

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CÂY RIỀNG GAGNEPAIN (ALPINIA GAGNEPAINII K. SCHUM., ZINGIBERACEAE)

Lê Huyền Trâm, Phan Minh
Giang, Phan Tổng Sơn
Khoa Hoá học, Trường ĐHKHTN,
ĐHQGHN

SUMMARY

*From the n-hexane soluble fraction from the methanol extract of the rhizomes of *Alpinia gagnepainii* K. Schum. (Zingiberaceae), a (4:1)-mixture of b-sitosterol and stigmasterol (1) and b-sitosterol glucoside (2) were isolated, the structure of which has been identified by MS, ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. The antimicrobial activity and the antioxidant effect of the extracts from the rhizomes of *Alpinia gagnepainii* were investigated.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Alpinia* (Riềng) là một trong những chi lớn thuộc họ Gừng (Zingiberaceae), gồm khoảng 200 loài khác nhau mọc rải rác ở nhiều vùng Đông Á, Đông Nam Á, từ Ấn Độ đến Nhật Bản, châu Úc và khu vực Thái Bình Dương... Cho đến nay người ta đã tìm thấy khoảng hơn 30 loài *Alpinia* có ở Việt Nam [1, 3]. Các cây thuộc chi *Alpinia* được dùng trong y học dân gian của nhiều nước. Thân rễ của nhiều loài *Alpinia* được dùng làm thuốc chữa đau dạ dày, đau bụng, đầy hơi, ỉa chảy, gây nôn, sốt rét, sốt nóng... Bên cạnh công dụng làm thuốc trong y học cổ truyền, các loài cây thuộc chi này còn được khai thác sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác như làm gia vị, hương liệu, phẩm màu trong chế biến thực phẩm và làm cảnh v.v... [2, 3]

Ở Việt Nam, cây Riềng Gagnepain (*Alpinia gagnepainii* K. Schum., Zingiberaceae) phân bố ở các tỉnh Hà Nam và Quảng Bình [1]. Cho đến nay, chưa có một công trình khoa học nào công bố về thành phần hoá học cũng như hoạt tính sinh học của cây Riềng Gagnepain. Trong y học cổ truyền nhân dân ta thường sử dụng thân rễ của các loài riềng để làm thuốc chữa bệnh, nên chúng tôi chọn đối tượng nghiên cứu là thân rễ riềng Gagnepain. Trong công trình này, chúng tôi thông báo một số kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của các phần chiết từ thân rễ cây riềng Gagnepain.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Mẫu thực vật

Thân rễ của cây Riềng Gagnepain được thu hái ở Tam Kỳ, Quảng Nam vào tháng 8 năm 2003. Mẫu thực vật đã được ThS Nguyễn Quốc Bình, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, giám định và lưu tại phòng lưu trữ mẫu của Viện (Kí hiệu: VN 782). Mẫu thực vật sau khi thu hái đem rửa sạch hết phần đất bám bên ngoài, để ráo nước rồi đem thái ngang mỏng và phơi khô trong bóng râm. Sau đó đem sấy mẫu ở 40-50°C, rồi xay thành bột mịn.

2. Điều chế các phần chiết và phân lập các hợp chất từ cây Riềng Gagnepain

Điều chế các phần chiết

Bột khô của thân rễ cây Riềng Gagnepain được ngâm chiết với metanol khan ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết metanol được cất loại bớt metanol rồi pha loãng bằng nước cất. Sau đó, dịch metanol - nước được chiết lần lượt với các dung môi n-hexan, điclometan, etylaxetat và n-butanol. Làm khan các dịch chiết rồi cất loại dung môi thu được các phần chiết tương ứng: phần chiết n-hexan (AGH), điclometan (AGD), etylaxetat (AGE) và n-butanol (AGB).

Hiệu suất ((% theo khối lượng nguyên liệu khô): **AGH** (0,95%), **AGD** (0,9%), **AGE** (0,84%), **AGB** (0,77%).

Phân lập các hợp chất và cấu trúc

Phân chiết n-hexan (**AGH**) được phân tách bằng sắc kí cột trên silicagel với hệ dung môi n-hexan-EtOAc hoặc n-hexan-axeton. Từ phân chiết này chúng tôi đã phân lập được hai chất. Cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định bằng các phương pháp phổ (MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR) là một hỗn hợp của β -sitosterol và stigmasterol với tỷ lệ là 4:1 (1) và một β -sitosterol glucosit (2). [4].

Chất 1

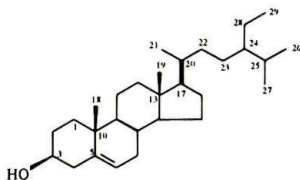
Kết tinh dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 138°C .

$R_f = 0,52$ (silicagel, hệ n-hexan/ethylaxetat (4/1; v/v).

