

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ HỢP CHẤT HÓA HỌC TRONG DỊCH CHIẾT CHLOROFORM TỪ HOA ĐU ĐỦ ĐỰC (*CARICA PAPAYA* L.) THU HÁI Ở QUẢNG NAM – ĐÀ NẴNG

STUDY ON ISOLATION AND DETERMINATION STRUCTURE SOME COMPOUNDS OF THE CHLOROFORM EXTRACT OF MALE *CARICA PAPAYA* FLOWERS FROM QUANG NAM - DA NANG

Đỗ Thị Thúy Vân¹, Phạm Văn Vượng², Lê Thị Thanh Phương³, Đào Hùng Cường¹, Giang Thị Kim Liên⁴

¹Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng; dttvan@ued.udn.vn

²Bệnh viện Quân Y 17 – Đà Nẵng; vuongds17@gmail.com

³Trường THPT Lê Hồng Phong – Quảng Nam; lephuongspdn@gmail.com

⁴Đại học Đà Nẵng; gtklien@ac.udn.vn

Tóm tắt - Hoa đu đủ đực (*Carica papaya* L.) được sử dụng nhiều trong dân gian để điều trị các bệnh về đường hô hấp. Trong nghiên cứu này, hoa đu đủ đực được thu hái tại một số địa điểm thuộc thành phố Đà Nẵng và tỉnh Quảng Nam. Nguyên liệu sau khi xử lý sơ bộ được chiết bằng dung môi methanol, quay khô thu được cao chiết tổng. Cao tổng methanol được chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexane, chloroform, dichloromethane và ethyl acetate. Bài báo này công bố kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất hóa học của phân đoạn chloroform bao gồm rutin (1), acid gallic (2), daucosterol (3). Cấu trúc các hợp chất được xác định dựa trên phân tích phổ NMR, phổ MS và so sánh với các dữ liệu trong tài liệu tham khảo

Từ khóa - *Carica papaya*; hoa đu đủ đực; rutin; acid gallic; daucosterol.

Abstract - Male flowers of *Carica papaya* are widely used in folk to treat respiratory diseases. In this research, male papaya flowers were collected in the some places of Danang city and Quangnam province. Pretreated ingredients were fractionally extracted with methanol solvent. Total methanol extract was fractionally separated by solvents with increasing polarization: *n*-hexane, chloroform, dichloromethane and ethyl acetate respectively. This article is about the chemical compounds of chloroform extraction. Three known compounds, rutin (1), acid gallic (2), daucosterol (3) were isolated and determined structure from the chloroform extract of male *Carica papaya* flowers. Their structure were determined by analysis of MS, NMR spectra and comparison with the published data.

Key words - *Carica papaya*; male *Carica papaya* flowers; rutin; acid gallic; daucosterol.

1. Đặt vấn đề

Cây đu đủ thuộc họ đu đủ (Caricaceae), có nguồn gốc châu Mỹ, được trồng khắp nơi ở nước ta. Trên thế giới, họ đu đủ gồm có 4 chi và 45 loài. Ở nước ta có một chi và một loài [1, 2]. Trong dân gian lá cây đu đủ được sử dụng để sát khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, chữa sốt rét, trừ giun sán [2, 4]. Gần đây, người dân địa phương ở Quảng Nam – Đà Nẵng đã sử dụng hoa cây đu đủ đực để điều trị các bệnh về đường hô hấp như viêm họng, ho, viêm cuống phổi, khàn tiếng hoặc mất tiếng ở người lớn, nhất là ở trẻ em. Ngoài ra, trong dân gian hoa đu đủ đực còn được coi như thần dược để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư như: Ung thư phổi, ung thư vú và ung thư gan [5]. Đã có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của lá đu đủ và quả đu đủ [2, 4, 6]. Thế nhưng vẫn còn rất ít nghiên cứu về bộ phận hoa của chúng.

