

Kết luận

Từ acid 3-pyridylacetic hydroclorid chúng tôi đã tổng hợp được natri risedronat một thuốc điều trị loãng xương và phòng ngừa loãng xương phổ biến. Quy trình điều chế natri risedronat đã được tối ưu hóa vì thế ổn định, kinh tế dễ dàng tiến hành những nghiên cứu sâu hơn. Đồng thời chúng tôi cũng thiết lập được quy trình kiểm nghiệm nhờ đó có thể kiểm tra chất lượng các nguồn nguyên liệu natri risedronat trong nước cũng như ngoại nhập.

Summary

From pyridylacetic hydrochloride acid, sodium risedronate, as a popular osteoporosis drug, was synthesized. The synthesis was optimized for stability, economy and simplicity toward the further research. Tests for quality control of sodium risedronate were also established.

Tài liệu tham khảo

- 1 Nguyễn Văn Tuấn, Nguyễn Đình Nguyễn. Loãng xương - Nguyên nhân, chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa NXB Y học Tp. HCM (2007) 205 tr.
- 2 Sean C Sweetman Martindale the complete drug reference. Pharmaceutical Press, 36th edition (2009), pp.1103-1104
3. Balasubramaniam; Ravisanka. Improved process for the preparation of risedronate sodium hemipentahydrate. WO patent 034580, (2009).
4. Lorenzo De Ferra; Stefano Turchetta; PietroMassardo. preparation of bisphosphonic acid. USpatent 0288509, (2005).
5. Tavhare M. Ankush et al. Novel process for preparing risedronic acid. US Patent 0121066, (2010).
6. Trương Phương, Nguyễn Anh Duy, Nguyễn Anh Tuấn. Nghiên cứu điều chế natri risedronat. Phần 1- điều chế acid 3-pyridylacetic hydroclorid. (2011), N^o3, tr. 31-37.

Các hợp chất flavon glycosid phân lập từ lá cây vam (*Diospyros dictyonema* Hiern.)

Nguyễn Văn Bằng², Lục Quang Tấn², Phan Văn Kiệm¹,
Châu Văn Minh¹, Nguyễn Xuân Nhiệm¹, Hoàng Lê Tuấn Anh¹,
Đan Thúy Hằng¹, Phan Tống Sơn³, Phạm Hải Yến¹,
Ninh Khắc Bản¹, Nguyễn Tiến Đạt¹

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

²Khoa Hóa học - Trường đại học Sư phạm Hà Nội 2

³Khoa Hóa học - Trường đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học QG Hà Nội

Đặt vấn đề

Chi thi (*Diospyros*) thuộc họ Thị (Ebenaceae) là một chi khá lớn bao gồm khoảng 450-500 loài phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới. Đa số các loài trong chi này đều là cây ăn quả, vừa có giá trị dinh dưỡng vừa có giá trị về kinh tế. Cây vam (*Diospyros dictyonema*) cũng là một cây ăn quả, phân bố chủ yếu ở vùng châu thổ sông Hồng. Cây cao từ 5-8 m, lá mọc so le, quả có màu xanh, khi chín chuyển sang màu vàng và có mùi thơm đặc trưng, quả có đường kính khoảng 3-3,5 cm. Cây ra hoa vào tháng 4-5, quả chín vào tháng 6-8 hàng năm. Thành phần hóa học chủ yếu của chi *Diospyros* là các hợp chất flavonoid,

naphthoquinon, lignan, megastigman, terpenoid .v.v...^[1,2] Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học của loài *D. dictyonema*

Bài báo này thông báo quá trình phân lập và xác định cấu trúc hóa học của bốn hợp chất flavon glycosid kaempferol 3-O-[2,3-bis-(4-hydroxy-*E*-cinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosid] (1), kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosid (2), kaempferol 3-O-(2"-*O*- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranosid (3) và quercetin 3-O-(2"-*O*- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranosid (4). Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-3 được xác định bằng các phương pháp phổ khối lượng

🔬 Nghiên cứu – Kỹ thuật

(ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1D and 2D-NMR)

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chung

Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufoalien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP₁₈ F_{254s} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC)

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh) Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC RP-18 (30-50 μm, FujiSilica Chemical Ltd.).

Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR): ¹H-NMR (600 MHz) và ¹³C-NMR (150 MHz) được đo trên máy Bruker AM600 FT-NMR Spectrometer, Viện Nghiên cứu Khoa học cơ bản (KBSI), Hàn Quốc.

