

CÁC HỢP CHẤT ASTEROSAPONIN PHÂN LẬP TỪ LOÀI SAO BIỂN *ACANTHASTER PLANCI*

Lê Thị Viên¹, Trần Thị Hồng Hạnh¹, Lê Bá Vinh¹, Phan Thị Thanh Hương¹,
Nguyễn Văn Thanh¹, Nguyễn Xuân Cường^{1*}, Nguyễn Hoài Nam¹,
Đỗ Công Thung², Châu Văn Minh¹

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

²Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Abstract

Using various chromatographic methods, two asterosaponins namely thornasteroside A (1) and sodium 6 α -[(*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(β -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2))-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-*O*- β -quinovopyranosyl)oxy]-5 α -pregn-9(11)-ene-20-one-3 β -yl-sulfate (2), were isolated from the methanol extract of starfish *Acanthaster planci*. Their structures were elucidated by 1D and 2D-NMR experiments and comparison of their NMR data with reported values.

Keywords. *Acanthaster planci*, Acanthasteridae, starfish, saponin, asterosaponin.

MỞ ĐẦU

Một nhóm các hợp chất chính từ các sinh vật biển ngành Da gai đó là các saponin. Các saponin ở biển là các triterpen glycosit, hầu hết thuộc loại holostane, (20S)-20-hydroxy-5 α -lanostane-carboxylic acid (18-20) lactone, còn các saponin sao biển lại là các asterosaponin, các steroid có nhóm chức sulphat. Tuy nhiên, khác với các hợp chất từ hải sản (các nhóm sulphat được gắn với các carbon đường) thì nhóm sulphat của các asterosaponin sao biển lại gắn vào phần khung cấu trúc [1].

Trong khuôn khổ các nghiên cứu của nhóm tác giả về các loài sao biển ở Việt Nam, chúng tôi công bố trong công trình này chi tiết quá trình phân lập và xác định cấu trúc của hai hợp chất asterosaponin từ loài sao biển *Acanthaster planci*.

THỰC NGHIỆM

1. Thiết bị và hóa chất

Phổ ¹H NMR (500 MHz) và ¹³C NMR (125 Hz) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR với TMS được sử dụng làm chất chuẩn nội. Phổ khối ion dương áp suất thấp (ESI-MS) được đo trên máy Agilent 1260 series single quadrupole LC/MS. Sắc lỏng tương áp (MPLC) được tiến hành trên máy Stage - Isolera One system (SE-751 03 Uppsala, Thụy Điển). Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel

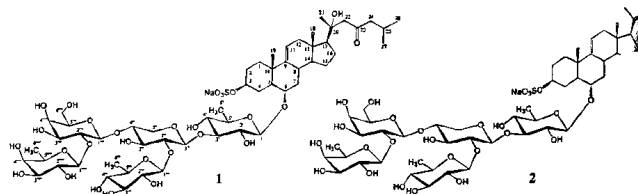
(Kieselgel 60, 70-230 mesh and 230-400 mesh, Merck) và YMC RP-18 (30-50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.). Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản trắng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001, Merck) và RP-18 F_{254s} plates (1.15685.0001, Merck). Vết chất được phát hiện bằng cách phun đều thuốc thử axit H₂SO₄ 10% và hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

2.2. Mẫu sao biển

Mẫu loài sao biển *A. planci* Linnaeus được thu tại khu vực Bãi Từ Long, Quảng Ninh, vào tháng 04 năm 2015 và được PGS. TS. Đỗ Công Thung giám định. Mẫu tiêu bản được lưu tại Viện Hóa sinh biển và Viện Tài nguyên và Môi trường biển.