Bài báo này trình bày kết quả phân lập ba hợp chất hóa học bao gồm rutin (1), acid gallic (2), daucosterol (3) từ dịch chiết chloroform của hoa đu đủ đực. Cấu trúc các hợp chất được xác định dựa trên sự phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ khối (MS) và so sánh với các dữ liệu trong tài liệu tham khảo.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Hoa đu đủ đực được thu hoạch vào tháng 12/2016 tại Quảng Nam – Đà Nẵng và đã được TS. Ngô Văn Trại (Chuyên gia cây thuốc Việt Nam – Viện dược liệu), ThS. Nguyễn Thế Anh và ThS. Hồ Ngọc Anh (Viện Hóa

học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam) xác định tên khoa học là *Carica papaya* L. (họ Đu đủ – Caricaceae). Mẫu tiêu bản ký hiệu DD001 hiện đang được lưu giữ tại phòng tiêu bản của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hoa đu đủ đực sau khi thu hái sẽ được rửa sạch, để ráo nước, phơi khô và xay thành bột. Bột hoa đu đủ đực có màu vàng nhạt, được bảo quản trong tủ lạnh để sử dụng cho nhiều nội dung thực nghiệm.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Dung môi: *n*-hexane, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), nước cất.

Dụng cụ, thiết bị: Cốc thủy tinh, các loại pipet, cột sắc ký, giấy lọc, cân phân tích, máy siêu âm, máy cô quay chân không.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufoilen 60F₂₅₄ và RP-18 F₂₅₄S (Merck, Đức). Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ pha thường (silica gel, 240-430 mesh, Merck, Đức) và pha đảo YMC (30-50 µm, Fujisilisa Chemical Ltd.). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 6120 mass spectrometer.

2.3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Bột hoa đu đủ đực (5,0 kg) được ngâm chiết siêu âm 3 lần với methanol (8 lít, 50°C, 30 phút). Dịch MeOH được lọc qua giấy lọc nhiều lần, gom lại và đem cất loại dung môi dưới áp suất thấp thu được 300 g cao chiết MeOH.

Cao chiết này sau đó được hòa tan với nước cất rồi tiến hành chiết phân bố 2 lần, lần lượt với các dung môi *n*-hexane (5 lít), chloroform (5 lít), dichloromethane (5 lít) và ethyl acetate (5 lít). Các dịch chiết này được đem cất loại dung môi dưới áp suất thấp thu được các cao chiết tương ứng *n*-hexane (CPH, 54g), chloroform (CPC, 12g), dichloromethane (CPD, 52g) và ethyl acetate (CPET, 20g). Cao chiết chloroform (CPC, 12g) được hòa tan với một lượng tối thiểu chloroform, sau đó tẩm với 50 g silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách hỗn hợp này bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/ methanol với độ phân cực tăng dần (dichloromethane/ methanol, 99:1 → 10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn CPC1 (3,4g), CPC2 (1,8g), CPC3 (1,4g), CPC4 (1,2g) và CPC5 (2,3g) [3].

Phân đoạn CPC2 (1,8 g) được phân tách bằng cột silica gel pha đảo, rửa giải với hệ dung môi methanol/ nước (2/1, v/v) thu được 3 phân đoạn từ CPC2A đến CPC2C. Hợp chất **1** (10 mg) thu được sau khi sử dụng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/ methanol/ nước (3/1/0,1, v/v) cho phân đoạn CPC2B.

Phân đoạn CPC5 (2,3 g) được cho qua cột silicagel pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane/ methanol (95/5, v/v) thu được 4 phân đoạn từ CPC5A đến CPC5D. Hợp chất **2** (3 mg) thu được sau khi sử dụng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/ methanol (4/1, v/v) cho phân đoạn CPC5B. Tiến hành cô quay khô và hòa tan phân đoạn CPC5D vào dung môi ethyl acetate thu được kết tủa trắng, hòa tan kết tủa và kết tinh lại trong hệ dung môi dichloromethane/ methanol (1/1, v/v) thu được hợp chất **3** (27 mg).

Rutin (**1**): Tinh thể hình kim màu vàng, điểm nóng chảy 190-193°C. Phổ khối ESI-MS (*m/z*) 633,1 [M+Na]⁺, C₂₇H₃₀O₁₆. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR, xem Bảng 1.

Acid gallic (**2**): Tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 236-238°C. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR, xem Bảng 2.

Daucosterol (**3**): Chất bột màu trắng, điểm nóng chảy 283-286°C. Phổ khối ESI-MS (*m/z*) 397,3 [M-C₆H₁₂O₆+H]⁺, C₃₅H₆₀O₆. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR, xem Bảng 3.

3. Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng, điểm nóng chảy 190-193°C. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 633,1 [M+Na]⁺, C₂₇H₃₀O₁₆. Phổ ¹H-NMR của **1** cho thấy sự xuất hiện hai tín hiệu doublet của proton vòng A tại δ_H 6,23 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6); 6,42 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8) và ba tín hiệu doublet khác tại δ_H 7,69 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-2'); 6,89 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5'); 7,65 (dd, *J* = 8,0; 2,5 Hz, H-6') của vòng B thể 1, 3, 4. Điều này chứng tỏ cấu trúc phần aglycon của hợp chất **1** là quercetin. Phổ ¹³C-NMR của **1** xuất hiện tín hiệu 15 nguyên tử carbon của khung flavonoid, bao gồm 5 carbon nhóm CH vùng thơm (δ_C nằm trong vùng từ 94,9 đến 123,5), 1 carbon của nhóm carbonyl (δ_C 179,4) và 9 carbon bậc 4. Tín hiệu cộng hưởng của các nhóm CH nằm trong vùng δ_H 3,25-3,83 trên phổ ¹H-NMR và δ_C 68,5-78,1 trên phổ ¹³C-NMR cùng với sự xuất hiện hai tín hiệu doublet của proton anomer tại δ_H 4,54 (1H, d,

J = 1,5 Hz, H-1'''); 5,12 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1'') và các tín hiệu của nhóm methyl, methylene ở δ_C 17,8; 68,5 trên phổ HSQC cho thấy trong cấu trúc của **1** có chứa hai gốc đường α-L-rhamnopyranosyl và β-D-glucopyranosyl. Trên phổ HMBC của **1** nhận thấy có sự tương tác giữa proton anomer của cấu tử đường glucopyranosyl (δ_H 5,12) và carbon C-3 của khung flavonoid (δ_C 135,6) cho thấy gốc đường glucopyranosyl được gắn vào vị trí C-3 của phần khung aglycon.

Bảng 1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **1** và hợp chất tham khảo

C	δ _C [#]	δ _C ^{a, b}	δ _H ^{a, c} (<i>J</i> , Hz)
Aglycon			
2	158,4	158,5	-
3	135,6	135,6	-
4	179,3	179,4	-
5	162,8	162,9	-
6	99,9	99,9	6,23 (d, 2,0)
7	165,9	166,0	-
8	94,9	94,9	6,42 (d, 2,0)
9	159,3	159,3	-
10	105,6	105,6	-
1'	123,6	123,1	-
2'	116,2	117,7	7,69 (d, 2,5)
3'	145,7	145,8	-
4'	149,7	149,8	-
5'	117,7	116,1	6,89 (d, 8,0)
6'	123,1	123,5	7,65 (dd, 8,0; 2,5)
3-O-β-D-glucopyranoside			
1''	102,3	104,7	5,12 (d, 7,5)
2''	75,6	75,7	3,25-3,47 (m)
3''	78,1	78,1	3,25-3,47 (m)
4''	71,3	71,4	3,25-3,47 (m)
5''	77,1	77,2	3,25-3,47 (m)
6''	68,6	68,5	3,49-3,83 (d, 10,5; 1,0)
6''-O-α-L-rhamnopyranoside			
1'''	104,7	102,4	4,54 (d, 1,5)
2'''	72,0	72,2	3,65 (dd, 3,5; 1,5)
3'''	72,2	72,1	3,56 (m)
4'''	73,9	73,9	3,28 (m)
5'''	69,6	69,7	3,32 (m)
6'''	17,8	17,8	1,14 (d, 6,0)

[#]δ_C của rutin [7], ^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Trên phổ HMBC cũng cho thấy, tương tác giữa proton anomer của cấu tử đường rhamnopyranosyl tại δ_H 4,54 (1H, d, *J* = 1,5 Hz, H-1''') với carbon C-6'' (δ_C 68,5) của cấu tử đường glucopyranosyl, tương tác giữa proton H-6'' của cấu tử đường glucopyranosyl tại δ_H 3,83 (1H, dd, *J* = 10,5/1,0 Hz, H_b-6'') với carbon C-1''' của cấu tử đường rhamnopyranosyl (δ_C 102,4) cho thấy 2 cấu tử đường này liên kết với nhau qua cầu oxí giữa C-1''' và C-6''. Từ dữ kiện phổ NMR thu được kết hợp so sánh với số liệu phổ NMR của rutin được công bố trong tài liệu [7], khẳng định hợp chất **1** là rutin.

