



# PHÂN LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT TỰ NHIÊN TỪ THÂN HÀNH TRINH NỮ HOÀNG CUNG (*Crinum latifolium* L., *Amaryllidaceae*)

Isolation of daucosterol and lycorine from the bulbs of *Crinum latifolium* L., *Amaryllidaceae*

Nguyễn Thị Tuyết Nhung<sup>1,a\*</sup>, Võ Thị Bạch Huệ<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup> Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng, Biên Hòa, Đồng Nai.

<sup>a</sup> tuyetnhung@lhu.edu.vn, <sup>b</sup> vothibachhue@gmail.com

**TÓM TẮT.** Trinh nữ hoàng cung (TNHC) từ lâu đã được dân gian biết đến với công dụng điều trị u xơ, ung thư tử cung, u xơ và ung thư tiền liệt tuyến. Từ thân hành TNHC, đề tài đã phân lập được 270,6 mg hợp chất CL1 và 570,4 mg hợp chất CL2 bằng phương pháp sắc ký cột. Các hợp chất này được kiểm tra độ tinh khiết trên sắc kí lớp mỏng và xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ nghiệm (phổ khối (MS), phổ hồng ngoại (IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)). Kết quả đã định danh được CL1 là  $\beta$ -sitosterol-3-O-D-glucopyranosid (daucosterol), một phytosterol có tác dụng ức chế hấp thu cholesterol ở đường ruột và CL 2 là lycorin, một alkaloid đại diện cho chi *Crinum*, có hoạt tính giảm đau, kháng viêm và kháng khối u mạnh.

**ABSTRACT.** *Crinum latifolium* L. is used in Asia folk medicine as an anticancer remedy, rubefacient, tonic and for treatment of allergic disorders and tumor diseases. This study isolated 270,6 mg of CL1 and 570,4 mg of CL2 from the bulbs of *Crinum latifolium* L. by column chromatography. These compounds were purified by thin layer chromatography (TLC) and identified by MS, IR and NMR spectrums. The results showed that CL1 was  $\beta$ -sitosterol-3-O-D-glucopyranosid (daucosterol) which inhibits cholesterol absorption in the intestine and CL 2 was lycorine, an important alkaloid of *Crinum* with antitumor, anti – inflammatory and antimicrobial activities.

**TỪ KHOÁ:** lycorin, daucosterol, *Crinum latifolium* L

**KEYWORDS:** lycorine, daucosterol, *Crinum latifolium* L

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trinh nữ hoàng cung (TNHC) (*Crinum latifolium* L. họ Amaryllidaceae) là một thảo dược quen thuộc trong dân gian với công dụng điều trị u xơ, ung thư tử cung, u xơ và ung thư tiền liệt tuyến. Alkaloid là nhóm hoạt chất chính mang lại các tác dụng sinh học của TNHC, ngoài ra còn có các thành phần khác như flavonoid, phytosterol và các acid hữu cơ [1]. Hiện nay đã có một số chế phẩm từ TNHC được phép lưu hành trên thị trường như Crila, OPCrilati ... Vì vậy nghiên cứu được tiến hành với mục đích chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất tự nhiên từ thân hành TNHC. Các hợp chất được phân lập sẽ là nguồn nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm các chế phẩm từ TNHC.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

#### Nguyên liệu

Thân hành TNHC được thu hái tại Bình Định vào tháng 3/2016. Nguyên liệu sau khi thu hái được rửa sạch, cắt thành lát nhỏ, phơi khô, xay thành bột thô có độ ẩm khoảng 9,4%.

#### Dung môi, hóa chất, trang thiết bị

Dung môi sử dụng trong nghiên cứu là ethanol, methanol, *n*-hexan, cloroform và ethyl acetat (Xilong chemical, Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Sắc ký lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng silicagel F<sub>254</sub> (Merck). Phát hiện bằng đèn UV ở bước sóng 254; 365 (nm); thuốc thử VS và Dragendorff. Sắc ký cột tiến hành với silica gel pha thuận, (Trung Quốc), cỡ hạt 0,040-0,060 mm.

Các thiết bị sử dụng gồm thiết bị quang phổ hồng ngoại (IR) Shimadzu IRAffinity-1S tại Khoa Dược, Đại học Y Dược TpHCM, máy đo khối phổ (MS) LC - MS Shimadzu – 8040 tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TpHCM và máy cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) Bruker AM 500 FT-NMR spectrometer tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### Chiết xuất, phân lập

Bột dược liệu (10 kg) được chiết ngấm kiệt với dung môi ethanol 70%. Thu hồi dung môi đến cao đặc, khối lượng cao thu được là 4,2 kg. Toàn bộ lượng cao được phân tán trong dung dịch acid hydrochloric 1% (điều chỉnh dung dịch thử đạt pH 3 - 4), sau đó kiểm hóa bằng dung dịch amoniac 25% (điều chỉnh dung dịch thử đạt pH 9 - 10). Lọc lấy dịch lọc, chiết với dung môi cloroform, dịch chiết được thu hồi dung môi và thu được 43,52 g cao đặc.

