc lại và sắc ký tinh chế trên cột nhỏ với hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat 85/15 (v/v) nhận được chất **1** (32 mg).

Phân đoạn C1B được rửa giải tiếp trên cột Al₂O₃ với *n*-hexan và clorofoc. Phân căn clorofoc (C2) được chạy sắc ký trên cột SiO₂ với hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat 95/5 (v/v) và tinh chế tiếp bằng kết tinh lại trong axeton nhận được chất **2** (11 mg).

1000 mg căn rửa giải bởi hỗn hợp clorofoc/etyl axetat (CE1) được chạy sắc ký trên cột SiO₂ với hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat 90/10 (v/v) cho 5 nhóm phân đoạn CE1A-CE1E. Phân tách tiếp CE1B trên bản mỏng điều chế SiO₂ với hệ dung môi *n*-hexan/ete etylic/axit axetic 60/40/1 (v/v/v) nhận được chất **3** (12 mg R_f 0,5). Phân tách tiếp CE1C bằng sắc ký trên cột silicagen và tinh chế tiếp bằng kết tinh lại trong axeton ở 0 °C nhận được chất **4** (27 mg).

*Số liệu phổ NMR

Hợp chất 1

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃).

δ (ppm) 5,35 (1H, brs, *J* = 5 Hz), 3,52 (1H, m), 2,20 (2H, m), 2,0 (2H, m), 1,0 (3H, s, CH₃), 0,91

(3H, d, *J* = 7 Hz, CH₃), 0,86 (6H, d, *J* = 7 Hz, 2x CH₃), 0,68 (3H, s, CH₃).

Hợp chất 2

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃).

δ (ppm) 5,34 (1H, m), 4,60 (1H, m), 2,33 (2H, m), 2,2-2,0 (4H, m), 1,60 (2H, m), 1,26 (24H, brs, 12 CH₂), 1,08 (3H, s, CH₃), 0,90 (3H, d, *J* = 7 Hz, CH₃), 0,87 (9H, m, 3CH₃), 0,67 (3H, m, 3CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), xem bảng 1.

Hợp chất 3

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃).

δ (ppm) 2,34 (2H, q, *J* = 7 Hz), 1,63 (1H, q, *J* = 7 Hz), 1,26 (24H, brs) và 0,87 (3H, t, *J* = 7 Hz, CH₃).

Hợp chất 4

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃).

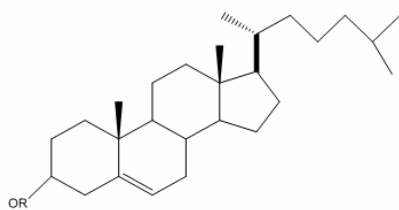
δ (ppm) 3,86 (1H, m), 3,72 và 3,62 (2H, dd, *J* = 5 & 11 Hz), 3,52 (2H, m), 3,45 (2H, m), 2,98 (1H, brs, OH), 2,64 (1H, brs, OH), 1,57 (2H, q, *J* = 7 Hz), 1,26 (24H, brs), và 0,88 (3H, t, *J* = 7 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃).

δ (ppm) 72,5, 71,87, 70,5, 64,22, 31,91, 29,7-29,3, 22,67 và 14,09.

Bảng 1: Số liệu phổ ¹³C-NMR của các hợp chất **1** và **2** (đo trong CDCl₃, 125 MHz)

Vị trí C	Hợp chất 1	Hợp chất 2	Vị trí C (tiếp)	Hợp chất 2	Nhánh 3- <i>O</i> -hexadecanoyl [6]
1	37,2	37,0	1'	173,4	173,9
2	31,6	31,7	2'	34,7	34,4
3	71,8	73,7	3'	25,0	25,0
4	42,2	42,3	4'-13'	29,1-29,7	29,1-29,7
5	140,7	139,8	14'	31,9	31,9
6	121,7	122,5	15'	22,7	22,7
7	31,8	31,9	16'	14,1	14,1
8	31,8	31,7			
9	50,1	50,1			
10	36,6	36,6			
11	21,1	21,1			
12	39,8	39,7			
13	42,3	42,3			
14	56,7	56,7			
15	24,3	24,3			
16	28,3	28,2			
17	56,1	56,1			
18	11,9	11,9			
19	19,3	19,3			
20	35,7	35,8			
21	18,7	18,7			
22	36,1	36,2			
23	23,8	23,8			
24	39,5	39,5			
25	28,0	28,0			
26	22,5	22,5			
27	22,8	22,7			