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 236-238°C. Trên phổ ¹H-NMR của **2** xuất hiện duy nhất một tín hiệu singlet ở vùng thơm

tại δ_H 7,08 (2H, s, H-2, H-6) cho thấy, hợp chất **2** có chứa vòng thơm bị thế ở 4 vị trí có trục đối xứng. Trên phổ ^{13}C -NMR của **2** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 6 nguyên tử carbon thuộc vòng thơm bao gồm 2 nhóm CH và 4 carbon bậc bốn. Bên cạnh đó, cũng xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của một nguyên tử carbon thuộc nhóm carbonyl tại δ_C 170,4 (C-7). Tín hiệu cộng hưởng của CH tại δ_C 110,3 (C-2, C-6) và của carbon bậc bốn tại δ_C 146,3 (C-3, C-5) với cường độ pic cao gấp đôi các tín hiệu cộng hưởng khác đã khẳng định hợp chất **2** chứa một vòng thơm bị thế ở 4 vị trí có trục đối xứng, trong đó có một nhóm thế carboxyl. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất **2** với dữ liệu phổ của hợp chất tham khảo ở tài liệu [8], kết luận hợp chất **2** là acid gallic.

Bảng 2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **2** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\text{#}, \text{a}}$	$\delta_C^{\text{a}, \text{b}}$	$\delta_H^{\text{a}, \text{c}}$ (J, Hz)
1	121,0	122,0	-
2	109,0	110,3	7,08 (s)
3	145,9	146,3	-
4	138,3	139,5	-
5	145,9	146,3	-
6	109,0	110,3	7,08 (s)
7	168,0	170,4	-

[#] δ_C của acid gallic [8], ^ađo trong CD_3OD , ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Hợp chất **3** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng, điểm nóng chảy 283-286°C. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 397,3 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6+\text{H}]^+$, $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$. Phổ ^1H -NMR của **3** cho thấy, sự có mặt của hợp chất có khung sterol đặc trưng bởi các tín hiệu của 2 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,68 (s, H-18); 0,96 (s, H-19), 3 nhóm methyl bậc hai tại δ_H 0,91 (d, $J = 6,5$ Hz, H-21); 0,83 (d, $J = 6,8$ Hz, H-29); 0,81 (d, $J = 6,8$ Hz, H-28) và 1 nhóm methyl bậc một tại δ_H 0,84 (t, $J = 7,6$ Hz, H-26). Trên phổ cũng xác nhận sự có mặt của một proton olefin tại δ_H 5,32 (br s, H-6). Sự xuất hiện của một phân tử đường glucose cũng được xác định trên phổ ^1H -NMR bởi tín hiệu proton anomer tại δ_H 4,22 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'). Phổ ^{13}C -NMR của **3** xuất hiện tín hiệu của 35 carbon, trong đó 29 tín hiệu được xác định là phụ thuộc vào khung sterol và 6 tín hiệu còn lại đặc trưng cho một đường glucose tại δ_C 100,79 (C-1'); 73,42 (C-2'); 76,67 (C-3'); 70,08 (C-4'); 76,67 (C-5'); 61,07 (C-6'). Trên phổ HMBC, tín hiệu tương tác giữa proton anomer δ_H 4,22 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1') với C-3 (δ_C 76,94) cho phép xác định vị trí liên kết của đơn vị đường vào vị trí C-3; tương tác giữa proton olefin δ_H 5,32 (br s, H-6) với C-4 (δ_C 38,29)/C-8 (δ_C 31,38)/C-10 (δ_C 36,16) cho thấy, sự tồn tại của một nối đôi tại C5/C6. Từ những dữ kiện phổ NMR thu được kết hợp so sánh với số liệu phổ NMR của daucosterol được công bố trong tài liệu tham khảo [9], khẳng định hợp chất **3** là daucosterol, một hợp chất khá phổ biến trong các loài thực vật.

