

CÁC THÀNH PHẦN PHENOLIC CỦA CÂY *ALPINIA GAGNEPAINII* K. SCHUM. (ZINGIBERACEAE)

PHENOLIC CONSTITUENTS OF *ALPINIA GAGNEPAINII* K. SCHUM. (ZINGIBERACEAE)

Phan Minh Giang, Lê Huyền Trâm, Phan Tổng Sơn
Phòng thí nghiệm Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

ABSTRACT

The perennial plant *Alpinia gagnepainii* K. Schum. (Zingiberaceae) is a rare species in Vietnam and found growing in some places in provinces Quang Binh, Quang Tri, Quang Nam, and Lai Chau, Vietnam. In our study program on chemical constituents and biological activities of the *Alpinia* species of Vietnam the phytochemical investigation of *A. gagnepainii* was carried out. Total MeOH extracts of the dried rhizomes of *A. gagnepainii* collected in provinces Quang Binh and Lai Chau were obtained individually by percolation at room temperature. Sequential liquid-liquid fractionations of the MeOH extracts, followed by repeated separation of the obtained soluble fractions using silica gel gradient column chromatography led to the isolation of a mixture of β -sitosterol and stigmasterol, (-)-pinocembrin, cardamomin, (-)-epicatechin, 5,6-dehydrokawain, naringenin 5-O-methyl ether, β -sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, and a new phenolic compound, designated alpininone. Their structures were determined on the basis of spectroscopic analyses, especially 1D and 2D NMR. The isolation and structure determination of these compounds are reported in this communication.

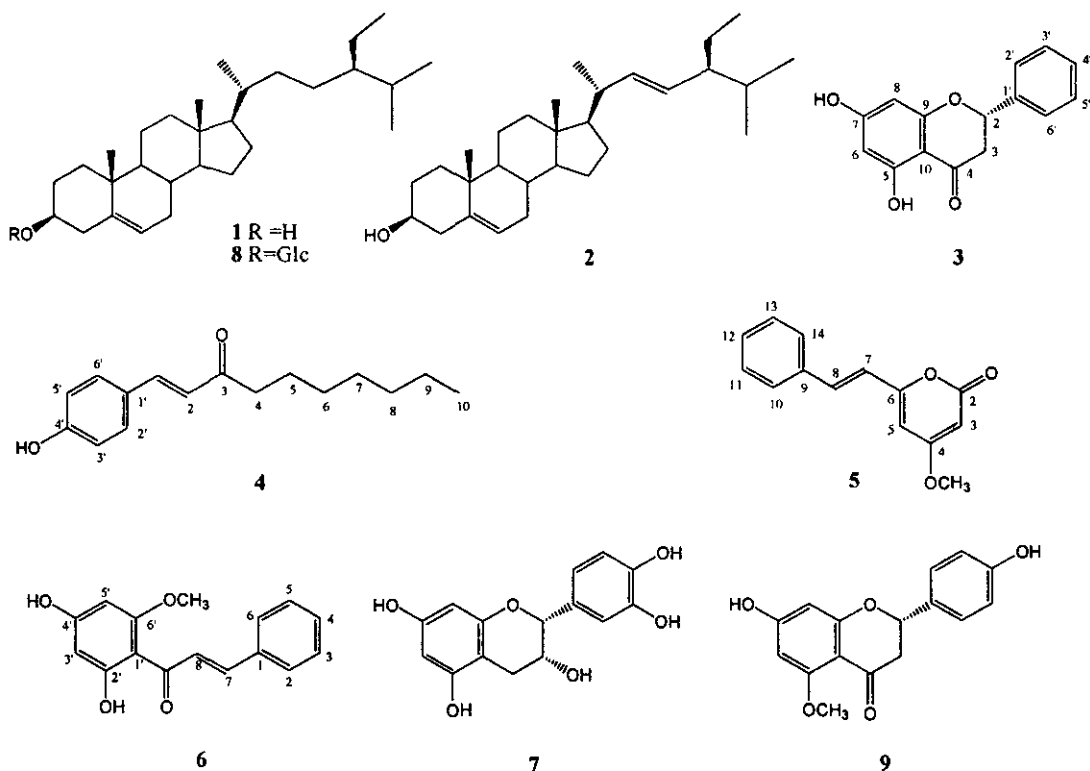
PHÂN MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây việc nghiên cứu các tác nhân dự phòng ung thư thu hút sự quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm. Khác với liệu pháp hoá học trong điều trị ung thư trong điều trị dự phòng ung thư các hiệu ứng phụ nghiêm trọng của thuốc cần được ngăn chặn, và các hợp chất thiên nhiên từ các cây thuốc có thể được phát triển thành các tác nhân dự phòng ung thư tiềm năng do các hợp chất này thường không thể hiện các độc tính mạnh [1,2]. Một số tác nhân dự phòng ung thư thiên nhiên đã được phát hiện có các cấu trúc của các diarylheptanoit, các flavonoit và các hợp chất phenolic như gingerol và paradol. Các cấu trúc tương tự cũng đã được phát hiện trong chương trình nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hoá học các loài *Alpinia* (Zingiberaceae) của Việt Nam [3-6]. Tiếp tục hướng nghiên cứu phát hiện các hợp chất thuộc các lớp cấu trúc có khả năng phát triển thành các tác nhân dự phòng ung thư bài báo này thông báo về việc phân lập và xác định cấu trúc của 9 hợp chất 1-9 từ thân rễ *Alpinia gagnepainii* K. Schum., một loài *Alpinia* hiếm của Việt Nam.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thân rễ khô *A. gagnepainii* (được thu thập ở Quảng Bình và Điện Biên) được chiết bằng MeOH ở nhiệt độ phòng. Phân bố phần chiết MeOH giữa H₂O với *n*-hexan và EtOAc cho các phần chiết tương ứng, *n*-hexan (hiệu suất so với lượng nguyên liệu khô ban đầu,

