

CÁC HỢP CHẤT TRITERPENOID TỪ QUẢ THỂ NẤM CỎ LINH CHI (*Ganoderma australe* (Fr.) Pat.)

Đỗ Xuân Hưng⁽¹⁾, Trần Trung Hiếu⁽¹⁾,
Đặng Ngọc Quang⁽²⁾, Trần Đình Thắng⁽³⁾

¹ Viện Sư phạm Tự nhiên, Trường Đại học Vinh

² Khoa Hóa, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

³ Viện Công nghệ Hóa, Sinh và Môi trường, Trường Đại học Vinh

Ngày nhận bài 5/6/2020, ngày nhận đăng 31/7/2020

Tóm tắt: Từ dịch chiết metanol của nấm cỏ linh chi (*Ganoderma australe*), bằng các phương pháp sắc kí đã phân lập được ba hợp chất và xác định cấu trúc các hợp chất này bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-, ¹³C-NMR, DEPT, HMBC HSQC và COSY). Các hợp chất được xác định là ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y và ganoderal A.

Từ khóa: *Ganoderma australe*; *Ganodermataceae*; ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y; ganoderal A.

1. Mở đầu

Ganoderma là một chi thuộc họ Ganodermataceae, với gần 300 loài phân bố rộng rãi ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam và nhiều nước châu Á khác. Linh chi chứa hơn 400 hợp chất bao gồm: triterpenoid, polysaccharide, nucleotide, sterol, steroid, axit béo, protein, peptide và các nguyên tố vi lượng, với các hoạt tính sinh học như chống xơ vữa động mạch, chống viêm, tăng cường hệ miễn dịch, chống ung thư, kháng khuẩn và vi rút, bảo vệ gan, chống lão hóa... [1, 2]. Nấm cỏ linh chi (*G. australe* (Fr.) Pat.) được tìm thấy ở một số vùng ở Việt Nam như Nghệ An, Quảng Bình, Thừa Thiên - Huế, được dùng để chữa bệnh. Chỉ mới có một số ít công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của loài này. Amolak C. J. và cộng sự [3] đã phân lập được 4 hợp chất từ loài nấm này ở Ấn Độ gồm 3 sterol là ergosterol, ergosterol palmitate, ergosta-7,22-dien-3-on và một lanostane triterpenoid là lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,21-diol. Gerber và cộng sự [4] đã tách được 5 triterpenoid là các axit applanoxidic A, C, F, G và H; cùng 3 sterol là 5 α -ergost-7en-3 β -ol, 5 α -ergost-7,22-dien-3 β -ol và 5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergost-6,22-dien-3 β -ol. Từ nguồn nguyên liệu nấm tự nhiên ở Bố Trạch, Quảng Bình, chúng tôi tiến hành phân lập 3 hợp chất triterpenoid, ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y và ganoderal A từ loài nấm cỏ linh chi (*G. australe*) bằng các phương pháp sắc ký và xác định cấu trúc hoá học bằng sự kết hợp các phương pháp phổ. Các hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài nấm này.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị

Sắc ký lớp mỏng sử dụng loại tráng sẵn silica gel 60F₂₄₅ (Merck), hiện hình bằng đèn UV và hơi iot. Chất hấp phụ silica gel 230-400mesh (Merck) được sử dụng trong sắc ký cột. Nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy Yanaco MP-S3. Phổ cộng hưởng từ hạt

nhân $^1\text{H-NMR}$ được đo trên máy Bruker 500MHz; phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC và COSY được đo trên máy Bruker 500 MHz tại Phòng Phân tích cấu trúc, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Nguyên liệu

Nấm cô linh chi (*G. australe*) được thu hái ở Bồ Trạch, Quảng Bình vào tháng 08/2019. Mẫu được định danh bởi PGS. TS. Ngô Anh, Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Tiêu bản được lưu giữ tại Viện Công nghệ Hóa, Sinh và Môi trường, Trường Đại học Vinh.

