

2596
1996

96.64-216/KQ

BỘ Y TẾ - LIÊN HIỆP DƯỢC
XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW2 HÀ NỘI

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI KyO_2O_3

**"NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT CÁC ALCALOID KHÁC
TỪ DỪA CẠN ĐỂ TẬN DỤNG NGUYÊN LIỆU"**

- 1995 -

B

2596

24/6/96

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI Ky0203

PGS. TRẦN NGUYỄN HỮU

Những người thực hiện chính :

1. PGS-PTS Phạm Thanh Kỳ - Đại học Dược Hà Nội.
2. PGS-DS Nguyễn Lan Phương-XNDPTW2 Hà Nội.
3. DS Nguyễn Xuân Chiến - XNDP TW2 Hà Nội.
4. DS Nguyễn Việt Hùng- XNDP TW2 Hà Nội.
5. DS Trần Văn Thanh - XNDP TW2 Hà Nội.
6. Tổ hoá chất Fx hoá - XNDP TW2 Hà Nội.

Lời cảm ơn

Trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình của các nhà khoa học tại các Viện nghiên cứu và trường Đại học, các chuyên viên và cán bộ nghiên cứu kỹ thuật của Xí nghiệp Dược phẩm TW 2. Đặc biệt, GS Nguyễn Xuân Dũng đã giúp gửi mẫu ghi khối phổ, PTS Đỗ Ngọc Thanh, PTS Phạm Bình Minh đã giúp chúng tôi ghi phổ hồng ngoại. PTS Nguyễn Quang Đạt giúp xác định độ chảy. Tiến sĩ Phan Quốc Kinh và PGS Nguyễn Văn Bàn đã cung cấp mẫu chuẩn. Phòng nghiên cứu, phân xưởng hoá và tổ hoá chất Xí nghiệp Dược phẩm TW 2 đã giúp đỡ triển khai sản xuất thử nghiệm và bào chế. Phòng KCS và dược sĩ Mai Phương đã giúp phân tích sản phẩm. Chúng tôi cũng đã nhận được sự giúp đỡ của nhiều bạn bè đồng nghiệp khác.

Bộ Khoa học Công nghệ và môi trường, Ban chủ nhiệm chương trình Ky02 cùng Ban Giám đốc và cán bộ quản lý của Xí nghiệp Dược phẩm 2 đã tạo điều kiện vật chất và động viên tinh thần cho thực hiện đề tài.

Chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc.

TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU HOẠT CHẤT CỦA CÂY DỪA CẠN THẾ GIỚI VÀ TRONG NƯỚC :

Đã từ lâu, Dừa cạn là một cây thuốc dân gian mọc hoang và được trồng nhiều ở các nước nhiệt đới như vùng Đông Nam Á, Ấn độ, Madagascar, Cu ba...

Các nhà khoa học đã sớm nghiên cứu cây Dừa cạn, đặc biệt từ những năm 1950 lần lượt đã tìm ra nhiều hoạt chất, chủ yếu là các alkaloid có nhân Indol và Dihidroindol chia làm 2 nhóm :

- Nhóm Monomer : gồm những chất có tác dụng hạ huyết áp, hạ đường huyết, lợi tiểu như Ajmalicin, Serpentin, Vindolin, Catharanthin.

- Nhóm Dimer : gồm những chất có tác dụng chữa ung thư như Vinblastin, Vincristin, Vinleurosin, Vinrosidin.

Ở nước ta, nhiều công trình của Viện dược liệu, Đại học Dược, Bộ môn dược lý Đại học Y và bệnh viện C Hà Nội đã nghiên cứu về Dừa cạn.

Xí nghiệp Dược phẩm TW 2 Hà Nội cũng đã sớm nghiên cứu cây Dừa cạn và đã được đưa vào chương trình cấp Nhà nước, các sản phẩm được đưa vào sản xuất và có tín nhiệm trong nhân dân cũng như y bác sĩ như viên Vinca chữa cao huyết áp, Vinblastin Sulfat thuốc tiêm đông khô dùng điều trị một số bệnh ung thư máu.