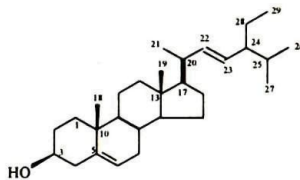
Phổ MS của 1 cho thấy đây là một hỗn hợp của hai chất 1a (M^+ , 414, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$) và 1b (M^+ , 412, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$).

Phổ IR chỉ ra sự có mặt của nhóm hydroxyl của một ancol bậc hai ở một vòng no sáu cạnh ($3420, 3304, 1057\text{ cm}^{-1}$) và nối đôi C=C ($1664, 1642, 958\text{ cm}^{-1}$).

Phổ ^1H -NMR cho thấy 1 là một hỗn hợp của β -sitosterol (1a) và stigmasterol (1b) với tỉ lệ khoảng 4:1. Trên phổ ^1H -NMR các tín hiệu cộng hưởng của cacbinol metin proton ở C-3 của cả 1a và 1b xuất hiện ở δ_{H} 3.52 dưới dạng triplet của triplet (tt, $J=4.8\text{Hz}, 11\text{Hz}$). Tín hiệu của proton của H-6 xuất hiện ở d 5.35 (dbr, $J=5.1\text{ Hz}$). Các tín hiệu của các proton của nối đôi có cấu hình *trans* xuất hiện ở δ_{H} 5.02 (dd, $J=9.0\text{Hz}, 14.4\text{Hz}$, H-23) và 5.15 (dd, $J=9.0\text{Hz}, 14.4\text{Hz}$, H-22) cho stigmasterol (1b). Các tín hiệu cộng hưởng của các nhóm methyl của β -sitosterol (1a) và stigmasterol (1b) xuất hiện tương đối phân giải, như hai nhóm methyl bậc ba ở δ 0.68 (s, 13-Me), δ 1.00 (s, 10-Me) (1a). δ 0.70 (s, 13-Me), δ 1.00 (s, 10-Me) (1b); nhóm methyl bậc hai dưới dạng dublet ở δ 0.92 (20-Me) (1a) và δ 1.00 (20-Me) (1b); nhóm methyl của etyl dưới dạng triplet ở d 0.84 (28-Me) (1a), d 0.79 (28-Me) (1b); nhóm isopropyl ở δ 0.81, 0.83 (2 25-Me) (1a) và 0.80, 0.84 (2 25-Me)



1a
(β -sitosterol)



1b
(stigmasterol)

(1b).

Các dữ kiện phổ ^{13}C -NMR cũng phù hợp với cấu trúc của các chất này.

Chất 2

Kết tinh dưới dạng tinh thể hình hạt, màu trắng ngà, điểm nóng chảy $281\text{--}283^\circ\text{C}$.

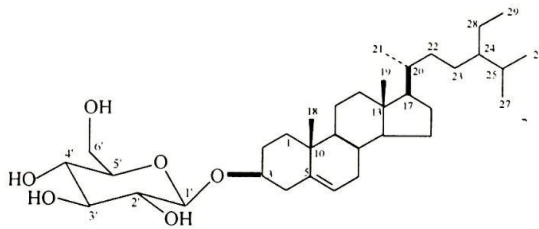
$R_f = 0,3$ (silica gel, hệ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1; v/v)).

Phổ MS của 2 xuất hiện pic ở m/z 414 của sitosterol. Trên phổ này cũng xuất hiện các pic ở các m/z như ở β -sitosterol.

Phổ IR của 2 có dải hấp thụ đặc trưng ở $n_{\text{max}} 3391\text{ cm}^{-1}$ (OH) và 1642 cm^{-1} (nối đôi $\text{C}=\text{C}$).

Phổ ^1H NMR xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của hai nhóm methyl bậc ba [$\delta 0.69$ (3H, s) và 1.00 (3H, s)], một nối đôi thế ba lần [$\delta 5.40$ (1H, brd, $J=5.1\text{ Hz}$)], một nhóm metin cacbinol [$\delta 3.52$ (1H, $J=5.1\text{ Hz}$, 11.7 Hz)]. Nhóm hiđroxy gắn với C-3 có cấu hình β do tương tác axial-axial giữa các C-H tương ứng ($J=11.7\text{ Hz}$). Các dữ kiện này cho thấy cấu trúc khung stigmasteran của hợp chất 2. Nhóm isopropyl [$\delta 0.82$ (3H, d, $J=6.8\text{ Hz}$); 0.84 (3H, d, $J=7.3\text{ Hz}$)], nhóm methyl của etyl ($\delta 0.85$, t, $J=7.6\text{ Hz}$), nhóm methyl bậc hai ($\delta 0.93$, 3H, d, $J=6.4\text{ Hz}$) thuộc mạch nhánh 2-methyl-3-ethyl-6-methyl hexyl. Tín hiệu cộng hưởng phân giải cao của anomeric proton ở $\delta 4.40$ (1H, $J=7.8\text{ Hz}$, Glc-1) cho thấy cấu hình β của glucosơ gắn vào nhóm hiđroxy ở C-3 của β -sitosterol. Vậy 2 là 3-O- β -sitosterol glucosid. Sản phẩm này có lẫn một chút stigmasterol glucosid [$\delta_{\text{H}} 5.02$ (dd, $J=9.0\text{ Hz}$, 11.4 Hz)].

