

Hai hợp chất alkaloid phân lập từ cây Dây đau xương (*Tinospora sinensis* (Lour.) Merr) trồng tại tỉnh Vĩnh Phúc

Vũ Đức Lợi^{1,*}, Nguyễn Thị Mai Trang¹, Trương Thị Vân Hoài¹,
Nguyễn Thúc Thu Hương¹, Nguyễn Thành Nam²

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Dược, Bệnh viện quân y, 7A, 466 Nguyễn Trãi, Quận 5, Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 03 tháng 5 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 7 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 06 tháng 12 năm 2017

Tóm tắt: Cây dây đau xương (*Tinospora sinensis* (Lour.) Merr) được trồng ở Vĩnh Phúc là một trong những cây thuốc phổ biến và có giá trị sử dụng cao trong đời sống. Trong chương trình nghiên cứu và phát triển dược liệu, trên cơ sở sử dụng các phương pháp sắc kí đã phân lập được hai hợp chất từ cây dây đau xương thu hái ở Vĩnh Phúc. Cấu trúc hóa học của hai hợp chất này được xác định là **decarin (1)** và **iwamid (2)** dựa trên các dữ liệu phổ khối lượng và cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp so sánh với dữ liệu phổ được công bố trong tài liệu tham khảo. Đây là công bố đầu tiên về thành phần benzophenanthridine của cây dây đau xương trồng ở Việt Nam.

Từ khóa: Dây đau xương, *Tinospora sinensis*, decarin, iwamid.

1. Đặt vấn đề

Cây Dây đau xương (*Tinospora sinensis* (Lour.) Merr), còn được gọi là khoan cân đằng, là loài thực vật sống lâu năm thuộc họ tiết dê *Menispermaceae* [1]. Ở Việt Nam, cây mọc nhiều ở vùng Tây bắc, mọc hoang khắp nơi ở miền núi cũng như các đồng bằng [1]. Trong y học cổ truyền, thân cây dây đau xương được sử dụng chữa sốt, phong thấp, chứng đau nhức gân cốt, đau dây thần kinh hông, đòn ngã tổn thương và để bồi bổ sức khỏe. Lá tươi cũng dùng đắp chỗ đau nhức trong gân cốt và trị rắn cắn [2]. Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chứng minh dây đau xương có tác dụng trong sốt rét, hạ sốt, kháng khuẩn, sát khuẩn, kháng u và hoạt tính antiprotozoal (*Leishmania*) [3, 4]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy

cây Dây đau xương có chứa một số nhóm chất như: chứa steroid, flavonoid, alkaloid, glycoside, một số hợp chất như: Magnoflorine, berberine, tinosporicide, menispermicide, palmatine, (+) - malabarolide và tinosinen I, tinosposide A và B tinosposide [5-8]. Tuy nhiên, ở nước ta cho đến nay có rất ít nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của dược liệu dây đau xương. Vì vậy, cần có các nghiên cứu về thành phần hóa học, tác dụng sinh học để bổ sung thêm dữ liệu về loài cây này, giúp sử dụng hiệu quả hơn.

Bài báo này trình bày về phân lập và xác định cấu trúc hóa học của hai hợp chất benzophenanthridin mới được phân lập từ dây đau xương trồng tại Vĩnh Phúc, Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-917879959.

Email: ducloi82@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4083>

Mẫu cây Dây đau xương được thu hái vào tháng 1 năm 2017 tại thị trấn Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Mẫu thực vật đã được giám định tên khoa học là: *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr, họ tiết dề *Menispermaceae*, mẫu được lưu giữ tại Khoa Y Dược, ĐHQGHN.

2.2. Dung môi, hóa chất

Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như methanol (MeOH), n-hexan, ethyl acetat (EtOAc), và dicloromethan (DCM) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Dung môi phân tích gồm MeOH, n-hexan, EtOAc, H₂O dùng để phân tích sắc ký đều đạt tiêu chuẩn phân tích. Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột là *silica gel* pha thường (0,040 - 0,063 mm, Nicalai Tesque Inc., Nhật Bản), YMC ODS-A (50μm, YMC Co. Ltd., Nhật Bản). Bản mỏng tráng sẵn trên đế nhôm loại pha thường Kieselgel 60 F₂₅₄ và pha đảo TLC Silica gel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, Darmstadt, Đức). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % hơi nóng để phát hiện vết chất.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP3 (Sanyo, Nhật Bản). Phổ khối ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1260 Series LC-MS ion Trap (Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một và hai chiều được đo trên máy JEOL ECX 400 (Jeol, Nhật Bản) và sử dụng dung môi CDCl₃/CD₃OD, chất nội chuẩn là tetramethylsilan (TMS).