w/w, 0,78% và 1,19%) và EtOAc (2,67% và 1,8%). Các phân tách các phần chiết *n*-hexan và EtOAc được thực hiện trên silica gel bằng sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột nhanh (FC) và sắc ký lỏng trung áp (MPLC), hệ dung môi gradient là *n*-hexan-(CH₃)₂CO, CH₂Cl₂-(CH₃)₂CO và CHCl₃-EtOAc. Các hợp chất được xác định cấu trúc bằng các phổ IR, EI-MS, 1D NMR (¹H-, ¹³C-NMR và DEPT) và 2D NMR (¹H-¹H COSY, HMQC và HMBC) [7,8]. Hoá lập thể của các hợp chất 3 và 9 (2*S*) được xác định bằng cách so sánh các giá trị [α]_D của 3 và 9 với các giá trị của tài liệu tham khảo. β-Sitosterol (1) và stigmasterol (2) đã được xác định trong các phần chiết *n*-hexan (Quảng Bình và Điện Biên); (-)-pinocembrin (3), alpininon (4) và 5,6-dehydrokawain (5) trong phần chiết *n*-hexan (Điện Biên); 3, cardamomin (6), (-)-epicatechin (7) và β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranozit (8) đã được phân lập từ phần chiết EtOAc (Quảng Bình); 4-6 và naringenin 5-*O*-metyl ete (9) từ phần chiết EtOAc (Điện Biên).