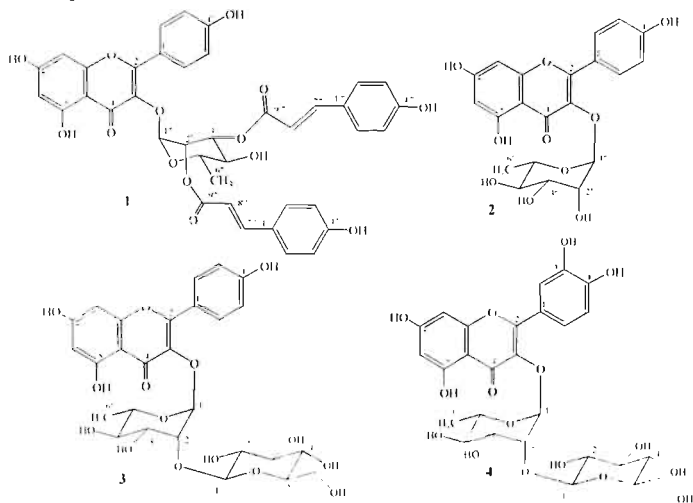
Mẫu thực vật

Mẫu là cây vâm *Diospyros dictyonema* Hiern. (Ebenaceae) được thu hái vào tháng 11 năm 2010 tại Xuân Trường, Nam Định. Tên khoa học

được TS. Ninh Khắc Bàn, Ths Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật giám định. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại phòng mẫu của Viện Hóa sinh Biển.

Phân lập các hợp chất

Lá vâm khô (3,0 kg) được chiết 3 lần bằng methanol (3 × 10 lit) thu được 280 g cặn chiết. Cặn chiết này được hòa tan vào 5 lit nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với cloroform (3 × 5 lit) và ethyl acetat (3 × 5 lit) thu được các cặn chiết tương ứng: cloroform (F1, 68 g), ethyl acetat (F2, 90,5 g) và lớp nước (F3). Lớp nước (F3) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký trao đổi ion Dianion HP-20 rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong nước (0, 25, 50, 70 và 100%) thu được bốn phân đoạn ký hiệu là F3A-F3D. Phân tách phân đoạn F3D (100% MeOH, 12g) bằng sắc ký cột silica gel pha thường rửa giải bằng cloroform/methanol/nước 6/1/0,05 thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu là F3D1-F3D4. Tinh chế phân đoạn F3D3 bằng sắc ký cột silica gel pha đảo (RP-18) rửa giải bằng methanol/nước (3/1, v/v) thu được hợp chất 2 (9,5 mg). Phân đoạn F3C (70% MeOH) bằng sắc ký cột pha ngược RP18 với hệ dung môi methanol/nước (5/1, v/v) thu được hợp chất 1 (15 mg). Hai hợp chất 3 (12 mg) và 4 (10 mg) được phân lập từ phân đoạn FC3B (50% MeOH) bằng sắc ký cột pha ngược RP18 với hệ dung môi methanol/nước (3/1, v/v) sau đó tinh chế bằng sắc ký điều chế pha thường với hệ dung môi cloroform/ methanol/ nước 8/2/0,1 (v/v/v)



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

Kaempferol 3-O-[2,3-bis-(4-hydroxy-*E*-cinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosid] (1)

Chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 180-181°C

ESI-MS: *m/z* 723 [M - H]⁻ 725 [M + H]⁺, CTPT C₃₉H₃₂O₁₄, M = 724.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 6,22 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,40 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 7,87 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-2', H-6'), 7,00 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3', H-5'), Rhamnopyranosyl: 5,62 (1H, d, *J* = 1,5 Hz, H-1''), 5,85 (1H, dd, *J* = 1,5, 3,5 Hz, H-2''), 5,31 (1H, dd, *J* = 3,5, 10,0 Hz), 3,67 (1H, t, *J* = 10,0 Hz, H-4''), 3,57 (1H, m, H-5''), 1,08 (3H, d, *J* = 6,0 Hz, H-6''), 2 x Cumaroyl: [7,38 (2H, d, *J* = 8,5 Hz) và 7,45 (2H, d, *J* = 8,5 Hz): H-2''', H-6''', H-2'''' (2H, d, *J* = 8,5 Hz): H-3''', H-5''', H-3'''' (2H, d, *J* = 8,5 Hz): H-3''', H-5''', H-5'''' (2H, d, *J* = 16,0 Hz), và 7,63 (d, *J* = 16,0 Hz): H-7''', H-7''''], [6,31 (d, *J* = 16,0 Hz), và 6,38 (d, *J* = 16,0 Hz): H-8''', H-8''''].

