

CÁC HỢP CHẤT STEROIT PHÂN LẬP TỪ LOÀI SAN HỒ MỀM *SINULARIA MICROSPICULATA*

Ninh Thị Ngọc¹, Phạm Thị Mai Hương¹, Châu Ngọc Diệp¹, Nguyễn Văn Thanh¹, Đỗ Công Thung²,
Nguyễn Xuân Cường¹, Nguyễn Hoài Nam^{1*}, 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

Three steroids as sarcophytosterol (1), 3 β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one (2), and 3 β ,7 α -dihydroxyergosta-5,24(28)-dien (3), were isolated from a methanol extract of the soft coral *Sinularia microspiculata*. Their structures were elucidated by 1D and 2D-NMR experiments and comparison of their NMR data with reported values. This is the first report on isolation of these compounds from the soft coral *S. microspiculata*.

Keywords. *Sinularia microspiculata*, Alcyoniidae, soft coral, steroid.

1. MỞ ĐẦU

Trong số các loài sinh vật biển, san hô mềm đã được biết đến là nguồn sản sinh dồi dào các hợp chất 3 β -monohydroxysterol và polyhydroxysterol, chủ yếu là các dẫn xuất của khung cơ bản là 24-methylcholestan. Các hợp chất polyhydroxysterol của các loài san hô mềm và nhiều loài sinh vật biển khác chủ yếu tồn tại ở dạng tự do hoặc dạng sulfat hóa và các dẫn xuất glycosit của chúng tồn tại khá ít, ngoại trừ được sản sinh nhiều ở các loài sao biển [1].

Trong khuôn khổ các nghiên cứu của nhóm tác giả về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài san hô mềm sinh sống tại các vùng biển của Việt Nam, công trình này công bố quá trình phân lập và xác định cấu trúc của ba hợp chất steroid phân lập được từ loài san hô mềm *S. microspiculata* đó là sarcophytosterol (1), 3 β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one (2) và 3 β ,7 α -dihydroxyergosta-5,24(28)-dien (3).

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 phun mù 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, Thụy Điển). Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (preparative HPLC) được thực hiện trên hệ thống máy Agilent 1200 series. Sắc ký cột (CC) được thực

hiện 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 san hô mềm

Mẫu loài san hô mềm *S. microspiculata* Tixier-Durivault được thu tại khu vực Đá Đen, Quảng Ninh, vào tháng 4 năm 2014 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 san hô mềm *S. microspiculata* sau khi thu về được rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C sau đó xay nhỏ thu được (2 kg). Bột khô của san hô mềm được chiết 3 lần với methanol có dung độ siêu âm, dịch chiết sau đó được cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn chiết methanol (200 g). Cặn chiết methanol được hòa vào nước, sau đó chiết phân lớp lần lượt với các dung môi là *n*-hexan, diclometan thu được các cặn chiết *n*-hexan (42 g), cặn diclometan (3 g) và dịch nước.

Cặn chiết *n*-hexan được tiến hành phân tách thô trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp, sử dụng cột nhồi silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:axeton (50:1 $\rightarrow$ 1/1) thu được 8 phân đoạn H1–

H8. Phân đoạn H3 (9g) được đưa lên cột pha đảo YMC RP-18 gradient (metanol:nước 1.5/1, 3/1, 6/1 và 100% M) thu được 13 phân đoạn H3A-H3N. Phân đoạn H3F (110 mg) được tinh chế trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan: etyl axetat (3/1) thu được hợp chất 2 (3 mg). Phân đoạn H3L (1 g) tiếp tục được tinh chế trên cột sắc ký silica gel pha đảo YMC (axeton:nước 3/1) thu được hợp chất 1 (2 mg). Phân đoạn H4 (5 g) được phân tách thô trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp, sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo RP-18 rửa giải gradient (metanol:nước 1,5/1→3/1→6/1→100% MeOH) thu được 12 phân đoạn H4A-H4M. Phân đoạn H4M (1,3 g) được đưa lên cột silicagel với với hệ dung môi rửa giải diclomethanol:etyl axetat (1/1) thu được năm phân đoạn H4M1-H4M5. Phân đoạn H4M1 (50 mg) tiếp tục được tinh chế trên cột sắc ký silica gel

với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:etyl axetat (1,5/1) thu được hợp chất 3 (5 mg).

