

CÁC DẪN CHẤT CỦA ACID NUCLEIC VÀ ACID BENZOIC TỪ NẤM LINH CHI THU HÁI TẠI QUẢNG NAM

Đỗ Thị Hà*, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Minh Khôi

Viện Dược liệu

* E-mail: hado.nimms@gmail.com

(Nhận bài ngày 02 tháng 7 năm 2014)

Tóm tắt

Từ phân đoạn nước của nấm linh chi (*Ganoderma lucidum* (W. Curtis ex Fr.) P. Karst.), bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phổ và các dữ liệu hóa lý, đã phân lập và nhận dạng cấu trúc của 2 hợp chất thuộc dẫn chất của acid nucleic gồm uracil (1), adenosin (2) và một dẫn chất của acid benzoic, acid gentisic (3). Trong đó hợp chất 1 và 3 lần đầu tiên phân lập từ nấm linh chi.

Từ khóa: Nấm linh chi, Uracil, Adenosin, Acid gentisic

Summary

Derivatives of nucleic and benzoic acids isolated from *Ganoderma lucidum* collected in Quangnam-Danang

Study on chemical compositions of the water fraction of methanol extract of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. (Ganodermataceae) resulted in isolation of 3 compounds (1 – 3). Their structures were identified by comparing their physicochemical and spectroscopic data to published values for three derivatives of nucleic acid including uracil (1), adenosine (2) and benzoic acid, gentisic acid (3)

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Adenosine, Uracil, Gentisic acid.

1. Đặt vấn đề

Nấm linh chi (*Ganoderma lucidum* (W. Curtis ex Fr.) P. Karst.) là một loại dược liệu quý, được sử dụng từ rất lâu trong y học cổ truyền của các nước Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và một số nước Đông Á khác trong đó có Việt Nam. Theo y học hiện đại, nấm linh chi được sử dụng trong phòng và điều trị các bệnh về tim mạch; hô hấp; gan, mật; thấp khớp; tiểu đường; ung thư;... [1], [2], [3]; với các tác dụng chính như: hạ cholesterol máu, hạ đường huyết; cải thiện chức năng vỏ thượng thận, duy trì chức năng nội tiết; ngăn ngừa và điều trị ung thư; chống dị ứng;... [1].

Hiện nay, trên thế giới có khoảng hơn 2000 bài báo khoa học về nấm linh chi được ghi nhận từ kỹ thuật nuôi trồng, xác định thành phần hóa học cho đến các hoạt tính sinh học, dược lý, công nghệ chiết xuất bào chế,... (thống kê của hệ thống ScienceDirect với từ khóa *Ganoderma lucidum*). Ở Việt Nam, nghiên cứu về nấm linh chi thường tập trung trên các lĩnh vực nuôi trồng và các tác dụng dược lý; những nghiên cứu về thành phần phân hóa học còn khá ít.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả

phân lập và nhận dạng cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ phân đoạn nước nấm linh chi làm cơ sở cho việc xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu và góp phần bổ sung thêm dữ liệu khoa học về thành phần hóa học của nấm linh chi thu hái tại Quảng Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là nấm linh chi thu hái từ tự nhiên tại Tiên Phước – Quảng Nam và được giám định tên khoa học bởi TS. Đỗ Hữu Thu, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu nghiên cứu được lưu tại khoa Hóa Thực vật – Viện Dược liệu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất:

Phân lập các hợp chất trong nấm linh chi bằng sắc ký cột (CC) và sắc ký lớp mỏng (TLC). Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là sephadex LH-20: silica gel pha thường (0,040 – 0,063 mm, Merck), pha đảo YMC-18. TLC được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60G F₂₅₄ (Merck), RP-18 (Merck). Phát hiện chất bằng đèn

từ ngoài ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10 % trong ethanol; nhưng bản mỏng trong thuốc thử, sấy khô rồi hơi nóng trên bếp điện để phát hiện vết chất.

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất:

Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ bao gồm: điểm chảy, phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều.

Điểm chảy được đo trên máy Kofler micro-hotstage.

Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electron Spray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD Trap.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Advance 500-Bruker AM500 FT-NMR. Chất nội chuẩn là tetramethyl silan (TMS).

