

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC, KHẢO SÁT CẤU TRÚC CỦA MỘT SỐ ANCALOIT TRONG CHI CRIMUM

Nguyễn Thị Minh, Trần Bạch Dương

Khoa Hóa học

Trường ĐH KHTN - ĐHQG Hà Nội

1. Đặt vấn đề

Nguồn thực vật ở Việt Nam rất phong phú và đa dạng. Cho đến nay có trên 7000 loài thực vật bậc cao đã được biết đến và theo dự đoán của các nhà thực vật học thì con số của các loài này có thể đạt tới 12.000 loài. Trong số đó hơn 2000 loài thực vật là các cây thuốc.

Cho tới nay, mặc dầu có nhiều loài cây được dùng làm thuốc chữa bệnh, nhưng nhiều thành phần trong đó cũng như cơ chế tác dụng của chúng vẫn còn chưa được biết rõ. Điều đó khiến cho việc xác định liều lượng được liệu sử dụng còn tùy tiện, và đôi khi những tác dụng phụ của chúng cũng chưa được lưu ý đầy đủ.

Trong các loài thực vật có chứa các lớp chất khác nhau như: các Tecpen, các lacton, các ancaloit, các cumarin, v.v... Riêng trong chi *Crinum* thuộc học Thủy Tiên có chứa các ancaloit với các dạng cấu trúc khác nhau và rất đặc trưng.

Hiện nay trên thế giới đã có trên 10.000 ancaloit với các cấu trúc khác nhau đã được biết đến và định rõ đặc điểm [1].

Hóa học các ancaloit quan tâm trước tiên đến sự phân lập, nhận dạng, xác định đặc điểm, cấu trúc và tổng hợp lớp chất này. Với kết quả của các qui trình điều tra sàng lọc có hệ thống và các tiến bộ về phương pháp, trong đó trước hết phải kể đến sự phát triển và áp dụng các phương pháp phân tích và nhận dạng có hiệu quả (như sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu lực cao...). Các phương pháp phân tích vật lý hiện đại được áp dụng để xác định cấu trúc như phổ cộng hưởng từ proton ($^1\text{H-NMR}$) và cacbon 13 ($^{13}\text{C-NMR}$), phổ khối lượng (MS), các phương pháp quang bất đối xứng, phương pháp phân tích cấu trúc (nhờ tia X).

Đặc biệt lý thú là hoạt tính sinh học của rất nhiều ancaloit. Một số ancaloit có tác dụng dược lý rất mạnh, do vậy trước đây các dược liệu chứa ancaloit hoặc các dịch chiết thuốc ngâm rượu của chúng và ngày nay các chất tinh khiết là bộ phận vững chắc của kho tàng thuốc chữa bệnh.

Các ancaloit còn là những chất mẫu (model) lý tưởng cho việc phát triển vô số loại thuốc tổng hợp. Nhiều loài có chứa ancaloit và được sử dụng trong nền y học dân tộc Việt Nam để chữa nhiều bệnh có kết quả [2].

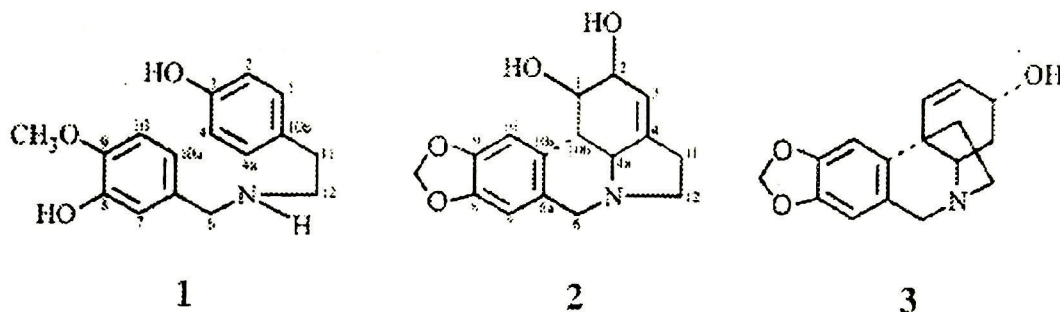
Các loài thuộc họ Thủy Tiên mọc ở Việt Nam như cây Náng Hoa trắng (*Crinum asiaticum* Linn.), cây Náng Hoa đỏ (*Crinum amabile* Donn.), cây hoa Loa Kèn (*Kippeastrium equestre* Herb.), cây hoa Thủy Tiên (*Narcissus tazetta* Linn.). Chúng hầu hết có hoa đẹp nên trồng để làm cảnh.

