

## CÁC HỢP CHẤT STEROIT PHÂN LẬP TỪ LOÀI HẢI MIỀN *MYCALE PLUMOSE*

Phan Văn Kiệm<sup>\*</sup>, Hoàng Lê Tuấn Anh, Phạm Hải Yến, Châu Văn Minh, Đan Thị Thúy Hằng,  
Nguyễn Thị Cúc, Dương Thị Hải Yến, Dương Thị Dung, Nguyễn Xuân Nhiệm, Bùi Hữu Tài,  
Trần Hồng Quang

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

Đến Tòa soạn 11-7-2012

### Abstract

By using various chromatographic methods, four steroids,  $3\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one (1),  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triolcholest-7-en (2), saringosterol (3), and cholesterol (4) were isolated from the methanolic extract of the Vietnamese marine sponge *Mycale plumose*. Their structures were identified by spectroscopic methods including ESI-MS, 1D- and 2D-NMR in comparison with the literature values. This is the first report of the NMR data of 2.

**Keywords:** *Mycale plumose*, Vietnamese marine sponge, steroid.

### 1. MỞ ĐẦU

Hải miên được biết đến như là một nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú cung cấp các hoạt chất có khả năng kháng ung thư đa dạng về cấu trúc hóa học các chất. Theo tác giả Liu và cộng sự [1], hai hợp chất metacycloprodigiosin và undecylprodigiosin được phân lập từ dịch chiết chloroform của chủng xạ khuẩn *Saccharopolyspora* sp. được trích ly từ loài hải miên *Mycale plumose* đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào rất tốt trên 5 dòng tế bào ung thư người là P388, HL60, A-549, BEL-7402 và SPCA4. Hợp chất Patecamine [2], được phân lập từ loài hải miên *Mycale* sp. thu tại New Zealand, thể hiện hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh đối với dòng tế bào ung thư người P388 (0,15 ng/ml). Các dẫn xuất mycalazal, dạng pyrrole-2-cacbadehyde có chứa mạch nhánh khác nhau ở cacbon C-5 được phân lập từ loài hải miên *Mycale cecilia* có khả năng ức chế sự sinh trưởng của một số dòng tế bào ung thư người, đặc biệt là dòng LNcaP (tuyển tiên liệt) [3].

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về các loài hải miên thuộc chi *Mycale*, tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học của loài hải miên *Mycale plumose*. Bài báo này thông báo một số kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài hải miên *M. plumose*. Từ dịch chiết phân đoạn hexane và butanol đã phân lập được 4 hợp chất dạng steroid. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định là  $3\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one (1),

$3\beta,5\alpha,6\beta$ -triolcholest-7-en (2), saringosterol (3) và cholesterol (4) bằng các phương pháp phổ.

### 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 trắng sẵn DC-Alufolien 60 F<sub>254</sub> và RP<sub>18</sub> F<sub>254</sub> (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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 (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 AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### 2.3. Mẫu sinh vật biển

Mẫu hải miên *Mycale plumose* Carter, 1882

được thu vào tháng 6 năm 2011 tại Cát Bà, Hải Phòng. Tên khoa học được PGS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển giám định. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Hải Phòng và Viện Hóa sinh biển.

#### 2.4. Phân lập các hợp chất

Hải miên *Mycale plumose* tươi (20 kg) được thái nhỏ, phơi khô, nghiền nhỏ và chiết 3 lần bằng metanol (ở 50°C, mỗi lần 3 giờ). Các dịch chiết được lọc qua phễu lút chân không, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 50 g cặn chiết metanol. Cặn chiết này được hòa tan vào 1 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với dung môi có độ phân cực tăng dần là hexan, clorofoc, etyl axetat và butanol (3 lần × 1L). Lớp dung môi hữu cơ thu được sau 3 lần chiết được loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 7 g cặn hexan, 20 g cặn clorofoc, 10 g cặn etyl axetat và 3 g cặn butanol.

Cặn clorofoc được hòa tan, tẩm bằng silica gel pha thường (tỉ lệ 1/1,5), cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô rồi nghiền mịn. Hỗn hợp này được phân tách thô trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi hexan/etyl axetat (gradient từ 100/0-0/100, v/v) thu được 5 phân đoạn (MP1-MP5). Phân đoạn MP2 được phân tách trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải hexan/axeton (6/1, v/v) thu được hợp chất 4 (8 mg). Phân đoạn MP4 được tinh chế trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/etyl axetat (5/1, v/v) thu được hợp chất 3 (6 mg). Phân đoạn MP5 được hòa tan bằng clorofoc, tẩm bằng silica gel pha thường (tỉ lệ 1/1), cất loại dung môi đến khô rồi nghiền mịn. Hỗn hợp này được tiến hành tinh chế trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/metanol (8/1, v/v) kết hợp với sắc ký lớp mỏng điều chế thu được 2 hợp chất 1 (5 mg) và 2 (5 mg).