2.3 Chiết xuất và phân lập

4,3 kg nấm linh chi chiết nóng bằng MeOH với tỷ lệ được liệu/dung môi là 1 : 15, ở 65°C, trong thời gian 3 giờ × 3 lần. Gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm và cô cách thủy đến cặn (260 g). Hòa tan hoàn toàn cặn trong nước và chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, dicloromethan, *n*-butanol với tỷ lệ 1 : 1, lắc 3 lần, gộp dịch chiết, cất quay dưới áp suất giảm thu được cặn *n*-hexan (24,2 g), cặn dicloromethan (70 g), cặn butanol (62,67) và cặn nước (47,3 g).

Từ cặn nước 10,4 g (lưu mẫu 36,9 g) tiến hành phân lập bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là sephadex LH-20, dung môi là methanol thu được 3 phân đoạn (ký hiệu là A1, A2 và A3). Phân đoạn A2 (2,57) cho qua cột sắc ký silica gel pha đảo, rửa giải bằng hệ dung môi gradient aceton - nước (1 : 2; 1 : 1; 2 : 1; 5 : 1) thu được 8 nhóm phân đoạn ký hiệu từ B1 -> B8. Nhóm phân đoạn B4 (0.41 g) được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột silica gel pha thường, hệ dung môi rửa giải là dicloromethan - methanol (10 : 1; 7 : 1; 5 : 1; 3 : 1) thu được hợp chất 2 (23,9 mg), hợp chất 3 (9,9mg) và 4 phân đoạn (ký hiệu từ C1 -> C4). Hòa tan phân đoạn C2 (70.7 mg) bằng lượng tối

thiểu methanol, tách lấy phần không tan, rửa tủa nhiều lần bằng MeOH, cô phần tủa sạch dưới áp suất giảm thu được hợp chất 1 (18,9 mg).

Chất 1: dạng bột màu trắng, nóng chảy ở nhiệt độ 250°C ít tan trong MeOH, tan trong DMSO; EI-MS *m/z*: 112,03 [M⁺]. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ_H 10,99 – 10,79 (2H, s, NH), 7,38 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-6), 5,45 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-5). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): C-5 (100,2), C-6 (142,1), C-4 (164,3), C-2 (151,5).

Chất 2: bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 234,5 – 235,5°C, tan trong MeOH; EI-MS *m/z*: 267,241 [M⁺]. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, MeOD), δ_H 3,77 (1H, dd, *J* = 3, 12,5 Hz, H5'b), 3,75 (2H, s, NH₂), 3,91 (1H, dd, *J* = 2,5, 12,5 Hz, H-5'a), 4,19 (1H, q, H-4'), 4,35 (1H, m, H-3'), 4,76 (1H, t, *J* = 5,5, 11,5 Hz, H-2'), 6,00 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, H-1'), 8,21 (1H, s, H-2), 8,33 (1H, s, H-8). Phổ ¹³C-NMR (125MHz, MeOD): C-5' (63,4), C-3' (72,6), C-2' (75,4), C-4' (88,1), C-1' (91,2), C-5 (113,6), C-8 (119,4), C-4 (141,9), C-2 (146,2), C-6 (153,5).

Chất 3: Bột màu trắng ngà; nhiệt độ nóng chảy 202 – 203°C; EI-MS *m/z*: 154,12 [M⁺]. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ_H 6,72 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3), 6,87 (1H, dd, *J* = 3,0, 9,0 Hz, H-4), 7,31 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, H-6). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD): δ_C C-1 (116,7), C-3 (117,9), C-6 (117,9), C-4 (122,8), C-5 (150,1), C-2 (155,9), C-7 (175,0).