Một số loài Thủy Tiên còn được sử dụng trong y học dân tộc Việt Nam. Thí dụ Náng Hoa trắng và Náng Hoa đỏ được dùng để chữa bệnh thấp khớp. Người ta dùng lá náng hơ nóng

để chữa bong gân khi ngã hoặc tập thể thao. Ở một số vùng người ta dùng dịch nước đun sôi của các cây này để xử lý bên ngoài khi chữa bệnh trĩ. Ngoài ra dịch nước ép của rễ nắng được dùng làm chất gây nôn mà không gây tác dụng phụ hoặc làm thuốc chữa viêm tai.

Chi *Crinum* thuộc họ Thủy Tiên (*Amarrylidaceae*). Các loài thuộc họ này đã được biết đến bởi sự có mặt của các ancaloit đặc trưng. Cho đến nay, đã có khoảng 150 loài thuộc 36 chi của họ này đã được nghiên cứu về thành phần ancaloit trên 1000 ancaloit khác nhau về cấu trúc bao gồm 12 kiểu vòng đã được phân lập từ những bộ phận khác nhau vào các giai đoạn phát triển khác nhau của các loài thuộc họ *Amarrylidaceae*.

Chi *Crinum* là đại diện thực thụ của họ Thủy Tiên (*Amarrylidaceae*) vì chi này thể hiện tất cả những nét chính về mặt hóa học của họ cây. Vì vậy, các trúc của các *Crinum* ancaloit mặc dầu khác nhau nhưng chúng đều dẫn xuất từ 3 nhân cơ bản là N-(3,4 - dioxibenzyl)-4-oxyphe-nylamin (ví dụ norbelladin 1), pyrrolo/de/phenanthridin (ví dụ lycorin 2) và 5,10b - ethanophenanthridin (ví dụ vitamin/(-)-crinin 3) [6].



Hoạt tính sinh học của các *Crinum* ancaloit cũng rất đáng chú ý. Ví dụ, trong các nghiên cứu in vitro, lycorin làm giảm đáng kể khả năng sống của các tế bào khối u. Lycorin - 1-O-glucosid với các liều lượng μg đã gây ra ở các mức độ khác nhau sự kích thích gây phân bào bạch huyết trong lách chuột. Hơn nữa chất này có độ độc cấp thấp ($> 200 \text{ mg/kg}$ chuột bạch). Vì vậy, lycorin-1-O-glucosid có khả năng là một tác nhân kích thích miễn dịch. Đối với các ancaloit khác của họ Thủy Tiên cũng có những ảnh hưởng tương tự, ví dụ như: dihydro lycorin, pseudolycorin, narciclasin, haemanthamin. Các dịch chiết (metanol) của nhiều cây *Amarrylidaceae* bao gồm cả các loài *Crinum* cũng biểu thị hoạt tính diệt khuẩn và diệt nấm rõ rệt.

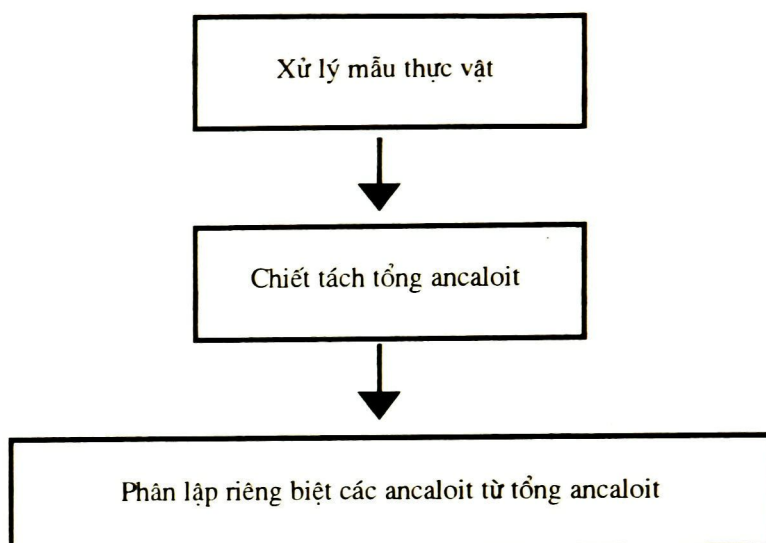
Mục đích và nhiệm vụ của đề tài nghiên cứu của chúng tôi là:

Nghiên cứu thành phần hóa học cây *Crinum asiaticum* (Náng hoa trắng) Việt Nam

Chúng tôi tập trung vào việc nghiên cứu qui trình phân lập hỗn hợp ancaloit trong cây náng hoa trắng và một số phương pháp phân tách hỗn hợp này nhằm thu được một số ancaloit tinh khiết.

2. Thực nghiệm

Để thực hiện các nhiệm vụ của đề tài nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thành phần ancaloit có trong cây Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* Linn.) theo các bước sau (sơ đồ 1):



Phân tách tổng ancaloit

Lá tươi (30g) và củ tươi (40kg) của cây Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.) được thu hái tại Văn Giang - Hưng Yên vào tháng 11 năm 1998 và để riêng rẽ. Mẫu được thái nhỏ, hong ngoài không khí, sau đó sấy ở 45-50°C đến khô rồi xay thành bột mịn.

Bột khô của lá và củ được ngâm chiết riêng rẽ ở nhiệt độ phòng lần lượt với metanol và axit axetic 2M trong metanol. Các dịch chiết được gộp chung rồi cất loại dung môi. Phần cặn được hòa tan trong axit axetic 2N, rồi chiết lần lượt với ete dầu hỏa (khoảng sôi 30-60°C, ete etylic và clorofoc. Tiếp đó phần dịch nước - axit được kiềm hóa với amoniac, rồi chiết bằng clorofoc, sau khi cất loại clorofoc thu được "tổng ancaloit".

Hiệu suất "tổng ancaloit":

Từ lá: 5g (0,17% so với khối lượng lá tươi);

Từ củ: 4,6g (0,1% so với khối lượng củ tươi).

Phân tách các ancaloit

Khảo sát "tổng ancaloit" của lá và củ bằng sắc ký lớp mỏng* (TLC; silicagel DC - Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 5554); hệ dung môi CHCl₃/CH₃OH (9: 1, v/v); phun thuốc thử Dragendorff - Munier) cho thấy "tổng ancaloit" của lá và củ chứa 14 đến 15 thành phần hiện màu da cam rõ rệt với thuốc thử Dragendorff - Munier.

Để phân tách các "tổng ancaloit" thành các nhóm riêng biệt có độ phân cực khác nhau, chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng gia tốc và gradient dung môi với thiết bị Backstroem Separo AB dưới các điều kiện dưới đây:

- Đường kính cột: 25mm;
- Chất hấp thụ: Silicagel Merck 60 (cỡ hạt 0,015-0,040mm);
- Tỷ lệ hỗn hợp cân tách / chất hấp phụ = 1/50;
- Hỗn hợp cân tải: được đưa lên cột bằng cách tẩm lên Silicagel Merck 60 (0,015-0,040mm) rồi nhồi lên đầu cột;

- Hệ dung môi rửa giải: các hỗn hợp của ete dầu hỏa (khoảng sôi 30 - 60 °C), $(CH_3)_2CO$, CH_3OH , trong $CHCl_3$, gradien;

- Tốc độ rửa giải: 15ml/phút; 10ml/phân đoạn.

Kết quả đã tách "tổng ancaloit" của củ và của lá thành 3 nhóm chất: I (có R_f từ 0,95 - 0,7), II (R_f 0,7 - 0,35) và III (R_f 0,35 - 0,05). Được ký hiệu với củ và lá thành các nhóm tương ứng là CA1; CA2; CA3 (đối với củ) và LA1; LA2; LA3 (đối với lá).