Phân lập các hợp chất tinh khiết từ cao cloroform bằng kỹ thuật sắc ký cột cô điển, chương trình dung môi với độ phân cực tăng dần từ *n*-hexan - cloroform – ethyl acetat đến methanol. Các phân đoạn được đặt tên từ PĐ 1 đến PĐ 11.

PĐ 7 xuất hiện tủa vô định hình, màu trắng. Tiến hành lọc và rửa tủa với dung môi methanol lạnh, kết tủa được đặt tên CL 1.

PĐ 9 xuất hiện chất rắn kết tinh hình khối nhỏ, không màu. Tiến hành lọc và rửa chất kết tinh với dung môi *n*-hexan lạnh và methanol lạnh, kết tủa được đặt tên CL 2.

Received: October, 8<sup>th</sup>, 2019

Accepted: May, 10<sup>th</sup>, 2020

\*Corresponding Author

Email: tuyetnhung@lhu.edu.vn

**Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc**

Hợp chất CL 1 và CL 2 được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau. Xác định cấu trúc các hợp chất này bằng phương pháp phân tích phổ IR, MS và NMR.

**3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN**

**Chiết xuất, phân lập**

Từ 43,52 g cao cloroform của thân hành TNHC, đề tài đã phân lập được 270,6 mg hợp chất CL 1 và 570,4 mg hợp chất CL 2.

**Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc**

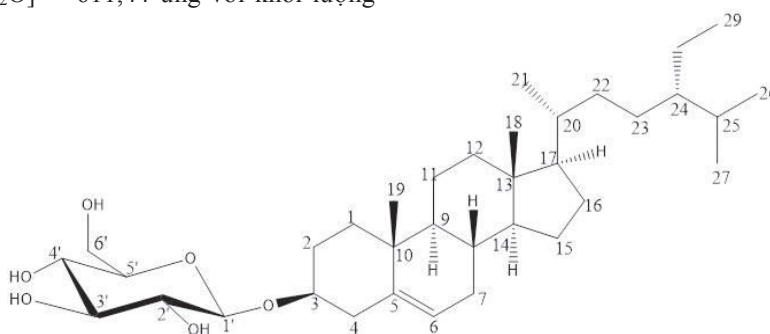
CL1 sau khi triển khai SKLM với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau: cloroform – methanol (9:1); n-butanol; ethyl acetat – acetone (3:7), phát hiện bằng thuốc thử VS, CL 1 chỉ cho 1 vết duy nhất. Như vậy, CL 1 tinh khiết trên SKLM.

CL 2 sau khi triển khai SKLM với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau: cloroform – methanol – NH<sub>3</sub> 25% (6:1:0,05); cloroform – ethyl acetat – methanol – NH<sub>3</sub> 25% (3:2:1:0,05); cloroform – acetonitril – NH<sub>3</sub> 25% (3:1:0,05); phát hiện tại bước sóng 254;365 nm và thuốc thử Dragendorff, CL 2 chỉ cho 1 vết duy nhất. Như vậy, CL 2 tinh khiết trên SKLM.

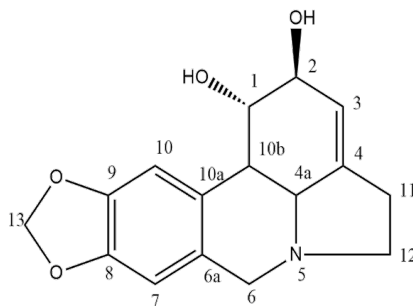
**Hợp chất CL 1:** bột vô định hình màu trắng. Phổ MS cho mảnh m/z [M+2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> = 611,44 ứng với khối lượng

