

KẾT QUẢ BAN ĐẦU VỀ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CÂY LÁ NGÓN (*GELSEMIUM ELEGANS*) CỦA VIỆT NAM

PHẦN I - PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC OXINDOL ANCALOIT

Đến Tòa soạn 21-11-2003

LẠI KIM DUNG, TRỊNH THỊ THỦY, TRẦN VĂN SUNG,
PHẠM GIA ĐIỀN, PHẠM THỊ NINH

Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

Chemical investigation of the leaves of Gelsemium elegans growing in Vietnam resulted in the isolation of the oxindol alkaloids: gelsemine, gelsevirine, humantenine and gelsenicine. Their structures have been determined on the basis of the IR, MS, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy.

I - MỞ ĐẦU

Theo các nhà thực vật Việt Nam, chi Lá ngón ở nước ta chỉ có một loài (*Gelsemium elegans*, Benth.), thuộc họ Mã tiên (Loganiaceae). Cây Lá ngón hay còn được gọi là Co ngón, Thuốc rút ruột, Đại trà đắng hay Đoạn trường thảo là loại cây mọc leo khá phổ biến ở miền rừng núi Việt Nam. Cây Lá ngón rất độc, đối với chuột nhắt trắng liều độc LD₅₀ là 200 mg lá khô / 1 kg chuột. Vì vậy người ta không hay dùng cây này làm thuốc mà chỉ dùng để tử tử hay với mục đích đầu độc. Ngoài ra, ở Trung Quốc hay dùng rễ cây này để làm thuốc chữa hủi hay chữa bệnh nấm tóc. Cây Lá ngón đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu về thành phần hóa học. Các kết quả nghiên cứu cho thấy cây này có chứa nhiều oxindol ancaloit có cấu trúc đa dạng như gelsemin, gelmixin, kuminin, kuminidin....

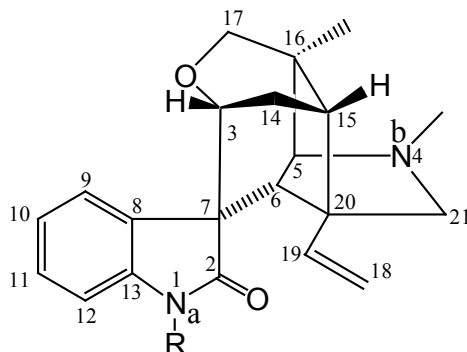
Gần đây, người ta còn tìm thấy oxindol ancaloit gắn với iridoit từ cây Lá ngón của Thái Lan [1, 2]. Cho đến nay ở trong nước cũng như trên thế giới chưa thấy có công bố nào về thành phần hóa học cây Lá ngón của Việt Nam. Tiến

hành nghiên cứu thành phần hóa học lá cây Lá ngón thu hái tại Lạng Sơn, chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất triterpen là axit ursonic và các oxindol ancaloit có cấu trúc hóa học khác nhau. Bài này trình bày kết quả nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc hóa học bốn hợp chất oxindol ancaloit là gelsemin (1), gelsevirin (2), humantenin (3) và gelsenixin (4). Cấu trúc hóa học của các chất tách ra được xác định bằng các phương pháp phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối (EI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-, ¹³C-NMR) và so sánh với các tài liệu đã công bố.

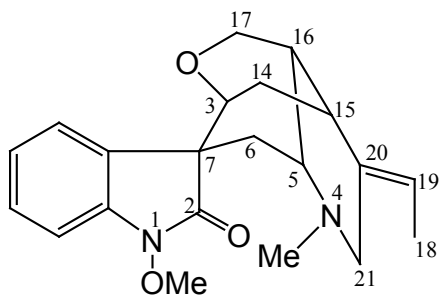
II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dịch chiết metanol 85% của lá cây Lá ngón sau khi loại dung môi dưới áp suất giảm, được chiết lần lượt bằng các dung môi n-hexan, etyl axetat và n-butanol. Cất loại dung môi thu được các cặn dịch chiết tương ứng. Từ cặn dịch chiết n-butanol axit hóa bằng HCl loãng và kiềm hóa bằng NaHCO₃ sau đó chiết lại bằng CHCl₃, thu được ancaloit tổng. Từ cặn ancaloit này, bằng sắc ký cột thường, sắc ký