**3β-Hydroxycholest-5-en-7-one (1):** Tinh thể màu trắng

ESI-MS  $m/z$  423  $[M+Na]^+$ , công thức phân tử  $C_{27}H_{44}O_2$  ( $M = 400$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ), xem bảng 1.

**3β,5α,6β-Triolcholest-7-en (2):** Chất bột màu trắng.

ESI-MS  $m/z$  401  $[M-H_2O+H]^+$ , công thức phân tử  $C_{27}H_{46}O_3$  ( $M = 418$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ ), xem bảng 1.

**Saringosterol (3):** Tinh thể hình kim, màu trắng.

ESI-MS  $m/z$  411  $[M-H_2O+H]^+$ , 393,0  $[M-2H_2O+H]^+$ , công thức phân tử  $C_{28}H_{48}O_2$  ( $M = 428$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 3,52 (1H, m, H-3), 5,35 (1H, t,  $J = 3,0$  Hz, H-6), 1,00 (3H, s, H-19), 0,92 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 0,87 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,90 (3H, d,  $J = 3,0$  Hz, H-27) và 0,68 (3H, s, H-18), 5,80 (1H, dd,  $J = 10,5, 17,5$  Hz, H-28), 5,13 (1H, dd,  $J = 1,5, 10,5$  Hz, H-29) và 5,18 (1H, dd,  $J = 1,5, 17,5$  Hz, H-29<sub>b</sub>).

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 37,3 (C-1), 31,7 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 31,9 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 55,8 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 36,1 (C-20), 18,8 (C-21), 29,1 (C-22), 34,6 (C-23), 77,7 (C-24), 35,9 (C-25), 16,5 (C-26, C-27), 142,6 (C-28) và 112,9 (C-29).

**Cholesterol (4):** Chất kết tinh màu trắng.

ESI-MS  $m/z$  409  $[M+Na]^+$ , công thức phân tử  $C_{27}H_{46}O$  ( $M = 386$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 3,52 (1H, m, H-3), 5,35 (1H, br d,  $J = 5,0$  Hz, H-6), 1,00 (3H, s, H-19), 0,91 (3H, s, H-21), 0,86 (6H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26, 27) và 0,68 (3H, s, H-18).

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 37,2 (C-1), 31,6 (C-2), 71,8 (C-3), 42,2 (C-4), 140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 31,8 (C-7), 31,8 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 56,1 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 35,7 (C-20), 18,7 (C-21), 36,1 (C-22), 23,8 (C-23), 39,5 (C-24), 28,0 (C-25), 22,5 (C-26) và 22,8 (C-27).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 nhận được dưới dạng tinh thể hình kim có màu trắng. Vết chất xuất hiện màu tím hồng, sau đó chuyển dần sang tím xanh trên sắc ký lớp mỏng (TLC) với thuốc thử đặc hiệu (phun dung dịch  $H_2SO_4$  10% rồi hơ nóng từ từ) cho thấy đây là một steroid. Các dữ liệu phổ  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR và DEPT cũng cho thấy đây là một hợp chất dạng steroid. Trên phổ proton xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 5 nhóm methyl cộng hưởng tại  $\delta$  0,70 (3H, s, H-18), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,86 (3H, d,  $J = 5,0$  Hz, H-27), 0,94 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-21), 1,21 (3H, s, H-19); 1 tín hiệu proton oximetin tại  $\delta$  3,60 (1H, m, H-3) và 1 tín hiệu proton olefinic cộng hưởng tại  $\delta$  5,68 (1H, s, H-6).

Kết hợp phân tích phổ carbon  $^{13}C$  và phổ DEPT cho thấy trong 27 tín hiệu carbon có 5 tín hiệu của các nhóm methyl tại  $\delta$  11,45 (C-18), 16,73 (C-19), 18,36 (C-21), 21,97 (C-26) và 22,22 (C-27); 10 tín hiệu carbon methylen; 8 tín hiệu carbon methin

với 1 tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của nhóm oximetin tại  $\delta_c$  69,48; 1 tín hiệu đặc trưng cho nối đôi thế 3 lần tại  $\delta_c$  125,07, 167,08 và 1 tín hiệu cộng hưởng của một nhóm cacbonyl tại  $\delta_c$  203,00.