2.4. Chiết tách và phân lập chất

Mẫu cây phơi khô, nghiền thành bột (1,2kg), chiết trong methanol (3 lần x 3 lít), bằng thiết bị chiết siêu âm (40°C, 3h). Dịch chiết được lọc qua giấy lọc, gộp lại và cất loại dung môi ở áp suất giảm thu được 108,0g cặn chiết methanol. Cặn chiết này được hòa tan vào một ít nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với n-hexane và ethylacetate (mỗi loại 3 ×

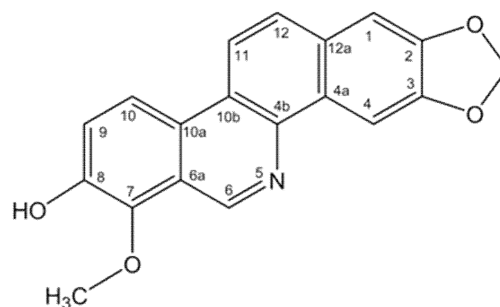
1,5lít). Các dịch chiết n-hexane, ethylacetate được cất thu hồi dung môi ở áp suất giảm thu được các cặn dịch chiết tương ứng n-hexane (H32,4 g) và (E, 36,0 g) và lớp nước (N, 20,6 g).

Cặn chiết ethylacetate (36,0g) được hòa tan với một lượng tối thiểu ethyl acetat sau đó tiến hành phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi chloroform/methanol (20/1 → 1/1) thu được bốn phân đoạn chính E1 (9,6 g), E2(8,3 g), E3(6,1 g), E4(4,2 g)

Từ phân đoạn E1 tiếp tục phân tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi n-hexane/ethylacetate (2/1) thu được 4 phân đoạn nhỏ E1.1(2,4g), E1.2(1,8g), E1.3(2,6g), E1.4 (1,2 g). Phân đoạn nhỏ E1.1 được phân tách tiếp trên cột sắc ký silicagel pha thường với hệ dung môi rửa giải là chloroform/ethylacetate (3/1) thu được hợp chất **L1** (10mg). Phân đoạn E1.3 được phân tách bằng sắc ký cột silica gel pha thường rửa giải bằng hệ dung môi n-hexane/n-butanol (3/1) thu được hợp chất **L2** (12 mg)

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hợp chất L1: Decarin



Hình 1. Cấu trúc hợp chất **L1**.

Chất ở dạng tinh thể hình kim, màu vàng. Nhiệt độ nóng chảy: 242-245°C.

CTPT: C₁₉H₁₃NO₄; KLPT M = 319.

Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR (DMSO-d₆) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Số liệu phổ NMR của **L1** và hợp chất tham khảo

Vị trí C	$^s\delta_c$	δ_c	DEPT	δ_H (J=Hz)	HMBC (H→C)
1	104,4	104,5	CH	7,53 (s)	2, 3, 4a
2	148,1	148,1	C	-	-
3	147,9	147,8	C	-	-
4	100,8	100,9	CH	8,52 (s)	3
4a	128,4	128,3	C	-	-
4b	138,7	138,6	C	-	-
6	145,7	145,8	CH	9,56 (s)	4b,6a, 10a
6a	121,4	121,6	C	-	-
7	142,1	142,1	C	-	-
8	147,5	147,5	C	-	-
9	123,5	123,6	CH	7,56 (d,8,5)	7, 10a
10	118,5	118,6	CH	8,47 (d,8,5)	6a, 8
10a	126,4	126,4	C	-	-
10b	120,0	119,9	C	-	-
11	118,5	118,7	CH	8,52 (d,9,0)	4b,10a,12,12a
12	127,0	127,0	CH	7,94 (d,9,0)	10b, 4a,1
12a	129,2	129,2	C	-	-
-OCH ₂ O-	101,4	101,4	CH ₂	6,20 (s)	2, 3
7-OCH ₃	61,1	61,2	CH ₃	4,01 (s)	7
8-OH	-	-	-	10,10 (s)	7, 8, 9

$^s\delta_c$ của decarin đo trong DMSO [9].

Hợp chất **L1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng nâu và hiện màu vàng trên bản TLC khi dùng thuốc thử Dragendorff cho thấy đây cũng là một alcaloid. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **L1** xuất hiện tín hiệu của 7 proton vòng thơm trong đó có: 1 nhóm methoxy tại δ_H 4,01(s); 2 cặp tín hiệu dạng doublet tại δ_H 7,56 (d, $J=8,5\text{Hz}$) và 8,48 (d, $J=8,5\text{Hz}$); 8,52 (d, $J=9,0\text{Hz}$) và 7,94 (d, $J=9,0\text{Hz}$); 1 nhóm dioximethylen (-OCH₂O-) tại δ_H 6,20(s); 1 nhóm hydroxyl tại δ_H 10,10(s); 3 tín hiệu dạng singlet tại δ_H 7,53(s), 8,52(s) và 9,56(s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT xuất hiện tín hiệu của 19 nguyên tử carbon trong đó có 1 carbonmethyl, 1 carbonmethylen, 7 carbonmethine và 10 carbon bậc bốn. Thông qua các tương tác trực tiếp H-C trên phổ HSQC độ chuyển dịch hóa học của các proton được gán với các carbon tương ứng.

