

CÁC HỢP CHẤT CLERODANE DITECPEN TỪ CÂY DÂY THẦN THÔNG *TINOSPORA CORDIFOLIA*

Châu Văn Minh¹, Phan Văn Kiệm¹, Nguyễn Tiến Đạt¹, Đan Thúy Hằng¹,
Nguyễn Hoài Nam¹, Nguyễn Xuân Cường¹, Ninh Khắc Bản², Nguyễn Thị Quý³,
Hoàng Thanh Hương¹

¹Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

Đến Tòa soạn 18-2-2010

Abstract

Tinospora cordifolia (Willd.) Miers (Menispermaceae) has been widely used in Vietnamese traditional medicine for the treatment of numerous diseases such as malaria, pharyngitis, rheumatism, and diabetes. Phytochemical investigation of the methanol extract of *Tinospora cordifolia* aerial parts led to the isolation of a new clerodane diterpene, 6 β -O- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2 α -hydroxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic acid methyl ester (**1**), and two known clerodane diterpene borapetoside F (**2**) and borapetoside B (**3**). Their chemical structures were determined by extensive spectroscopic methods including FTICR-MS and 1D and 2D NMR.

Keywords: *Tinospora cordifolia*, Menispermaceae, clerodane diterpene.

1. MỞ ĐẦU

Dây thần thông hay còn gọi là rẽ gió *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers, thuộc họ Tiết dê, Menispermaceae. Cây có dây leo gần như là cây thảo, thân xốp, có khía, ít sần sùi. Lá có cuống, hình trái xoan - tim, gần hình mắt chim với một mũi nhọn rất nhọn, dài 8 cm, rộng 7 cm, gân sơ cấp 5 - 7, gân giữa với 1 cặp gân bên, dính liền với các gân con thành những mắt lưới hình đa giác; cuống mảnh, nhọn, ngắn hơn phiến; Hoa từng nhóm 3 - 4 cái xếp thành 1 - 2 chùm ở nách lá. Cây ra hoa vào tháng 12 hàng năm. Quả đỏ, hình trứng, chứa một hạt dẹp. Cây phân bố rộng ở vùng Đông Dương, mọc hoang trên rừng núi và cũng được trồng để làm thuốc. Cây có vị rất đắng, tính hàn, không độc, có tác dụng tả thực nhiệt, khử tích trệ, tiêu ứ huyết, tán ung độc, lợi tiểu, hạ nhiệt, thông kinh, lợi tiêu hoá. Trong dân gian, cây thường dùng làm thuốc bổ đắng, chữa sốt rét mới phát hay kinh niên, chữa viêm họng, no hơi đầy tức, đại tiện táo bón, bế kinh, kinh nguyệt không đều. Cây còn được dùng trị thấp khớp, đái đường. Ở Ấn Độ, người ta dùng dây thần thông chữa sốt rét có chu kỳ, dùng giải nhiệt do sốt; bột rễ và thân chế thuốc bổ dưỡng dùng trị ỉa chảy và lỵ mạn tính. Dây tán bột rồi hầm uống dùng làm thuốc giải khát và kích dục. Dịch lá tươi có tác dụng lợi tiêu được dùng để trị bệnh lậu. Thành phần hóa học chủ yếu của cây là clerodane diterpene, các alkaloid inosporin, berberin, giloin, giloinin và lignan [1 - 4]. Trong chương trình nghiên cứu sàng lọc, tìm kiếm các hoạt

chất sinh học từ các cây thuốc dân tộc của chúng tôi, dịch chiết metanol dây thần thông có hoạt tính kháng một số dòng tế bào ung thư *in vitro* như tế bào ung thư cổ tử cung Hela (IC₅₀ = 3,78±0,77 µg/mL), SKOV3 (IC₅₀ = 13,29±0,37 µg/mL), tế bào ung thư vú KPL4 (IC₅₀ = 13,2±0,59 µg/mL), tế bào ung thư biểu mô thận chuyển dạng COS7 (IC₅₀ = 16,14±1,05 µg/mL). Do đó, cây dây thần thông được chọn là đối tượng nghiên cứu để tìm kiếm các hoạt chất sinh học bằng cách tách chiết, phân lập các hợp chất. Bài báo này bước đầu thông báo kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3 hợp chất khung clerodane ditecpen (**1-3**) từ dây thần thông, trong đó hợp chất 6 β -O- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2 α -hydroxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic axit metyl este (**1**) lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp tách chiết

- Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP₁₈ F₂₅₄ (Merck-Đức). Các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu.

- Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp

pha thường (Silica gel 240-430 mesh, Merck) hoặc pha đảo (ODS-60-14/63, Fujisilisa-Nhật Bản).

2.2. Các phương pháp phổ

- Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1200 LC-MSD Trap của Viện hóa học các chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Mẫu thực vật

Mẫu dây thần thông *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers (Menispermaceae) (phần trên mặt đất) được thu hái vào tháng 10 năm 2008 tại Bạch Mã và được TS Ninh Khắc Bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

2.4. Phân lập các chất

Mẫu dây thần thông (2kg) chiết với MeOH (3 lần) bằng siêu âm, cất loại dung môi bằng áp suất giảm thu được 35 g cặn chiết MeOH. Cặn này được hòa vào nước cất và tiến hành chiết phân bố với etyl axetat thu được các cặn chiết tương ứng là: cặn etyl axetat ký hiệu là TC2 (15g) và cặn nước TC3 (20 g). Cặn chiết etyl axetat (TC2, 15g) được tiến hành phân tách thô trên sắc ký cột silicagel pha thường với hệ dung môi rửa giải gradient clorofoc/metanol từ 10/1 đến 1/1 (v/v) thu được 3 phân đoạn là TC2C (2,5 g), TC2D (3,1 g) và TC2E (4,8 g). Tiếp tục phân tách phân đoạn TC2C bằng sắc ký cột silica gel

pha thường với hệ dung môi rửa giải là clorofoc/axeton (1/2, v/v) thu được hợp chất **1** (5 mg). Tinh chế phân đoạn TC2E bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải là clorofoc/metanol/nước (8/1/0,1, v/v/v) thu được hợp chất **2** (25 mg). Hợp chất **3** (7 mg) được tinh chế từ phân đoạn TC2D bằng sắc ký cột silica gel pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải là axeton/nước (1/1,5, v/v).

6 β -O- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2 α -hydroxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic axit methyl este (1**):** Chất bột màu trắng; đnc: 162 - 163 °C; ESI-MS: m/z 573 [M + Na]⁺; FTICR-MS: m/z 573,19424 [M + Na]⁺ calcd. for C₂₇H₃₄O₁₂Na 573,19480.

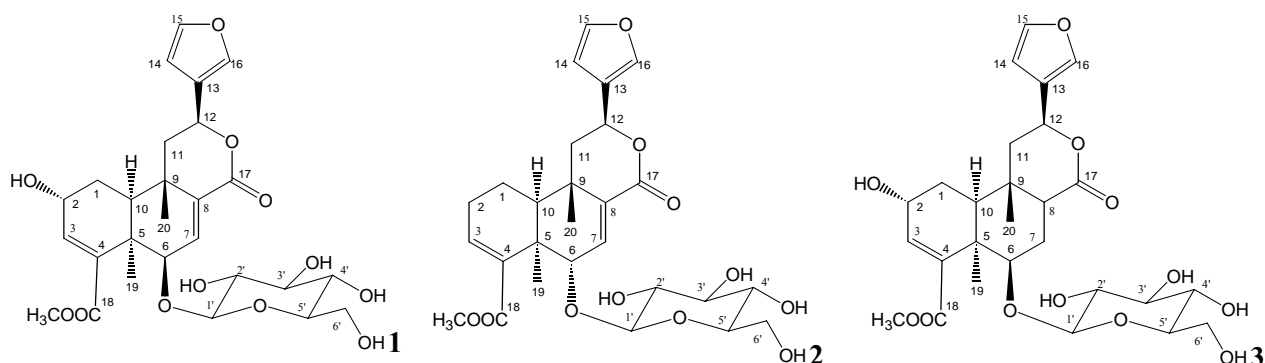
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), xem bảng 1.

6 α -O- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic axit methyl este (borapetoside F, **2):** Chất bột màu trắng; đnc: 174 - 175 °C; ESI-MS: m/z 557 [M + Na]⁺ (M = 534, C₂₇H₃₄O₁₁).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), xem bảng 1.

6 β -O- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2 α -hydroxy-3,13(16),14-clerodantriene-17,12-olid-18-oic axit methyl este (borapetoside B, **3):** Chất bột màu trắng; đnc: 153 - 154°C; ESI-MS: m/z 575 [M + Na]⁺ (M = 552, C₂₇H₃₆O₁₂).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), xem bảng 1.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-3

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối lượng ESI-MS của **1** cho thấy pic ion tại m/z 573 [M+Na]⁺. Trên phổ ¹H NMR xuất hiện các tín hiệu của hai nhóm methyl tại δ_H 1,15 và 1,48, một nhóm methoxy (δ_H 3,79), các tín hiệu của một gốc đường với proton anome tại δ_H 4,45 và tín

hiệu của 5 proton nối đôi trong vùng δ_H 6,43 - 7,64.

