

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DANH CẤU TRÚC CỦA ALKALOID TỪ LÁ CÂY DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG (*Phyllanthus amarus Schum.et Thonn*)

Nguyễn Trọng Tuấn¹ và Nguyễn Ngọc Hạnh²

ABSTRACT

From the crude alkaloid extract of the dried leaves of *Phyllanthus amarus Schum.et Thonn* (Euphorbiaceae), isobubbialine, a securineage alkaloid, has been isolated. The structure of this compound has been elucidated by means of UV, IR, MS and NMR spectra as well as comparison with those of published in literature.

Keywords: *phyllanthus amarus*, alkaloid, securinine, isobubbialine

Title: Isolation and structured elucidation of the alkaloid from the leaves of *Phyllanthus amarus*

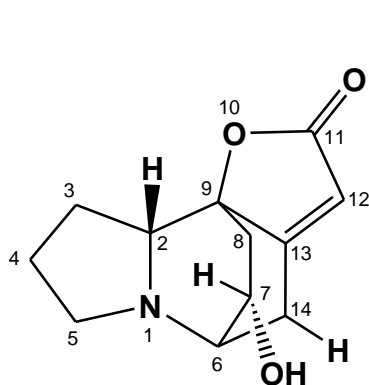
TÓM TẮT

Từ alkaloid thô của bột lá cây khô Diệp hạ châu, một alkaloid thuộc khung securinine đã được cô lập tại phân đoạn giải ly cột với hệ dung môi giải ly là chloroform: methanol = 60:40 (v/v). Hợp chất này được nhận danh là isobubbialine. Cấu trúc của hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ hiện đại như: phổ tử ngoại, phổ hồng ngoại, phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

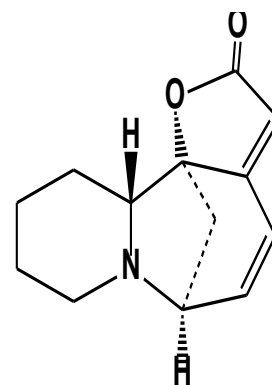
Từ khóa: *Diệp Hạ Châu Đắng*, *cận thô*, *isobubbialine*, *phổ tử ngoại*, *phổ hồng ngoại*, *phổ cộng hưởng từ hạt nhân*, *phổ khối lượng*

1 MỞ ĐẦU

Cây Diệp Hạ Châu đắng có tên khoa học là *Phyllanthus amarus Schum.et Thonn*, thuộc họ Thầu Dầu Euphorbiaceae (Đỗ Tất Lợi, 1995; Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004), mọc hoang ở Việt Nam, Ấn Độ, các nước Đông Dương... Trong dân gian người ta sử dụng cây Diệp Hạ Châu đắng để chữa các bệnh viêm thận, phù thũng, sỏi thận, trẻ em suy dinh dưỡng, viêm ruột, kiết lị, viêm gan, điều kinh, lọc máu, điều huyết, ung nhọt, đình rêu, lở ngứa, rắn rết cắn. Theo các nghiên cứu gần đây, các alkaloid cô lập được từ cây Diệp Hạ Châu đắng đều thuộc khung securinine (Joshi B. S., 1986).



Isobubbialine



Securinine

Công trình nghiên cứu này tìm hiểu thành phần hóa học từ dịch chiết chloroform của alkaloid thô của bột lá cây Diệp Hạ Châu đắng và đã phân lập được một alkaloid. Bằng các phương pháp vật lý như đo điểm nóng chảy, phổ hồng ngoại (IR), tử ngoại (UV), khối phổ (MS), ^1H - NMR, ^{13}C - NMR, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC và ^1H - ^{13}C HMQC, và so sánh với tài liệu đã công bố, cấu trúc hóa học của alkaloid này đã được xác định là Isobubbialine (Peter J. Houghton *et al.*, 1996.)

2 THỰC NGHIỆM

2.1 Nguyên liệu

Mẫu lá cây Diệp Hạ Châu đắng do Trung tâm bảo tồn và sản xuất dược liệu miền Trung cung cấp.