phân tử 576,44 phù hợp với công thức phân tử C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>. Phổ IR cho các đỉnh hấp thụ tương ứng với số sóng ν (cm<sup>-1</sup>) 3385,07 (OH); 2958,80 (CH<sub>2</sub>-CH); 1460,11 (-C=C-H); 800,46 và 661,58 (-C=C-). Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO) được trình bày ở Bảng 1. Trên phổ <sup>13</sup>C-NMR có 34 tín hiệu carbon, trong khoảng δ<sub>c</sub> từ 60 - 80 ppm có 4 tín hiệu cộng hưởng ở δ<sub>c</sub> 73,43 ppm; 76,71 ppm; 70,1 ppm và 76,89 ppm khoảng cách không đều nhau; cùng với tín hiệu của nhóm methylen (-CH<sub>2</sub>-) ở δ<sub>c</sub> = 61,07 ppm và 1 tín hiệu ở vị trí δ<sub>c</sub> 100,76 ppm là carbon -O-C-O- ở vị trí C-1' cho thấy đây là 6 tín hiệu carbon của đường β-D-glucose. Dựa vào phổ HSQC, <sup>13</sup>C-NMR, và <sup>1</sup>H-NMR cho thấy có 1 carbon nhóm methin (-CH-) không no tại δ<sub>c</sub> = 121,16 ppm; 12 nhóm methylen (-CH<sub>2</sub>-) tại δ<sub>c</sub> 61,07 ppm (C-6'); 38,28 ppm (C-12); 36,80 ppm (C-1); 33,32 ppm (C-22); 31,39 ppm (C-7); 31,34 ppm (C-8); 29,23 ppm (C-2); 27,75 ppm (C-16); 23,83 ppm (C-15); 22,58 ppm (C-28); 20,56 ppm (C-11) và 1 carbon nhóm methylen (-CH<sub>2</sub>-) bị chông ở vị trí dung môi trên phổ <sup>13</sup>C-NMR, thể hiện rõ trên phổ HSQC có δ<sub>c</sub> = 39,20 ppm; 4 nhóm methin (-CH-) no tại δ<sub>c</sub> 56,15 ppm (C-14); 55,40 (C-17); 35,45 (C-20); 28,69 (C-25). 1 nhóm methyl tại 11,62 ppm (C-18).

Kết hợp các dữ liệu và so sánh với tài liệu tham khảo [2] đã xác định hợp chất CL 1 là β-sitosterol-3-O-D-glucopyranosid (daucosterol) có cấu trúc như Hình 1.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của daucosterol



Hình 2. Cấu trúc hóa học của lycorin

**Hợp chất CL 2:** là một kết tinh dạng hình khối không màu. Phổ MS cho mảnh m/z [M+H]<sup>+</sup> = 288,34 ứng với khối lượng phân tử 287,34; phù hợp với công thức phân tử C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>. Phổ IR cho các đỉnh hấp thụ tương ứng với số sóng ν (cm<sup>-1</sup>) 3325,28 (OH); 1018,41 (- O-CH<sub>2</sub>-O-); 987,40 – 744,52 (C=C). Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO) được trình bày ở Bảng 2. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho thấy CL 2 có 17 proton cho các tín hiệu từ 2-7 ppm, trong đó có 2 tín hiệu bị trùng pic dung môi, được phát hiện nhờ phổ HSQC, đó là δ<sub>c</sub> 3,32 ppm (1H; d; j =14,5) và 2,50 ppm (1H; overlapped). Phổ <sup>13</sup>C-NMR cho

thấy CL 2 có 16 carbon cho các tín hiệu từ 20-150 ppm. Trong đó có một carbon có tín hiệu δ<sub>c</sub> = 40,0 ppm trùng với pic dung môi, được xác định dựa vào phổ HSQC. Có 2 tín hiệu carbon gần với nhóm thế oxy, dịch chuyển về vùng từ trường thấp δ<sub>c</sub> = 145,61 ppm và 145,16 ppm. Có một tín hiệu chuyển dịch về vùng từ trường thấp đặc trưng cho nhóm methylenedioxy (-O-CH<sub>2</sub>-O-) δ<sub>c</sub>=100,5 ppm.

Kết hợp các dữ liệu và so sánh với tài liệu tham khảo [3] đã xác định hợp chất CL 2 là lycorin có cấu trúc như Hình 2. Lycorin đã phân lập có độ tinh khiết 99,7% (xác định bằng phương pháp HPLC- đầu dò PDA).