Phổ ¹³C NMR và DEPT của **1** cho thấy sự có mặt của 2 nhóm methyl tại δ_C 23,9 và 27,4, một nhóm methoxy (δ_C 52,8), hai nhóm carboxy tại δ_C 171,2 và 172,0, một gốc đường glucopyranoside với tín hiệu cacbon anome tại δ_C 105,7 (C-1') và 5 tín hiệu cacbon khác trong vùng δ 71,3 - 78,1 (C-2' → C-5') và δ 62,5 (C-6'). Hằng số liên kết $J = 7,5$ Hz

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của các hợp chất 1 - 3

C	1		2		3	
	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, J = Hz)	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, J = Hz)	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, J = Hz)
Aglycone						
1	30,8	1,93/2,09 (m)	19,6	2,08 (m)	29,2	2,06/2,27 (m)
2	63,9	4,38 (m)	25,0	2,40 (m)	64,6	4,56 (m)
3	138,5	6,43 (d, 3,5)	141,5	6,67 (dd, 3,5, 4,5)	141,3	6,44 (d, 3,5)
4	141,4	-	138,1	-	140,3	-
5	43,5	-	41,9	-	42,7	-
6	81,1	4,56 (d, 2,5)	78,9	4,85 (d, 4,0)	80,0	4,60 (d, 3,0)
7	140,9	6,98 (d, 2,5)	138,1	6,83 (d, 4,0)	27,6	2,30 (m)
8	137,0	-	137,8	-	42,2	3,48 (dd, 2,0, 11,5)
9	38,1	-	38,3	-	38,2	-
10	46,5	2,10 (m)	46,5	2,35 (m)	51,4	2,32 (m)
11	45,1	2,09/2,43 (m)	46,5	2,08, 2,36 (each m)	46,2	2,00, 2,15 (m)
12	72,3	5,28 (dd, 3,0, 11,5)	72,6	5,26 (dd, 4,0, 11,5)	71,7	5,55 (dd, 6,0, 11,5)
13	125,3	-	125,4	-	126,0	-
14	109,7	6,56 (d, 1,5)	109,7	6,54 (dd, 1,0, 1,5)	109,8	6,53 (dd, 1,0, 2,0)
15	145,0	7,54 (dd, 1,5, 2,0)	145,0	7,53 (dd, 1,5, 3,0)	145,0	7,53 (dd, 2,0, 3,5)
16	141,5	7,64 (s)	141,1	7,62 (d, 1,0)	140,7	7,61 (s)
17	171,2	-	172,0	-	178,4	-
18	172,0	-	170,7	-	169,4	-
19	23,9	1,48 (br s)	25,3	1,45 (br s)	29,6	1,58 (br s)
20	27,4	1,15 (br s)	27,3	1,16 (br s)	23,7	0,99 (br s)
OMe	52,8	3,79 (s)	52,3	3,73 (s)	52,4	3,77 (s)
Glu						
1'	105,7	4,45 (d, 7,5)	105,9	4,49 (d, 8,0)	106,2	4,46 (d, 7,5)
2'	75,8	3,30 (m)	75,6	3,30 (m)	75,6	3,28 (m)
3'	78,1	3,35 (m)	78,0	3,34 (m)	78,1	3,35 (m)
4'	71,3	3,38 (m)	71,4	3,35 (m)	71,3	3,40 (m)
5'	77,8	3,42 (m)	77,9	3,44 (m)	77,7	3,46 (m)
6'	62,5	3,74/3,88 (m)	62,5	3,75/3,88 (m)	62,3	3,73/3,84 (m)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

của proton anome (δ_H 4,45) chứng tỏ đây là đường β -glucopyranoside. Ngoài ra kết hợp với các tín hiệu quan sát thấy trên phổ proton cho thấy sự có mặt của một vòng furan thể tại vị trí C-3. Những dữ kiện này gợi ý cấu trúc của **1** có dạng khung clerodane diterpen rất phổ biến trong chi *Tinospora*. So sánh số liệu ¹³C NMR của **1** với tài liệu tham khảo [5] cho thấy **1** gần như trùng khớp với hợp chất borapetoside F phân lập từ cây *Tinospora tuberculata* [5] ngoại trừ sự xuất hiện của một carbon oxymethine tại δ_C 63,9 (C-2). Điều này chứng tỏ **1** là một dẫn xuất hydroxy của borapetoside F.