Trên phổ HMBC thấy có các tương tác giữa 8-OH (δ_H 10,10) với C-7 (δ_C 142,1)/C-8 (147,5)/C-9 (123,6); tương tác giữa các proton của nhóm methoxy (OCH₃) tại δ_H 4,01 với C-7 (δ_C 142,1) cho phép khẳng định vị trí nhóm hydroxy và methoxy lần lượt tại C-8 và C-7. So sánh dữ liệu phổ NMR của **L1** hoàn toàn trùng khớp với decarin [9]. Như vậy, **L1** được xác định chính xác là **decarin**.

3.2. Hợp chất 2

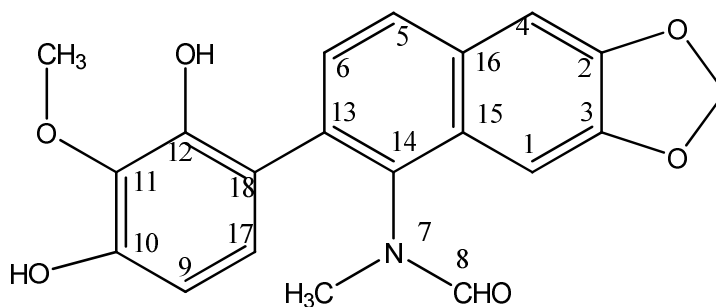
Chất bột vô định hình, màu nâu. Nhiệt độ nóng chảy: 270-274°C.

CTPT: C₂₀H₁₇NO₆; KLPT M = 367.

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆) được trình bày ở Bảng 2:

Bảng 2. Số liệu phổ NMR của **L2** và hợp chất tham khảo

Vị trí C	$^{\#}\delta_{\text{C}}$	δ_{C}	DEPT	$\delta_{\text{H}}(J=\text{Hz})$	HMBC (H→C)
1	99,8	98,6	CH	6,98 (s)	2, 3, 16
2	148,5	147,8	C	-	-
3	149,6	148,8	C	-	-
4	103,7	104,1	CH	7,45 (s)	3, 5,15
5	127,6	126,8	CH	7,80 (d,8,0)	13,16
6	128,5	127,7	CH	7,21 (d,8,5)	13,14,18
8	164,3	163,2	CH	7,95 (s)	-
9	104,7	107,2	CH	6,36 (d,8,5)	10,18
10	149,7	150,1	C	-	-
11	137,7	135,5	C	-	-
12	153,6	147,5	C	-	-
13	135,5	134,6	C	-	-
14	136,7	135,4	C	-	-
15	129,4	128,0	C	-	-
16	131,7	130,4	C	-	-
17	123,8	124,6	CH	6,59 (d,8,0)	10,12,13
18	115,6	117,8	C	-	-
N-CH ₃	33,0	32,7	CH ₃	2,88 (s)	8, 14
-OCH ₂ O-	102,2	101,5	CH ₂	6,16 (d,2,5)	2, 3
10-OH	-	-	-	9,34(s)	11
11-OCH ₃	60,5	59,9	CH ₃	3,69 (s)	11
12-OH	-	-	-	8,72(s)	18

Giá trị $^{\#}\delta_{\text{C}}$ của iwamid đo trong CDCl₃ [10]Hình 2. Cấu trúc hợp chất **L2**.

Hợp chất **L2** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu nâu và hiện màu vàng trên bản TLC khi dùng thuốc thử Dragendorff cho thấy đây cũng là một alkaloid. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **L2** xuất hiện tín hiệu của: 2 nhóm hydroxyl tại δ_{H} 8,72(s) và 9,34 (s); 1 nhóm methoxy tại δ_{H} 3,69(s); 6 proton thuộc vòng thơm tại δ_{H} 6,98 (s), 7,45(s), 7,21(d, $J=8,5\text{Hz}$), 7,80(d, $J=8,0\text{Hz}$),

6,36(d, $J=8,5\text{Hz}$) và 6,59 (d, $J=8,0\text{Hz}$); 1 nhóm *N*-methyl tại δ_{H} 2,88(s) tín hiệu của 1 nhóm dioximethylen (-OCH₂O-) tại δ_{H} 6,16(d, $J=2,5\text{Hz}$); 1 proton của nhóm aldehyde tại δ_{H} 7,95(s).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT của **L2** xuất hiện tín hiệu của 20 nguyên tử carbon trong đó có 7 carbonmethine, 1 carbonmethylen, 10

carbon bậc bốn và 2 carbonmethyl. Tín hiệu của nhóm carbonyl tại δ_C 163,2(C-8) bị dịch chuyển về phía trường mạnh do đó có thể dự đoán nhóm carbonyl này được nối với nito (-NCHO). Bên cạnh đó, trên các phổ này còn xác nhận tín hiệu của 1 nhóm methoxy tại δ_C 59,9 (1-O \underline{C} H₃) và 1 nhóm *N*-methyl tại δ_C 32,7.