Để phân lập riêng biệt các ancaloit từ các nhóm I, II và III, chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký cột nhanh thông thường (FC) dưới áp suất - 0,2 bar, với chất hấp phụ silicagel Merck 60 (0,015 - 0,040mm), và các hệ dung môi là ete dầu hỏa (khoảng sôi 30 - 60°C), $(CH_3)_2CO$, CH_3OH , trong $CHCl_3$, gradien.

Kết quả chúng tôi đã phân lập được bốn ancaloit ký hiệu lần lượt A2, A7, A8 và A10.

Các ancaloit nêu trên đã được tinh chế bằng cách kết tinh trong dung môi thích hợp, kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng (silicagel, hệ dung môi I, thuốc thử Dragendorff - Munier) và khảo sát phổ khối lượng (EI - MS, 70 eV) xác định sơ bộ phân tử lượng.

Khảo sát sơ bộ tính kháng khuẩn, kháng nấm của các tổng ancaloit

Hoạt tính kháng khuẩn - kháng nấm của các "tổng ancaloit" được xác định bằng kỹ thuật khuếch tán trên môi trường đặc. Các "tổng ancaloit" được tẩm trên khoanh giấy sắc ký số 5 ($N^{\circ}5$) và đặt trên mặt đĩa thạch dinh dưỡng đã trộn nhũ dịch vi khuẩn - vi nấm có 10^6 - 10^7 tế bào/ml tỷ lệ 1% so với môi trường. Chúng tôi đã tiến hành thử tác dụng của các "tổng ancaloit" trên 5 chủng vi khuẩn gram (-); 5 chủng vi khuẩn (+) và hai chủng vi nấm.

Kết quả đã định được tác dụng ức chế rõ rệt của các cặn "tổng ancaloit" CA đối với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Sacrina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và LA đối với các chủng vi khuẩn *Sacrina lutea*, *Escherichia coli*.

3. Kết luận

Trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu, chúng tôi đã thu được một số kết quả sau đây:

1. Đã áp dụng có cải tiến qui trình chiết đối với ancaloit nói chung để chiết tách các ancaloit có trong cây Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* Linn.), chúng tôi đã thu được tổng ancaloit từ các mẫu lá, củ cây và lycorin (là một *Crinum* ancaloit chủ yếu).

2. Bằng các phương pháp sắc ký hiện đại:

- Sắc ký lớp mỏng (SKLM),

- Sắc ký lỏng gia tốc và gradient dung môi (Accelerating gradient chromatography - AGC),

- Sắc ký lỏng cột nhanh (FC), chúng tôi đã phân lập được bốn (04) ancaloit tinh khiết từ các tổng ancaloit của củ và lá cây.

3. Các ancaloit này đã được kết tinh phân đoạn với các dung môi khác nhau và xác định sơ bộ phân tử lượng bằng phương pháp quang phổ khối lượng (MS).

4. Kết quả thử tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm của các cặn tổng ancaloit (CA và LA) cho thấy:

+ Đối với cặn tổng ancaloit CA có nồng độ 10mg/ml có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn như: *Bacillus subtilis*, *Sacrina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

+ Với cặn tổng ancaloit LA có nồng độ 10 mg/ml có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn như: *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Trần Chấn, Vũ Văn Chuyên, Trần Hợp, Địa lý các họ cây ở Việt Nam - NXB Khoa học và kỹ thuật, trang 177, 1987.
2. Vũ Văn Chuyên, Phân loại thực vật bậc cao, tập II, trang 224, NXB Y học Hà Nội, 1971.
3. Vũ Văn Chuyên, Võ Văn Chi, Phạm Nguyên Hồng, Trần Hợp, Lê Khả Kế, Đỗ Tất Lợi, Thái Văn Chùng (chủ biên Lê Khả Kế), Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam, tập V, trang 19, NXB Khoa học và kỹ thuật, 1975.
4. Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ miền Nam Việt Nam, quyển II, trang 627, 628, 1972.
5. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, trang 770-773, NXB Khoa học, Hà Nội 1969.
6. Ghosal S., Saini K. S. and Razdan S., Phytochemistry 1985, 24, 2141.