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT CÁC ANCOLOIT KHÁC TỪ DỪA CẠN ĐỂ TẬN DỤNG NGUYÊN LIỆU.

Như chúng ta đã biết Dừa cạn có nhiều hoạt chất mà chúng ta chỉ mới chiết được hoạt chất toàn phần (Viên Vinca) và phân lập Vinblastin sulfat.

Đề tài Ky0₂0₃ nhằm chiết các alkaloid khác để tận dụng nghiên cứu chủ yếu là phân lập Ajmalicin (Raubasin) từ rễ do nhu cầu điều trị và nghiên cứu Vindolin, Catharanthin từ lá.

1. Ajmalicin C₂₁H₂₄N₂O₃, là một alkaloid có tác dụng hạ huyết áp tuần hoàn não dùng chữa suy giảm trí nhớ ở người già, phòng và điều trị rối loạn tuần hoàn não (1). Đây là alkaloid được phân lập đầu tiên từ rễ dừa cạn và Gontarel đã xác định công thức cấu tạo từ 1951 (2). Đã được hãng Bohrringer (Đức) sản xuất

dưới tên biệt dược Lamuran, và hãng Pierre Fabre (Pháp) đưa vào công thức viên Duxil, Iskedyl.

Là tinh thể, điểm chảy 253-257°C, $[\alpha]_D^{20} = -60^\circ$ (C=0,5/CHCl₃)

UV_{max} 227, 282nm (2).

2. Vindoline C₂₅H₃₂N₂O₆ được Kamat và cộng sự phân lập từ 1958, Gorman và cộng sự xác định cấu trúc năm 1962 (2,3) được nghiên cứu có tác dụng hạ đường huyết (4). Vindoline là một alkaloid nhân dihydroindol được sinh tổng hợp trong cây với alkaloid nhân indol để tạo ra dimer. Ngày nay hãng Pierre Fabre đã thành công bán tổng hợp Vinblastin đi từ Vindolin và Catharanthin.

Vindolin là alkaloid có nhiều trong lá Dừa cạn khoảng 3 tháng tuổi. Có thể phân lập thẳng từ lá hoặc đi từ các Frakci tiền Vinblastin qua phân lập trên cột.

Là tinh thể điểm chảy 154-155°C $[\alpha]_D^{26} = -18^\circ$ /CHCl₃

UV_{max} 212, 254, 304nm (6,7).

3. Catharanthin C₂₁H₂₄N₂O₂, được N. Neuss và M.Gorman phân lập và xác định cấu trúc năm 1961 (2) là alkaloid nhân Indol tham gia cấu trúc dimer trong Vinblastin. Catharanthin đã được nghiên cứu có tác dụng lợi tiểu (4,8).

Là tinh thể, điểm chảy 126 - 128°C, $[\alpha]_D^{26} + 290^\circ$ /CHCl₃

UV_{max} 226, 284, 292nm (2,5).

NỘI DUNG VÀ CÁC BƯỚC THỰC HIỆN :

A. CHIẾT PHÂN LẬP VINDOLIN VÀ CATHARANTHIN (6,7).

Trong quá trình phân lập Vinblastin từ alkaloid toàn phần của lá Dừa cạn đã tận dụng các frakci có Vindolin và Catharanthin là các alkaloid xuất hiện sớm trên cột phân lập.

Đã lấy được Vindolin và Catharanthin thô và từ đó đã phân lập được Vindolin và Catharanthin đạt tiêu chuẩn qua kiểm tra sắc ký lớp mỏng, quang phổ tử ngoại, hồng ngoại và khối phổ.

Đã gửi mẫu chào hàng cho hãng Pierre Fabre (Pháp) chưa trả lời kết quả.

Nếu được ăn hàng sẽ triển khai chiết lớn.

