

PHÂN LẬP 3 HỢP CHẤT LIGNAN TỪ LÁ CÂY ĐÈ (*FICUS RELIGIOSA* L.)

Đến Tòa soạn 10-6-2009

HOÀNG THANH HƯƠNG¹, TRẦN HỒNG QUANG¹, CẨM THỊ ÍNH¹, CHÂU VĂN MINH¹,
PHAN VĂN KIÊM¹, JOELLE QUETIN-LECLERCQ², YVAN VANDER HEYDEN³

¹Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Universite Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Analytical chemistry, drug analysis and pharmacognosy unit, Avenue E. Mounier

³Vrije Universiteit Brussel-VUB, Department of Analytical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Laarbeeklaan

ABSTRACT

Phytochemical study on the leaves of *Ficus religiosa* led to the isolation of three lignans. Their chemical structures were determined to be (+)-pinoresinol (**1**), pinoresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**) and syringaresinol *O*- β -D-glucopyranoside (**3**) by means of spectroscopic studies including NMR and ESI mass spectra. The antioxidant activities of these compounds were screened using DPPH system. Among them, compounds **1** and **3** exhibited significant scavenging activities with EC_{50} values of 16.90 and 16.93 μ M, respectively.

I - MỞ ĐẦU

Cây đề (*Ficus religiosa* L., họ Moraceae) là một loài cây lâu năm có nguồn gốc từ Ấn Độ. Ở nước ta, cây được trồng ở các vùng đồng bằng và vùng núi [1]. Vỏ và lá cây được sử dụng trong dân gian ở Việt Nam để chữa trị các bệnh eczema, viêm dạ dày, lỵ và tiểu đường [1, 2]. Lá và quả của nó được sử dụng trong các bài thuốc dân gian ở Ấn Độ để chữa trị các bệnh về hô hấp và da liễu [3]. Dịch chiết metanol của lá *Ficus religiosa* thể hiện khả năng kháng viêm thông qua ức chế sản sinh NO và các cytokine tiền viêm, ức chế sự biểu hiện của mRNA và protein của enzym nitric oxide synthase và của các cytokine ở các đại thực bào khu trú ở não chuột [4].

Mới đây chúng tôi đã thông báo kết quả phân lập và xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*R*)-megastigman-7-en-

3,5,6,9-tetrol 9-*O*- β -D-glucopyranoside [5], (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*, 9*R*)-megastigman-7-en-3,5,6,9-tetrol 9-*O*- β -D-glucopyranoside và (3*S*,7*E*,9*R*)-3,9-dihydroxy-megastigman-5,7-dien từ lá cây *Ficus religiosa* L., [6]. Bài báo này mô tả kết quả phân lập, xác định cấu trúc hoá học của 3 hợp chất lignan và hoạt tính chống oxy hoá của chúng qua mô hình thu dọn gốc tự do DPPH.

II - THỰC NGHIỆM

1. Phương pháp nghiên cứu

Điểm chảy được đo trên máy Kofler micro-hotstage. Độ quay cực được đo trên máy Polatronic D Schimidt + Haench. Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS: Electron Spray Ionization-Mass Spectra) được đo trên máy AGILENT 1200 LC-MSD Trap. Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP₁₈ F_{254s} (Merck). Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ. Silica gel pha thường có cỡ hạt 240 - 430 mesh và Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30 - 50 μm, FujiSilisa Chemical Ltd.). Sắc ký trao đổi ion được thực hiện qua cột Dianion HP-20 (Merck).

2. Nguyên liệu

Lá cây *F. religiosa* được thu hái vào tháng 9 năm 2007 tại Tam Đảo, Vĩnh Phúc. Tên khoa học được TS Trần Huy Thái, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nguyên liệu lá tươi được xử lý diệt men và sấy khô ở nhiệt độ 60°C.