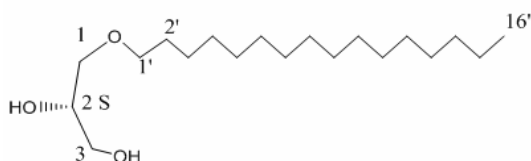


1

1. R = H 2. R = CH₃(CH₂)₁₄CO



3



4

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** có dạng tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c. 148 °C. Các pic giả phân tử ở m/z 387,3 $[M+H]^+$ và 385,2 $[M-H]^+$ trên phổ ESI cho biết khối lượng phân tử là 386. Phổ 1H -NMR có dạng đặc trưng của các hợp chất steroid với sự có mặt các singlet của hai nhóm methyl góc tại δ_H 1,00 và 0,68 ppm cùng các doublet của ba nhóm methyl tại δ_H 0,91 (3H, d, $J = 7$ Hz) và 0,86 ppm (6H, d, $J = 7$ Hz). Sự hiện diện các tín hiệu ở δ_H 5,35 (1H, brs, $J = 5$ Hz) và 3,52 ppm (1H, m) chứng tỏ có mặt một nối đôi bị thế 3 lần và một nhóm hydroxy. Kết luận tương tự cũng có được ở phổ ^{13}C -NMR và DEPT. Số liệu các phổ này cho biết phân tử có 27 nguyên tử cacbon, trong số đó có 5 cacbon methyl, một cacbon bậc 4 olefinic tại δ_C 140,7, một cacbon metin olefinic tại 122,7 và một cacbon oximetin tại 71,8 ppm. Tương tác H-C của proton metilen liền kề nối đôi (δ_H 2,2 ppm) với cacbon ở δ_C 140,7 và 71,8 ppm cùng tương tác của các proton methyl ở δ_H 1,00 (3H, s, H-19) với cacbon bậc 4 olefinic tại δ_C 140,7 ppm trên phổ HMBC đã khẳng định cấu trúc Δ^5 -3 β -hydroxy.

Hằng số vật lý, khối lượng phân tử và các số liệu phổ cho phép dự đoán hợp chất phân lập được là cholesterol. Cấu trúc này được khẳng định qua sự so sánh trực tiếp với chất chuẩn.

Hợp chất **2** kết tinh trong axeton cho tinh thể hình kim, đ.n.c. 73 °C. Phổ ESI có pic $[M+H]^+$ ở m/z 625,83 ứng với khối lượng phân tử là 624,8. Trên phổ 1H -NMR ngoài những tín hiệu tương tự như phổ của chất **1** còn có thêm những tín hiệu proton của

một nhóm α -metilen (gần kề cacbon cacbonyl) tại δ_H 2,33 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), một nhóm β -metilen tại δ_H 1,60 (2H, m), một nhóm methyl tại δ_H 0,88 (3H, t, $J = 7$ Hz) và một tín hiệu đơn rộng tại δ_H 1,26 ppm (24H, brs) ứng với sự hiện diện của một axit béo có mạch cacbon dài và không phân nhánh. Điều này cũng cho thấy rõ khi so sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của hai hợp chất **1** và **2** (xem bảng 1). Độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử cacbon từ C-1 đến C-27 đều trùng khớp, ngoại trừ C-3. Trên phổ của **2** còn xuất hiện các tín hiệu của cacbon cacbonyl tại δ_C 173,4, một cacbon methyl tại δ_C 14,1 và nhiều cacbon metilen trong vùng δ_C 22,7-34,7 ppm. Sự chuyển dịch về phía trường cao của cacbon cacbonyl cũng như sự chuyển dịch về phía trường thấp của C-3 tại δ_C 73,7 và H-3 tại δ_H 4,60 ppm là do có sự hình thành liên kết este. Số liệu phổ của nhánh acyl hoàn toàn trùng khớp với số liệu phổ của nhánh 3-*O*-hexadecanoyl ở các hợp chất 1-*O*-alkyl-3-*O*-hexadecanoyl trong tài liệu [6] (bảng 1). Kết hợp với số liệu phổ khối đã xác định được hợp chất **2** là 3-*O*-hexadecanoyl cholesterol (cholesteryl palmitat).

Hợp chất **3** được xác định là axit hexadecanoic (axit palmitic) qua các số liệu phổ 1H -NMR, phân tích sắc ký khí và so sánh trực tiếp với chất chuẩn.

Hợp chất **4** có dạng tinh thể hình khối, đ.n.c. 66°C. Phổ khối ESI-MS cho các pic giả phân tử ở m/z 339,21 $[M+Na]^+$ và 315,22 $[M-H]^+$ ứng với khối lượng phân tử là 316.