Alpininon (4) là một hợp chất mới được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt, đ.n.c. 264-265°C. Khối lượng phân tử của 4 được xác định từ các dữ kiện phổ ¹³C-NMR, DEPT, EI-MS (*m/z* 246, [M]⁺) và ESI-MS (247,1, [M+H]⁺; 245,1, [M-H]⁻) là C₁₆H₂₂O₂. Phổ IR spectrum chỉ ra sự có mặt của các nhóm hydroxy (3382 cm⁻¹), cacbonyl (1641 cm⁻¹) và vòng thơm (1599, 1580, 1514 và 1466 cm⁻¹). Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của 4 cho phép xác định một nhóm 4-hydroxyphenyl [δ_{H} 6,87 (2H, d, *J*=8,5 Hz) và 7,42 (2H, d, *J*=8,5 Hz)], một nối đôi *trans* liên hợp với nhóm cacbonyl [δ_{H} 6,59 (1H, d, *J*=16 Hz), 7,5 (1H, d, *J*=16 Hz); δ_{C} 123,4 (d), 142,8 (d) và 201,1 (s)], và một nhóm heptyl [δ_{H} 0,88 (3H, t, *J*=7 Hz), 1,31 (8H, m), 1,66 (2H, quintet, *J*=7 Hz) và 2,63 (2H, t, *J*=7,5 Hz)]. Kết quả là

cấu trúc của **4** đã được xác định là 1-(4'-hydroxyphenyl)-1-decen-3-on. Các sự phân mảnh trên phổ EI-MS ở m/z 246, 162, 147, 119 và 107 hoàn toàn phù hợp với cấu trúc này. Phổ HMBC của hợp chất **4** cho các tương tác giữa H-1 (δ_H 7,5), H-2 (δ_H 6,59), H-4 (δ_H 2,63) và H-5 (δ_H 1,66) với C-3 (δ_C 201,1); giữa H-1, H-2, H-3' và H-5' (δ_H 6,87) với C-1' (δ_C 126,2) và giữa H-2' và H-6' (δ_H 7,42) với C-4' (δ_C 159,6) cũng khẳng định cho cấu trúc này.

Như vậy các sterol và sterol glucozit, các flavanon, flavan-3-ol, chalcon và các hợp chất phenolic dạng gingerol đã được phân lập là các thành phần chính của *A. gagnepainii*.

PHÂN THỰC NGHIỆM

Phương pháp và Thiết bị

Điểm nóng chảy được đo trên thiết bị Boetius và không hiệu chỉnh. Độ quay cực được đo trên thiết bị Polartronic D (Schmidt + Haensch). Phổ FT-IR được đo trên thiết bị Nicolet Magna IR-760 spectrometer. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) được đo trên thiết bị Bruker Avance 500 spectrometer. Tetrametylsilan (TMS) là chất chuẩn nội zero. Độ chuyển dịch hoá học (δ) được biểu thị bằng ppm. Phổ EI-MS được đo trên thiết bị Hewlett-Packard 5989B mass spectrometer. Phổ ESI-MS được đo trên hệ thống LC/MSD Trap Agilent Series 1100, sử dụng cột Zobax SB C18, hệ dung môi 15% MeOH trong (H_2O + axit fomic), tốc độ dòng 0,4 ml/phút. Silica gel (63-100 μm , Merck) được sử dụng cho CC và FC. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản precoated DC Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), hiện màu bằng đèn UV (λ 254 nm) và các thuốc hiện 1% vanillin trong H_2SO_4 đặc và 5% FeCl_3 trong EtOH. MPLC được thực hiện trên thiết bị SEPARO AB MPLC (Bäckström Separo AB, Lidingsö) sử dụng cột thủy tinh Separo (25 cm \times 2,5 cm), được nhồi bằng silica gel Merck (15-40 μm), bơm FMI Lab, Model QD-O-SSY (Fluid Metering, Inc., Oyster Bay, NY) được đặt ở tốc độ dòng 20-30 mL/phút.

