

KẾT QUẢ BAN ĐẦU VỀ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CÂY SINH ĐỊA (*REHMANNIA GLUTINOSA* LIBOSCH)

NGUYỄN THI HOÀNG ANH, TRẦN VĂN SÙNG

Viện Hóa học – Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia
Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội

MỞ ĐẦU

Cây Sinh địa (*Rehmannia glutinosa* Libosch) thuộc họ Scrophulariaceae là cây lâu năm có rễ củ. Rễ cây Sinh địa là một vị thuốc quan trọng và đã được sử dụng từ lâu trong y học dân gian. Rễ cây này được dùng làm thuốc bổ, thuốc chữa viêm nhiễm và chữa sốt. Trong y học dân gian, rễ cây Sinh địa được sử dụng dưới ba dạng khác nhau: rễ tươi, rễ phơi khô và rễ được hấp với hơi nước vài lần [1, 2]. Một số nghiên cứu về thành phần hoá học của cây *R. glutinosa* đã được các nhà khoa học Nhật bản công bố [1-4]. Theo các công bố trên, lớp chất chủ yếu trong *R. glutinosa* là iridoid, iridoid glycosid, norcarotenoid glycosid,... Trong chương trình nghiên cứu, tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học từ các cây thuốc Việt nam, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học cây Sinh địa của Việt nam.

Từ các dịch chiết etyl axetat và butanol của rễ cây Sinh địa phơi khô, một iridoid và năm iridoid glucosid đã được phân lập. Cấu trúc của các chất phân lập được xác định bằng cách kết hợp các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H và ^{13}C -NMR), phổ khối (MS) và so sánh với các dữ liệu phổ trong tài liệu. Chúng là rehmaglutine D (1), ajugol (2), ajugoside (3), 6-O-*E*-feruloyl ajugol (4), 6-O-(4''-O- α -L-rhamnopyranosyl) vanilloyl ajugol (5), catalpol (6).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh chế dịch chiết etyl axetat rễ cây Sinh địa bằng các phương pháp sắc kí cột (sử dụng các chất nhồi cột khác nhau như sephadex LH20, silicagel, chất hấp phụ pha đảo RP18), sắc kí bản mỏng điều chế với các hệ dung môi khác nhau đã phân lập được hai hợp chất 1 và 2.

- Hợp chất 1 thu được dưới dạng vô định hình. Phổ khối va chạm electron (EI-MS) cho thấy pic m/z 219 và 221 $[\text{M-H}]^+$ (22% và 7.8%) của đồng vị ^{35}Cl và ^{37}Cl . Phổ ^1H -NMR chỉ ra 11 tín hiệu, trong đó có 4 tín hiệu nằm ở vùng trường cao (1.6 – 2.3 ppm) và 7 tín hiệu ở vùng trường thấp (3.4 – 5.5 ppm), các tín hiệu nằm ở trường thấp này thể hiện sự có mặt của các proton có tương tác với các dị nguyên tố. Phổ ^{13}C -NMR và APT cho biết phân tử có chứa 9 cacbon, bao gồm 4 nhóm $-\text{CH}_2$, 5 nhóm CH và một các bon bậc bốn, trong đó có 5 tín hiệu ở vùng trường thấp (72- 102 ppm). Các tín hiệu proton và các bon ở vùng trường thấp có thể gán cho nhóm acetal [δ_{H} 5.30 (*d*, J = 5.5Hz); δ_{C} 101.3], một nhóm hydroxy bậc hai [δ_{H} 3.81 (*dd*, J = 10.4, 9.9Hz); δ_{C} 76.2], một nhóm hydroxy bậc ba [δ_{C} 85.2] và một nguyên tử clo liên kết với các bon bậc 2 [δ_{H} 4.06 (*dd*, J = 10.0, 1.5Hz); δ_{C} 74.1]. Ngoài ra còn có mặt vòng oxid 1, 10 [δ_{H} 3.42 (*dd*, 10.3, 1.6), 4.40 (*d*, 10.3); δ_{C} 72.7] trong cấu trúc của một iridoid 3 vòng. So sánh các dữ liệu phổ kể trên với

số liệu phổ của tài liệu [5] cho phép kết luận rằng chất **1** là Rehmaglucin D, một iridoid chứa clo hiếm thấy trong thiên nhiên.