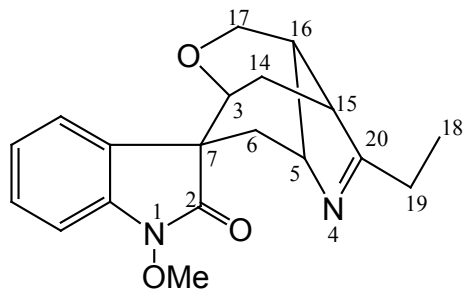
cột nhanh (flash chromatography) và sắc ký lớp mỏng điều chế trên silicagel với các hệ dung môi thích hợp đã phân lập được các ancaloit **1**, **2**, **3** và **4** sạch.



1: R= H Gelsemin
2: R= OCH₃ Gesevirin



3: Humantenin



4: Gelsenixin

Bảng 1: Số liệu phổ ¹H-NMR của chất **1-4** [500 MHz, CDCl₃, giá trị δ (ppm), J (Hz)]

H	Gelsemin (1)	Gesevirin (2)	Humantenin (3)	Gelsenixin (4)
3	3,77 s	3,80 br s	3,62 d (7,4)	3,72 dd (4,5; 1,9)
5	3,49 s	3,41 d (0,7)		4,41 m
6ax	1,98 br s	2,02 s		2,65 m
6eq				2,37 dd (15,5; 2,0)
9	7,38 d (7,4)	7,45 d (7,3)	7,37 d (7,3)	7,53 d (7,5)
10	6,97 dt (7,6; 7,6; 0,7)	7,06 dt (7,6; 7,6; 1,1)	7,11 dt (7,6; 7,6; 1,0)	7,06 dt (7,6; 7,6; 1,0)
11	7,16 dt (7,6; 7,6; 0,8)	7,29 dt (7,7; 7,7; 1,1)	7,31 dt (7,6; 7,6; 1,1)	7,25 dt (7,6; 7,6; 1,1)
12	6,72 d (7,6)	6,95 d (7,7; 0,5)	7,01 d (7,7)	6,87 d (7,6)
14ax	2,81 dd (14,3; 2,7)	2,83 dd (14,5; 2,9)	2,60 m	2,37 dd (15,5; 2,2)
14eq	1,98 br s	2,02 ddd (14,5; 5,6; 2,8)	1,69 q (6,7)	2,13 ddd (15,0; 5,5; 3,0)
15	2,30 m	2,31 m	2,28 m	2,71 d (9,0; 7,4)

16	2,45 d (8,3)	2,45 d (8,4)	2,33 m	2,45 m
17a	3,90 dd (11,1;1,6)	3,98 d (11,1;2,1)	4,19 dd (11,0; 1,0)	4,27 dd (10,0; 3,4)
17e	4,07 dd (11,1;1,6)	4,09 dd (11,1; 2,1)	4,05 dd (11,0; 5,3)	3,93 dd (10,0; 3,5)
18ax	5,07 dd (11,1;1,0)	4,97 dd (17,8; 1,1)	1,65 d (6,8), CH ₃	18-CH ₃ 1,28 t (7,4)
18eq	4,93 dd (17,8;11,0)	5,14 dd (11,0; 1,2)		
19	6,25 dd (17,8; 10,9)	6,24 dd (17,8; 11,0)	5,38 br q (6,8)	2,87 dd (17,0; 9,3) 2,40 dd (17,0; 7,5)
21exo	2,75 d (10,6)	2,77 d (10,4)	3,41 d (15,0)	
21endo	2,37 d (10,5)	2,35 d (10,3)	3,33 d (15,0)	
N _b Me	2,25 s	2,25 s	2,36	
N _a OMe		3,96 s	3,98	3,94 s
N-H	9,25			

Bảng 2: Số liệu phổ ¹³C-NMR của chất **1-4** [125 MHz, CDCl₃, giá trị δ (ppm)]