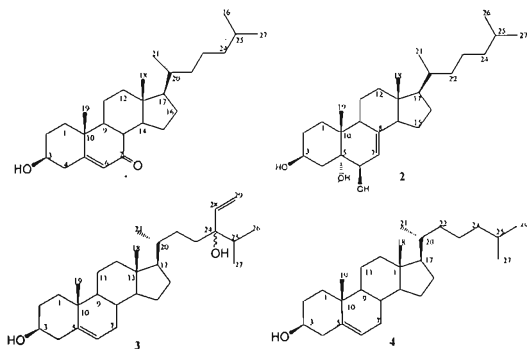
Kết hợp so sánh các dữ liệu thu được ở trên với số liệu phổ của hợp chất  $3\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one [4] thấy hoàn toàn phù hợp tại các vị trí tương ứng (bảng 1). Từ đó có thể khẳng định hợp chất **1** chính là  $3\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one.

Hợp chất **2** cũng được dự đoán là một hợp chất dạng steroid khi hiện bằng thuốc thử axit sunfuric 10%. Kết quả phân tích phổ proton  $^1\text{H}$ , cacbon  $^{13}\text{C}$ , DEPT và HSQC cũng cho thấy đây là một hợp chất steroid với 27 tín hiệu cacbon. Trong đó có 5 tín hiệu cộng hưởng của nhóm methyl; 10 tín hiệu cacbon methylen; 8 tín hiệu cacbon metin; 4 tín hiệu của cacbon không gắn với nguyên tử hidro. Các tín hiệu của proton được gán với tín hiệu cacbon tương ứng dựa trên kết quả phân tích phổ HSQC. Các kết quả phân tích phổ cho thấy có 5 nhóm methyl được xác định tại  $\delta_c$  11,78 (C-18)/ $\delta_H$  0,53 (3H, s, H-18),  $\delta_c$  17,64 (C-19)/ $\delta_H$  0,89 (3H, brs, H-19),  $\delta_c$  18,63 (C-21)/ $\delta_H$  0,90 (3H, brs, H-21),  $\delta_c$  22,34 (C-26)/ $\delta_H$  0,85 (3H, d,  $J = 2,5$  Hz, H-26),  $\delta_c$  22,62 (C-27)/ $\delta_H$  0,84 (3H, d,  $J = 2,5$  Hz, H-27). Bên cạnh đó còn xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 2 nhóm oximetin tại  $\delta_c$  65,92 (C-3)/ $\delta_H$  3,75 (1H, m, H-3),  $\delta_c$  72,10 (C-6)/ $\delta_H$  3,37 (1H, m, H-6) và một tín hiệu cacbon bậc ba nối với ôxi tại  $\delta_c$  74,42 (C-5). Ngoài ra còn có tín hiệu

của 1 nối đôi thế 3 lần tại  $\delta_c$  119,39 (C-7)/ $\delta_H$  5,08 (1H, brs, H-7) và  $\delta_c$  139,67 (C-8).

Từ bảng số liệu nhận thấy giá trị tín hiệu cacbon từ C-20 đến C-27 của **2** khá phù hợp với các tín hiệu cacbon của **1** chứng tỏ hợp chất **1** và **2** có cùng một dạng mạch nhánh.

So sánh các dữ liệu phổ NMR của **2** với các hợp chất có cấu trúc tương tự có thể gợi ý **2** là  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triolecholest-7-en. Tuy nhiên, không có tài liệu nào công bố đầy đủ các số liệu phổ NMR của hợp chất này [8]. Do đó, chúng tôi kết hợp so sánh số liệu phổ của hợp chất **2** với 2 hợp chất có phân cấu trúc tương tự là hợp chất **1** [4] và hợp chất  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triolecholest-7-en-24-metylen [5]. Kết quả cho thấy tại các phần có cấu trúc tương tự thì số liệu phổ thu được là hoàn toàn phù hợp (bảng 1). Cấu trúc của hợp chất **2** còn được khẳng định thêm dựa trên kết quả phân tích phổ HMBC (hình 2). Proton H-7 xuất hiện tương tác HMBC với cacbon C-6, C-9 và C-11; proton của nhóm methyl  $\text{CH}_3$ -18 xuất hiện tương tác với cacbon C-12, C-13, C-14 và C-17; proton của nhóm methyl  $\text{CH}_3$ -19 có sự tương tác với các tín hiệu cacbon C-1, C-5, C-9 và C-10; tín hiệu proton của nhóm methyl  $\text{CH}_3$ -21 tương tác với cacbon C-17, C-20 và C-22; proton của 2 nhóm methyl  $\text{CH}_3$ -26 và  $\text{CH}_3$ -27 có sự tương tác với cacbon C-24, C-25, C-26 và C-27. Từ đó có thể kết luận hợp chất **2** chính là  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triolecholest-7-en. Đây là lần đầu tiên số liệu phổ NMR đầy đủ của hợp chất **2** được công bố.