3. Chiết xuất và phân lập

Bột lá khô *F. religiosa* (2 kg) được chiết siêu âm với metanol trong 12 giờ, sau khi loại dung môi dưới áp suất giảm, tiến hành chiết pha lỏng-lỏng với 2 loại dung môi nước: chloroform (1:1). Phần dịch chloroform (FRC) được sắc ký trên cột silica gel pha thuận với hệ dung môi gradient n-Hexan:Aceton (90:10-0:100) thu được 3 phân đoạn FRC1, FRC2 và FRC3. Phân đoạn FRC3 được tinh chế trên cột silica gel pha thuận, rửa giải với hệ dung môi CHCl₃:Aceton (8:1) thu được hợp chất **1** (36 mg). Phần dịch nước (FRW) được rửa giải qua cột Dianion HP-20 với hệ dung môi gradient nước-metanol lần lượt là 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 và 0:100 thu được 3 phân đoạn FRW1, FRW2 và FRW3. Phân đoạn FRW1 được sắc ký trên cột silica gel pha thuận với hệ dung môi rửa giải là EtOAc:MeOH:H₂O (4:1:0.1) thu được hợp chất **2** (30 mg). Phân đoạn FRW3 được sắc ký trên cột silica gel pha đảo, rửa giải với hệ dung môi MeOH:H₂O (1:1) thu được hợp chất **3** (20 mg).

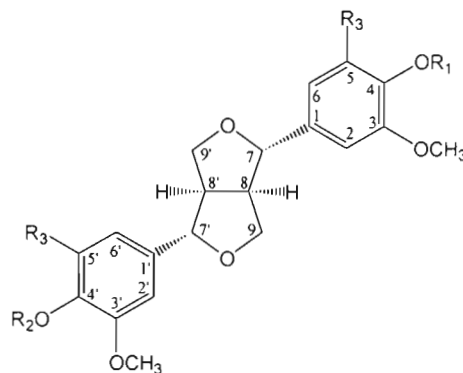
4. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ

Hợp chất 1: Dạng chất rắn màu trắng. Điểm chảy 122°C. [α]_D+51,0 (c=0,1, CHCl₃).

ESI-MS *m/z*: 341,0 [M-H₂O+H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6,89 (2H, d, *J* =

2,5 Hz, H-2, 2'), 6,88 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5, 5'), 6,82 (2H, dd, *J* = 2,0, 8,0 Hz, H-6, 6'), 4,73 (2H, d, *J* = 4,5 Hz, H-7, 7'), 4,24 (2H, m, H_a-9, 9'), 3,90 (6H, s, 2 x OCH₃), 3,88 (2H, m, H_b-9, 9'), 3,10 (2H, dd, *J*=4,5, 6,5 Hz, H-8, 8').

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): xem bảng 1.



	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	H	H
2	β -D-glucopyranose	β -D-glucopyranose	H
3	H	β -D-glucopyranose	OCH ₃

Hợp chất 2: Dạng chất rắn màu trắng. Điểm chảy 225°C. [α]_D-24,3 (c=0,1, MeOH).

ESI-MS *m/z*: 705,0 [M+Na]⁺ và 681,0 [M-H]⁻. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 7,17 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-5, 5'), 7,04 (2H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2, 2'), 6,92 (2H, dd, *J* = 2,0, 8,5 Hz, H-6, 6'), 4,77 (2H, d, *J* = 4,0 Hz, H-7, 7'), 4,26 (1H, dd, *J* = 6,5, 9,0 Hz, H_a-9, 9'), 3,90 (2H, H_b-9, 9'), 3,88 (6H, s, 2 x OCH₃), 3,12 (2H, m, H-8, 8').

4,90 (d, *J* = 7,5 Hz, glc, H-1, 1'), 3,87 (glc, H_a-6, 6'), 3,69 (glc, H_b-6, 6').

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm): xem bảng 1.

Hợp chất 3: Dạng chất rắn màu trắng. Điểm chảy 175°C. [α]_D-20,8 (c = 0,7, MeOH).