- Chất **2** thu được ở dạng vô định hình. Phổ ^1H và ^{13}C -NMR cho thấy có nhóm methin gắn với nhóm hydroxy [δ_{H} 3.92 (*dt*, $J = 5.2, 2.9$); δ_{C} 78.1], nhóm methylen với tương tác geminal [δ_{H} 1.78 và 2.04, ($J_{\text{gem}} = 13.5$); δ_{C} 50.0], nhóm methyl bậc ba [δ_{H} 1.31, *s*; δ_{C} 25.3], hai proton của nối đôi [δ_{H} 4.85*m* và 6.15 (*ddd*, $J = 6.3, 1.9, 0.5$); δ_{C} 105.8 và 140.3] và một nhóm acetal [δ_{H} 5.46 (*d*, $J = 2.2$); δ_{C} 93.6]. Ngoài các tín hiệu đã kể trên còn thấy sự có mặt của đường glucose với tín hiệu anome [δ_{H} 4.64 (*d*, $J = 8.0$); 99.3]. Với các dữ liệu phổ đó kết hợp so sánh với tài liệu [6] có thể kết luận rằng đây là glucosid của một C9-iridoid có tên là Ajugol.

Từ dịch chiết butanol, bằng các phương pháp sắc ký tương tự như đã kể trên đã phân lập được 4 iridoid glucosid (**3** – **6**).

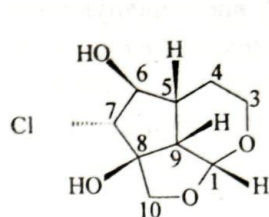
- Chất **3** có phổ ^1H và ^{13}C -NMR gần giống như chất **2**, phân tử cũng gồm C9-iridoid đính với một đường gluco. Nhưng trong phổ của chất **3** thấy xuất hiện thêm tín hiệu của nhóm axetyl [δ_{H} 2.05 *s*, δ_{C} 22.3 (CH_3COO); 173.1 (C=O)]. Độ dịch chuyển hóa học C-8 (90.1 ppm) của chất **3** dịch về phía trường thấp với $\Delta\delta = 12\text{ppm}$ so với chất **2** chứng tỏ rằng nhóm axetyl được gắn ở vị trí C-8. So sánh với các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân trong tài liệu [3,7] cho phép kết luận chất **3** chính là Ajugosid.

- Hợp chất **4** nhận được dưới dạng vô định hình. Phổ khối ion hóa bằng bụi electron và ba lần tứ cực (ESI + Q3-MS) cho pic cơ bản tại m/z 547 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. So sánh phổ ^1H -NMR của chất **4** với phổ của Ajugol (**2**) cho thấy ngoài các tín hiệu của phần C9-iridoid và gluco như ajugol còn có ba tín hiệu proton của vòng thơm [δ_{H} 7.18 (*dd*, $J = 1.9$); 7.04 (*dd*, $J = 1.9$ và 8.3); 6.80 (*d*, $J = 8.3$)], 2 proton ở vị trí *trans* của một nối đôi [δ_{H} 7.62, 6.40] với hằng số tương tác $J = 15.9\text{Hz}$ và tín hiệu của nhóm methoxy đính ở vòng thơm [δ_{H} 3.89, *s*]. Các tín hiệu trong phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy ngoài sự có mặt của các tín hiệu như ở chất ajugol trong phân tử còn được gắn với gốc feruloyl. Điều này thể hiện qua các tín hiệu sau trong phổ ^{13}C -NMR: nhóm ester 168.8 ($\text{C} = \text{O}$), nối đôi gắn với nhóm ester 146.7, 140.9, một nhóm thế hydroxy ở vòng thơm δ_{C} 149.2. Các số liệu phổ trên được so sánh với số liệu phổ trong tài liệu [4] đã kết luận được rằng chất **4** có cấu trúc là 6-O-E-feruloylajugol.