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 159,05 (C-2), 135,48 (C-3), 179,31 (C-4), 163,15 (C-5), 99,92 (C-6), 165,78 (C-7), 94,84 (C-8), 158,49 (C-9), 105,95 (C-10), 122,46 (C-1'), 131,86 (C-2', C-6'), 116,76 (C-3', C-5'), 161,17 (C-4'), Rhamnopyranosyl: 100,31 (C-1''), 72,20 (C-2''), 73,08 (C-3''), 71,07 (C-4''), 70,95 (C-5''), 17,74 (C-6''), 2 x Cumaroyl: 127,15, 127,06 (C-1'''), C-1''''), 131,36, 131,16 (C-2''', C-6''', C-2''''), C-6''''), 116,86, 116,80 (C-3''', C-5''', C-3''''), C-5''''), 161,61, 161,39 (C-4''', C-4''''), 147,67, 146,98 (C-7''', C-7''''), 114,96, 114,41 (C-8''', C-8''''), 168,51, 167,77 (C-9''', C-9'''').

Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosid (2)

Chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 172-174°C

ESI-MS *m/z* 433 [M+H]⁺ (positive), 431[M-H]⁻ (negative), CTPT: C₂₁H₂₀O₁₀, M = 432.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 6,22 (brs, H-6), 6,39 (brs, H-8), 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, H-2', H-6'), 6,95 (d, *J* = 8,5 Hz, H-3', H-5'), 5,40 (brs, H-1''), 4,24 (brs, H-2''), 3,72 (d, *J* = 5,0 Hz, H-3''), 3,36 (H-4''), 3,36 (H-5'') và 0,94 (d, *J* = 6,5 Hz, H-6'').

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 159,30 (C-2), 136,23 (C-3), 179,65 (C-4), 163,25 (C-5), 99,88 (C-6), 166,01 (C-7), 94,79 (C-8), 158,59 (C-9), 105,93 (C-10), 122,67 (C-1'), 131,90 (C-2', C-6'), 116,54 (C-3', C-5'), 161,60 (C-4'), 103,53 (C-1''), 72,16 (C-2''), 72,05 (C-3''), 73,21 (C-4''), 71,94 (C-5'') và 17,65 (C-6'').

Kaempferol 3-O-(2''-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranosid (3)

ESI-MS: *m/z* 593 [M - H]⁻, 595 [M + H]⁺, 617 [M+Na]⁺, CTPT C₂₇H₃₀O₁₅, M = 594

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 6,22 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,39 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 7,78 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2', H-6'), 6,96 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3', H-5'), Rhamnopyranosyl: 5,73 (1H, d, *J* = 1,0 Hz, H-1''), 4,31 (1H, dd, *J* = 1,0, 3,5 Hz, H-2''), 3,82 (1H, dd, *J* = 3,5, 9,5 Hz, H-3''), 3,36 (1H, H-4''), 3,42 (1H, H-5''), 0,98 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-6''), Glucopyranosyl: 4,44 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1'''), 3,25 (1H, dd, *J* = 8,0, 8,0 Hz, H-2'''), 3,38 (1H, H-3'''), 3,39 (1H, H-4'''), 3,25 (1H, H-5'''), 3,75 (1H, dd, *J* = 2,5, 12,0 Hz, H_a-6'''), 3,70 (1H, dd, *J* = 5,0, 12,0 Hz, H_b-6''').

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 159,38 (C-2), 136,47 (C-3), 179,56 (C-4), 163,14 (C-5), 99,97 (C-6), 165,90 (C-7), 94,86 (C-8), 158,59 (C-9), 106,01 (C-10), 122,62 (C-1'), 131,95 (C-2', C-6'), 116,58 (C-3', C-5'), 161,59 (C-4'), Rhamnopyranosyl: 102,59 (C-1''), 82,55 (C-2''), 71,87 (C-3''), 73,54 (C-4''), 71,94 (C-5''), 17,61 (C-6''), Glucopyranosyl: 107,03 (C-1'''), 75,40 (C-2'''), 77,94 (C-3'''), 71,08 (C-4'''), 77,94 (C-5'''), 62,47 (C-6''').

Quercetin 3-O-(2''-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranosid (4)

ESI-MS: *m/z* 609 [M - H]⁻, 611 [M + H]⁺, 623 [M+Na]⁺ CTPT C₂₇H₃₀O₁₄, M = 610

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 6,24 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,40 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 7,38 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,95 (H, d, *J* = 9,0 Hz, H-5'), 7,34 (H, dd, *J* = 9,0, 2,0 Hz, H-5'), Rhamnopyranosyl: 5,66 (1H, d, *J* = 1,0 Hz, H-1''), 4,29 (1H, dd, *J* = 1,0, 3,5 Hz, H-2''), 3,87 (1H, dd, *J* = 3,5, 9,5 Hz, H-3''), 3,37 (1H, H-4''), 3,42 (1H, H-5''), 1,00 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-6''), Glucopyranosyl: 4,40 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1'''), 3,24 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, H-2'''), 3,38 (1H, H-3'''), 3,39 (1H, H-4'''), 3,19 (1H, H-5'''), 3,69 (2H, d, *J* = 3,5, H-6''').