C	Gelsemin (1)	Gelsevirin (2)	Humantenin (3)	Gelsenicin (4)
2	179,18	172,85	174,30	171,15
3	69,28	69,34	72,06	74,72
5	71,91	72,25	61,46	72,12
6	50,31	50,88	28,16	37,47
7	54,03	52,19	55,16	55,67
8	131,67	128,10	129,05	132,03
9	128,03	128,19	128,02	124,50
10	121,57	122,72	119,54	123,18
11	127,89	127,91	125,78	127,88
12	109,08	107,05	107,21	106,39
13	140,63	139,41	138,84	137,85
14	22,67	23,00	25,24	25,48
15	35,58	35,81	34,43	39,55
16	37,98	38,06	38,11	42,29
17	61,28	61,46	66,84	61,86
18	112,29	112,99	12,74	9,82
19	138,27	138,05	122,88	26,82
20	53,77	54,01	136,91	184,41
21	65,68	66,07	45,52	
N _b Me	40,50	40,61	42,43	
N _a OMe		63,07	63,28	63,16

Phổ hồng ngoại của các ancaloit **1-4** đều có hấp thụ đặc trưng của nhóm carbonyl ở 1710 cm⁻¹. Phổ ¹H-NMR đều có tín hiệu của 4 proton thơm cạnh nhau ở trong khoảng δ 6,7 - 7,4 ứng với H-9, H-10, H-11 và H-12. Phổ ¹H-NMR của

các chất này ở vùng trường cao tương đối phức tạp vì có nhiều tín hiệu của các proton no (aliphatic proton) bị che phủ lẫn nhau, cho thấy đây là các oxindol ancaloit có chứa hệ vòng không no (aliphatic polycyclic) [2, 4]. Kết luận

này được chứng minh thêm qua phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT: phía trường thấp có tín hiệu của nhóm cacbonyl (δ 170-180, C-2), 4 nhóm CH của nhân thơm (δ 106-132, C-9, C-10, C-11 và C-12). Phía trường cao hơn là tín hiệu của nhóm OCH_2 (δ 61,3-66,8, C-17), $\text{N}_b\text{-CH}_2$ (δ 65,7-66,1, C-21) và cacbon vòng no (δ 23,0-55,0). Phổ khối va chạm electron (EI-MS) của các chất **1** - **4** đều có pic ion phân tử.

Phổ khối va chạm electron (EI-MS) của chất **1** có pic ion phân tử ở m/z 322 $[\text{M}]^+$ (40) ($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$) và một số pic quan trọng khác ở m/z 279 $[\text{M}-43]^+$ (40), 251 $[\text{M}-71]^+$ (20), 108 $[\text{M}-214]^+$ (100). Pic m/z 120 $[\text{M}-202]^+$ do tạo thành ion 1-metyl-3-vinylpyridinium. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất **1** có tín hiệu của 4 proton thơm cạnh nhau ở δ 7,38 - 6,72 và tín hiệu của nhóm cacbonyl δ 179,16 (C-2) ở phổ $^{13}\text{C-NMR}$ chứng minh cho sự có mặt của vòng oxindol. Phía trường cao hơn là tín hiệu của nhóm metylenoxy (δ 61,28, C-17) và nhóm $\text{CH}_2\text{-N}$ (δ 65,68, C-21). Doublet kép của vinyl proton ở δ 6,25 (H-19) và cặp doublet ở δ 5,07 (Ha-18), 4,93 (Hb-18) cho thấy phân tử có nhóm $=\text{CH}_2$ ở cuối mạch. Điều này được khẳng định thêm qua tín hiệu của nhóm $=\text{CH}_2$ (δ 112,29) trong phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT. Hai phổ này cũng cho biết phân tử có 20 nguyên tử cacbon trong đó có: 1 nhóm CH_3 (δ 40,50, $\text{N}_b\text{-CH}_3$), 4 nhóm CH_2 , 10 nhóm CH và 5 cacbon bậc bốn (Cq). Qua phân tích phổ và so sánh với số liệu đã công bố trong tài liệu [2], đã xác định được cấu trúc của chất **1** là gelsemin. Gelsemin là một ancaloit rất độc, đặc biệt đối với tim và tương đối phổ biến trong chi Lá ngón (*Gelsemium*).