2.3. Phân lập các hợp chất

Mẫu sao biển *A. planci* sau khi thu về được loại bỏ nội tạng rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ dưới 50°C sau đó xay nhỏ thu được 3,5 kg bột khô. Bột khô sao biển được chiết 3 lần với metanol trên thiết bị chiết siêu âm, dịch chiết sau đó được cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn chiết MeOH (210 g). Cặn chiết metanol được hòa vào nước, sau đó chiết phân lớp với dung môi diclometan thu được cặn chiết diclometan (68 g) và dịch nước. Lớp nước được đưa lên cột Diaion HP-20 rửa giải gradient với hệ dung môi lần lượt là nước, metanol:nước 25/75, metanol:nước 75/25 và metanol thu được 4 phân



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1 và 2

Bảng 1: Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ phần aglycon của 1, 2 và các chất tham khảo

C	$^{\circ}\delta_{\text{C}}$	1		$^{\circ}\delta_{\text{C}}$	2	
		$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}} (J = \text{Hz})$		$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}} (J = \text{Hz})$
1	36,2	35,96	1,37 m/1,60 m	35,9	35,99	1,35 m/1,61 m
2	29,7	29,30	1,88 m/2,75 m	29,4	29,45	1,86 m/2,76 m
3	78,0	77,86	4,89 m	77,6	77,65	4,85 m
4	31,0	30,63	1,75 m/3,35 m	30,7	30,75	1,67 m/3,44 m
5	49,5	49,15	1,49 m	49,2	49,29	1,45 m
6	80,5	79,89	3,82 m	80,2	80,25	3,76 m
7	41,8	41,20	1,25 m/2,65 m	41,6	41,57	1,26 m/2,66 m
8	35,6	35,31	2,08 m	35,5	35,58	2,05 m
9	145,4	145,48		146,0	146,14	
10	38,5	38,30	-	38,3	38,41	-
11	116,7	116,66	5,20 d (5,5)	116,0	116,06	5,21 br s
12	42,6	42,40	2,09 m/2,28 m	40,6	40,59	2,13 br s
13	41,8	41,58	-	42,5	42,56	-
14	54,1	53,98	1,37 m	53,7	53,72	1,32 m
15	23,6	25,11	1,27 m/1,80 m	23,1	25,57	1,20 m/1,75 m
16	25,6	23,20	1,80 m/2,25 m	25,6	23,17	1,61 m/2,35 m
17	59,7	59,37	1,78 m	63,3	63,43	2,51 dd (9,0, 9,5)
18	13,8	13,60	1,01 s	13,1	13,18	0,56 s
19	19,5	19,29	0,93 s	19,2	19,25	0,91 s
20	73,9	73,87	-	208,3	208,42	-
21	27,2	26,92	1,65 s	31,0	31,07	2,08 s
22	55,2	55,10	2,76 d (15,0)/2,90 d (15,0)			
23	211,5	212,41	-			
24	54,1	53,98	2,46 dd (7,0, 16,5) 2,52 dd (6,5, 16,5)			
25	24,6	24,44	2,20 m			
26	22,9	22,67	0,91 d (6,5)			
27	22,7	22,53	0,91 d (6,5)			

$^{\circ}\delta_{\text{C}}$ phần aglycon của thornasteroside A [2], $^{\circ}\delta_{\text{O}}$ trong pyridine- d_5 , $^{\circ}\delta_{\text{C}}$ 125 MHz, $^{\circ}\delta_{\text{H}}$ 500 MHz, $^{\circ}\delta_{\text{C}}$ phần aglycon của natri 6 α -[(O - β -D-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- O - β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- O -[β -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- O - β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- O - β -D-quinovopyranosyl)oxy]-5 α -pregn-9(11)-ene-20-one-3 β -yl-sulfat đo trong pyridine- d_5 [3].