Sarcophytosterol (1): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$ -75 (c 0,1, CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), xem bảng 1; ESI-MS: *m/z* 451 [M + Na]⁺, (C₂₉H₄₈O₂, M = 428).

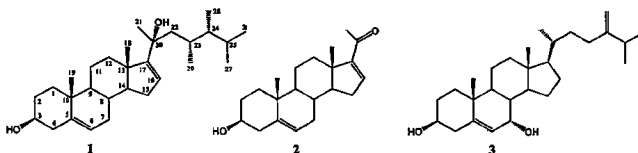
3β-Hydroxypregna-5,16-dien-20-one (2): Chất bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$ -30 (c 0,1, CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), xem bảng 1; ESI-MS: *m/z* 337 [M + Na]⁺, (C₂₉H₃₈O₃, M = 446).

3β,7α-Dihydroxyergost-5,24(28)-diene (3): Chất bột màu trắng; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), xem bảng 2; ESI-MS: 397 [M-H₂O+H]⁺ (C₂₈H₄₆O₂, M = 414).

Bảng 1: Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) của các hợp chất 1, 2 và các chất tham khảo

C	^a δ _C	1		^b δ _C	2	
		δ _C	δ _H dạng pic (J = Hz)		δ _C	δ _H dạng pic (J = Hz)
1	37,1	37,19	1,10 m/1,85 m	37,1	37,15	1,10 m/1,86 m
2	31,6	31,69	1,52 m/1,85 m	31,6	31,68	1,50 m/1,85 m
3	71,8	71,81	3,52 m	71,6	71,76	3,52 m
4	42,3	42,35	2,26 m/2,32 m	42,2	42,32	2,25 m/2,30 m
5	141,0	141,07	-	141,4	141,41	-
6	121,5	121,50	5,37 t (3,0)	120,9	121,06	5,36 t (3,0)
7	31,5	31,52	1,62 m/2,02 m	31,5	31,57	1,62 m/2,03 m
8	30,4	30,49	1,71 m	30,2	30,23	1,70 m
9	50,3	50,37	1,02 m	50,5	50,53	1,03 m
10	36,6	36,68	-	36,7	36,72	-
11	20,9	21,01	1,60 m	20,6	20,71	1,60 m
12	36,2	36,25	1,59 m/2,11 m	34,7	34,69	1,35 m/2,11 m
13	47,4	47,41	-	46,1	46,12	-
14	57,9	57,97	1,42 m	56,4	56,49	1,43 m
15	31,0	31,06	1,89 m/2,08 m	32,2	32,28	2,04 m/2,31 m
16	123,8	123,79	5,50 t (1,5)	144,2	144,40	6,70 dd (2,0, 3,0)
17	160,9	160,98	-	155,4	155,44	-
18	18,1	18,13	1,00 s	15,7	15,74	0,92 s
19	19,3	19,32	1,04 s	19,2	19,32	1,05 s
20	75,9	75,97	-	196,7	196,84	-
21	29,6	29,63	1,37 s	27,0	27,15	2,26 s
22	49,0	49,12	1,50 m/1,59 m			
23	29,6	29,63	1,84 m			
24	45,4	45,46	1,08 m			
25	30,8	30,87	1,44 m			
26	21,0	20,92	0,86 d (6,5)			
27	21,4	21,46	0,89 d (6,5)			
28	11,6	11,58	0,75 d (6,5)			
29	15,7	15,74	0,78 d (6,5)			

^aδ_C của sarcophytosterol [2], ^bδ_C của 3β-hydroxypregna-5,16-dien-20-one [3].



