

CÁC HỢP CHẤT IRIDOID GLYCOSIT PHÂN LẬP TỪ CÂY Kừ NAM GAI (MYRMECODIA TUBEROSA JACK)

Nguyễn Phương Hạnh¹, Trần Thị Hồng Hạnh², Nguyễn Hữu Toàn Phan^{3*}, Nguyễn Thị Diệu Thuần³,
Lê Thị Viên¹, Nguyễn Văn Thanh², Nguyễn Xuân Cường²,
Nguyễn Hoài Nam², Châu Văn Minh²

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Abstract

Four iridoid glycosides namely asperuloside (1), premnosidic acid (2), asperulosidic acid (3), and deacetyl-asperulosidic acid (4) were isolated from a methanol extract of the ant plant *Myrmecodia tuberosa* Jack. Their structures were elucidated by 1D and 2D-NMR experiments and comparison of their NMR data with reported values.

Keywords. *Myrmecodia tuberosa*, Rubiaceae, iridoid, iridoid glycoside.

1. MỞ ĐẦU

Kỳ nam gai, Bí kỳ nam (*Myrmecodia tuberosa* Jack) là loài được liệu duy nhất thuộc chi *Myrmecodia*, họ Cà phê (Rubiaceae). Theo kinh nghiệm dân gian, loài cây này thường được sử dụng làm thuốc trong điều trị các bệnh về gan, tiêu hóa, trị viêm tấy, đau đầu và bệnh thấp khớp. Ở nước ta, loài kỳ nam gai đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (2007) và Danh lục đỏ cây thuốc (2006) ở mức phân hạng nguy cấp (EN) và sẽ nguy cấp (VU) nhằm khuyến cáo bảo vệ [1, 2].

Trong khuôn khổ các nghiên cứu về các loài được liệu ở Lâm Đồng, Việt nam chúng tôi công bố trong công trình này quá trình phân lập và xác định cấu trúc của bốn hợp chất iridoid glycoside từ loài Kỳ nam gai (*Myrmecodia tuberosa* Jack).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. 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 lượng phân tử điện tử (ESI-MS) được đo trên máy Agilent 1260 series single quadrupole LC/MS. Sắc ký lỏng trung áp (MPLC) được tiến hành trên máy Biotage - Isolera One system (SE-751 03 Uppsala, Sweden). Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel Kieselgel 60, 70–230 mesh and 230–400 mesh, Merck) và YMC RP-18 (30–50 µm, 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 thực vật

Mẫu Kỳ nam gai (*Myrmecodia tuberosa* Jack) được thu hái vào tháng 8 năm 2013 tại Đạm Rong, Lâm Đồng, Việt Nam và được Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản số TN/326 Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật và Viện Nghiên cứu Khoa học Tây nguyên – Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

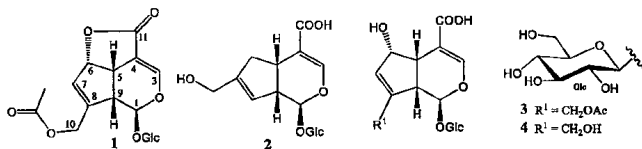
2.3. Phân lập các hợp chất

Mẫu Kỳ nam gai sau khi thu hái về được làm khô và nghiền mịn rồi chiết 3 lần với MeOH có dung siêu âm, dịch chiết sau đó được cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol (45 g). Cặn chiết metanol được hòa vào nước, sau đó chiết phần lớp lần lượt với các dung môi là n-hexan, diclometan và etyl axetat thu được các cặn chiết n-hexan (10 g), diclometan (4,5 g), etyl axetat (2 g) và dịch nước.

Phần đoạn nước được phân tách trên cột Diaion HP-20 rửa giải gradient với hệ dung môi lần lượt là 100% nước → methanol:nước 50:50 → 100% methanol thu được 3 phần đoạn từ W1 → W3. Phần đoạn W1 (100% metanol) (7.5g) được phân tách trên

sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan: methanol: nước (5:1:0.1) thu được 5 phân đoạn W1.1→W1.5. Từ phân đoạn W1.1 (380 mg) chạy sắc ký cột pha đảo YMC RP-18, hệ dung môi axeton: nước (1:4) thu được 3 phân đoạn W1.1A (160 mg), W1.1B (90 mg) và W1.1C (20 mg). Phân đoạn W1.1B được tiếp tục phân tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi ethyl axetat:metanol: nước (20:1:0.1) và tiếp tục phân tách trên cột pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi axeton: nước (1:10) thu được hợp 1 (5,0 mg). Từ

phân đoạn W1.4 (2,5 g) chạy sắc ký cột pha đảo YMC RP-18, hệ dung môi axeton: nước (1:10), và tiếp tục phân tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan:metanol: nước (4,5:1:0,1) thu được 2 hợp chất 2 (8,0 mg) và 3 (5,0 mg). Từ phân đoạn W1.5 (90 mg) chạy sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan: metanol: nước (3:1:0.1), và tiếp tục tinh chế trên cột pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi metanol: nước (1:4) thu được hợp chất 4 (4,0 mg).