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): Aglycon: 159,37 (C-2), 136,56 (C-3), 179,67 (C-4), 163,20 (C-5), 99,98 (C-6), 160,00 (C-7), 94,83 (C-8), 158,00 (C-9), 105,96 (C-10), 122,87 (C-1'), 117,03 (C-2', C-6'), 146,50 (C-3'), 149,88 (C-4'), 116,51 (C-5'), 122,87 (C-6'), Rhamnopyranosyl: 102,68 (C-1''), 82,72 (C-2''), 71,90 (C-3''), 73,65 (C-4''), 71,97 (C-5''), 17,63

(C-6''), Glucopyranosyl' 107,12 (C-1'''), 75,42 (C-2'''), 77,88 (C-3'''), 70,98 (C-4'''), 77,88 (C-5'''), 62,38 (C-6'').

Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất bột có màu vàng của một hợp chất flavon. Phổ ¹H-NMR của **1** xuất hiện 6 cặp tín hiệu doublet (mỗi tín hiệu tương ứng với 2 proton và có giá trị hằng số tương tác đều bằng 8,5 Hz) tại δ 7,87, 7,45, 7,38, 7,00, 6,81 và 6,76 đặc trưng cho sự có mặt của 3 vòng benzen thế para. Hai tín hiệu doublet tại δ 6,22 (1H, d, J = 2,0 Hz) và 6,40 (1H, d, J = 2,0 Hz) điển hình cho hai proton H-6 và H-8 của vòng A của khung flavon. Sự có mặt của một gốc đường rhamnosyl được nhận biết bởi sự có mặt của proton gắn với cacbon anome tại δ 5,62 (1H, d, J = 1,5 Hz, H-1''), tín hiệu doublet của nhóm methyl tại δ 1,08 (3H, J = 6,0 Hz, H-6'') và 4 proton khác tại δ 5,85 (1H, dd, J = 1,5, 3,5 Hz, H-2''), 5,31 (1H, dd, J = 3,5, 10,0 Hz,), 3,67 (1H, t, J = 10,0 Hz, H-4''), 3,57 (1H, m, H-5''). Tín hiệu tại δ 5,62 có giá trị J = 1,5 Hz chứng tỏ cả hai proton H-1'' và H-2'' của gốc đường này đều chiếm các vị trí equatorial và liên kết được tạo thành giữa gốc đường với phần aglycon là liên kết O-α-glycosid. Ngoài ra, phổ ¹H-NMR còn xuất hiện bốn tín hiệu doublet đều có giá trị J = 16,0 Hz tại 7,62, 7,63, 6,31 và 6,38 gợi ý sự có mặt của hai nối đôi với cấu hình *trans*. Hai nối đôi ngoài vòng này thường xuất hiện trong cấu trúc của dẫn xuất coumaroyl, phù hợp với sự có mặt của 2 trong 3 vòng benzen thế para nêu trên. Những dữ kiện phổ ¹H-NMR cho thấy, cấu trúc của **1** bao gồm phần aglycon dạng kaempferol, hai nhóm coumaroyl và một gốc đường rhamnosyl.

Phổ ¹³C-NMR xuất hiện các tín hiệu của hai gốc coumaroyl trong đó hai vòng benzen thế para được xác định tại δ 127,15 (C), 127,06 (C), 131,36 (2 x CH), 131,16 (2 x CH), 116,86 (2 x CH), 116,80 (2 x CH), 161,61 (C), 161,39 (C), hai nối đôi ngoài vòng tại δ 147,67 (C), 146,98 (C), 114,96 (CH), 114,41 (CH) và hai cacbon cacboxylat tại δ 168,51, 167,77. Các tín hiệu của phân tử đường rhamnosyl rất điển hình tại δ 100,31, 72,20, 73,08, 71,07, 70,95 là các tín hiệu CH và một tín hiệu CH₃ tại δ 17,74. Các tín hiệu còn lại tại δ 159,05 (C-2), 135,48 (C-3), 179,31 (C-4), 163,15 (C-5), 99,92 (C-6), 165,78