Kết hợp với các phổ NMR xác định được công thức phân tử là C₁₉H₄₀O₃. Trên các phổ 1H - và ^{13}C -NMR kết hợp DEPT có mặt các tín hiệu ứng với proton của các nhóm oximetin và oximetilen ở δ_H 3,86 (1H, m), 3,72 (1H, dd, $J = 5,0$ & 11,0 Hz, Ha), 3,62 (1H, dd, $J = 3,0$ & 11,0 Hz, Hb), 3,52 (2H, m) và 3,45 ppm (2H, m) cùng tín hiệu của các cacbon tương ứng tại δ_C 70,5, 64,22, 72,5 và 71,5 ppm. Kết hợp với sự hiện diện của 2 tín hiệu đơn rộng của proton trong các nhóm hydroxy tại δ_H 2,64 và 2,98 ppm có thể nhận ra **4** là một dẫn xuất thế một lần của glycerol. Sự có mặt một multiplet ở δ_H 3,86 ppm ứng với H-2 chứng tỏ vắng mặt nhóm thế ở C-2 [7]. Tương tác H-C trên HMBC của proton metilen tại δ_H 1,57 (2H, q, $J = 7$ Hz) với cacbon ở δ_C 71,8 cùng các tín hiệu trên phổ 1H -NMR tại δ_H 1,26 (26H, brs, 13CH₂) và 0,88 ppm (3H, t, $J = 7$ Hz, CH₃) xác nhận sự hiện diện một gốc rượu béo no mạch dài và không phân nhánh. Tương tác HMBC của proton oximetilen ở δ_H 3,45 (H-1') với cacbon oximetilen ở δ_C 72,5 ppm (C-1) xác nhận có liên kết ete giữa glycerol và rượu béo ở C-1. Các số liệu phổ khối và NMR cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **4** là 1-*O*-hexadecyl glycerol (chimyl alcohol) và được khẳng định khi so sánh trực tiếp với chimyl alcohol chuẩn. Cũng như các chimyl alcohol thiên nhiên

khác hợp chất 4 có cấu hình ở C-2 là S [2].

Chimyl ancol đã được phân lập từ một số loài sinh vật biển. Tác dụng ức chế di căn ung thư đã được nghiên cứu *in vivo* [8].

4. KẾT LUẬN

Từ dầu gan cá nhám góc *Squalus japonicus* Ishikawa đã phân lập và xác định được cấu trúc thêm 4 hợp chất là cholesterol (1), cholesteryl palmitat (2), axit palmitic (3) và 1-O-hexadecyl glycerol (4). Đây là công bố đầu tiên về sự hiện diện các chất này ở loài *Squalus japonicus*.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện dưới sự tài trợ của Đề tài: Nghiên cứu quy trình sản xuất thực phẩm chức năng giàu hoạt chất alkylglyxeryl ete từ nội tạng động vật thủy sản, Mã số: 629/HĐ-KHCN-CNSH, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. J. V. Compagno, M. Dando & S. Fowler. *Sharks of the World*, Field Guides, Princeton and Oxford.

Liên hệ: Chu Quang Truyền

Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên
Nhà 1H Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Email: quangtruyen69@gmail.com.

Princeton University Press (2005).

2. H. Taguchi, W. L. Armarego. *Glycerol ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism*, In © 1998. John Wiley & Sons, Inc. *Med. Res. Rev.*, **18(1)**, 43-89 (1998).

3. T. Iannitti, B. Palmieri. *An update on the therapeutic roll of alkylglycerols*, *Mar. Drugs*, **8**, 2267-2300 (2010).

4. Chu Quang Truyền, Cẩm Thị Ính, Hoàng Thanh Hương, N. A. Latyshev, S. P. Kasijanov, Phạm Quốc Long. *Phân lập, xác định squalene và acyl glycerol monoalkyl ete từ dầu gan cá nhám góc Squalus japonicus Ishikawa*, *Tạp chí Hóa học*, **51(6ABC)**, 122-125 (2013).

5. E. G. Bligh, W. J. Dyer. *A rapid method of total lipid extraction and purification-* *Canadian journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917 (1959).

6. P. Radhika, V. L. Rao, H. Laatsch. *Chemical constituents of marine soft coral of the genus Lobophytum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **52(11)**, 1345-1348 (2004).

7. *The Aldrich library of ¹³C-NMR and ¹H FT-NMR*, Ed. C. J. Pouchert, J. Behnke 1: 168 B, 283 C, 757 B, 949 C, 950 A, 950 C, 950 B (1993).

8. Deniau, A. L. et al. *Which alkyl glycerols from shark liver oil have antitumour activities?* *Biochimie* 2010. Doi:10.106/j biochi. 2009.12.010.