Nguyên liệu thực vật

Thân rễ *A. gagnepainii* được thu thập ở Quảng Bình (tháng 5 năm 2004) và Điện Biên (tháng 6 năm 2005) và được giám định thực vật bởi nhà thực vật học Nguyễn Quốc Bình, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Điều chế các phân chiết và Phân lập các hợp chất 1-9

Thân rễ *A. gagnepainii* được rửa sạch, cắt lát mỏng, sấy trong bóng râm và sấy bằng tủ sấy ở 50°C, sau đó được nghiền thành bột. Bột thân rễ được chiết bằng MeOH ở nhiệt độ phòng (5 lần, mỗi lần trong 3 ngày), sau đó được cất loại MeOH dưới áp suất giảm. Phân chiết MeOH được phân tách theo độ phân cực bằng sự phân bố giữa H_2O và lần lượt với các dung môi *n*-hexan và EtOAc. Theo phương pháp này các phân chiết đã được điều chế từ các nguyên liệu khô của Quảng Bình và Điện Biên với các hiệu suất tương ứng sau: *n*-hexan (0,78% và 1,19%) và EtOAc (2,67% và 1,8%). Các phân tách CC, FC và MPLC đã dẫn đến sự phân lập β -sitosterol (1), stigmasterol (2), (-)-pinocembrin (3), alpininon (4) và 5,6-dehydrokawain (5) (hệ dung môi *n*-hexan-(CH_3)₂CO gradient) từ các phân chiết *n*-hexan; 3-5, cardamomin (6), (-)-epicatechin (7), β -sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranozit (8), naringenin 5-*O*-metyl ete (9) đã được phân lập từ phân chiết EtOAc (các hệ dung môi *n*-hexan-(CH_3)₂CO gradient, CH_2Cl_2 -(CH_3)₂CO gradient và CHCl_3 -EtOAc gradient) bằng

CC, FC và MPLC.

β -Sitosterol (1) và *stigmasterol (2)*: Tinh thể hình kim màu trắng. Đ.n.c. 138°C. R_f 0,52 (TLC, silica gel, *n*-hexan-EtOAc 4:1, v/v). Phổ IR, EI-MS, ¹H- và ¹³C-NMR phù hợp với của mẫu chuẩn.

(-)-*Pinocembrin (3)*: Tinh thể hình kim màu trắng. Đ.n.c. 198-199°C. [α]_D³⁰ -32,5° (c 1,17, CHCl₃). R_f 0,45 (TLC, silica gel, CHCl₃-EtOAc 10:1, v/v). UV λ_{\max} (EtOH) (log ϵ) nm: 210,9 (4,58), 290,2 (4,26). IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3099, 1623, 1583, 1488, 1173, 1088. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2,8 (1H, dd, *J*=3, 17,5 Hz, H-3a), 3,07 (1H, dd, *J*=13, 17,5 Hz, H-3b), 5,4 (1H, dd, *J*=3,5, 13 Hz, H-2), 5,99 (2H, brs, H-6, H-8), 7,38-7,46 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 12,1 (1H, s, 5-OH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 29,8 (t, C-3), 79,2 (d, C-2), 95,7 (d, C-8), 96,6 (d, C-6), 102,6 (s, C-10), 126,2 (d, C-2', C-6'), 128,9 (d, C-3', C-4', C-5'), 138,5 (C-1'), 163,2 (s, C-9), 163,9 (s, C-5), 166,5 (s, C-7), 195,6 (C-4). EI-MS: *m/z* (%) 256 (C₁₅H₁₂O₄, M⁺, 99,8), 255 (54,7), 228 (3,4), 179 (100), 153 (25), 152 (83,8), 124 (71,9), 105 (7,8), 77 (31,7).