(C-7), 94,84 (C-8), 158,49 (C-9), 105,95 (C-10), 122,46 (C-1'), 131,86 (C-2', C-6'), 116,76 (C-3', C-5'), 161,17 (C-4') được xác định thuộc vào khung kaempferol, trong đó tín hiệu tại δ 135,48 (C) gợi ý cho vị trí nối của gốc đường vào C-3. Như vậy, điều đáng quan tâm là vị trí nối của hai gốc coumaroyl vào đường rhamnosyl. Các vị trí có thể nối được gốc coumaroyl chỉ có thể là C-2'', C-3'', và C-4''. Chú ý đến hai tín hiệu tại δ 5,31 và 5,85 có thể thấy hai tín hiệu này đã bị dịch chuyển khá mạnh về phía trường thấp hơn so với bình thường do sự hình thành liên kết este của hai nhóm coumaroyl với gốc đường. Phân tích đến giá trị hằng số tương tác của từng tín hiệu có thể thấy tín hiệu tại δ 5,85 ở dạng doublet của doublet với giá trị J = 1,5, 3,5 Hz, chứng tỏ đây là H-2'' (do H-1'' có J = 1,5 Hz), còn tín hiệu tại δ 5,31 ở dạng doublet của doublet với giá trị J = 3,5, 10,0 Hz chứng tỏ đây là H-3'' (vị trí H-4'' phải xuất hiện dưới dạng một triplet với J = 10 Hz) [3]. Như vậy có thể khẳng định hai nhóm coumaroyl nối vào C-2'' và C-3'' của gốc đường. Với những phân tích nêu trên, hợp chất **1** có công thức phân tử là C₃₉H₃₂O₁₄ (M = 724). Kết quả này được khẳng định thêm bởi phổ khối lượng với sự xuất hiện các pic ion tại m/z 723 [M - H]⁻, 725 [M + H]⁺ trên phổ ESI-MS. Kết quả so sánh các giá trị phổ của **1** với các giá trị đã công bố cho hợp chất kaempferol 3-O-[2,3-bis-(4-hydroxy-E-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranoside] có cấu trúc như phân tích nêu trên là hoàn toàn phù hợp. Hợp chất này còn được gọi là 2'',3''-di-O-p-coumaroylzelin hay platanosid và được phân lập từ các loài *Platanus acerifolia*, *Platanus orientalis* và *Foeniculum vulgare* [2], tuy nhiên đây là lần đầu tiên nó được phát hiện từ loài *Diospyros dictyonema*. Hợp chất này được thông báo là có hoạt tính ức chế sự phát triển của một số dòng tế bào ung thư thực nghiệm *in vitro* [6].

Hợp chất **2** thu được dưới dạng chất rắn có màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 172-174°C đặc trưng cho các hợp chất flavon. Phổ ¹H-NMR của **2** xuất hiện hai vùng tín hiệu rõ ràng, một vùng tín hiệu của các proton vòng thơm nằm ở phía trường thấp hơn và một vùng tín hiệu của một phân tử đường ở vùng trường cao hơn. Trong đó sự có mặt của một vòng thơm thế para (vòng B) được nhận biết bởi hai tín hiệu doublet tại δ 7,78 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-2', H-6'), 6,95 (2H, d,

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

$J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'); hai tín hiệu đơn tại δ 6,22 và 6,39 phù hợp với hai proton ở vị trí H-6 và H-8 của vòng A của các hợp chất flavon. Ngoài ra, trên phổ này $^1\text{H-NMR}$ không thấy xuất hiện các proton olefin khác chứng tỏ rằng hợp chất flavon này có các nhóm thế tại C-3, C-5 và C-7. Một phân tử đường rhamnose cũng được xác định bởi các tín hiệu δ 5,40 (brs, H-1''), 4,24 (brs, H-2''), 3,72 (d, $J = 5,0$ Hz, H-3''), 3,36 (H-4'', H-5'') và 0,94 (d, $J = 6,5$ Hz, H-6''). Tín hiệu vạch đơn tại δ 5,40 cho thấy giá trị của hằng số tương tác giữa H-1'' và H-2'' rất nhỏ, điều này khẳng định cả hai proton này đều chiếm vị trí equatorial, tức là sự có mặt của liên kết α -glycosit. Tín hiệu doublet tại δ 0,94 ($J = 6,5$ Hz) cũng rất đặc trưng cho phân tử đường rhamnose.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **2** xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon và hoàn toàn phù hợp với các phân tích trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Trong đó 6 tín hiệu tại δ 103,53 (C-1''), 72,16 (C-2''), 72,05 (C-3''), 73,21 (C-4''), 71,94 (C-5''), 17,65 (C-6'') là thuộc vào phân tử đường rhamnose^[4] và 15 carbon còn lại (trong đó có hai tín hiệu bị chập vào nhau tại δ 131,90 và 116,54 có cường độ cao hơn các tín hiệu CH khác) là thuộc vào phần aglycon. Tín hiệu của carbon cacbonyl tại δ 179,65 (C, C-4), của vòng B thế para tại δ 122,67 (C, C-1'), 131,90 (CH, C-2', C-6'), 116,54 (CH, C-3', C-5'), 161,60 (C, C-4'). Giá trị δ tại C-3 (136,23) phù hợp với sự có mặt của liên kết glycosit tại đây^[4]. Trên phổ hoàn toàn không có các tín hiệu của các nhóm thế khác, chứng tỏ tại các vị trí C-5, C-7 và C-4' phải là các nhóm hydroxy. Kết quả trên cho thấy hợp chất **2** là 3-O- α -L-rhamnopyranosyl keampferol. Tất cả các giá trị phổ NMR của hợp chất **2** được so sánh với các dữ kiện đã công bố cho 3-O- α -L-rhamnopyranosyl keampferol^[4] và cho sự phù hợp hoàn toàn. Ngoài ra, phổ khối lượng cũng khẳng định thêm kết luận trên bởi sự có mặt của các pic ion m/z 433 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positive), 431 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negative) trên phổ ESIMS, hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ ($M = 432$). Hợp chất 3-O- α -L-rhamnopyranosyl keampferol cũng xuất hiện ở nhiều loài thực vật. Tuy nhiên, đây là lần đầu nó được phát hiện từ cây *Diospyros dictyonema*.