ESI-MS *m/z*: 602,9 [M+Na]⁺ và 579,0 [M-H]⁻. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 6,73 (2H, s, H-2', 6'), 6,67 (2H, s, H-2, 6), 4,77 (1H,

d, $J = 4,5$ Hz, H-7), 4,73 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-7'), 4,30 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H₃-9), 3,93 (1H, dd, $J = 3,0, 9,0$ Hz, H_b-9), 3,87 (6H, s, 2 x OCH₃), 3,85 (6H, s, 2 x OCH₃), 3,80 (1H, dd, $J = 2,5, 12,0$ Hz, H₃-9') 3,69 (1H, dd, $J = 5,0, 12,0$ Hz, H_b-9') 3,14 (2H, m, H-8, 8'), 4,88 (d, $J = 7,5$ Hz, glc. H-1), 3,80 (dd, $J = 2,5, 12,0$ Hz, glc. H-6_a), 3,69 (dd, $J = 5,0, 12,0$ Hz, glc. H-6_b), 3,50 (m, glc. H-2), 3,44 (m, glc. H-3), 3,42 (m, glc. H-4), 3,22 (m, glc. H-5).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm): xem bảng 1.

5. Hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH

Phương pháp đánh giá khả năng thu dọn gốc tự do DPPH được thực hiện theo phương pháp của Aquino và cộng sự [7]. DPPH là các gốc tự do bền hấp thụ ở bước sóng 515 nm, nồng độ hấp thụ của chúng giảm dần khi tác dụng với chất có hoạt tính chống oxy hoá. Độ hấp thụ của DPPH ở các lô thí nghiệm được đo trên máy Uvikon 933 spectrophotometer tại bước sóng 515 nm. Sử dụng α -tocopherol là lô đối chứng dương. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Công thức tính nồng độ phần trăm DPPH còn lại sau khi phản ứng

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}_{20\text{min}}] / [\text{DPPH}_0] \times 100$$

% DPPH_{REM}: Nồng độ phần trăm DPPH còn lại sau phản ứng

DPPH_{20min}: Nồng độ DPPH trong dung dịch sau 20 phút phản ứng

DPPH₀: Nồng độ DPPH trong dung dịch đối chứng

Phương pháp thống kê được thực hiện trên phần mềm GraphPad Prism 4.0. Kết quả được mô tả bởi giá trị EC₅₀ (μ M). Sai số giữa các thí nghiệm được biểu thị bằng giá trị \pm SEM. $P < 0,05$ biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa so với lô đối chứng.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** được phân lập từ phân đoạn FRC3 có điểm chảy 122°C và $[\alpha]_D +51,0$ (c=0,1, CHCl₃). Tín hiệu m/z 341,0 [M-H₂O + H]⁺ trên phổ ESI-MS chứng tỏ khối lượng phân tử là 358.

Kết hợp với các dữ liệu phổ NMR có thể dự đoán hợp chất phân lập được có công thức phân tử C₂₀H₂₂O₃. Trên phổ ¹H-NMR ngoài các tín hiệu ứng với 2 nhóm metoxy tại δ_H 3,90 (6H, s)/ δ_C 55,94 ppm xuất hiện các tín hiệu của vòng thơm có hệ tương tác ABX tại δ_H 6,89 (2H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,82 (2H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz) và 6,88 ppm (2H, d, $J = 8,0$ Hz). Các tín hiệu cacbon mang oxy tại δ_C 146,72 (C-3, 3') và 145,24 ppm (C-4, 4'), cacbon metin aromatic tại δ_C 108,64 (C-2, 2'), 114,29 (C-5, 5') và 118,94 ppm (C-6, 6') cùng với cacbon bậc bốn tại δ_C 132,90 ppm (C-1, 1') trên phổ ¹³C-NMR cũng xác nhận sự có mặt 2 vòng thơm thế 3 lần. Các tín hiệu của cacbon aliphatic của 2 nhóm oxy metylen tại δ_C 71,65 (C-9, 9'), 2 nhóm oxy metin tại δ_C 85,86 (C-7, 7') và 2 nhóm metin tại δ_C 54,14 ppm (C-8, 8') chứng tỏ có mặt vòng 3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane [8].

Các phân tích trên cho thấy hợp chất phân lập được có dạng khung lignan đối xứng hoàn toàn và được dự đoán là pinoresinol. Sự phù hợp hoàn toàn về các hằng số vật lý và dữ liệu phổ với tài liệu tham khảo [9] (bảng 1) đã xác định chất phân lập được là (+) pinoresinol (**1**). Các tương tác trên phổ HMBC đã khẳng định cấu trúc này.