I. Chiết xuất phân lập Vindolin từ lá Dừa cạn :

1. Chiết xuất Vindolin thô :

Lá Dừa cạn xay thô được chiết xuất bằng cồn Metylic hoặc Etylic. Cò thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Chuyển sang dạng muối alcaloid bằng dung dịch axit loãng. Loại tạp bằng dung môi hữu cơ. Dịch axit được kiềm hoá bằng NH_4OH tới pH thích hợp và chiết Vindolin bằng dung môi hữu cơ - Cò thu hồi dung môi được Vindolin thô.

2. Phân lập Vindolin và tinh chế :

Cần thô Vindolin được phân lập trên cột Al_2O_3 . Dựa vào kiểm tra sắc ký lớp mỏng, tập trung các Frakci có Vindolin. Cò thu hồi dung môi. Cần được hoà tan trong tối thiểu Metanol nóng, lọc. Dịch lọc để kết tinh lạnh. Tinh thể Vindolin được rửa trên lọc với một ít Metanol. Sấy khô được Vindolin tinh khiết. Hiệu suất 3 -5 phần vạn/được liệu khô.

II. Chiết xuất phân lập Vindolin từ sản phẩm thu hồi trong lúc phân lập Vinblastin.

Từ Vindolin thô thu được qua cột phân lập Vinblastin được tiếp tục tách trên cột Al_2O_3 với dung môi hữu cơ. Cò thu hồi dung môi. Cần được hoà tan trong lượng tối thiểu Metanol nóng. Lọc và để kết tinh như trên. Hiệu suất gấp 2-5 lần so với Vinblastin thu được trên cột.

III. Chiết xuất phân lập Catharanthin :

- Lá Dừa cạn khô, xay thô, được chiết xuất bằng cồn Metylic hoặc Etylic. Cò thu hồi dung môi. Chuyển dạng muối alcaloid bằng dung dịch axit loãng, loại tạp bằng dung môi hữu cơ (dicloretan, trichloroetylen). Dịch chiết axit được kiềm hoá bằng ammoniac đến pH thích hợp. Chiết Catharanthin bằng benzen (hoặc dicloretan, trichloroetylen). Cò thu hồi dung môi được cần thô Catharanthin. Cần thô được phân lập trên cột Al_2O_3 dùng dung môi benzen. Cò và hút khô phòng bọt các frakci có catharanthin. Kết tinh trong Metanol và tinh chế được Catharanthin tinh khiết. Hiệu suất 2-3 phần vạn.

- Phân lập từ Catharanthin thô thu hồi trên cột phân lập Vinblastin được tiến hành tương tự như với cần thô Catharanthin chiết xuất từ lá.

B. CHIẾT XUẤT PHÂN LẬP AJMALICIN TỪ RỄ DỪA CẠN.

I. Nguồn nguyên liệu :

- Đã nghiên cứu phân tích rễ Dừa cạn mọc hoang của Thạch Hà, Đà Nẵng.

Đây là rễ mọc hoang lưu niên nên hàm lượng rất thấp. Rễ chính nhỏ và phần lớn là rễ phụ. Trong khi thiếu nguyên liệu chúng tôi đã hợp đồng mua nguyên liệu của Đà Nẵng để chiết xuất.

- Đã mua nguyên liệu rễ Dừa cạn của Trại dược liệu Tuy Hoà. Đây là rễ được chào mầu là đạt tiêu chuẩn ^{xuất} khẩu, nhưng khi nhận số lượng lớn (500kg) thì về cảm quan và hàm lượng đều không đạt, rễ nhỏ và nhiều rễ phụ.

II. Phân tích định tính định lượng rễ Dừa cạn :

Trong số 24 alcaloid phân lập được rễ Dừa cạn (9) thì Ajmalicin là alcaloid quan trọng nhưng hàm lượng chỉ có 0,1 - 0,3%. Cùng với Ajmalicin trong rễ còn có serpentin, nếu đem hydro hoá được tetrahydro serpentin tức là Ajmalicin.

Có nhiều phương pháp định lượng Ajmalicin :

Tách các alcaloid bằng sắc ký trên giấy hoặc lớp mỏng hoặc bằng điện di. Xác định hàm lượng bằng so mầu, quang phổ hoặc đo độ huỳnh quang (fluorimetric) (10).