đoạn ký hiệu từ W₁ đến W₄: Phân đoạn W₃ (7,5 g) được phân tách sơ bộ trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp (MPLC), sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo RP-

18 với hệ dung môi metanol:nước (1/1) thu được phân đoạn ký hiệu W_{3A}→W_{3G}. Tiếp tục tinh chế phân đoạn W_{3B} (550 mg) bằng sắc ký cột silica gel

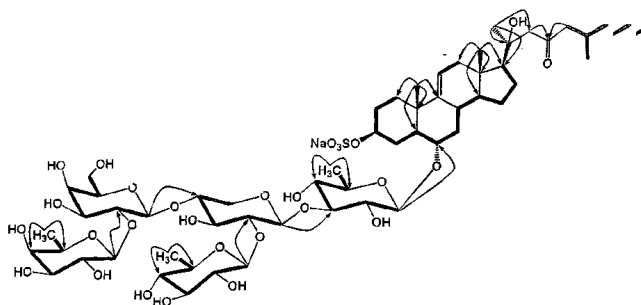
pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải CH_2Cl_2 :metanol:nước (2/1/0,2), sau đó tinh chế tiếp bằng sắc ký cột nhồi Shephadex LH-20 với pha động là metanol:nước (1:1) thu được hợp chất 2 (11 mg). Phân đoạn W_4 (3,6 g) được phân tách sơ bộ trên MPLC, sử dụng cột nhồi silica gel với hệ dung môi CH_2Cl_2 :metanol:nước (6/1/0,1) thu được 4 phân đoạn $W_A \rightarrow W_D$. Phân đoạn W_D (100 mg) được

đưa lên cột sephadex LH-20 sử dụng pha động metanol:nước (2/1) thu được hai phân đoạn W_{D1} (40mg) và W_{D2} (30 mg). Phân đoạn W_{D1} (40mg) được tiếp tục phân tách trên sắc ký cột pha thường hệ dung môi CH_2Cl_2 :metanol:nước (3/1/0,1) và tinh chế tiếp bằng sắc ký cột silica gel pha đảo YMC sử dụng hệ dung môi metanol:nước (1,5/1) thu được hợp chất 1 (8,5 mg).

Bảng 2: Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ phân chuỗi đường của 1, 2 và các chất tham khảo

C	$^{\circ}\text{C}$	1		$^{\circ}\text{C}$	2	
		$\delta_{\text{C}}^{\text{h}, \text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{h}, \text{d}} (J = \text{Hz})$		$\delta_{\text{C}}^{\text{h}, \text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{h}, \text{d}} (J = \text{Hz})$
<i>Qui I</i>						
1'	104,4	104,40	4,85 d (7,5)	105,1	105,12	4,79 d (8,0)
2'	74,2	74,16	3,99 ^f	74,1	74,16	3,97 dd (8,0, 9,0)
3'	90,2	89,34	3,93 ^f	90,2	90,23	3,81 t (9,0)
4'	74,6	74,33	3,57 ^f	74,5	74,54	3,55 t (9,0)
5'	72,0	71,99	3,75 ^f	71,9	72,08	3,67 m
6'	18,2	18,54	1,61 d (6,0)	17,9	18,54	1,58 d (6,0)
<i>Xyl</i>						
1''	105,1	104,40	5,12 d (7,5)	104,4	104,49	5,01 d (7,5)
2''	82,6	83,16	3,99 ^f	82,2	82,19	4,06 ^f
3''	75,7	75,24	4,26 ^f	75,5	75,81	4,07 ^f
4''	79,2	78,30	4,24 ^f	79,2	79,25	4,20 ^f
5''	64,7	64,21	3,46/3,84 ^f	64,5	64,60	3,47/3,79 ^f
<i>Qui II</i>						
1'''	105,1	105,63	5,13 d (7,5)	105,1	105,12	5,25 d (7,0)
2'''	75,7	76,05	4,02 ^f	75,4	76,31	4,07 ^f
3'''	76,9	76,81	4,12 ^f	76,9	76,98	4,07 ^f
4'''	76,3	75,57	3,90 ^f	76,2	75,58	4,03 ^f
5'''	73,8	73,87	3,70 ^f	73,9	73,93	3,67 ^f
6'''	18,7	18,16	1,83 d (6,0)	18,5	17,98	1,77 d (6,0)
<i>Gal</i>						
1''''	102,5	102,03	4,95 d (7,5)	102,4	102,48	4,98 d (7,5)
2''''	83,5	82,65	4,43 ^f	83,4	83,49	4,43 ^f
3''''	75,1	74,65	4,18 dd (3,0, 9,0)	75,0	75,00	4,18 ^f
4''''	69,5	69,25	4,44 ^f	69,0	69,39	4,47 ^f
5''''	76,9	76,81	4,06 ^f	76,8	76,82	4,05 ^f
6''''	62,2	61,91	4,25/4,40 ^f	62,0	62,05	4,32/4,40 ^f
<i>Fuc</i>						
1'''''	107,2	106,66	4,87 d (7,5)	107,2	107,27	4,84 d (7,5)
2'''''	72,0	73,47	4,38 ^f	71,9	73,67	4,41 ^f
3'''''	75,1	74,65	4,02 ^f	75,0	75,07	4,00 ^f
4'''''	72,7	72,32	3,96 ^f	72,6	72,61	3,95 ^f
5'''''	72,0	71,85	3,60 ^f	71,9	71,95	3,62 ^f
6'''''	17,5	17,12	1,49 d (6,0)	17,2	17,24	1,45 d (6,0)