3. Kết quả và bàn luận

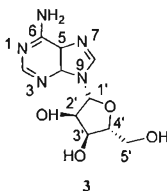
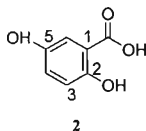
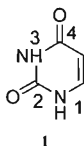
Chất 1: Dạng bột màu trắng, nóng chảy ở nhiệt độ 250°C, KLPT là 112.03. Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO) kết hợp với phổ DEPT cho thấy có 2 nhóm -CH= ở 100,2 và 142.1 ppm, 2 nhóm >C=O ở 151,5 và 164,3 ppm. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) cho thấy có 2 proton methin kề nối đôi (-CH=) ở 5,45 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H5) và 7,38 (1H, d, *J* = 8 Hz, H2), 2 proton ở 10,99 – 10,79 (2H, s) của nhóm NH. Từ những dữ kiện phổ ở trên so sánh với dữ liệu phổ hợp chất uracil công bố trong tài liệu tham khảo [4], [13] có thể suy ra hợp chất 1 thuộc nhóm acid nucleic có tên gọi là pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion hay uracil.

Chất 2: Chất bột màu trắng, nhiệt độ nóng

cháy 234,5 – 235,5°C. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất 2 nhận thấy sự xuất hiện của 2 tín hiệu proton vùng trường 8,21 (1H, s, H-2) và 8,33 (1H, s, H-8), được cho là do ảnh hưởng của hai nitro bên cạnh trong phân tử. Mặt khác sự xuất hiện của 5 proton ở khoảng 3.77 đến 4.76 và một oxygenated proton ở 6,00 thể hiện sự có mặt của vòng lacton 5 cạnh thế hydroxyl ở các vị trí 2'→5'. Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT của hợp chất 2 chỉ thấy xuất hiện tín hiệu của 10 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm methylen, 6 nhóm methin cùng với 3 carbon bậc 4. Từ cơ sở những dữ kiện trên, kết hợp so sánh với những dữ liệu phổ trong tài liệu [7], [8] nhận thấy hợp chất 2 chính là adenosin.

Chất 3: Chất màu trắng ngà; nhiệt độ nóng

cháy 202 – 203°C. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất 3 nhận thấy tín hiệu của các proton thơm tại vùng δ_H 6,72 – 7,31 ppm. Trong đó nhân thơm được thế tại 3 vị trí 1, 2 và 5 do xuất hiện các tín hiệu của 3 proton còn lại đặc trưng của vị trí 3, 4 và 6 tại δ_H 6,72 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-3), 6,87 (1H, dd, J = 3,0, 9,0 Hz, H-4), 7,31 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-6). Phổ ¹³C-NMR cho thấy sự có mặt của carbon vùng trường thấp thế hydroxy ở δ_C C-5 (150,1) và C-2 (155,9), carbon bậc 3 thuộc nhân thơm ở δ_C C-3 (117,9), C-6 (117,9), C-4 (122,8) và tín hiệu carbon của nhóm acid COOH (C-7) ở δ_C 175,0. Từ dữ liệu phân tích phổ ở trên kết hợp với so sánh dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [5], hợp chất 3 dự đoán là acid 2,5-dihydrobenzoic hay acid gentisic.



Hình 1. Các hợp chất phân lập từ phân đoạn nước của nấm linh chi (1 – 3)

Trong dược liệu, adenosin có trong thành phần của *Gleditsia aquatica* Marsh., *Lolium perenne* L.... [8], [7]. Từ sợi nấm của *Ganoderma capense*, adenosin đã được Yu G. J. và cộng sự phân lập lần đầu tiên vào năm 1979. Năm 1985, nhóm nghiên cứu của Shimizu A. đã tách adenosin từ hỗn hợp các nucleosid trong dịch chiết nước của nấm linh chi và chứng minh tác dụng ức chế kết tập tiểu cầu của nucleosid này [12]. Hiện nay, adenosin được

sử dụng như một loại thuốc có tác dụng chống loạn nhịp tim, chống viêm và ức chế hệ thần kinh trung ương [11].

Uracil lần đầu tiên được phân lập từ nấm linh chi, là một trong 4 loại nucleobase trong RNA. được tìm thấy trong trái khổ qua (*Momordica charantia* L.) [4], trong loài *Spongilla wagner* [13].