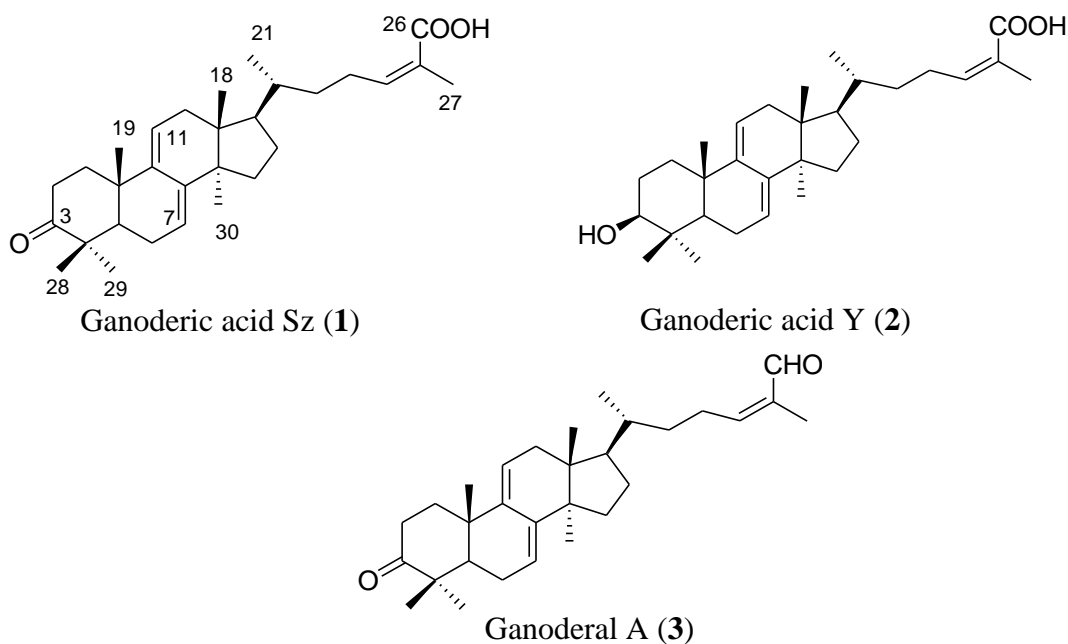
2.3. Phân lập các hợp chất

Mẫu nấm được sấy khô ở nhiệt độ từ 40-50 $^{\circ}\text{C}$ trong 48 giờ, sau đó được xay nhỏ (6,5 kg) và chiết với MeOH bằng siêu âm (20Lx 3lần). Tiến hành lọc. Dịch lọc được cất loại dung môi bằng thiết bị quay cất chân không dưới áp suất giảm, thu được cao metanol (754 g). Phân bố cao metanol trong nước, sau đó chiết lần lượt với các dung môi ethyl acetate và butanol, quay cất chân không thu được 442 g cao ethyl acetate và 167 g cao butanol và dịch nước.

Cao ethyl acetate được phân tách trên cột silicagel, với hệ dung môi rửa giải là chloroform : methanol (100:0, 40:1 : 30:1; 20:1; 10:1: 4:1; 2:1), thu được 10 phân đoạn. Phân đoạn 3 được phân tách lại bằng sắc ký cột với hệ dung môi chloroform : methanol (30:1) thu được chất hợp chất **3** (138 mg), chất **1** (360 mg) và hợp chất **2** (10 g).

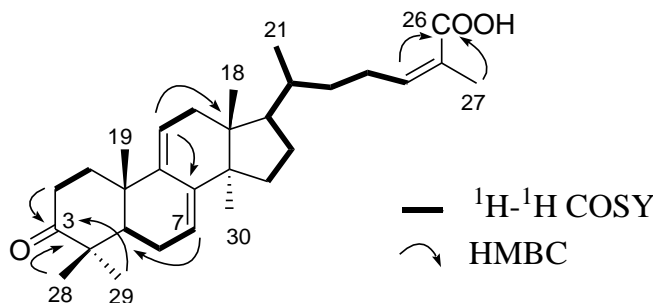
3. Kết quả và thảo luận

Từ dịch chiết methanol của nấm cô linh chi, bằng các phương pháp sắc ký cột trên silica gel đã phân lập được hợp chất **1**, **2** và **3**.