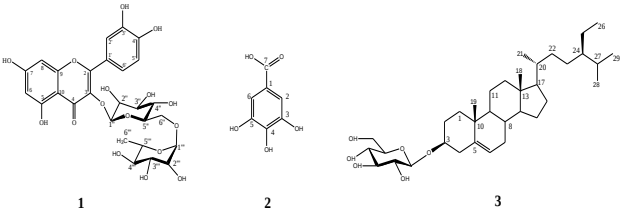
Bảng 3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **3** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\text{#}, \text{a}}$	$\delta_C^{\text{a}, \text{b}}$	$\delta_H^{\text{a}, \text{c}}$ (J, Hz)
Aglycon			
1	37,0	36,79	
2	31,6	29,22	

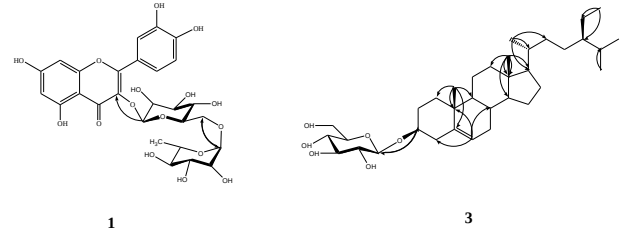
3	78,9	76,94	3,43 (m)
4	39,5	38,29	
5	141,6	140,42	
6	121,9	121,10	5,32 (br s)
7	31,6	31,32	
8	31,7	31,38	
9	50,0	49,58	
10	36,5	36,16	
11	20,8	20,55	
12	38,5	39,33	
13	42,1	41,81	
14	56,5	56,14	
15	24,5	23,80	
16	28,7	27,72	
17	55,8	55,42	
18	12,0	11,61	0,68 (s)
19	19,0	18,90	0,96 (s)
20	36,0	35,43	
21	18,5	18,56	0,91 (d, 6,5)
22	34,0	33,33	
23	28,0	25,46	
24	45,7	45,13	
25	28,9	28,70	
26	19,5	19,63	0,84 (t, 7,6)
27	22,8	22,58	
28	18,7	19,03	0,81 (d, 6,8)
29	12,0	11,73	0,83 (d, 6,8)

3-O-β-D-glucopyranoside			
1'	100,9	100,79	4,22 (d, 8,0)
2'	73,2	73,42	2,90 (m)
3'	76,2	76,67	3,12 (m)
4'	70,0	70,08	3,02 (m)
5'	75,4	76,67	3,08 (m)
6'	61,7	61,07	3,40 (m)
			3,64 (dd, 6,0;10,0)

[#] δ_C của daucosterol [9], ^ađo trong $\text{DMSO}-d_6$, ^b125 MHz, ^c500 MHz.



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



Hình 2. Các tương tác HMBC chính của hợp chất **1, 3**

4. Kết luận

Từ cao chiết chloroform của hoa đu đủ đực (*Carica papaya* L.), bằng các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ NMR, MS kết hợp nhóm tác giả đã phân lập và xác định được cấu trúc của 3 hợp chất hóa học là rutin (1), acid gallic (2), daucosterol (3).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học Hà Nội, 2004.
- [2] Ho Thi Ha, Do Thi Hoa Vien, Le Quang Hoa, "The study on bioactive properties of some compounds from *Carica papaya* leaves", *Vietnam Journal of Science and Technology*, 2+3, 1994, pp. 119-122.
- [3] Nguyễn Kim Phi Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh, 2007.
- [4] Krishna K.L., Paridhavi M. and Jagruti A Patel, "Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.)", *Natural Product Radiance*, 7(4), 2008, pp. 364-373.
- [5] Marline Nainggolan and Kasmirul, "Cytotoxicity activity of male *Carica papaya* L. flowers on MCF-7 breast cancer cells", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), 2015, pp. 772-775.
- [6] A. P. de Almeida, M. M. F. S. Miranda, I. Simoni, M. D. Wigg, M. H. C. Lagrota, S. Costa, "Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion", *Phytotherapy Research*, 12, 1998, pp. 562-567.
- [7] Ahmad S.A., Catalano S., Marsili A., Morelli I., Scartoni V. (1977), "Chemical examination of the leaves of *Ardisia solanacea*", *Planta Medica*, 32(6), pp. 162-164.
- [8] Eldahshan O.A., "Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of Carob leaves grown in Egypt", *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), 2011, pp. 52-55.
- [9] Laurence V., Catherine L., Georges M., Thierry S., Hamid A. H., "Cytotoxic isoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*", *Phytochemistry*, 50, 1999, pp. 63-69.

(BBT nhận bài: 04/12/2019, hoàn tất thủ tục phản biện: 13/01/2020)