Alpininon (4): Tinh thể hình kim màu vàng nhạt. Đ.n.c. 264-265°C. R_f 0,48 [TLC, silica gel, *n*-hexan-(CH₃)₂CO 2:1, v/v]. UV λ_{\max} (EtOH) (log ϵ) nm: 235 (4,15), 325 (4,56). UV λ_{\max} (EtOH+AlCl₃) (log ϵ) nm: 207 (4,98), 219,1 (4,99), 328,1 (4,52). IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3382, 1641, 1599, 1580, 1514, 1466, 1276, 1167. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,88 (3H, t, *J*=7 Hz, H-10), 1,31 (8H, m, H-6, H-7, H-8, H-9), 1,66 (2H, quintet, *J*=7 Hz, H-5), 2,63 (2H, t, *J*=7,5 Hz, H-4), 6,59 (1H, d, *J*=16 Hz, H-2), 6,87 (2H, d, *J*=8,5 Hz, H-3', H-5'), 7,42 (2H, d, *J*=8,5 Hz, H-2', H-6'), 7,5 (1H, d, *J*=16 Hz, H-1), 8,69 (1H, brs, OH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 14,1 (q, C-10), 22,6 (t, C-9), 24,7 (t, C-5), 29,1 (t, C-7), 29,4 (t, C-6), 31,7 (t, C-8), 40,7 (t, C-4), 116,2 (d, C-3', C-5'), 123,4 (d, C-2), 126,2 (s, C-1'), 130,2 (d, C-2', C-6'), 142,8 (d, C-1), 159,6 (s, C-4'), 201,1 (C-3). EI-MS: *m/z* (%) 246 (C₁₆H₂₂O₂, M⁺, 4,9), 162 (41,5), 147 (100), 119 (24,6), 107 (17), 91 (20,1). ESI-MS: 247,1 ([M+H]⁺), 245,1 ([M-H]⁻).

5,6-Dehydrokawain (5): Tinh thể hình kim màu vàng. Đ.n.c. 138-140°C. R_f 0,37 [TLC, silica gel, *n*-hexan-(CH₃)₂CO 2:1, v/v]. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 1728, 1641, 1608. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,82 (3H, s, 4-OCH₃), 5,46 (1H, d, *J*=2 Hz, H-3), 5,94 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8), 6,58 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7), 7,3 (6H, m, H-5, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 55,9 (q, 4-OCH₃), 88,8 (d, C-3), 101,3 (d, C-5), 118,6 (d, C-7), 127,4 (d, C-14), 127,7 (d, C-10), 128,3 (d, C-13), 128,9 (d, C-11), 129,4 (d, C-12), 135,2 (s, C-9), 135,8 (d, C-8), 158,6 (s, C-2), 164,0 (s, C-6), 171,1 (s, C-4). EI-MS: *m/z* (%) 228 (C₁₄H₁₂O₃, M⁺, 100), 211 (7,9), 200 (32,8), 185 (21,7), 157 (58,6), 129 (33,3), 103 (26,2), 77 (38,2), 69 (56).

Cardamomin (6): Tinh thể hình kim màu vàng. R_f 0,41 (TLC, silica gel, CHCl₃-EtOAc 10:1, v/v). IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3162, 1630, 1542, 1485, 1214, 1171, 1113. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,93 (3H, s, 6'-OCH₃), 5,96 (1H, d, *J*=2,5 Hz, H-5'), 6,03 (1H, d, *J*=2,5 Hz, H-3'), 7,39-7,46 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 7,78 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8), 7,90 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7), 12 (1H, s, 5-OH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 55,9 (q, 6'-OCH₃), 91,7 (d, C-3'), 96,3 (d, C-5'), 106,0 (s, C-1'), 127,8 (d, C-7), 128,4 (d, C-2, C-6), 128,9 (d, C-3, C-

5), 130,1 (d, C-4), 135,6 (s, C-1), 142,1 (d, C-8), 163,4 (s, C-6'), 164,9 (s, C-4'), 167,3 (s, C-12), 192,7 (s, C=O). EI-MS: m/z (%) 270 ($C_{16}H_{14}O_4$, M^+ , 51,1), 269 (49,9), 253 (6,8), 193 (100), 131 (4,8), 103 (11,4), 77 (12,9).