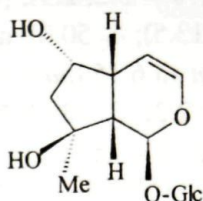
- Chất **5**: khi so sánh phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất **5** với các số liệu phổ của **4** thì thấy rằng chất **5** cũng có các tín hiệu của phần ajugol. Ngoài ra trong phân tử còn có nhóm axyl đính vào C-6 của phần ajugol và đồng thời với một vòng thơm có 3 tín hiệu tương tác kiểu ABX [δ_{H} 7.21 (*dd*, $J = 8.5$); 7.61 (*d*, $J = 2.0$); 7.63 (*dd*, $J = 8.5$ và 2.0)]. Trong vùng độ dịch chuyển hoá học của đường, ngoài đường glucose còn có mặt một phân tử đường khác. Tín hiệu của proton anome [δ_{H} 5.49 (*d*, $J = 1.65$)] và một nhóm sec-methyl [δ_{H} 1.21 (*d*, $J = 6.3$)] chứng minh rằng phân tử đường đó là rhamnopyranosyl. So sánh các số liệu phổ đã phân tích ở trên và tài liệu [4] dẫn đến kết luận rằng chất **5** có cấu trúc của 6-O-(4''-O- α -L-rhamnopyranosyl)vaniloyl ajugol.

- Chất **6** nhận được dưới dạng vô định hình. Phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất này gần giống như phổ của ajugol, tín hiệu của nhóm methyl (C-10) và hai proton có tương tác geminal ở 1.78 và 2.04 ppm (C-7) biến mất. Nhưng lại xuất hiện nhóm methylen ở vùng trường thấp hơn (3.77 và 4.13 ppm) với hằng số tương tác geminal $J = 12.9\text{Hz}$ và một dublet ở 3.44ppm, $J = 1.2\text{Hz}$ (H-7). Trong phổ ^{13}C -NMR thì tín hiệu của C-7 dịch về phía trường thấp với $\Delta\delta = 12.5\text{ppm}$, và tín hiệu của C-8 lại dịch về phía trường cao với $\Delta\delta$

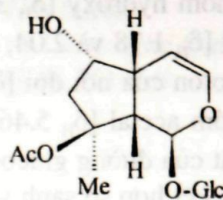
= 13.3ppm so với các tín hiệu tương ứng của ajugol. Tín hiệu của H-7 và sự thay đổi về độ dịch chuyển hoá học của C-7 và C-8 chứng minh sự có mặt nhóm epoxy gắn ở vị trí C-7 và 8 của phân tử chất 6. So sánh phổ của chất này với số liệu phổ trong tài liệu [5] có thể kết luận rằng chất 6 có cấu trúc của Catalpol.



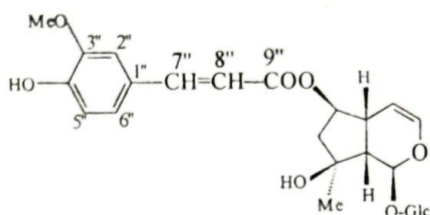
Rehmaglutin D (1)



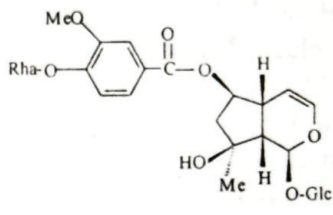
Ajugol (2)