Hình 1: Cấu trúc của các hợp chất 1-3

Phổ ^1H NMR của hợp chất **1** có ba olefinic proton với độ chuyển dịch hóa học lần lượt là 5,05, d, $J = 6,5$ Hz; 5,39, d, $J = 3,5$ Hz và 6,08, t, $J = 7,5$ Hz, năm nhóm methyl có dạng vân đơn, một nhóm methyl có dạng vân đôi 0,92, d, $J = 6,5$ Hz và một nhóm methyl có dạng vân đơn liên kết với liên kết đôi có độ chuyển dịch hóa học ở 1,92 ppm. Ngoài ra, phổ ^1H NMR của hợp chất **1** còn có nhiều nhóm -CH- và -CH₂ như liệt kê trong bảng 1. Phân tích phổ ^{13}C NMR của hợp chất **1** cho thấy có 30 tín hiệu, bao gồm một nhóm ketone vòng 216,9 ppm, một nhóm carboxylic acid liên hợp (172,6 ppm) và ba liên kết đôi. Phổ DEPT cho biết chất **1** có 5 nhóm CH, 8 nhóm CH₂, 7 nhóm CH₃ và 10 carbon bậc 4. Như vậy, hợp chất **1** được dự đoán là một lanostane triterpenoid. Phổ ^1H - ^1H COSY có các tương quan giữa i) H-1 và H-2; ii) H-6 và H-5, H-7; iii) H-11 và H-12; các tương quan khác như trong hình 2. Phân tích phổ 2D NMR (HSQC và HMBC) (hình 2) cho thấy nhóm ketone vòng ở vị trí C-3 do tương tác xa HMBC giữa H-2, H-28, H-29 và C-3. Trong khi đó, nhóm carboxylic acid được xác định tại C-26 do nó có tương quan HMBC với H-24 và H-27. Hai liên kết đôi cũng được xác định ở C₇₋₈ và C₉₋₁₁ do các tương quan HMBC: i) H-7 và C-5, C-6, C-9; ii) H-11 và C-8, C-10, C-13. Từ các kết quả phân tích phổ của hợp chất **1**, chúng tôi kết luận hợp chất này là ganoderic acid Sz (**1**) (Hình 1). Trước đó, ganoderic acid Sz (**1**) đã được tinh sạch và xác định cấu trúc từ nấm *Ganoderma lucidum* thu mua ở Thượng Hải, Trung Quốc [5] và nấm *Ganoderma oerstedii* ở Mexico [6]. Hợp chất ganoderic acid Sz (**1**) có hoạt tính hoạt hóa hệ miễn dịch với IC₅₀ là 44,6 μM [7].



Hình 2: Các tương quan 2D NMR quan trọng của hợp chất **1**

Bảng 1: Dữ liệu phổ ^1H NMR của các hợp chất **1-3** (CDCl_3)

STT	Hợp chất 1	Hợp chất 2	Hợp chất 3
1	1,76, m 2,27, m	1,98, m 1,57, m	1,75, m 2,21, m
2	2,77, dt, 5,5, 14,5 2,35, ddd, 3,5, 4,5, 6,0	2,00, m 1,71, m	2,70, m 2,32, m
3		3,26, dd, 4,5, 12,0	
5	1,54, dd, 4,0, 12,0	1,09, dd, 5,0, 11,0	1,50, m
6	2,22, m 2,06, m		
7	5,50, d, 6,5	5,47, d, 5,5	5,43, d, 6,0
11	5,39, d, 3,5	5,32, d, 6,0	5,31, d, 5,5