Hợp chất **3** nhận được dưới dạng chất bột màu vàng, màu đặc trưng của hợp chất flavon.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **3** xuất hiện các tín hiệu của 6 proton olefin trong đó có hai tín hiệu doublet tại δ , 6,22 và 6,39 với hằng số tương tác $J = 2,0$ Hz điển hình cho hai proton nằm ở vị trí meta với nhau của vòng A. Vòng B được xác định là thế para do sự xuất hiện của hai cặp tín hiệu doublet tại 7,78 (2H, $J = 8,5$ Hz) và 6,96 (2H, $J = 8,5$ Hz). Tín hiệu của proton H-1'' tại 5,73 ($J = 1,0$ Hz) và tín hiệu nhóm methyl dưới dạng doublet ($J = 6,5$ Hz) tại δ 0,98 điển hình cho một đơn vị đường rhamnopyranosyl. Các tín hiệu tại δ 4,44 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1''') và 3,75 (1H, dd, $J = 2,5, 12,0$ Hz, H_a-6'''), 3,70 (1H, dd, $J = 5,0, 12,0$ Hz, H_b-6''') điển hình cho sự có mặt của đường glucopyranosyl. Giá trị hằng số tương tác $J_{\text{H-1}''\text{H-2}''} = 1,0$ Hz và $J_{\text{H-1}''\text{H-2}'''} = 8,0$ Hz cho thấy proton H-1'' và H-2'' đều chiếm các vị trí equatorial còn hai proton H-1''' và H-2''' đều chiếm các vị trí axial. Điều này khẳng định sự hình thành liên kết O- α -glycosid của đường rhamnose và liên kết O- β -glycosid của đường glucose.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và các phổ DEPT của **3** khẳng định sự có mặt 25 tín hiệu của 27 nguyên tử carbon (do vòng B đối xứng), trong đó các tín hiệu của đường rhamnopyranosyl được xác định tại δ 102,59 (CH), 82,55 (CH), 71,87 (CH), 73,54 (CH), 71,94 (CH), 17,61 (CH₃), và phân tử đường glucopyranosyl tại δ 107,03 (CH), 75,40 (CH), 77,94 (CH), 71,08 (CH), 77,94 (CH), 62,47 (CH₂). Cấu trúc dạng keampferol được xác định bởi 13 tín hiệu carbon còn lại, trong đó điển hình là tín hiệu của vòng B đối xứng (δ 131,95, 2 x CH; 116,58, 2 x CH), tín hiệu của nhóm C=O tại δ 179,56. Giá trị C-3 (δ 136,47) đặc trưng cho liên kết của phân tử đường vào C-3^[5]. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton và cacbon ở từng vị trí được xác định bằng phổ HSQC và HMBC. Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa proton H-1'' (δ 5,73) với C-3 (δ 136,47) và tương tác của H-1''' (δ 4,48) với C-2'' (δ 82,55) khẳng định đường glucosyl nối vào C-2'' của đường rhamnosyl, và đường rhamnosyl nối với C-3 thông qua các liên kết ete. Sự tạo thành liên kết ete giữa đường glucosyl vào C-2'' đã làm dịch chuyển mạnh tín hiệu cộng hưởng của C-2'' lên đến 82,55 (trong khi phổ biến $\delta_{\text{C-2}}$ của đường rhamnopyranose là 72-73 ppm). Với cấu trúc dự đoán nêu trên, kết hợp với kết quả so sánh với các giá trị phổ đã

⊕ Nghiên cứu – Kỹ thuật

công bố^[5], hợp chất **3** được xác định là kaempferol 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside, một hợp chất có công thức phân tử là C₂₇H₃₀O₁₅ (M = 594). Kết quả phổ khối lượng với sự xuất hiện các pic ion tại *m/z* 593 [M - H]⁻, 595 [M + H]⁺, 617 [M+Na]⁺ hoàn toàn phù hợp với khẳng định nêu trên. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được tìm thấy từ loài *Diospyros dictyonema*.