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1–4

Bảng 1: Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của các hợp chất 1 và 2

C	1		2	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$
1	93,35	5,97 s	98,26	5,18 d (7,5)
3	150,27	7,32 d (2,0)	153,31	7,53 br s
4	106,18		112,79	
5	37,46	3,68*	36,66	3,18 dd (8,0, 16,0)
6	86,29	5,58 m	39,72	2,13 m
				2,85 m
7	128,97	5,75 s	144,79	
8	144,29		128,41	5,82 br s
9	45,30	3,31*	47,01	2,74 t (7,5)
10	61,90	4,68 dd (1,5, 14,5)	61,44	4,21 dd (2,0, 14,5)
		4,80 dd (1,5, 14,5)		4,34 d (14,5)
11	172,24		171,00	
C=O	172,51			
COCH ₃	20,61	2,11 s		
1'	100,06	3,30 d (9,0)	100,32	4,74 d (8,0)
2'	74,67	3,21 dd (8,0, 9,5)	74,87	3,25 dd (7,5, 9,0)
3'	77,92	3,39 t (8,5)	77,85	3,42 t (9,0)
4'	71,62	3,30*	71,53	3,31*
5'	78,39	3,30*	78,35	3,31*
6'	62,81	3,70 dd (6,5, 12,0)	62,65	3,66 dd (5,5, 12,5)
		3,94 dd (2,5, 12,0)		3,88 d (12,5)

^a đo trong CD₃OD, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, * tín hiệu bị chồng lấp.

Asperuloside (1): Chất dầu không màu; $[\alpha]_D^{20}$ -190 (c 0,16, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD), xem bảng 1;

Premnosidic acid (2): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{20}$ +7 (c 0,125, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD), xem bảng 1

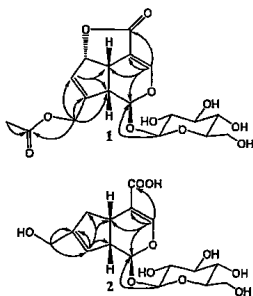
Asperulosidic acid (3): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{20}$ +22 (c 0,19, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 5,08 (1H, d, J = 9,0, H-1), 7,67 (1H, s, H-3), 3,04 (1H, t, J = 6,5 Hz, H-5), 4,81 (1H, H-6), 6,04 (1H, s, H-7), 2,65 (1H, t, J = 7,5 Hz, H-9), 4,81 (1H, H-10), 4,96 (1H, dd, J = 2,0, 12,0 Hz, H-10), 4,74 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1'), 3,28 (1H, dd, J = 8,0, 9,0 Hz, H-2'), 3,40 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-3'), 3,64 (1H, dd, J = 5,0, 12,5 Hz, H-6'), 3,87 (1H, dd, J = 2,0, 12,5 Hz, H-6'), 2,11 (3H, s, COCH_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 101,27 (C-1), (155,33 C-3), 108, 60 (C-4), 42,5 (C-5), 75,39 (C-6), 131,96 (C-7), 145,93 (C-8), 46,27 (C-9), 63,79 (C-10), 171,00 (C-11), 100,60 (C-1'), 74,93 (C-2'), 77,90 (C-3'), 71,59 (C-4'), 78,55 (C-5'), 62,99 (C-6'), 172,56 (C=O), 20,73 (COCH_3).

Deacetyl-asperulosidic acid (4): Chất bột màu trắng; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 5,06 (1H, d, J = 9,0, H-1), 7,62 (1H, s, H-3), 3,04 (1H, t, J = 6,5 Hz, H-5), 4,87 (1H, H-6), 6,04 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-7), 2,57 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-9), 4,23 (1H, br d, J = 11,0 Hz, H-10), 4,47 (1H, br d, J = 11,0 Hz, H-10), 4,74 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1'), 3,28 (1H, dd, J = 8,0, 9,0 Hz, H-2'), 3,42 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-3'), 3,65 (1H, dd, J = 5,0, 11,0 Hz, H-6'), 3,87 (1H, dd, J = 1,5, 11,0 Hz, H-6') và $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CD_3OD): δ 101,40 (C-1), 154,54 (C-3), 109,30 (C-4), 43,04 (C-5), 75,57 (C-6), 129,88 (C-7), 151,48 (C-8), 46,03 (C-9), 61,74 (C-10), 171,65 (C-11), 100,44 (C-1'), 75,00 (C-2'), 77,84 (C-3'), 71,66 (C-4'), 78,48 (C-5'), 62,84 (C-6').