Acid gentisic (acid 2,5-dihydrobenzoic) là một dẫn xuất của acid benzoic, được tìm thấy

trong rượu vang [6]. Theo nhóm nghiên cứu của Ashidate K. (2005), acid gentisic có tác dụng ức chế quá trình oxy hóa LDL và ức chế sự hình thành của cholesterol ester hydroperoxyd [14]. Nghiên cứu chỉ ra tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của acid gentisic thử nghiệm trên mô hình ty thể gan chuột bị cô lập (RLM) và hồng cầu người. Sự có mặt của acid gentisic (GA) trong quá trình chiếu xạ làm giảm đáng kể mức độ phá hủy chất béo và protein trong RLM gây bởi bức xạ gamma. Hơn nữa, GA bảo vệ hồng cầu người chống lại sự phơi nhiễm bởi các bức xạ gamma. Các tác dụng chống oxy hóa của acid gentisic được cho là do đặc tính của các nhóm phenoxyl trong công thức phân tử [15].

Trong các nghiên cứu trước đây, nhóm tác giả đã phân lập được 2 hợp chất ergosteran (ergosterol và ergosterol peroxyd), 5 hợp chất lanostan triterpen gồm ganodermediol, ganoderiol F, lucidiol, acid lucidenic N, ganodermanontriol từ nấm linh chi thu hái tại Quảng Nam [9], [10].

Kết quả của nghiên cứu tiếp theo này bổ sung thêm cơ sở dữ liệu về hóa học của hai hợp chất nhóm acid nucleic và một dẫn chất nhóm acid benzoic góp phần làm cơ sở để xây dựng đầu vãn tay hóa học của nấm linh chi thu hái tại Quảng Nam.

4. Kết luận

Bằng các phương pháp sắc ký đã phân lập được 3 hợp chất từ phân đoạn nước của nấm linh chi thu hái tại Quảng Nam. Dựa vào các kết quả phổ nghiệm và so sánh với dữ liệu phổ công bố trong các tài liệu tham khảo đã nhận dạng được các hợp chất này là uracil (1), adenosin (2) và acid gentisic (3). Trong đó hợp chất 1 và 3 lần đầu tiên phân lập từ nấm linh chi.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia NAFOSTED:106.99-2011.47. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Viện Hóa Học - Viện Hàn Lâm Khoa Học trong việc đo dữ liệu phổ của các hợp chất tinh khiết.

Tài liệu tham khảo

- 1 Bộ Y tế (2011), *Dược liệu học*. Tập 1. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 135 – 139. 2. Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học, Hà Nội, tr. 671 – 672. 3. Đỗ Tất Lợi (2006), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học. 4. Ngô Hải Đăng, Phùng Văn Trung, Nguyễn Ngọc Hạnh (2011), "Khảo sát thành phần hóa học của trái khô qua (*Momordica charantia* L.)", *Tạp chí Khoa học*, 19a, tr. 53 – 59. 5. Ammar S. et al. (2008), "Mutagenic, antimutagenic and antioxidant activities of a new polyphenolic and a flavonoid substances isolated from *Anagallis monelli*", *Natural Product Research*, 22(8), pp. 658 – 665. 6. Ashidate K et al. (2005), "Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma", *European Journal of Pharmacology*, 523(3), pp. 173 – 179. 7. Denisa L et al. (2004), " β -Adenosine, bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production", *Phytochemistry*, 65, pp. 181 – 187. 8. Ehab A et al. (2010), "Acylated triterpenoidal saponins and cytokynins from *Gleditsia aquatica*", *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2(3), pp. 24 – 33. 9. Ha D. T et al. (2013), "In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress", *Journal of Ethnopharmacology*, 50(3), pp. 875 – 885. 10. Ha DT, Thuy PT, Khoi NM (2013), "Ergostane and lanostane steroids from fruiting body of *Ganoderma lucidum* collected in Quangnam – Danang", *Journal of Medicinal Materials*, 18(6), pp. 389 – 394. 11. Haskó G et al. (2008), "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases", *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (9), pp. 759 – 770. 12. Huie CW, Di X (2004), "Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components", *Journal of Chromatography B*, (2008). 13. Li YQ et al. (2010), "Study on the chemical constituents of *Spongilla wagneri*", *Zhong Yao Cai*, 33(1), pp. 60 – 61. 14. Tian RR et al. (2009), "Comparison of phenolic acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times", *Molecules*, 14(2), pp. 827 – 838. 15. Joshi R et al. (2012), "Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: in vitro and pulse radiolysis studies", *Free Radical Research*, 46(1), pp. 11 – 20.