2.2 Thiết bị

- Điểm nóng chảy được đo trên máy Electrothemat IA 9000 Series, dùng mao quản không hiệu chỉnh tại Viện Công Nghệ Hóa Học.
- Phổ hồng ngoại IR ghi trên máy quang phổ hồng ngoại Bruker 40, dùng viên nén KBr tại Viện Công Nghệ Hóa Học.
- Phổ UV- Vis đo trên máy Jasco 500, cuvet thạch anh tại Viện Công Nghệ Hóa Học.
- Phổ khối lượng đo trên thiết bị 1100 Series MSD-Ion TRAP tại Viện Công Nghệ Hóa Học.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ^1H - NMR; ^{13}C - NMR; ^1H - ^1H COSY; ^1H - ^{13}C HMBC và ^1H - ^{13}C HMQC được đo trên máy IEOL-JNM-LA0 tại Đại Học Y Dược TOYAMA Nhật Bản. Dung môi CDCl_3 , CD_3OD , chất nội chuẩn TMS, máy cộng hưởng tần số 400 MHz.
- Phổ DEPT được thực hiện tại Trung tâm phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3 Chiết xuất và cô lập alkaloid isobubbialine

Bột lá khô (4 kg), được chiết bằng cách ngâm kiệt với dung dịch nước acid HCl 1N 3 lần ở nhiệt độ phòng, lọc lấy dịch acid. Dịch acid được kiềm hóa bằng NH_4OH đến pH= 9 ~10, sau đó trích với CHCl_3 . Dịch trích CHCl_3 sau khi được rửa với nước cất đến pH=7, làm khan với Na_2SO_4 , loại dung môi dưới áp suất kém thu được 6,12 g cặn thô alkaloid (hiệu suất: 0,15%).

Từ cặn thô alkaloid thu được, tiến hành sắc ký cột nhanh, mỗi phân đoạn sắc ký cột nhanh là 500 ml, theo dõi trên sắc ký bản mỏng để gộp các phân đoạn có R_f giống nhau, hệ dung môi giải hấp có độ phân cực tăng dần: ete dầu hỏa, ete dầu hỏa – chloroform, chloroform, chloroform-methanol, methanol. Tất cả thu được 13 phân đoạn.

Tiếp tục lấy phân đoạn 11 và 12 trong số 13 phân đoạn này để tiến hành sắc ký cột với cột thủy tinh có đường kính $\phi= 2,5$ cm, dài 0,5 m chứa 100 g silicagel 60H Merk (230-400 mesh). Mỗi phân đoạn sắc ký cột được hứng là 100 ml, cô thu hồi dung môi và kiểm tra sắc ký bản mỏng để gộp các phân đoạn có R_f giống nhau, hệ

dung môi giải hấp có độ phân cực tăng dần: ete dầu hỏa, ete dầu hỏa- chloroform, chloroform, chloroform- methanol, methanol. Tất cả thu được 54 phân đoạn.

Tại phân đoạn 43- 48, CHCl₃: MeOH = 60:40, thu được 0,16 g cặn màu vàng, kết tinh nhiều lần trong MeOH thu được 97 mg tinh thể isobubbialine hình kim (R_f = 0,26; hệ dung môi CHCl₃: MeOH = 6:1).

3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Isobubbialine được cô lập từ cặn thô alkaloid của lá cây Diệp Hạ Châu đẳng dưới dạng tinh thể hình kim không màu. Điểm nóng chảy 175- 176 °C (MeOH)

Phổ tử ngoại: λ_{max} (EtOH) có điểm hấp thụ ở 248 nm

Phổ hồng ngoại: cho các dải hấp thụ (KBr cm⁻¹): 3124 ν_{OH}, 1764 (nhóm C=O) và 1653 (C=C). chứng tỏ có sự hiện diện của γ lacton bất bão hòa.