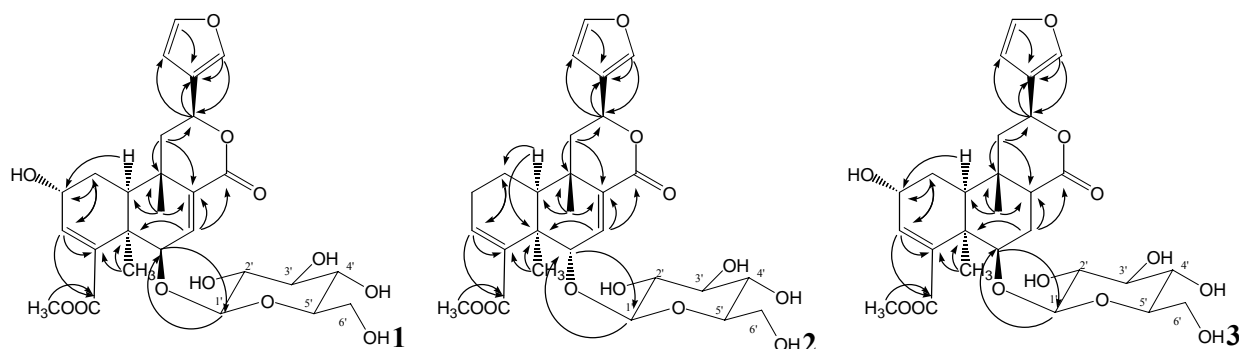
Phổ hai chiều HSQC cho phép gán các giá trị độ dịch chuyển hoá học của các proton với nhóm carbon tương ứng. Phổ HMBC của **1** cho thấy các tương tác giữa proton H-1 (δ_H 1,93/2,09) với C-2 (δ_C 63,9)/C-3 (δ_C 138,5)/C-5 (δ_C 43,5) và với C-10 (δ_C 46,5). Tương tác giữa H-3 (δ_H 6,43) với C-5 (δ_C 43,5)/C-18 (δ_C 172,0); giữa H-6 (δ_H 4,56) với C-5

(δ_C 43,5)/C-10 (δ_C 46,5)/C-19 (δ_C 23,9), C-7 (δ_C 140,9)/C-8 (δ_C 137,0) và với C-1' (δ_C 105,7). Đặc biệt, tương tác giữa proton anome của phân tử đường tại δ_H 4,45 với tín hiệu C-6 (δ_C 81,1) chứng tỏ gốc đường gắn vào vị trí C-6. Cấu hình tương đối giữa hai vòng A/B của nhóm chất dạng khung clerodane được xác định dựa vào giá trị độ dịch chuyển hoá học của hai nhóm methyl vị trí 19 và 20. Ở cấu hình dạng *cis*, nhóm C-19 bị ảnh hưởng bởi tương tác γ -gauche với các nhóm carbone khác ít hơn so với ở cấu hình *trans*, do đó độ dịch chuyển hoá học của C-19 ở vị trí *cis* ($\delta_C > 20$ -29) sẽ nằm trong vùng trường cao hơn so với vị trí *trans* ($\delta_C < 20$) [6]. Tín hiệu C-19 của **1** xuất hiện tại δ_C 23,9 chứng tỏ vòng A/B có cấu hình *cis*. Trong cấu hình *cis*-clerodane, độ dịch chuyển hoá học của proton H-20 ở vị trí equatorial ($\delta_H > 1,00$) sẽ nằm ở trường thấp hơn so với ở vị trí axial ($\delta_H \sim 0,80$) [7]. Với δ_H 1,15 (H-20), cấu trúc của **1** được xác định là $5\alpha,10\alpha$ -

cis-clerodane. Ngoài ra, proton H-6 có hằng số liên kết nhỏ $J = 2,5$ Hz chứng tỏ H-6 nằm ở vị trí *equatorial* [6, 8]. Tương tự với proton H-2 có hằng số liên kết $J = 2,5$ chứng tỏ cấu hình của nhóm 2-OH nằm ở vị trí *equatorial* [8]. Như vậy, hợp chất **1** là 6-*O*- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2-hydroxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic acid methyl ester, một hợp chất mới lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên.