Phổ khối EI-MS của chất **2** có sự phân mảnh phù hợp với chất **1**, nhưng có hơn một nhóm metoxy (OCH_3), được thể hiện qua pic ion phân tử ở m/z 352 $[\text{M}]^+$ (40) và một số pic khác ở m/z 321 $[\text{M}-31]^+$ (90), 309 $[\text{M}-43]^+$ (35), 291 $[\text{M}-31-30]^+$ (16), 278 $[\text{M}-74]^+$, 108 $[\text{M}-31-214]^+$ (100). Pic m/z 323 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ (14), 292 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{-OCH}_3]^+$ (14), 239 $[\text{M}-82-31]^+$, 176 $[\text{M}-176]^+$ tạo thành do có sự chuyển dạng *trans* [2]. Pic m/z 321 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (90), 291 $[\text{M}-\text{OCH}_3\text{-NO}]^+$ (14), gợi ý cho thấy nhóm metoxy gắn với nitơ của nhân indol. Kết luận này được khẳng định thêm

qua phổ NMR. So sánh phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **2** với chất **1**, ta thấy hai chất chỉ có sự thay đổi ở nhân indol: (δ _H 6,72, δ _C 107,05, C-12) và có thêm một nhóm metoxy (δ _H 3,96, δ _C 63,07). Các tín hiệu của hệ vòng monotерpen đều phù hợp với phổ của gelsemin. Qua phân tích phổ và so sánh với số liệu đã công bố trong tài liệu [2, 3], đã xác định được cấu trúc của chất **2** là gelsevirin hay còn có tên là $\text{N}_a\text{-metoxygelsemin}$.

Phổ EI-MS của chất **3** có pic ion phân tử m/z 354 (60) và một số pic quan trọng khác ở m/z 339 $[\text{M}-15]^+$ (8), 323 $[\text{M}-31]^+$ (100), 178 $[\text{M}-176]^+$ (10), 122 $[\text{M}-232]^+$ (70). Phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **3** có nhân oxindol giống với chất **1** và **2**, nhưng lại có doublet của nhóm methyl cạnh nối đôi δ 1,65 (d, J = 6,80 Hz, H₃-18), quartet của vinyl proton δ 5,38 (q, J = 6,8 Hz, H-19) và singulet của nhóm N-CH_3 ở δ 2,36. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **3**, có tín hiệu của nhóm $\text{CH}_2\text{-N}$ chuyển về phía trường cao hơn (δ 45,52, C-21) và nhóm metylenoxy chuyển về phía trường thấp hơn so với chất **1**, **2** (δ 66,84, C-17), cho thấy phân tử chất **3** có sự chuyển vị của nối đôi ở mạch nhánh (C₁₈-C₂₀). Kết luận này được khẳng định qua tín hiệu của nhóm $=\text{CH}$ (δ 122,88, C-19) và Cq cạnh nối đôi (δ 136,91, C-20). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT cũng cho biết chất **3** có 21 nguyên tử cacbon, trong đó có 3 nhóm CH_3 , 4 nhóm CH_2 , 9 nhóm CH và 5 cacbon bậc 4 (Cq). Qua phân tích phổ và so sánh với số liệu đã công bố trong tài liệu [2, 4], đã xác định được cấu trúc của chất **3** là humantenin. Chất này cũng đã được tìm thấy từ cây Lá ngón của Thái Lan [2].

Phổ EI-MS của chất **4** có pic ion phân tử ở m/z 326 (60) và một số pic khác ở m/z 321 $[\text{M}-31]^+$ (90), 309 $[\text{M}-17]^+$ (5), 295 $[\text{M}-31]^+$ (100), 150 $[\text{M}-176]^+$ (90), 122 $[\text{M}-176-28]^+$ (100). Phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất **4** có nhân oxindol phù hợp với phổ của chất **2** và **3**, nhưng không có tín hiệu của vinyl proton (H-19) mà thay vào đó là tín hiệu của nhóm etyl được thấy rõ qua một triplet (δ 1,28, t, H₃-18) và hai doublet của doublet ở δ 2,87 và δ 2,40 (H_a-19; H_b-19). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho thấy phân