Hợp chất **4** nhận được dưới dạng chất bột màu vàng, màu đặc trưng của hợp chất flavon. Phổ ¹H-NMR của **4** xuất hiện các tín hiệu của 5 proton olefin trong đó có hai tín hiệu doublet tại δ_H 6,24 và 6,40 với hằng số tương tác *J* = 2,0 Hz điển hình cho hai proton nằm ở vị trí meta với nhau của vòng A. Vòng B được xác định là thể 1,3,4 do sự xuất hiện của ba tín hiệu điển hình tại 7,38 (1H, d, *J* = 2,0 Hz), 6,95 (1H, d, *J* = 9,0 Hz) và 7,34 (1H, dd, *J* 9,0, 2,0 Hz). Tín hiệu của proton H-1" tại 5,66 (*J* = 1,0 Hz) và tín hiệu nhóm methyl dưới dạng doublet (*J* = 6,5 Hz) tại δ 1,00 điển hình cho một đơn vị đường rhamnopyranosyl. Các tín hiệu tại δ 4,44 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1"') của proton gắn với carbon anome của đường và tín hiệu nhóm oximetylen tại δ 3,69 (2H) điển hình cho sự có mặt của đường glucopyranosyl. Giá trị hằng số tương tác *J*_{H-1''H-2''} = 1,0 Hz và *J*_{H-1''H-2''} = 8,0 Hz cho thấy proton H-1" và H-2" đều chiếm các vị trí equatorial còn hai proton H-1"' và H-2"' đều chiếm các vị trí axial. Điều này khẳng định sự hình thành liên kết O-α-glycosid của đường rhamnose và liên kết O-β-glycosid của đường glucose.

Phổ ¹³C-NMR và các phổ DEPT của **4** khẳng định sự có mặt của 27 nguyên tử carbon, trong đó các tín hiệu của đường rhamnopyranosyl được xác định tại δ 102,68 (CH), 82,72 (CH), 71,90 (CH), 73,65 (CH), 71,90 (CH), 17,63 (CH₃), và phân tử đường glucopyranosyl tại δ 107,12 (CH), 75,42 (CH), 77,88 (CH), 70,98 (CH), 77,88 (CH), 62,38 (CH₂). Cấu trúc dạng quercetin của phần aglycon được xác định bởi 15 tín hiệu carbon còn lại, trong đó điển hình là tín hiệu của nhóm C=O tại δ 179,67. Giá trị C-3 (δ 136,50) đặc trưng cho liên kết của phân tử đường vào C-3^[5] Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton và carbon ở từng vị trí được xác định bằng phổ HSQC và HMBC. Trên phổ HMBC

xuất hiện tương tác giữa proton H-1" (δ 5,66) với C-3 (δ 136,56) và tương tác của H-1"' (δ 4,40) với C-2" (δ 82,72) khẳng định đường glucosyl nối vào C-2" của đường rhamnosyl, và đường rhamnosyl nối với C-3 thông qua các liên kết ether. Sự tạo thành liên kết ete giữa đường glucosyl vào C-2" đã làm dịch chuyển mạnh tín hiệu cộng hưởng của C-2" lên đến 82,72 (trong khi phổ biến δ_{C-2} của đường rhamnopyranose là 72-73 ppm). Với cấu trúc dự đoán nêu trên, kết hợp với kết quả so sánh với các giá trị phổ đã công bố^[5] hợp chất **4** được xác định là quercetin 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranosid, một hợp chất có công thức phân tử là C₂₇H₃₀O₁₆ (M = 610). Kết quả phổ khối lượng với sự xuất hiện các pic ion tại *m/z* 609 [M - H]⁻, 611 [M + H]⁺ và 623 [M+Na]⁺ hoàn toàn phù hợp với khẳng định nêu trên. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được tìm thấy từ loài *Diospyros dictyonema*.