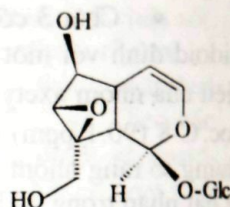
Ajugosid (3)



6-O-E-Feruloyl ajugol (4)



6-O-(4''-O-Rhamnopyransyl)-
-vanilloyl ajugol (5)



Catalpol (6)

PHẦN THỰC NGHIỆM

Độ quay cực $[\alpha]_D$ được đo trên máy DIP-1000 Digital Polarimeter Ver.100.19, CHLB Đức. Phổ khối được đo trên máy AMD 402, CHLB Đức. Phổ ^1H và ^{13}C -NMR được ghi trên máy VARIAN GEMINI ở 300 MHz và 75 MHz (tương ứng). Cho mục đích phân tích, bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60 F_{254} Merck độ dày 0.2mm, và bản ngược pha tráng sẵn RP-8, RP-18 F_{254} Merck độ dày 0.25mm đã được sử dụng. Bản mỏng điều chế tráng sẵn silicagel 60 F_{254} , độ dày 1mm được dùng cho sắc ký điều chế. Silicagel Merck 60, cỡ hạt 70-200 mesh (sắc ký cột thường), cỡ hạt 230-400 mesh (sắc ký cột nhanh), RP-18 (sắc ký cột ngược pha) và sephadex LH-20 đã được sử dụng.

Chiết mẫu thực vật: Rễ cây Sinh địa đã phơi khô được mua ở Phố Lãn Ông vào tháng 7.2000. Mẫu cây được sấy khô lại và xay nhỏ (2.2kg), rồi chiết nóng 4 lần với Etanol 95%. Dịch chiết etanol thu được (240g) hoà tan trong 500ml nước. Dịch nước này được phân bố lại bằng cách chiết lần lượt với n-hexan, etyl axetat và butanol. Sau khi các dung môi n-hexan, etyl axetat, butanol được cất loại dưới áp suất giảm sẽ thu được các dịch chiết n-hexan (9.5g), etyl axetat (11.0g) và butanol (28g).

Dịch chiết etylaxetat được cho qua cột silicagel, với dung môi giải hấp là CHCl_3 : MeOH = 95 : 5 thu được phân đoạn A (1.16g) và với dung môi CHCl_3 : MeOH = 90 : 10 thu được phân đoạn B (0.85g). Phân đoạn A được tiếp tục tinh chế bằng cách cho qua cột sephadex, dung môi MeOH thu được 7 phân đoạn. Phân đoạn giàu chất 1 được tiếp tục cho chạy qua cột flash silicagel với hệ dung môi giải hấp n-hexan : EtOAc = 3 : 7 thu được 7mg chất 1, $[\alpha]_D^{20} = + 57.5^\circ$ (c = 0.43, MeOH) {[2]: $[\alpha]_D^{19} = + 60.6^\circ$ (c = 0.19, MeOH)}.

Phân đoạn B (0.85g) cho chạy qua cột sephadex với dung môi giải hấp là MeOH thu được 9 phân đoạn. Phân đoạn giàu chất 4 (194mg) được cho qua cột RP18, dung môi MeOH : H₂O = 6 : 4 thu được 19mg hợp chất 4, $[\alpha]_D^{25} = -110^0$ (c = 1.28, MeOH) {[4]: $[\alpha]_D^{28} = -147.0^0$ (c = 0.33, MeOH)}.

Dịch chiết butanol được chạy qua cột silicagel, dung môi giải hấp CHCl₃ : MeOH = 75 : 25 thu được phân đoạn có khối lượng là 1.2g, với tỉ lệ 70 : 30 thu được các phân đoạn có khối lượng là 1.56g, 2.74g, 0.62g. Phân đoạn có khối lượng 1.2g kể trên được tinh chế tiếp bằng cột ngược pha RP-18, dung môi MeOH : H₂O = 1 : 1 thu được 6 phân đoạn. Phân đoạn giàu chất 3 (347mg) chạy qua cột silicagel CHCl₃ : MeOH = 85 : 15, sau đó lại qua cột RP-18, dung môi MeOH : H₂O = 4 : 7, thu được 26 mg hợp chất 3, $[\alpha]_D^{20} = -56.9^0$ (c = 0.69, MeOH) {[7]: $[\alpha]_D^{20} = -102.9^0$ (c = 0.40, MeOH)}.