tử của chất **4** có 19 nguyên tử cacbon, trong đó có 2 nhóm CH₃, 4 nhóm CH₂, 8 nhóm CH và 5 cacbon bậc 4 (Cq). Phổ ¹³C-NMR của chất **4** ở phía trường thấp, ngoài tín hiệu của nhóm cacbonyl ở δ_C 171,45 (C-2) còn có tín hiệu của nhóm -C=N ở δ_C 184,41 (C-20); phía trường cao có tín hiệu của nhóm methyl ở δ 9,82 (C-18), metylen ở 26,82 (C-19) và tín hiệu của nhóm metoxy ở δ 63,16 (N_a-OCH₃). Qua phân tích phổ và so sánh với chất **2** và **3**, đã xác định được cấu trúc của chất **4** là gelsenixin. Dẫn xuất 19-oxo-gelsenixin cũng được tìm thấy từ cây Lá ngón của Thái Lan [2]. Người ta đã xác định được cấu hình tuyệt đối của gelsenixin bằng nhiễu xạ tia X (X-ray) và phổ nhĩ sắc tròn (CD).

Một điều lý thú là, dựa vào kết quả nghiên cứu cấu trúc hóa học các monoteren indol ancaloit được phân lập từ chi Lá ngón, các nhà khoa học Nhật Bản và Thái Lan đã đưa ra giả thuyết quá trình sinh tổng hợp các *Gelsemium ancaloit*. Cấu trúc của các ancaloit này đã được đưa ra một cách độc lập dựa trên cơ sở phát sinh sinh học và kết hợp với phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân phân giải cao một chiều và hai chiều. Tất cả các phương pháp thoái biến thông thường nhằm xác định cấu trúc của *Gelsemium ancaloit* đều không thành công.

III - THỰC NGHIỆM

1. Hóa chất và thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân đo trên máy Bruker Avance 500 MHz tại Viện Hóa học: Độ dịch chuyển hoá học (δ) được tính theo ppm, tetramethylsilan (TMS) cho ¹H-NMR hoặc tín hiệu dung môi CDCl₃ cho ¹³C-NMR được dùng làm nội chuẩn, hằng số tương tác (J) tính bằng Hz. Phổ khối EI-MS ghi trên máy Hewlett Packard 5989B MS Engine với năng lượng ion hoá 70 eV tại Viện Hóa học. Điểm chảy đo trên máy BOTIUS (Heiztisch Mikroskop) tại Viện Hoá Học. Sắc ký lớp mỏng phân tích (SKLMPT) được tiến hành trên bản mỏng nhôm silicagel Merck 60F₂₄₅ trắng sẵn, độ dày 0,2 mm. Silicagel cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm được dùng cho sắc ký cột.

2. Xử lý mẫu thực vật và phương pháp chiết

Mẫu cây Lá ngón được thu hái vào tháng 8 năm 2000 tại Đồng Văn, Lạng Sơn. Tên cây do TS. Ngô Văn Trại xác định, tiêu bản số 2199 được lưu tại Viện Dược liệu, Hà Nội. 600 g Lá ngón khô được ngâm chiết với dung dịch MeOH / H₂O (85 : 15). Dịch chiết được loại bớt dung môi dưới áp suất giảm, sau đó chiết lần lượt với n-hexan, EtOAc, và n-butanol. Loại dung môi thu được 3,5 g, 12 g và 15,4 g cạn dịch chiết tương ứng. Hòa tan cạn dịch chiết n-BuOH bằng dung dịch axit HCl (5%), lọc bỏ phần không tan, dịch axit được kiềm hóa bằng NaHCO₃ và chiết lại bằng CHCl₃ (4 lần). Cất loại CHCl₃ dưới áp suất giảm thu được 2,1 g ancaloit tổng (hàm lượng 0,035% so với lá khô). 2,1 g cạn ancaloit được phân tách bằng SKC trên silicagel, dung môi giải hấp: CHCl₃/MeOH (98 : 2 → 80 : 20) thu được 43 phân đoạn (100 ml / phân đoạn). Các phân đoạn có sắc ký lớp mỏng gắn nhau được gộp lại thành 7 phân chính (F-1 - F-7). Các phân đoạn được tinh chế tiếp bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel, hoặc sắc ký lớp mỏng điều chế với các hệ dung môi thích hợp thu được các ancaloit **1-4** sạch.