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn không màu. Các tín hiệu trên phổ ^1H và ^{13}C NMR rất tương tự với phổ của **1** chứng tỏ **2** cũng là một hợp chất có khung clerodane diterpenoit. Sự khác nhau rõ nét nhất giữa các phổ của hai hợp chất này là tín hiệu của carbon oxymethine δ_{C} 63,9 (C-2) của **1** bị thay thế bằng tín hiệu nhóm metylen δ_{C} 25,0. Sự

mất đi nhóm hydroxyl tại C-2 còn làm thay đổi độ dịch chuyển hóa học tại C-1 ($\Delta = -11,2$ ppm) và C-3 ($\Delta = +3,0$ ppm). Điều này còn được khẳng định bằng sự xuất hiện pic ion m/z 557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ trên phổ khối lượng ESI-MS của **2**, tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$ ($M = 534$), tức là sự mất đi một nhóm hydroxy so với **1**. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của **2** được xác định trước hết bằng sự so sánh các giá trị phổ tương ứng của **2** với **1** (bảng 1) và so sánh với các giá trị phổ đã công bố cho hợp chất borapetoside F [5], một hợp chất cũng đã được biết đến từ loài *Tinospora tuberculata*. Sau đó, các dữ kiện phổ cũng như cấu trúc phân tử của **2** được kiểm tra bằng các phổ HSQC và HMBC. Sự phù hợp hoàn toàn về các giá trị phổ của **2** với số liệu đã công bố chứng tỏ đây là hợp chất borapetoside F [5].



Hình 2: Một số tương tác HMBC chính của các hợp chất **1-3**

Hợp chất **3** thu được dưới dạng chất rắn không màu. Các phổ ^1H và ^{13}C NMR của **3** cũng có dạng phổ tương tự như của hợp chất **1**. Điều này cho thấy hợp chất **1** cũng là một clerodane diterpenoit. So sánh chi tiết các giá trị phổ NMR của hợp chất **3** với hợp chất **1** (bảng 1) cho thấy chỉ có các giá trị phổ tại C-6, C-7, C-8, C-9 và C-10 là khác nhau, đặc biệt hai tín hiệu tại δ 138,1/137,8 của nối đôi tại C-7/C-8 của **1** đã mất đi và thay bằng hai tín hiệu của hai carbon tại δ 27,6 (CH_2)/42,2 (CH) tương ứng với carbon C-7/C-8. Như vậy, hợp chất **3** là borapetoside F, một hợp chất clerodane diterpenoit cũng được biết đến từ cây *Tinospora tuberculata* và *Tinospora rumphii* [8]. Phổ ESI-MS với sự xuất hiện pic ion m/z 575 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 552$, $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$) và sự phù hợp hoàn toàn với các dữ kiện phổ đã công bố cho phép khẳng định **3** là borapetoside B [8]. Hai hợp chất borapetoside B và borapetoside F đều được phân lập từ *T. tuberculata*. Đây là thông báo đầu tiên về hai hợp chất này từ loài *T. cordifolia*. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất nêu trên sẽ được thông báo trong những công trình tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Từ dịch chiết metanol của dây thần thông

Tinospora cordifolia (Willd.) Miers (Menispermaceae), bằng các phương pháp sắc ký kết hợp, ba hợp chất clerodane diterpene, 6 β -*O*- β -D-glucopyranosyl-15,16-epoxy-2 α -hydroxy-3,7,13(16),14-clerodantetraene-17,12-olid-18-oic axit metyl este (**1**), borapetoside F (**2**) và borapetoside B (**3**) đã được phân lập. Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng các phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Hợp chất **1** lần đầu tiên được biết đến từ thiên nhiên, hai hợp chất **2** và **3** được tìm thấy lần đầu từ loài *T. cordifolia*.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự giúp đỡ kinh phí của đề tài KC10.20/06-10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nxb. Y học Hà Nội (2001).
2. Võ Văn Chi. Từ Điển Cây thuốc Việt Nam, p. 63-64, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (1999).
3. Đỗ Huy Bích và cộng sự. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập II, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (2004).
4. Panchabhai T. S., Kulkarni U. P., Rege N. N., Phytother Res., 22, 425 (2008).

5. N. Fukuda, M. Yonemitsu, T. Kimura. Liebigs Ann. Chem., 491 - 495 (1993).
6. S. Manabe, C. Nishino. Tetrahedron, 42, 3461 - 4370 (1986).
7. B. Blas, J. Zapp, H. Becker. Phytochemistry, 65, 127 - 137 (2004).
8. T. S. Martin, K. Ohtani, R. Kasai, K. Yamasaki. Phytochemistry, 42, 153 - 158 (1996).

Liên hệ: **Phan Văn Kiệm**

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.
Email: phankiem@vast.ac.vn