Phân đoạn 1.56g cho qua cột sephadex, MeOH thu được 6 phân đoạn. Phân đoạn giàu chất 2 (210mg) được tinh chế tiếp tục bằng các cột flash silicagel, CHCl₃ : MeOH : H₂O, rồi cột RP-18, MeOH : H₂O = 2 : 8 thu được 50mg chất 2, $[\alpha]_D^{20} = -167.6^0$ (c = 0.87, MeOH) {[4]: $[\alpha]_D^{24} = -172.1^0$ (c = 0.53, MeOH)}.

Phân đoạn có khối lượng 2.74g được tinh chế bằng cột sephadex, dung môi MeOH thu được 5 phân đoạn. Phân đoạn chứa chất 5 (923mg) được tiếp tục làm sạch bằng các cột flash silicagel, CHCl₃ : MeOH = 85 : 15; cột RP-18, MeOH : H₂O = 4 : 6, bản mỏng điều chế, dung môi CHCl₃ : MeOH : H₂O, thu được 7mg chất 5, $[\alpha]_D^{20} = -108.0^0$ (c = 0.32, MeOH) {[4]: $[\alpha]_D^{28} = -156.0^0$ (c = 0.25, MeOH)}.

Phân đoạn có khối lượng là 0.62g được cho qua cột sephadex, MeOH thu được 4 phân đoạn. Phân đoạn chứa chất 6 được cho chạy qua cột flash silicagel, CHCl₃ : MeOH : H₂O = 70 : 25 : 2, tiếp theo là cột flash silicagel, CHCl₃ : MeOH : H₂O = 65 : 30 : 3 thu được 15mg chất 6, $[\alpha]_D^{20} = -96.3^0$ (c = 0.85, MeOH) {[7]: $[\alpha]_D^{20} = -102.2^0$ (c = 0.85, MeOH)}.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Giáo dục và Khoa học, CHLB Đức (Bundes Ministerium fuer Bildung und Forschung) đã tài trợ cho công trình nghiên cứu này. Chúng tôi cũng xin cảm ơn Ts. A. Porzel về việc đo phổ Cộng hưởng từ hạt nhân (¹H, ¹³C-NMR) và Ts. J. Schmidt đo phổ khối (MS).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Isao Kitakawa, Youichi Fukuda, Toshio Taniyama and Masayuki Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.* 34 (3), 1399 - 1402 (1986).
2. Isao Kitakawa, Youichi Fukuda, Toshio Taniyama and Masayuki Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.* 39 (5), 1171 - 1176 (1991).
3. Marcella Guiso, Rinaldo Marini-Bettolo and Alessandro Agostini, *Gazzetta Chimica Italiana*, 104, 25-33 (1974).
4. Hiroaki Nishimura, Hiroshi Sasaki, Takashi Morota, Masao Chin and Hiroshi Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 28 (10), 2705 - 2709, (1989).
5. Takashi Morota, Hiroaki Nishimura, Hiroshi Sasaki, Masao Chin, Ko Sugama, Takao Katsuhara and Hiroshi Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 28 (9), 2385 - 2391, (1989)
6. Takashi Morota, Hiroshi Sasaki, Ko Sugama, Hiroaki Nishimura, Masao Chin and Hiroshi Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 29 (2), 523 - 526 (1990).
7. Takashi Morota, Hiroshi Sasaki, Hiroaki Nishimura, Ko Sugama, Masao Chin and Hiroshi Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 28 (8), 2149 - 2153, (1989)