^aC phân chuỗi đường của thornasteroside A đo trong pyridine-*d*₅ [2], ^bđo trong pyridine-*d*₅, ^c125 MHz, ^d500 MHz, ^eC phân chuỗi đường của natri 6α-[(*O*-β-D-fucopyranosyl-(1→2)-*O*-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-quinovopyranosyl-(1→2))-*O*-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-*O*-β-D-quinovopyranosyl)oxy]-5α-pregn-9(11)-ene-20-one-3β-yl-sulfate đo trong pyridine-*d*₅ [3], ^ftín hiệu bị chồng lấp.



Hình 2: Các tương tác COSY (→) và HMBC (→) chính của 1

Thornasteroside A (1): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$ -5 (c 0,1, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_5) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_5), xem bảng 1 và 2; ESI-MS: m/z 1289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{56}\text{H}_{91}\text{NaO}_{28}$, $\text{M} = 1266$).

Natri 6a-[($\text{O}-\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-O}-\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-O}-\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-O}-\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-O}-\beta\text{-D-quinovopyranosyl}]\text{oxy]-5}\alpha\text{-pregn-9(11)-ene-20-one-3}\beta\text{-yl-sulfate}$ (2): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25} +10$ (c 0,1, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_5) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Pyridine- d_5), xem bảng 1; ESI-MS: m/z 1143 $[\text{M}-\text{Na}]^-$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{79}\text{NaO}_{27}\text{S}$, $\text{M} = 1166$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 được phân lập dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Các phổ NMR của 1 đặc trưng cho một hợp chất asterosaponin, một lớp chất điển hình của các loài sao biển [2]. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của 1 xuất hiện 56 tín hiệu cacbon, trong đó có 27 tín hiệu của phần khung aglycon 29 tín hiệu của một chuỗi năm đơn vị đường. Sự có mặt của năm gốc đường được xác định với sự xuất hiện các tín hiệu của năm cacbon anome tại δ_c 104,40 (C-1' và C-1''), 105,63 (C-1'''), 102,03 (C-1''') và 106,66 (C-1''') có tương tác với các tín hiệu proton anome (mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 7,5$ Hz) tương ứng tại δ_H 4,85 (H-1'), 5,12 (H-1''), 5,13 (H-1''') và 4,95 (H-1''') và 4,87 (H-1''') trên phổ HSQC. Sự xuất hiện của ba tín hiệu methyl tại δ_c 18,54 (C-6'), 18,16 (C-6'') và 17,12 (C-1''')/ δ_H 1,61 (H-6'), 1,83 (H-6'') và 1,49 (H-6''') mỗi tín hiệu 3H, d, $J = 6,0$ Hz, cho phép dự đoán sự có mặt

của các đơn vị đường quinovose hoặc fucose. So sánh số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chuỗi đường (bảng 2) với các số liệu đã được công bố [2] kết hợp với kết quả phân tích các phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HSQC, HMBC và COSY (hình 2) cho phép xác định chuỗi đường là 3-O-($\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl}$).