Thông qua các tương tác trực tiếp trên phổ HSQC độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử proton được gán với các carbon tương ứng. So sánh các số liệu phổ NMR của **L2** với hợp chất 10-*O*-demethyl-12-*O*-methylarnottianamide [11] thấy độ chuyển dịch hóa học tại hầu hết các vị trí phù hợp trừ độ chuyển dịch hóa học tại vị trí C-12 (147,5 so với 153,6). Kết hợp với các phân tích trên có thể khẳng định có sự demethyl hóa tại vị trí C-12 của hợp chất 10-*O*-demethyl-12-*O*-methylarnottianamide. Các tương tác HMBC chi tiết được liệt kê trong Bảng 2 và Hình 2. Từ những dữ liệu trên kết hợp so sánh với các số liệu đã được công bố trong tài liệu tham khảo [10], hợp chất **L2** được xác định là **iwamid**.

4. Kết luận

Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phân tích phổ hiện đại, chúng tôi đã phân lập xác định cấu trúc phân tử của 2 hợp chất benzophenanthridin là **decarin (1)** và **iwamid (2)**. Đây là công bố đầu tiên về thành phần triterpen có trong cây dây đau xương trồng ở Việt Nam và hợp chất **2** lần đầu tiên phân lập được từ cây dây đau xương chi *Tinospora*.

Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Tất Lợi (2004), *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học: 492-493
- [2] Võ Văn Chi (2003), *Từ điển thực vật thông dụng*, NXB. KH & KT, Hà Nội.
- [3] Patani A, editor (2002), *Indian Herbal Pharmacopoeia*. Revised New ed. Mumbai: Indian Drug Manufactures Association.
- [4] Budavari S, editor (2001), *The Merck Index*. 13th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co Inc.
- [5] Rastogi RP, Mehrotra BN, editors (1993), *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Vol. 3. PID, New Delhi: CSIR.
- [6] Rastogi RP, Mehrotra BN, editors (1995), *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Vol. 4. PID, New Delhi: CSIR.
- [7] Rastogi RP, Mehrotra BN, editors (1998), *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Vol. 5. PID, New Delhi: CSIR.
- [8] G.V.Srinivasan, K.P. Unnikrishnan, A.B. Rema Shree, and Indira Balachandranm (2008), “HPLC Estimation of berberine in *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*”, *Indian J Pharm Sci* 70(1): 96-99.
- [9] Martinb, M.T., Rasoanaivo, L. H., Raharisololalao, A. (2005), “Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*”, *Fitoterapia*, 76, 590
- [10] Ngoumfo, R.M., Jouda, J.-B., Mouafo, F.T., Komguem, J., Mbazoa, C.D., Shiao, T.C., Choudhary, M.I., Laatsch, H., Legault, J., Pichette, A., Roy, R., (2010), “In vitro cytotoxic activity of isolated acridone alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr.”, *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3601-3605.
- [11] Hisashi Ishii, Tsutomu Ishikawa, Sheng-Teh Lu and Ih-Sheng Chen (1984), “Baeyer-Villiger-type oxidation of an immonium group: the structural establishment of naturally occurring amides related to benzo[c] phenanthridine alkaloids”, *J. Chem. Soc.*, 1, pp. 1769-1774.

Two Alkaloid Compounds Isolated from *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr) Growing in Vinh Phuc Province, Vietnam

Vu Duc Loi¹, Nguyen Thi Mai Trang¹, TruongThi Van Hoai,
Nguyen Thuc Thu Huong¹, Nguyen Thanh Nam²

¹VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²Department of Pharmacy, Military Hospital 7A, 466 Nguyen Trai, 5 District,
Ho Chi Minh city, Vietnam

Abstract: *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr) grown in Vinh Phuc, Viet Nam is one of the most popular and valuable medicinal medicinal plants in the life. In the research and development program of medicinal materials, based on the use of chromatography methods, have isolated two compounds from bone pain harvests collected in Vinh Phuc. The chemical structure of the two compounds is determined to be **decarine (1)** and **iwamide (2)** based on mass spectral and nuclear magnetic resonance data comparing to the spectral data published in the literature refer. This is the first publication of the benzophenanthridine of *Tinospora sinensis* in Vietnam.

Keywords: *Tinospora sinensis*, decarine, iwamide.