**Bảng 1.** So sánh phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của CL 1 với daucosterol (dung môi đo DMSO)

Vị trí	Daucosterol [2]		Hợp chất CL 1	
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	36,8		36,8	
2	27,9		29,23	
3	77,0		76,7	3,08 (1H; m)
4	39,8		39,2	1,95 (1H; m) 1,14 (1H; m)
5	140,3		140,4	
6	121,3	5,30 (1H; m)	121,2	5,32 (1H; m)
7	31,5		31,4	
8	49,6		49,6	
9	36,3		36,18	
10	38,3		38,3	
11	20,6		20,6	
12	40,0		38,28	2,35 (1H; m) 2,10 (1H; m)
13	41,9		41,8	
14	55,5		56,2	0,95 (3H; m)
15	23,9		23,8	
16	29,3		27,75	
17	56,2		55,4	
18	11,6	0,64 (3H; s)	11,6	0,65 (3H; s)
19	19,1	1,2 (3H; m)	19,1	1,08 (3H; m)
20	35,5		35,5	1,33 (1H; m)
21	19,8		18,58	
22	33,4		33,3	
23	25,4		25,4	
24	45,2		45,1	
25	22,6		22,6	1,62 (1H; m)
26	11,7		11,8	
27	28,7		28,7	
28	19,0		19,7	
29	18,7		18,9	
	<b>D- Glucose</b>			
1'	100,8	4,2 (1H; d)	100,8	4,22 (1H; d)
2'	73,5	2,88 (1H; m)	73,4	2,88 (1H; m)
3'	76,8	3,11 (1H; m)	76,7	3,12 (1H; m)
4'	70,1	3,00 (1H; m)	70,1	3,07 (1H; m)
5'	76,8	3,50 (1H; m)	76,9	3,47 (1H; m)
6'	61,1	3,62 (1H; m) 3,39 (1H; m)	61,1	3,64 (1H; m) 3,41 (1H; m)

**Bảng 2.** So sánh phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  của CL 2 với lycorin (dung môi đo DMSO)

Vị trí	Lycorin [3]		Hợp chất CL 2	
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	70,2	4,27 (1H; s)	70,2	4,27 (1H; s)
2	71,7	3,97 (1H; s)	71,7	3,97 (1H; s)
3	118,4	5,36 (1H; s)	118,4	5,36 (1H; s)
4	141,6	-	141,7	-
4a	60,7	2,60 (1H; d)	60,8	2,60 (1H; d)
6	56,7	3,32 (1H; d) 4,01 (1H; d)	56,7	3,32 (1H; d) 4,02 (1H; d)
6a	129,6	-	129,6	-
7	107	6,67 (1H; s)	106,9	6,67 (1H; s)
8	145,2	-	145,2	-
9	145,6	-	145,6	-
10	105,0	6,8 (1H; s)	105,0	6,8 (1H; s)
10a	129,7	-	129,7	-
10b	40,0	2,50 (1H; overlapped)	40,2	2,49 (1H; overlapped)
11	28,1	2,40-2,50 (2H; m)	28,1	2,44-2,50 (2H; m)
12	53,2	3,19 (1H; m) 2,20 (1H; m)	53,3	3,19 (1H; m) 2,20 (1H; m)
13	100,5	5,94-5,95 (2H; 2d)	100,5	5,94-5,95 (2H; 2d)
1-OH		4,74 (1H; d)		4,78 (1H; d)
2-OH		4,85 (1H; d)		4,89 (1H; d)

### Bàn luận

Daucosterol là một hợp chất thuộc nhóm phytosterol, thường gặp ở nhóm thực vật bậc cao. Tác dụng nổi bật nhất của phytosterol là ức chế sự hấp thu cholesterol ở đường ruột.

Lycorin là một chất đánh dấu để kiểm nghiệm dược liệu TNHC và một số dược liệu trong chi *Crinum*. Lycorin đã phân lập có độ tinh khiết cao (99,7%), khối lượng phân lập lớn (570,4 mg), được lựa chọn để thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn của ISO 35.

### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được hai hợp chất tự nhiên từ phân đoạn cloroform của thân hành Trinh nữ hoàng cung, lần lượt được xác định là daucosterol (270,6 mg) và lycorin (570,4 mg). Lycorin với độ tinh khiết cao (99,7%) được chọn để thiết lập chất đối chiếu, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm.

### 5. CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện và hỗ trợ kinh phí cho đề tài cấp cơ sở mã số LHU-RF-MP-18-01-15.

## 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học - Thời đại, **2007**, 510-512.
- [2] Azadeh Manayi. *et al*, Chemical Constituents and Cytotoxic Effect of the Main Compounds of *Lythrum salicaria* L., *Z. Naturforsch* (**2013**), 68c, 367 – 375.
- [3] Nguyễn Hữu Lạc Thủy, “Nghiên cứu thành phần hóa học, thiết lập chất đối chiếu và xây dựng quy trình kiểm nghiệm thành phần alcaloid và flavonoid cho cây Trinh Nữ Hoàng Cung–*Crinum latifolium* L., Amaryllidaceae”, Luận án tiến sĩ dược học, **2014**, Đại học Y Dược TP. HCM, 119.