Gelsemin (1): Chất dầu, đnc. 178⁰C, được tách ra từ phân đoạn F-4 bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel, dung môi CHCl₃/MeOH (95 : 5). Hàm lượng: 0,013% (so với nguyên liệu khô). R_f = 0,52, dung môi CHCl₃ / MeOH (90 : 10). Phổ hồng ngoại (ν^{*}_{KBr} cm⁻¹): 3249,3; 2921,7 (N-H); 1709,6 (C=O); 1618,4; 1473,1; 1231,0; 1097,1; 909,1; 735. Phổ khối EI-MS (70 eV) m/z (%): 322 [M]⁺ (40), 279 (40), 251 (20), 146 (15), 134 (16), 120 (15), 108 (100), 93 (8), 77 (10). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR: Bảng 1 và 2.

Gelsevirin (2): Chất bột màu trắng, đnc. 245⁰C được tách ra từ phân đoạn F-3, bằng sắc ký lớp mỏng điều chế, hàm lượng 0,0013%. R_f = 0,40, CHCl₃ / MeOH (95 : 5). Phổ hồng ngoại (ν^{*}_{KBr} cm⁻¹): 2930,0; 2247,9; 1732,9 (C=O); 1625,9; 1472,1; 1331,7; 1084,3; 917,1; 756,6. Phổ khối EI-MS (70 eV) m/z (%): 352 [M]⁺(40), 321 (90), 309 (25), 291 (12), 278 (12), 250 (10), 108 (100). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR: Bảng 1 và 2.

Humantenin (3): Chất vô định hình màu nâu, thu được từ phân đoạn F-2; Rf = 0,50, CHCl₃ / MeOH (95 : 5), hàm lượng 0,0028%. Phổ hồng ngoại (ν_{KBr}^* cm⁻¹): 2929,2; 1719,6 (C=O); 1614,6; 1461,5; 1326,5; 1116,4; 912,4; 747,3. Phổ khối EI-MS (70 eV) *m/z* (%): 354 [M]⁺ (100), 339 [M-15]⁺ (8), 323 [M-31]⁺ (100), 308 (6), 178 (12), 122 (80). Phổ ¹H và ¹³C-NMR: Bảng 1 và 2.

Gelsenixin (4): Chất dầu, được tách ra từ phân đoạn F-1 bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel, dung môi CHCl₃ / MeOH (98 : 2), hàm lượng 0,005%. Rf = 0,43, CHCl₃ / MeOH (95 : 5). Phổ hồng ngoại (ν_{KBr}^* cm⁻¹): 2929,0; 2245,0; 1726,4 (C=O); 1620,2; 1323,6; 1111,2; 914,5; 733,3. Phổ khối EI-MS (70 eV) *m/z* (%): 306 [M]⁺ (100) (C₂₀H₂₂N₂O), 291 [M-15]⁺ (7), 277 (7), 263 (18), 223 (25), 120 (20), 108 (16), 70 (45). Phổ ¹H và ¹³C-NMR: Bảng 1 và 2.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn TS Ngô Văn Trại (Viện Dược liệu, Hà Nội) về việc thu hái và xác định mẫu thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (1991). Những Cây thuốc và Vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, Tr. 366.
2. Dhavadee Ponlux, Sumphan Wongscripanata, Sanan Subhadhirasakul, Hiromitsu Takayama, Masaki Yokota, Koreharu Ogata (1988). Tetrahedron, Vol. 44, P. 5075 - 5094.
3. Schun Yeh, Geoffrey A. Cordell (1986). Journal of Natural Products, Vol. 49, P. 483 - 487.
4. Long-Ze Lin, Schun Yeh, Geoffrey A. Cordell, Chou-Zhou Ni, and Jon Clardy (1991). Phytochemistry, Vol. 30, P. 679 - 683.