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-3

Bảng 2: Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của các hợp chất 3 và $3\beta,7\alpha$ -dihydroxyergosta-5,24(28)-dien

C	δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	37,1	37,04	1,86 m/1,14 m	
2	31,4	31,40	1,86 m/1,52 m	
3	71,4	71,37	3,58 m	
4	42,1	42,04	2,19 m/2,24m	2, 3, 6, 10
5	146,3	146,26	-	
6	123,9	123,89	5,60 dd (1,5, 5,0)	4, 7, 8, 10
7	65,4	65,36	3,85 br s	
8	37,6	37,55	1,48 m	
9	42,3	42,30	1,23 m	
10	37,4	37,42	-	
11	20,8	20,73	1,50 m/1,54 m	
12	39,2	39,21	1,18 m/2,01 m	
13	42,2	42,21	-	
14	49,5	49,45	1,45 m	
15	24,3	24,30	1,15 m/1,72 m	
16	28,3	28,26	1,31 m/1,92 m	
17	55,7	55,71	1,21 m	
18	11,7	11,65	0,69 s	12, 13, 17
19	18,3	18,26	1,00 s	1, 5, 9, 10
20	35,8	35,73	1,43 m	
21	18,8	18,75	0,96 d (7,0)	17, 20, 21
22	34,7	34,70	1,57 m/1,18 m	
23	30,9	30,86	2,18 m/1,89 m	
24	157,0	156,88	-	
25	33,9	33,83	2,23 m	24, 26, 27
26	22,1	22,02	1,03 d (7,0)	24, 25, 27
27	22,1	21,88	1,02 d (7,0)	24, 25, 26
28	106,0	105,99	4,66 br s/4,71 br s	23, 24, 25

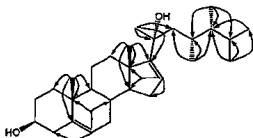
δ_{C} của $3\beta,7\alpha$ -dihydroxyergosta-5,24(28)-dien [4], δ_{C} trong CDCl_3 , $^{\text{b}}$ do 125 MHz, $^{\text{d}}$ 500 MHz.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Các phổ NMR của nó đặc trưng cho một hợp chất steroid. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện 29 tín hiệu cacbon trong đó có các tín hiệu đặc trưng của một nhóm oximetin [δ_{C} 71,78 (d, C-3)], một cacbon bậc bốn gắn trực tiếp với ôxi [δ_{C} 75,97 (s, C-20)], hai liên kết đôi bị thế ba vị trí [δ_{C} 141,07 (s, C-

5)/121,50 (d, C-6) và 123,79 (d, C-16)/160,98 (s, C-17)] và bảy nhóm methyl [δ_{C} 18,13 (C-18), 19,32 (C-19), 29,63 (C-21), 20,92 (C-26), 21,46 (C-27), 11,58 (C-28) và 15,74 (C-29)]. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của 1 cũng xuất hiện các tín hiệu chứng minh cho sự có mặt của một nhóm oximetin tại δ_{H} 3,52 (1H, m, H-3) và hai proton olefin tại δ_{H} 5,37 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-6) và 5,50 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-16). Ngoài ra, sự xuất hiện của ba nhóm methyl bậc ba [δ_{H} 1,00 (H-18),

1,04 (H-19), 1,37 (H-21), mỗi tín hiệu ^3H , s] và bốn nhóm methyl bậc hai [δ_{H} 0,86 (H-26), 0,89 (H-27), 0,75 (H-28), 0,78 (H-29), mỗi tín hiệu ^3H , d, $J = 6,5$ Hz] cho phép dự đoán hợp chất 1 có cấu trúc bộ khung dạng 23,24-dimethylcholesterol. Nhận định này được khẳng định bằng tương tác HMBC của các proton methyl H-26 (δ_{H} 0,86)/H-27 (δ_{H} 0,89) với C-24 (δ_{C} 45,46)/C-25 (δ_{C} 30,87), H-28 (δ_{H} 0,75) với C-23 (δ_{C} 29,63)/C-24 (δ_{C} 45,46)/C-25 (δ_{C} 30,87), và của H-29 (δ_{H} 0,78) với C-22 (δ_{C} 49,12)/C-23 (δ_{C} 29,63)/C-24 (δ_{C} 45,46). Proton methyl H-21 (δ_{H} 1,37) có tương tác HMBC với C-17 (δ_{C} 160,98)/C-20 (δ_{C} 75,97)/C-22 (δ_{C} 49,12) cho phép xác định vị trí của carbon bậc bốn mang ôxi C-20 và một liên kết đôi bị thế ba vị trí tại C-16/C-17. Vị trí của liên kết đôi còn lại tại C-5/C-6 được xác định bằng tương tác HMBC (hình 2) giữa proton methyl H-19 (δ_{H} 1,04) và C-1 (δ_{C} 37,19)/C-5 (δ_{C} 141,07)/C-9 (δ_{C} 50,37)/C-10 (δ_{C} 36,68). Từ các dữ kiện đã nêu, cùng với sự phù hợp hoàn toàn về số liệu ^{13}C -NMR của 1 với các số liệu tương ứng đã được công bố (bảng 1) cho phép khẳng định hợp chất này chính là sarcophytosterol [2].