Kết luận

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, bốn hợp chất flavon glycosid đã được tinh sạch từ dịch chiết methanol của lá cây vòm *Diospyros dictyonema*. Cấu trúc hóa học của chúng được xác định là kaempferol 3-O-[2,3-bis-(4-hydroxy-E-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranosid] (**1**), kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosid (**2**), kaempferol 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside (**3**) và quercetin 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside (**4**) bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS), kết hợp so sánh với các số liệu phổ đã được công bố. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ cây *Diospyros dictyonema*. Hợp chất **1** có khả năng ức chế sự phát triển của một số dòng tế bào ung thư thực nghiệm *in vitro*^[6] và hợp chất **2** có hoạt tính kháng viêm mạnh^[7]

Summary

Four flavone glycosides were isolated from the methanol extracts of the *Diospyros dictyonema* leaves. Structural elucidation by NMR and ESI-mass spectral data in reference to the literatural values identified them to be kaempferol 3-O-[2,3-bis-(4-hydroxy-E-cinnamoyl)-α-L-rhamnopyranoside] (**1**), kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranoside (**2**), kaempferol 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-

*rhamnopyranoside (3) and quercetin 3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside (4). Of them, compound (1) and (2) have been reported to exhibit cytotoxic activity against some cell lines^[6] and anti-inflammatory activity^[7], respectively. These compounds were isolated from *Diospyros dictyonema* for the first time.*

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi, Từ điển Cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, (1997), trang 728.

2. Dictionary of Natural Products on DVD, version 18.1, Copyright[©] 1982-2009 CRC Press.

3. Kaouadji, M. Acylated and non-acylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* buds. *Phytochemistry*, (1990) 29 (7), 2295-2297.

4. Maurad Kaouadji, Acylated and Non-acylated kaempferol monoglycoside from *Planta acerifolia* buds. *Phytochemistry*, (1990) Vol 29 (7), 2295-2297

5. Andreas Hasler, Gian-Andrea Gross, Beat Meier and Otto Sticher, Complex flavonol glycosides from the leaves of Ginkgo biloba. *Phytochemistry*, (1992) 31 (4), 1391-1394

6. Dimas K, Demetzos C, Mitaku S, Marselos M, Tzavaras T, Kokkinopoulos D., Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines *in vitro*., *Pharmacol Res. Jan*, (2000) 41(1) : 85-88.

7. Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, Cho DH, Cho JY., Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties, *Molecules*. (2011) 18, 16 (4) : 3338-44.

Các hợp chất diterpen phân lập từ loài san hô mềm - *Lobophytum compactum*

Đinh Thị Thu Thủy^{1,2}, Châu Văn Minh¹, Trần Thu Hà^{2,3},
Phan Văn Kiệm¹, Nguyễn Phương Thảo¹,
Nguyễn Xuân Cường¹, Nguyễn Hoài Nam¹,
Nguyễn Xuân Nhiệm¹, Hoàng Lê Tuấn Anh¹, Vũ Anh Tú¹

¹Viện Hóa sinh Biển - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên -

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Cục Sở hữu trí tuệ - Bộ Khoa học và Công nghệ

Đặt vấn đề

Sinh vật biển là nguồn cung cấp dồi dào các hợp chất có hoạt tính sinh học, là nguyên liệu cho các ngành y - dược, sinh học. Trong đó có nhiều hợp chất có cấu trúc vô cùng độc đáo, không thể tìm thấy ở các loài sinh vật trên cạn^[1]. Trong số các loài sinh vật biển, san hô mềm đã và đang nhận được nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới bởi sự dồi dào về nguồn nguyên liệu và sự đa dạng về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chúng. San hô mềm là một nhóm sinh vật biển quan trọng và chúng có mặt ở các rạn san hô trên khắp thế giới, đặc biệt là ở các vùng biển nhiệt đới với độ sâu từ 5-30 m. Các chi *Sinularia*, *Lobophytum* và *Sarcophyton* là phổ biến nhất và có khả năng sinh sản, phát triển

sinh khối nhanh. Một điều thú vị là, một số loài *Sarcophyton* có chứa hàm lượng diterpen đạt tới 10% trọng lượng mẫu khô. Hàm lượng diterpen rất cao này có thể giữ vai trò quan trọng cho sự tồn tại của san hô mềm với chức năng bảo vệ, cạnh tranh, sinh sản và có thể cả chức năng pheromon. Người ta cho rằng, các loài san hô mềm không có các cơ quan bảo vệ vật lý nên được bảo vệ khỏi kẻ săn mồi bằng mức độ tích lũy cao các độc tố diterpen trong các mô của chúng^[2].

Trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cơ bản về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài san hô mềm thuộc chi *Sarcophyton* và *Lobophytum* sinh sống tại các vùng biển Việt Nam, bài báo này công bố kết quả phân lập và xác định cấu trúc của 3 hợp chất diterpen dạng