Hợp chất **2** được phân lập từ phân đoạn FRW 1. Phổ khối lượng có mặt các tín hiệu m/z 705,0 [M+Na]⁺ và 681,0 [M-H]⁻ ứng với khối lượng phân tử là 682. Kết hợp với dữ liệu phổ NMR có thể suy ra công thức phân tử là C₃₂H₄₂O₁₆. Các số liệu phổ NMR của hợp chất **2** nhìn chung khá đồng nhất với hợp chất **1** (bảng 1). Sự khác biệt ở đây là trên phổ NMR của hợp chất **2** xuất hiện thêm các tín hiệu của 2 đường monosacarit pyranose. Ngoài tín hiệu anome của các đường tại δ_H 4,90 2H, d, $J=7,5$ Hz/ δ_C 102,87 ppm, còn có các tín hiệu ứng với cacbon của 2 nhóm oxy metylen tại δ_H 3,87, 3,69 (m)/ δ_C 62,51 ppm và các nhóm oxy metin tại δ_C 74,90, 78,19, 71,34 và 77,84 ppm. Những điều này xác nhận sự có mặt của 2 nhánh đường β -D-glucopyranosyl tương tác giữa proton anome tại δ_H 4,90 ppm với tín hiệu cộng hưởng của cacbon ở 147,51 ppm trên phổ HMBC đã xác nhận các mạch đường được gắn kết với phần aglycon tại

Bảng 1: Phổ ^{13}C -NMR của các hợp chất

Cacbon	1 ^{#a}	1 ^a	2 ^b	3 ^b
1	132,9	132,90	137,74	139,54
2	108,7	108,64	111,68	104,86
3	146,7	146,72	151,00	154,40
4	145,3	145,24	147,51	135,61
5	114,3	114,29	118,09	154,40
6	118,9	118,94	119,79	104,86
7	85,9	85,86	87,06	87,16
8	54,2	54,14	55,51	55,70
9	71,7	71,65	72,78	72,84
1'	132,9	132,90	137,74	133,08
2'	108,7	108,64	111,68	104,55
3'	146,7	146,72	151,00	149,35
4'	145,3	145,24	147,51	136,24
5'	116,3	114,29	118,09	149,35
6'	118,9	118,94	119,79	104,55
7'	85,9	85,86	87,06	87,56
8'	54,2	54,14	55,51	55,48
9'	71,7	71,65	72,78	72,91
3, 3'-OCH ₃	55,94	56,00 x 2	56,79 x 2	-
3,5-OCH ₃			-	57,09 x 2
3', 5'-OCH ₃			-	56,83 x 2
glc. 1			102,87	105,35
2			74,90	75,70
3			77,84	77,81
4			71,34	71,33
5			78,19	78,32
6			62,51	62,59
1'			102,87	
2'			74,90	
3'			77,84	
4'			71,34	
5'			78,19	
6'			62,51	

^aĐo trong CDCl₃, ^bĐo trong CD₃OD, #Số liệu phổ từ tài liệu tham khảo [9]

C-4 và C-4'. Kết hợp với các số liệu trên phổ khối lượng, cùng với sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh các dữ kiện phổ NMR với tài liệu tham khảo [10], hợp chất này được xác định là pinoresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside (2).

Hợp chất 3 được phân lập từ phân đoạn FRW3 công thức phân tử được xác định là C₂₈H₃₆O₁₃ nhờ dữ liệu phổ NMR và sự xuất hiện của các tín hiệu *m/z* 602,9 [M+Na]⁺ và 579,0 [M-H]⁻ trên phổ khối lượng phun mù điện tử.