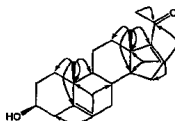


Hình 2: Các tương tác HMBC chính của 1

Hợp chất 2 cũng được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Các phổ NMR của nó tương tự như các phổ của 1, ngoại trừ các tín hiệu của phần nhánh. Trên phổ ^1H và ^{13}C -NMR phần nhánh của 2 chỉ xuất hiện các tín hiệu của một nhóm keton [δ_{C} 196,84 (C-20)] và một nhóm methyl [δ_{C} 27,15 (C-21)/ δ_{H} 2,26 (^3H , s, H-21)]. So sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của 2 với các số liệu đã được công bố (bảng 1) cùng với kết quả phổ HMBC (hình 3) cho phép khẳng định hợp chất này chính là 3β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one [3, 5].

Hợp chất 3 được xác định là $3\beta,7\alpha$ -dihydroxyergosta-5,24(28)-dien [4] bằng cách so sánh số liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của nó với

các số liệu đã được công bố kết hợp với phân tích số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều. Đây là lần đầu tiên các hợp 1-3 được phân lập từ loài *San hô mềm S. microspiculata*.



Hình 3: Các tương tác HMBC chính của 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.02/13-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Kobayashi, F. Kanda, S. R. Damarla, D. V. Rao, C. B. Rao. *Marine sterols. XVII. Polyhydroxysterols of the soft corals of the Andaman and nicobar coasts. (2). Isolation and structures of three 16-hydroxy steroidal glycosides from an Alcyonium sp. soft coral*. Chem. Pharm. Bull., 38(9), 2400-2403 (1990).
2. Y. Lu, Y.-C. Lin, Z.-H. Wen, J.-H. Su, P.-J. Sung, C.-H. Hsu, Y.-H. Kuo, M. Y. Chiang, C.-F. Dai, J.-H. Sheu. *Steroid and cembranoids from the Dongsha atoll soft coral Lobophytum sarcophytoides*. Tetrahedron, 66(35), 7129-7135 (2010).
3. B. B. Shingate, B. G. Hazra, D. B. Salunke, V. S. Pore, F. Shirazi, M. V. Deshpande. *Synthesis and antimicrobial activity of steroidal C-20 tertiary alcohols with vinyl side chain*. Chem. Biol. Interface, 1(2), 198-208 (2011).
4. F. De Riccardis, L. Minale, M. Iorizzi, C. Debitus, C. Lévi. *Marine sterols. Side-chain-oxygenated sterols, possibly of abiotic origin, from the new Caledonian sponge Stelodoryx chlorophylla*. J. Nat. Prod., 56(2), 282-287 (1993).
5. N. X. Zhang, X. L. Tang, L. van Ofwegen, L. Xue, W. J. Song, P. L. Li, G. Q. Li. *Cyclopentenone derivatives and polyhydroxylated sterols from the soft coral Sinularia acuta*. Chem. Biodivers., 12(2), 273-283 (2015).

Liên hệ: Nguyễn Hoài Nam

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: namnguyenhoai@imbc.vast.vn.