STT	Hợp chất 1	Hợp chất 2	Hợp chất 3
12	2,25, <i>m</i> 2,12, <i>m</i>	2,20, <i>m</i> 2,10, <i>m</i>	
15	1,38, <i>m</i> 1,66, <i>m</i>	1,38, <i>m</i> 1,62, <i>m</i>	
16	1,31, <i>m</i> 2,01, <i>m</i>	2,09, <i>m</i>	
17	1,61, <i>m</i>	1,57, <i>m</i>	1,56, <i>m</i>
18	0,59, <i>s</i>	0,57, <i>s</i>	0,51, <i>s</i>
19	1,20, <i>s</i>	1,00, <i>s</i>	1,04, <i>s</i>
20	1,42, <i>m</i>	1,41, <i>m</i>	1,40, <i>m</i>
21	0,92, <i>d</i> , 6,5	0,92, <i>d</i> , 6,5	0,87, <i>d</i> , 6,5
22	1,53, <i>m</i> 1,16, <i>m</i>	1,54, <i>m</i> 1,18, <i>m</i>	
23	2,57, <i>m</i> 2,46, <i>m</i>	2,57, <i>m</i> 2,46, <i>m</i>	
24	6,08, <i>t</i> , 7,5	6,08, <i>t</i> , 7,5	6,42, <i>t</i> , 7,0
26			9,30, <i>s</i>
27	1,92, <i>s</i>	1,92, <i>s</i>	1,70, <i>s</i>
28	0,88, <i>s</i>	0,88, <i>s</i>	1,00, <i>s</i>
29	1,09, <i>s</i>	1,08, <i>s</i>	1,12, <i>s</i>
30	1,13, <i>s</i>	0,88, <i>s</i>	0,80, <i>s</i>

Bảng 2: Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của các hợp chất 1-3 (CDCl_3)

STT	Hợp chất 1	Hợp chất 2	Hợp chất 3
1	36,6	35,8	36,7
2	34,8	27,9	34,9
3	216,9	79,0	217,1
4	47,5	38,7	47,5
5	50,7	49,2	50,7
6	23,7	23,0	23,7
7	119,9	120,2	120,1
8	142,9	140,7	142,7
9	144,5	142,7	144,6
10	37,2	37,4	37,2
11	117,3	116,3	117,2
12	37,8	37,8	37,8
13	43,8	43,8	43,8
14	50,3	50,3	50,3

STT	Hợp chất 1	Hợp chất 2	Hợp chất 3
15	31,5	31,5	28,0
16	27,9	27,8	31,5
17	50,9	50,9	50,8
18	15,7	15,8	15,7
19	22,1	22,8	22,1
20	36,2	36,2	36,2
21	18,3	18,3	18,3
22	35,8	35,7	34,7
23	26,9	26,9	26,1
24	147,0	145,9	155,7
25	125,8	125,8	139,1
26	172,6	172,5	195,6
27	20,5	20,5	9,2
28	25,4	25,6	25,4
29	25,4	28,2	25,4
30	22,5	15,7	22,5

Hợp chất 2 cũng có các dữ liệu phổ hoàn toàn tương tự như hợp chất 1, chỉ có một sự khác biệt là dữ liệu phổ của hợp chất 2 không có nhóm ketone vòng, thay vào đó là tín hiệu của nhóm hydroxyl ở vị trí C-3 (3,26, *dd*, $J = 4,5, 12,0$ Hz trong phổ ^1H NMR và 79,0 ppm trong phổ ^{13}C NMR). Cấu hình tương đối của 3-OH được xác định là β -equatorial do có hằng số tách J lớn [8]. Vị trí 3-OH được khẳng định bởi tương tác xa HMBC giữa C-3 và H-2, H-28, H-29. Như vậy, hợp chất 2 được xác định là ganoderic acid Y [8]. Hợp chất này có hoạt tính gây độc tính tế bào ung thư biểu mô KB, với $\text{IC}_{50} = 77,65 \mu\text{g/ml}$ [8].