Phổ ¹³C- NMR kết hợp với DEPT cho thấy trong phân tử chất này có 12 cacbon, trong đó có 1 nhóm cacbonyl (C=O) ở 177 ppm; 1 C=C ở 175,7 ppm; 5 nhóm CH₂ ở 26,5 ; 27,9; 31,8; 33,6; và 53,5. Nhóm CH₂ ở 53,5 pm sẽ kề với nguyên tử N. 3 nhóm CH ở 57,4 ; 64,7 ; và 72,3. Một cacbon tứ cấp ở 86,2 chứng tỏ cacbon này phải kế nguyên tử oxy.

Phổ ¹H-NMR cũng cho thấy có proton vinyl ở 5,80 ppm của H-12; 4,18 của H-7 kề nhóm OH

Phổ khối lượng LC-MSD-Ion Trap: ứng với mũi [M+H]⁺ = 222 ⇒ mũi ion phân tử [M⁺] = 221 phù hợp với công thức phân tử của isobubbialine: C₁₂H₁₅O₃N

Kết hợp với phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều 2D- NMR là ¹H- ¹H COSY và ¹H- ¹³C HMBC (Bảng 1), chúng tôi xác nhận thêm về cấu trúc của isobubbialine.

Bảng 1: Dữ liệu phổ ¹H, ¹³C-NMR , COSY và HMBC của isobubbialine

Vị trí cacbon	¹ H-NMR(δppm)	¹³ C-NMR(δppm)	COSY ¹ H-H ¹	HMBC
2	3,05	64,7 (CH)	2/3a	C8, C9
3	1,90; 2,20	26,5 (CH ₂)	3/4b; 3a/3b	C2, C9
4	2,18	27,8 (CH ₂)	4a/4b; 4b/5a; 4b/5b	C3
5	3,03; 3,80	53,5 (CH ₂)	5a/5b; 5/4	C3, C6
6	3,25	57,4 (CH)	6/14a; 6/14b	C2, C13
7	4,18	72,3 (CH)	7/8a; 7/8b	
8	1,88	33,6 (CH ₂)	8a/8b	C2, C7, C9, C13
9		86,2 (C)		
11		177,0 (C=O)		
12	5,80	112,4 (CH=)		
13		175,7 (C=)		
14	2,79; 2,92	31,8 (CH ₂)	14a/14b	C13

4 KẾT LUẬN

- Từ lá Diệp Hạ Châu đắng (*Phyllanthus amarus*) đã phân lập được một hợp chất alkaloid dưới dạng tinh khiết.
- Bằng các kỹ thuật phân tích phổ hiện đại và so sánh với tài liệu được công bố, chúng tôi nhận danh hợp chất alkaloid đó là isobubbialine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, trang 133, NXB Khoa học và kỹ thuật. 1995.
- Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam, Đỗ Huy Bích và tập thể tác giả viện Dược liệu. Tập I, NXB Khoa học và Kỹ thuật, trang 675. 2004
- Joshi, B. S., D. H. Gawad, S. W. Pelletier, G. Kartha and K. J. Bhandary. 1986. Isolation and Structure (X-Ray Analysis) of *Ent-Norsecurinine*, An Alkaloid from *Phyllanthus niruri*. Journal of Nature Products Vol. 49 No. 4, 614-20.
- Petchnaree Prapaisri, Nuntavan Bunyapraphatsara, A. Geoffrey Cordell, J. Cowe Heather and Philip J. J Cox. 1986. X-Ray Crystal and Molecular Structure of Nirurine, a Novel Alkaloid related to the Securinega Alkaloid Skeleton, from *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). Journal of Chemical Society Perkin Transaction 1, 1551-1556.
- Peter J. Houghton, Z. Woldemariam Tibebe, Siobhan O'Shea and S. P. Thyagarajan. 1996. Two Securinega-type Alkaloids from *Phyllanthus amarus*. Phytochemistry, Vol. 43 No.3, 715-717.
- Võ Văn Chi .Từ điển cây thuốc Việt Nam, trang 235, NXB Y học. 1999.