Phần aglycon của 1 có các tín hiệu đặc trưng của hai nhóm oximetin [δ_c 77,86 (C-3) và 79,89/ δ_H 4,89 (1H, m, H-3) và 3,82 (1H, m, H-6)], một cacbon bậc bốn liên kết với ôxi [δ_c 73,87 (C-20)], một liên kết đôi bị thế ba vị trí [δ_c 145,48 (s, C-9) và 116,66 (d, C-11)/ δ_H 5,20 d ($J = 5,5$ Hz, H-11)], một nhóm keton [δ_c 212,41], và năm nhóm methyl [δ_c 13,60 (C-18), 19,29 (C-19), 26,92 (C-21), 22,67 (C-26) và 22,53 (C-27)/ δ_H 1,01 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 1,65 (3H, s, H-21) và 0,91 (6H, d, $J = 6,5$ Hz, H-26 và H-27)]. Tín hiệu proton oximetin H-3 bị dịch chuyển mạnh về phía vùng trường thấp tại δ_H 4,89 chứng minh vị trí liên kết thường gặp của nhóm sulfat tại C-3. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ COSY cho phép xác định các mảnh cấu trúc H-1/H-2/H-3/H-4/H-5/H-7/H-7/H-8/H-14/H-15/H-16/H-17, H-11/H-12, H-24/H-25/H-26(H-27). Kết quả này cùng với tương tác xa HMBC nhận được giữa H-19 (δ_H 0,93) và C-1 (δ_c 35,96)/C-5 (δ_c 49,15)/C-9 (δ_c 145,48)/C-10 (δ_c 38,30), H-18 (δ_H 1,01) và C-12 (δ_c 42,40)/C-13 (δ_c 41,58)/C-14 (δ_c 53,98)/C-17 (δ_c 59,37), H-21 (δ_H 1,65) và C-17 (δ_c 59,37)/C-20 (δ_c 73,78)/C-22 (δ_c 55,10) và giữa H-22 (δ_H 2,76 và 2,90)/H-24 (δ_H 2,46 và 2,52) và C-22

212,41) cho phép xác định chính xác cấu trúc của phần aglycon (hình 2). Ngoài ra, tương HMBC nhận được giữa proton anome H-1' (δ_H 7) và C-6 (δ_C 79,89) cho phép xác định vị trí liên của chuỗi năm đơn vị đường tại C-6 của aglycon. các dữ kiện đã nêu, cùng với sự phù hợp về số phổ ^{13}C -NMR với các số liệu tương ứng đã công bố cho phép xác định hợp chất 1 chính là nasteroside A [2].

Hợp chất 2 được xác định là natri 6 α -[(*O*- β -D-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- β -D-galactopyranosyl-4)-*O*-(β -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2))-*O*- β -D-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- β -D-quinovopyranosyl)-5 α -pregn-9(11)-ene-20-one-3 β -yl-sulfate [3], cơ sở phân tích chi tiết số liệu phổ cộng hưởng hạt nhân một chiều (^1H -NMR và ^{13}C -NMR) và chiều (HSQC, HMBC, COSY và ROESY) kết so sánh với các số liệu phổ đã được công bố (1 và 2).

Lời cảm ơn. Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam, đề tài mã số: VAST.TĐ.ĐAB.03/13-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dictionary of Natural Products on DVD, version 18.1, Copyright® 1982-2009 CRC Press.
2. V. U. Ahmad, A. Basha. *Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Cholestanes, Ergostanes, Withanolides, Stigmastane*. New York: Springer; 2007.
3. Y. Itakura, T. Komori. *Biologically active glycosides from Asteroidea, IX. steroid oligoglycosides from the starfish Asterias amurensis [cf.] versicolor* Sladen, 2. *Structure elucidation of two new oligoglycoside sulfates, versicoside B and versicoside C*. Liebigs Annalen der Chemie, 1986(2), 359-373 (1986).

Tập thể: Nguyễn Xuân Cường

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
E-mail: cuongnx@imbc.vast.vn.