Hợp chất 3 cũng có dữ liệu phổ NMR trùng với hợp chất 1, tuy nhiên ở vùng trường yếu trong phổ ^1H NMR xuất hiện một vân đơn với độ chuyển dịch hóa học khá lớn ở 9,30 ppm và tín hiệu ở 195,6 ppm trong phổ ^{13}C NMR, được dự đoán hợp chất 3 có nhóm aldehyde. Vị trí của nhóm aldehyde được xác định ở C-26 do tương tác xa HMBC giữa H-24, H-27 và C-26. Do vậy, hợp chất 3 được xác định là ganoderal A (3). Nó được tìm thấy trong nấm *Ganoderma concinna* thu ở Columbia [9] và *Ganoderma lucidum* thu ở Nhật Bản [10]. Qua nghiên cứu thăm dò cho thấy hợp chất 3 có hoạt tính ức chế acetylcholinesterase [10].

4. Kết luận

Quả thể nấm cổ linh chi (*Ganoderma australe*) được ngâm chiết với dung môi chọn lọc, rồi cất loại dung môi đã thu được các cao tương ứng. Phân lập các hợp chất từ các cao chiết bằng phương pháp sắc ký thu được hợp chất 1, 2 và 3. Xác định cấu trúc các hợp chất bằng các phương pháp phổ 1D-NMR và 2D-NMR đã cho phép khẳng định các chất là ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y và ganoderal A.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Sanodiya B. S., Thakur G. S., Baghel R. K., Prasad G. B. K. S., Bisen P. S., “*Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus”, *Curr. Pharm. Biotech.*, 10, 717-742, 2009.
- [2] Russell R., Paterson M., “*Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory”, *Phytochemistry*, 67 (18), 1985-2001, 2006.
- [3] Amolak C. J., Sushil K. G., “The isolation of lanosta-7,9(II),24-trien-3 β ,21-diol from the fungus *Ganoderma australe*”, *Phytochemistry*, 23, 686-689, 1984.
- [4] Gerber A. L., Smania A. Jr., Delle Monache F., Biachi N. Jr., and Smania E. F. A., “Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllphoromycetidae)”, *Int. J. Med. Mushr.*, 2, 303-311, 2000.
- [5] Li C., Yin J., Guo F., Zhang D., Sun H. H., “Ganoderic acid Sz, a new lanostanoid from the mushroom *Ganoderma lucidum*”, *Nat. Prod. Res.*, 19(5), 461-465, 2005.
- [6] Mendoza G., Suárez-Medellín J., Espinoza C., Ramos-Ligonio A., Fernández J.J., Norte M., Trigos Á., “Isolation and characterization of bioactive metabolites from fruiting bodies and mycelial culture of *Ganoderma oerstedii* (Higher Basidiomycetes) from Mexico”, *Int. J. Med. Mushrooms*, 17(6), 501-509, 2015.
- [7] Seo H. W., Hung T. M., Na M., Jung H. J., Kim J. C., Choi J. S., Kim J. H., Lee H. K., Lee I., Bae K., Hattori M., Min B. S., “Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity”, *Arch. Pharm. Res.*, 32(11), 1573-1579, 2009.
- [8] Nguyễn Thị Hồng Phúc, Bùi Thị Thu Hiền, Lê Thị Phương Hoa, Đặng Ngọc Quang, “Anticancer constituents from the Vietnamese lingzhi *Ganoderma lucidum*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 52, 308-312, 2014.
- [9] González A. G., León F., Rivera A., Padrón J. I., González-Plata J., Zuluaga J. C., Quintana J., Estévez F., Berme J. J., “New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*”, *J. Nat. Prod.*, 65(3), 417-421, 2002.
- [10] Morigiwa A., Kitabatake K., Fujimoto Y., Ikekawa N., “Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*”. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(7), 3025-3028, 1986.

SUMMARY

TRITERPENOIDS FROM FRUIT BODY OF *Ganoderma australe* (FR.) PAT.

Ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y and ganoderal A were isolated from the methanolic extract of the fruit body of *Ganoderma australe*. The structures of these compounds were completely elucidated by using a combination of 1D- NMR (^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT) and 2D NMR (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) analyses.

Keyword: *Ganoderma australe*; *Ganodermataceae*; ganoderic acid Sz, ganoderic acid Y; ganoderal A.