Trong điều kiện cho phép chúng tôi đã dùng phương pháp tách bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng quang phổ, đo ở bước sóng 282nm trên máy quang phổ shimadzu và Secomam.

Tiến hành :

1. Bọt rễ Dừa cạn thông qua rây mịn chiết bằng Metanol trên Soxhlet trong 3 giờ. Dịch chiết đem cô đậm đặc.

2. Hydrogen - hoá : Dịch chiết Metanol được hydrogen - hoá với tác nhân Naborohydrua (NaBH_4), lắc, làm lạnh ở $t^0 5^0\text{C}$, để yên chỗ tối trong 2 giờ.

3. Sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng quang phổ :

a. 50ml dung dịch metanol được thêm vào 50ml nước lắc 4 lần với trichloroetylen.

Dịch chiết được cô còn lại 5ml.

b. Chạy sắc ký lớp mỏng :

Phiến mỏng Silicagel GF 254.

Dung môi triển khai : CHCl_3 : Metanol (97:3) v/v

Triển khai 15cm.

Chấm dung dịch chuẩn : 200mcl (Ajmalicin bazơ).

Dung dịch thử : 200mcl.

Phiến mỏng sau khi triển khai để khô ở không khí tránh ánh sáng. Đem soi UV 254nm. Định vị vết chuẩn, vết thử và mẫu trắng tương ứng.

Đem cạo lấy các vết và chiết riêng bằng metanol, tránh ánh sáng.

c. Định lượng Ajmalicin :

Đo phổ ở bước sóng 282nm. So sánh mật độ quang mẫu thử với mẫu chuẩn song song đối chiếu mẫu trắng từ đó ta tính được hàm lượng Ajmalicin có trong rễ.

C_M = hàm lượng của mẫu thử.

C_S = hàm lượng mẫu chuẩn.

E_M = mật độ quang mẫu thử.

E_S = mật độ quang mẫu chuẩn.

$$C_M = \frac{E_M}{E_S} \times C_S$$

Loại rễ mọc hoang của Thạch Hà, Đà Nẵng không Hydrogen - hoá chỉ có rất ít Ajmalicin, trung bình 2 phần vạn. Rễ cây lưu niên bị hoá gỗ, vỏ chỉ còn rất ít hoạt chất.

Rễ được trồng chăm bón ở Tuy Hoà thu hoạch sau 1 năm bình quân 0,2% (đã hydro - hoá). Tiêu chuẩn rễ xuất khẩu bình quân 0,5% Ajmalicin (đã hydro - hoá).

III. Chiết xuất phân lập Ajmalicin từ rễ Dừa cạn :

Từ chiết xuất thí nghiệm đã triển khai chiết xuất và phân lập Ajmalicin quy mô sản xuất thử nghiệm 30kg rễ cho mỗi mẻ.

1. Xay rây :

Rễ Dừa cạn được xay trên máy xay búa với mắt rây 3mm. Loại bỏ lõi, còn khoảng 18 - 20 kg bột rễ.

2. Ngâm kiệt :

20 kg bột rễ làm ẩm bằng cồn 90% kiểm pH 8,5 đậy kín trong 1 giờ.

Dược liệu đã làm ẩm được cho vào bình ngâm kiệt inox 150 l. Thực hiện ngâm kiệt ngược dòng trên hệ thống 5 bình chiết.

3. Cô thu hồi dung môi :

Dịch chiết I khoảng 75 - 80 lít được cô áp lực giảm trên máy Simax còn khoảng 4 lít (hết mùi cồn).

4. Chuyển dạng axit và loại tạp :

Dịch cô đặc được khuấy với axit sulfuric 2%, đảm bảo dung dịch có pH₂.

Lọc loại cặn trên phễu Büchner.

Dịch lọc đem loại tạp (lipoïd thực vật) bằng khuấy 2 lần với trichloroetylen. Loại phân trichloroetylen để thu hồi tái sử dụng.