Các số liệu phổ NMR của hợp chất 3 nhìn chung cũng khá tương đồng với hợp chất 1 (bảng 1). Sự khác biệt ở đây là hợp chất 3 có thêm 2 nhóm metoxy và một nhánh đường monosacarit pyranose. Sự có mặt của một nhánh đường β -D-glucopyranosyl được xác định bởi tín hiệu anome tại δ_{H} 4,88 (1H, d, *J*=7,5 Hz)/ δ_{C} 105,35 ppm, tín hiệu ứng với cacbon của 4 nhóm oxy metin δ_{C} 75,70; 77,81; 71,33 và 78,32 ppm cùng một nhóm oxy metylen tại δ_{C} 62,59

ppm. Ngoài ra trên phổ cũng quan sát thấy sự có mặt của 4 nhóm metoxy tại δ_H 3,85/ δ_C 56,83 và δ_H 3,87/ δ_C 57,09 ppm. Từ các phân tích trên kết hợp với sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh số liệu phổ NMR với tài liệu tham khảo [11] đã xác định hợp chất phân lập được là syringaresinol

O- β -D-glucopyranoside (**3**). Cấu trúc này cũng được khẳng định bằng phổ HMBC.

Kết quả thử hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH của các hợp chất (bảng 2) cho thấy hợp chất **1** và **3** thể hiện hoạt tính tốt. Hợp chất **2** không có hoạt tính ở nồng độ thí nghiệm.

Bảng 2: Hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH

Hợp chất	EC ₅₀ (μ M)
(+)-Pinoresinol (1)	16,90 \pm 0,1*
Pinoresinol di- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (2)	> 58,65
Syringaresinol <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (3)	16,93 \pm 0,84*
α -Tocopherol	11,25 \pm 0,54*

*Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng: p < 0,05

IV - KẾT LUẬN

Từ lá cây đề *Ficus religiosa* L. đã phân lập và nhận dạng được 3 hợp chất lignan (+)-pinoresinol (**1**), pinoresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**) và syringaresinol *O*- β -D-glucopyranoside (**3**). Các hợp chất (**1**) và (**3**) có hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH tốt với giá trị EC₅₀ tương ứng là 16,9 và 16,93 μ M. Đây là công bố đầu tiên về sự có mặt của các hợp chất này trong cây *F. religiosa* L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, Hà Nội, 471 (1999).
- Ji-Xian Guo et al. International Collation of Traditional and Folk Medicine. World Scientific Publishing Co., Pte., Ltd., Vol. 4, 5 -6 (1997).
- O. Mousa, P. Vuorela, J. Kiviranta, S. A. Wahab, R. Hiltunen, H. Vuorela. J. Ethnopharmacol., 41, 71 - 76 (1994).
- Hyo Won Jung, Hye Young Son, Chau Van Minh, Young Ho Kim and Yong-Ki Park. Phytother. Res., 22, 1064 - 1069 (2008).
- Cầm Thị Ính, Trần Hồng Quang, Hoàng Thanh Hương, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiệm. Tạp chí Hoá học, T.47 (1), 81 - 81 (2009).
- Cầm Thị Ính, Trần Hồng Quang, Châu Văn Minh, Hoàng Thanh Hương, Phan Văn Kiệm. Tạp chí Dược học, 395, tr. 40-43 (2009).
- Aquino R, Morelli S, Rosaria Lauro M, Abdo S, Saija A, Tomaino A. Nat. Prod., 64(8), 1019 - 1023 (2001).
- Akihiro Hosokawa, Megumi Sumino, Tomonori Nakamura, Shingo Yano, Toshikazu Sekine, Nijsiri Ruangrunsi, Kazuko Watanabe, and Fumio Ikegami. Chem. Pharm. Bull., 52(10) 1265 - 1267 (2004).
- Barbara Vermes, Otto Seligmann and Hildebert Wagner. Phytochemistry, 30 (9), 3087 - 3089 (1991).
- Takeshi Deyama. Chem. Pharm. Bull., 31(9), 2993 - 2997 (1983).
- Hiromi Kobayashi, Hiroko Karasawa, Toshio Miyase, and Seigo Fukushima. Chem. Pharm. Bull., 33(4), 1452 - 1457 (1985).

Tác giả liên hệ: **Cầm Thị Ính**

Viện Hóa học các hợp chất tự nhiên
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.