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 được phân lập dưới dạng chất bột vô hình. Phổ ^1H - và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy các tín hiệu của khung iridoit glycosit với $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ ở 5,97 (s, 1-)/93,35 (C-1); 7,32 (d, J = 2,0 Hz, H-3)/150,27 (C-3); 5,58 (m, H-6)/86,29 (C-6); 5,75 (s, H-7)/128,97 (C-7). Tín hiệu của nhóm cacboxylic trong vòng lacton xuất hiện ở δ_{C} 172,24. Sự hiện diện của nhóm $-\text{CH}_2\text{OAc}$ gần với cacbon không no (C-8) được quan sát thấy ở δ_{C} 61,90, 172,51 và 20,61. Các tín hiệu của các proton trong vùng δ_{H} 3,20-3,96 ppm ứng với tín hiệu của proton anome δ_{H} 4,70 (d, J = 8,0 Hz, H-1') xác định sự hiện diện của một đơn vị đường. Hằng số tương tác J lớn của proton anome ứng với các tín hiệu cacbon đặc trưng tại δ_{C} 100,06 (C-1'), 74,67 (C-2'), 77,92 (C-3'), 71,62 (C-4'), 78,39

(C-5'), 62,81 (C-6') cho phép xác định phân tử đường là β -D-glucose. Các dữ kiện phổ của hợp chất 1 được so sánh với hợp chất asperuloside đã công bố [3] cho thấy có sự trùng khớp hoàn toàn. Cấu trúc của 1 còn được khẳng định thêm dựa vào tương tác HMBC giữa H-10 (δ_{H} 4,68, 4,80) với nhóm acetyl carbonyl (δ_{C} 172,51) và với C-7, C-8, C-9, tương tác giữa H-1' (δ_{H} 4,70) với C-1 chứng tỏ nhóm acetyl và phân tử đường được đính tại các vị trí C-10 và C-1 của khung aglycon. Các tương tác HMBC khác cũng được phân tích chi tiết (xem hình 2) cho phép khẳng định hợp chất 1 chính là asperuloside, một hợp chất đã được tìm thấy ở một số loài thực vật khác.



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

Hợp chất 2 thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ $^1\text{H NMR}$ và $^{13}\text{C NMR}$ cho thấy hợp chất này cũng có khung iridoit glycoside với sự xuất hiện của 16 cacbon, trong đó các tín hiệu tại $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,18 (d, J = 7,5 Hz, H-1)/98,26 (C-1), 7,53 (br s, H-3)/153,31 (C-3), 3,18 (dd, J = 8,0, 16,0 Hz, H-5)/36,66 (C-5), 5,82 (br s, H-8)/128,41 (C-8) rất đặc trưng cho phần khung aglycon. Sáu tín hiệu cacbon tại δ_{C} 100,32 (C-1'), 74,87 (C-2'), 78,35 (C-3'), 71,53 (C-4'), 77,85 (C-5'), 62,65 (C-6') cùng với tín hiệu của proton anome tại δ_{H} 4,74 (d, J = 8,0 Hz, H-1') đã khẳng định sự có mặt của một đơn vị đường β -D-glucose. Cấu trúc của hợp chất 2 được xác định là premnosidic acid khi có sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ của hợp chất 2 với tài liệu đã công bố về hợp chất này [4]. Cấu trúc của hợp chất 2 cũng được khẳng định một cách chắc chắn hơn dựa vào tương tác HMBC giữa H-10 (δ_{H} 4,21, 4,34) với C-7, C-8, tương tác giữa H-1' (δ_{H} 4,74) cũng như các tương tác HMBC khác cũng được phân tích chi tiết (xem hình

2) cho phép khẳng định hợp chất 2 chính là premnosidic acid, một hợp chất cũng đã được tìm thấy ở một số loài thực vật khác.

Tương tự, dựa vào kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp so sánh với các số liệu tương ứng đã được công bố cũng xác định được cấu trúc của hai hợp chất 3 và 4 lần lượt là asperulosidic acid và deacetyl-asperulosidic acid [5].

Lời cảm ơn. Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước thuộc Chương trình Tây Nguyên 3 (mã số: TN3/T14).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. *Sách đỏ Việt Nam, phần II- Thực*

vật. Hà Nội: Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ; 2007.

2. Nguyễn Tập. *Cẩm nang cây thuốc cần bảo vệ ở Việt Nam*. Hà nội: Nxb Mạng lưới lâm sản ngoài gỗ Việt Nam; 2007.
3. H. Otsuka, K. Yoshimura, K. Yamasaki, M. C. Cantoria. *Isolation of 10-O-acyl iridoid glucosides from a Philippine medicinal plant, Oldenlandia corymbosa L. (Rubiaceae)*. Chem. Pharm. Bull., 39(8), 2049–2052 (1991).
4. S. Negi, Shukla, V., M. S. M. Rawat, G. Pant, A. Nagatsu. *Premnosidic acid, a new iridoid glycoside from Premna barbata*. Indian J. Chem. - B, 43(8), 1805–1806 (2004).
5. O. Tzakou, P. Mylonas, C. Vagias, P. V. Petrakis. *Iridoid glucosides with insecticidal activity from Galium melanantherum*. Z. Naturforsch. C, 62(7-8), 597–602 (2007).

Liên hệ: Nguyễn Hữu Toàn Phan

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng
E-mail: nhtphan@gmail.com