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

Hợp chất **3** và **4** được xác định lần lượt là saringosterol [6] và cholesterol [7] bằng cách phân tích chi tiết các số liệu phổ  $^{1\text{D}}$ -NMR, ESI-MS và so

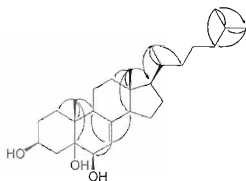
sánh các số liệu phổ với các giá trị tương ứng đã được công bố trong tài liệu tham khảo.

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của 1 và 2

C	1			2				
	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (J, Hz)	@ $\delta_C$	* $\delta_C$	$\delta_C^{d,b}$	$\delta_H^{d,c}$ (J, Hz)	HMBC (H-C)
1	36,46	35,99		31,8	-	31,14		
2	31,29	30,22		34,0	-	32,41		
3	70,61	69,48	3,60 m (1H)	68,4	-	65,92	3,75 m (1H)	
4	41,90	41,16		40,9	-	38,96		
5	165,23	167,08		77,0	-	74,42		
6	126,27	125,07	5,68 s (1H)	74,4	-	72,10	3,39 m (1H)	
7	202,40	203,00		119,2	-	119,39	5,08 brs (1H)	6, 9, 14
8	45,52	45,06		143,8	-	139,67		
9	50,07	49,64		44,5	-	42,22		
10	38,38	38,32		38,2	-	36,59		
11	21,34	20,79		23,0	-	23,26		
12	38,82	38,07		40,6	-	40,16		
13	41,90	42,78		44,9	-	43,04		
14	50,07	49,64		55,9	-	54,06		
15	26,41	25,89		24,0	-	21,29		
16	28,60	28,91		28,7	-	27,40		
17	54,91	54,45		57,6	-	55,54		
18	12,07	11,45	0,70 s (3H)	12,4	-	11,78	0,53 s (3H)	12, 13, 14, 17
19	17,40	16,73	1,21 s (3H)	18,8	-	17,64	0,89 brs (3H)	2, 5, 9, 10
20	35,80	35,29		37,2	35,80	35,54		
21	18,96	18,36	0,94 d (3H, 6,0)	19,3	18,96	18,63	0,90 brs	17, 20, 22
22	36,28	35,79		36,0	36,28	35,54		
23	23,92	23,39		32,1	23,92	22,62		
24	39,58	39,08		158,0	39,58	38,88		
25	28,09	27,56		35,0	28,09	27,35		
26	22,64	22,22	0,83 d (3H, 7,0)	23,3	22,64	22,34	0,85 d (3H, 2,5)	24, 25, 27
27	22,88	21,97	0,86 d (3H, 5,0)	106,9	22,88	22,62	0,84 d (3H, 2,5)	24, 25, 26

\*Do trong  $CDCl_3$  &  $CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>DMSO-d<sub>6</sub>, \* $\delta_C$  của 3 $\beta$ -hydroxy, cholest-5-en-7-one [4].

<sup>2</sup> $\delta_C$  của 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triolecholest-7-ene-24-metylen [5].



Hình 2: Các tương tác HMBC chính của 2

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của đề tài 02/2011/HD-NCCBUD. Các tác giả cảm ơn PGS. TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển đã giám định tên mẫu và ThS. Đặng Vũ Lương, Viện Hóa học đã giúp đo các phổ NMR.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R. Liu, C. B. Cui, L. Duan, Q. Q. Gu, W. M. Zhu. *Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from*

- a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov., Arch Pharm Res., **28**(12), 1341-4 (2005).
2. T. K. Peter, W. B. John, H. G. M. Murray. *Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand Marine sponge mycale* sp.. Tetrahedron Letters, **32**(44), 6411-6414 (1991).
  3. J. O. María, Z. M. Eva, S. Carmen, S. Javier, J. L. Carballo. *Structure and cytotoxicity of new metabolites from the sponge Mycale cecilia*, Tetrahedron, **60**(11), 2517-2524 (2004).
  4. G. Notaro, V. Piccialli, D. Sica. *New steroidal hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge Cliona copiosa*, Journal of natural products, **55**(11), 1588-94 (1992).
  5. I. Maria, M. Luigi, R. Raffaele. *Polar steroids from the marine scallop Patinopecten yessoensis*, Journal of Natural Products, **51**(6), 1098-1103 (1988).
  6. G. Michefle, D. Daniel, B. Chantal. *Hydroperoxy-24 vinyl-24 cholesterol, nouvel hydroperoxyde naturel isole de deux tuniciers: Phallusia mamillata et cliona intestinalis*. Tetrahedron Letters, **23**(18), 1905-1906 (1982).
  7. L. J. Goad, and T. Akihisa. *Analysis of sterols*, Academic Press, 1<sup>st</sup> edition, 363 (1997).
  8. Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 15:1, Chapman & Hall/CRC

**Liên hệ: Phan Văn Kiệm**

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam  
 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội  
 E-mail: phankiem@vast.ac.vn.  
 Điện thoại: 0983555031.