5. Chiết alcaloid toàn phần :

Dịch chiết axit đã loại tạp, cho vào thùng inox 50l kiểm hoá đến pH 9,5 - 10 bằng cách cho từ từ NH₄OH vừa khuấy đều..

Hút vào bình thuỷ tinh quả lê 100 l, chiết 5 lần x 4 l trichloroetylen.

Dịch chiết hữu cơ được lọc qua Na₂SO₄ khan đem cô thu hồi dung môi.

6. Cô và hút phồng bột :

Dịch chiết sau khi lọc qua Na₂SO₄ khan được cô chân không thu hồi dung môi. Dùng chân không mạnh hút phồng bột rồi cạo lấy alcaloid toàn phần dạng bột nâu sáng óng ánh lẫn tinh thể, hàm lượng Ajmalicin 20%. Hiệu suất 0,5% tính từ dược liệu khô.

Phân lập Ajmalicin trên cột Al₂O₃

1. Hoạt hoá Alumin oxyt :

Dùng alumin oxyt Brokmann II được hoạt hoá đến độ ẩm thích hợp theo phương pháp riêng.

2. Nạp Al₂O₃ vào cột :

Dùng cột inox. Mỗi cột nạp 30 kg Al₂O₃. Cho vào cột 20 lít hỗn hợp dung môi benzen : clorofoc 9/1, khoá vòi ở đáy. Đổ từ từ oxyt nhôm vào thỉnh thoảng dùng que khuấy. Chú ý dung môi phải luôn luôn ngập mặt oxyt nhôm.

Để ổn định cột trong 24 giờ.

3. Phân lập Alcaloid toàn phần :

Cho 1 kg alcaloid toàn phần hoà tan trong 2 lít Clorofoc rồi đổ từ từ lên mặt cột Alumin oxyt. Dùng đĩa thuỷ tinh cời nhẹ lên mặt cột. Mở khoá và bắt đầu hứng các frakci vào chai thuỷ tinh, mỗi frakci lấy 10 lít. Thường xuyên tiếp dung môi vào cột sao cho trên mặt cột luôn luôn có dung môi. Dùng sắc ký lớp mỏng kiểm tra frakci nào có Ajmalicin thì nhập cô chung.

4. Cô và hút phồng bột :

Các frakci có Ajmalicin được cô thu hồi dung môi trên thiết bị cô quay tròn thuỷ tinh Rotavapor và dùng chân không mạnh hút phồng bột.

5. Kết tinh, tinh chế :

Sau khi hút phồng bột đem hoà tan cần trong tối thiểu metanol nóng. Để kết tinh lạnh được Ajmalicin tinh thể. Lọc. Rửa bằng ít metanol lạnh trên phễu. Sấy khô. Bảo quản trong lọ đậy kín tránh ánh sáng. Hiệu suất 0,1% tính từ dược liệu khô.

Ajmalicin thu được đã được kiểm tra về hoá lý đạt tiêu chuẩn so với mẫu của Hungari và mẫu Viện dược liệu tinh chế.

Kiểm tra phổ hồng ngoại Viện kiểm nghiệm.

Khối phổ (tại Hà Lan)

Thử độc tính tại Bộ môn dược lý Đại học y Hà Nội.

C. HYDROGEN - HOÁ ALCALOID TOÀN PHẦN.

Alcaloid toàn phần chiết xuất được chỉ chứa trung bình 20% Ajmalicin (định lượng đo quang). Đem hydrogen - hoá chuyển serpentín có trong rễ thành tetrahydro serpentín (Ajmalicin) có thể tăng hàm lượng Ajmalicin lên gấp đôi. Trong phòng thí nghiệm người ta hydrogen - hoá bằng từ dịch chiết (10). Tác nhân hydrogen - hoá tốt nhất là dùng Naborohydrua (NaBH_4). Chất này phải nhập nội rất đắt.

Chúng tôi đã cải tiến, hydrogen- hoá ở giai đoạn alcaloid toàn phần (xem sơ đồ). Với NaBH_4 tốt, chúng tôi nâng hàm lượng Ajmalicin trong Alcaloid toàn phần từ 20% lên 40%.