(-)-*Epicatechin* (7): Tinh thể hình kim màu vàng. Đ.n.c. 240-243°C. R_f 0,43 (TLC, silica gel, $CHCl_3$ -EtOAc 1:5, v/v). $[\alpha]_D^{30}$ -37,9° (c 0,58, MeOH). IR (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3141, 1616, 1518, 1466, 1265, 1187, 1146, 1017. 1H -NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD): δ 2,83 (1H, dd, $J=2,5$, 16 Hz, H-4a), 2,89 (1H, dd, $J=4,5$, 16 Hz, H-4b), 4,21 (1H, brs, H-3 β), 4,86 (1H, s, H-2 β), 5,98 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 6,0 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 6,82 (2H, brs, H-5', H-6'), 7,0 (1H, brs, H-3'). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD): δ 27,7 (t, C-4), 66,1 (d, C-3), 78,2 (d, C-2), 94,8 (d, C-8), 95,4 (d, C-6), 98,5 (s, C-10), 113,5 (d, C-5'), 114,7 (d, C-2'), 118,1 (d, C-6'), 130,3 (s, C-1'), 144,17 (s, C-4'), 144,23 (s, C-3'), 155,5 (s, C-9), 155,9 (s, C-7), 156,3 (s, C-5). EI-MS: m/z (%) 290 ($C_{15}H_{14}O_6$, M^+ , 22,6), 152 (33,2), 139 (100), 138 (8,3), 123 (40,9).

β -*Sitosterol 3-O- β -D-glucopyranozit* (8): Bột vô định hình màu trắng. R_f 0,57 (TLC, silica gel, EtOAc-MeOH 10:1, v/v). Phổ IR, EI-MS, 1H - và ^{13}C -NMR phù hợp với của mẫu chuẩn.

Naringenin 5-O-methyl ether (9): Tinh thể hình kim không màu. Đ.n.c. >260°C. $[\alpha]_D^{25}$ -253,3° (c 0,3, MeOH). R_f 0,66 (TLC, silica gel, $CHCl_3$ - $(CH_3)_2CO$ 5:1, v/v). IR (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3229, 1620, 1588, 1518, 1158, 1111. 1H -NMR (DMSO- d_6): δ 2,53 (1H, dd, $J=2,8$ Hz, 16,4 Hz, H-3a), 2,98 (1H, dd, $J=12,5$ Hz, 16,4 Hz, H-3b), 3,87 (3H, s, 5-OCH $_3$), 5,33 (1H, dd, $J=2,8$ Hz, 12,5 Hz, H-2), 5,94 (1H, d, $J=2,1$ Hz, H-6), 6,05 (1H, d, $J=2,1$ Hz, H-8), 6,78 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2', H-6'), 7,28 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-3', H-5'), 9,5 (1H, brs, OH), 10,5 (1H, brs, OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 44,7 (t, C-3), 55,6 (q, 5-OCH $_3$), 78,0 (d, C-2), 93,2 (d, C-8), 95,6 (d, C-6), 104,4 (s, C-10), 115,1 (d, C-3', C-5'), 128,1 (d, C-2', C-6'), 129,3 (s, C-1'), 157,5 (s, C-4'), 162,2 (s, C-9), 164,2 (s, C-5), 164,3 (s, C-7), 187,7 (s, C-4). EI-MS: m/z % 286 ($C_{16}H_{14}O_5$, M^+ , 100), 285 (71), 193 (27), 167 (92), 166 (35), 138 (29), 120 (23).

Lời cảm ơn. Công trình nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học tự nhiên (Việt Nam) và International Foundation for Science (IFS) (Thụy Điển).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tamini R. M., Lagiou P., Adami H. O., Trchopoulos D., *J. Inter. Med.*, 251, 286-300 (2002).
2. Surh Y. J., *Mutat. Res.*, 428, 305-327 (1999).
3. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hoá học*, 42, 376-378 (2004).
4. Phan Minh Giang, Đặng Bách Tài, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hoá học*, 43, 105-108 (2005).
5. Phan Minh Giang, Otsuka H., Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hoá học*, 43, 610-613 (2005).
6. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, Matsunami K., Otsuka H., *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1335-1337 (2005).
7. Phan Minh Giang, Lê Huyền Trâm, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hoá học*, 43, 524-528 (2005).
8. Lê Huyền Trâm, Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hoá học*, 45, 126-130 (2007).