Các dữ kiện phổ ^{13}C NMR cũng phù hợp với cấu trúc của chất này.



3-O- β - sitosterol glucozit

2

3. Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Chúng tôi đã tiến hành thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của 4 phần chiết n-hexan (AGH), diclometan (AGD), etylaxetat (AGE) và n-butanol (AGB) theo phương pháp của Vanden Bergher và Vlietlink [5].

Các chủng vi khuẩn đã được dùng để thử hoạt tính bao gồm 8 vi sinh vật thuộc 4 nhóm sau:

- 2 vi khuẩn gram (-): *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2 vi khuẩn gram (+): *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.
- 2 nấm mốc: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*.
- 2 nấm men: *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae*.

Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các phần chiết được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các phần chiết từ thân rễ cây Riềng Gagnepain

STT	Chủng vi sinh vật	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, $\mu\text{g/ml}$)			
		AGH	AGD	AGE	AGB
1	<i>Escherichia coli</i>	200	50	(-)	(-)
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	50	(-)	(-)
3	<i>Bacillus subtilis</i>	50	(-)	(-)	(-)
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	50	(-)	(-)
5	<i>Aspergillus niger</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
6	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	(-)	(-)	(-)
7	<i>Candida albicans</i>	(-)	(-)	(-)	100
8	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	(-)	(-)	(-)	50

Ghi chú: (-): không có tác dụng kháng vi sinh vật kiểm định

4. Hoạt tính chống oxy hoá của các phần chiết

Hoá chất

- Nước cất;
- Dung dịch đệm axetat có pH = 4,7;
- Dung dịch indigocarmin 0,001 N;
- Dung dịch H₂O₂ 0,2 N;
- Máu chống đông (máu lấy tại Trung tâm huyết học và truyền máu, Bệnh viện Bạch Mai) là nhóm máu O. Máu được lấy vào ống nghiệm sạch, khô, ly tâm tách huyết tương và được pha loãng 500 lần bằng nước cất.
- Các phần chiết được pha loãng thành các nồng độ từ 1,0 đến 25,0 mg%.

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá

Tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của các phần chiết từ thân rễ cây Riềng Gagnepain với nhóm máu thử là nhóm máu O theo phương pháp Xavron [6]. Tác dụng chống oxy hóa được đánh giá trên cơ sở nghiên cứu ảnh hưởng của các phần chiết này lên độ hoạt động của enzym peroxydaza trong máu.

Kết quả cho thấy hai phần chiết có hoạt tính chống oxy hoá là phần chiết **AGE** và **AGB**.

Các kết quả được trình bày ở các bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các phần chiết AGE và AGB lên độ hoạt động của peroxydaza máu người (nhóm máu O)

Nhóm máu	Mẫu thử	Hoạt độ peroxydaza (% so với mẫu đối chứng)							
		0 mg% (Đối chứng)	1,0 mg%	5,0 mg%	7,5 mg%	10,0 mg%	15,0 mg%	20,0 mg%	25,0 mg%
O	AGE	100	44,59	21,3	13,9	5,49	-		
	AGB	100	52,53	24,21		16,53	6,8	15,72	-

Ghi chú: (-): kim hãm hoàn toàn hoạt động của enzym peroxydaza

Kết quả ở bảng 2 cho thấy các phần chiết AGE và AGB đều có hiệu lực kìm hãm đối với độ hoạt động của peroxydaza máu người và phần chiết AGE có tác dụng kìm hãm mạnh hơn phần chiết AGB.

KẾT LUẬN

1. Từ phần chiết n-hexan của thân rễ cây riềng Gagnepain đã phân lập được một hỗn hợp 4:1 của β -sitosterol và stigmasterol và β -sitosterol glucosit. Cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định nhờ các phương pháp vật lý hiện đại (MS, IR, ^1H NMR)
2. Đã khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các phần chiết. Các phần chiết **AGH** và **AGD** có tác dụng ức chế một số chủng vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*); phần chiết không có tác dụng kháng khuẩn, nhưng kháng được hai chủng nấm men (*Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae*); còn phần chiết AGE không có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.
3. Đã khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của các phần chiết. Các phần chiết **AGH** và **AGD** không có ảnh hưởng lên peroxydaza máu người trong phản ứng oxy hoá indigocarmin; còn các phần chiết **AGE** và **AGB** có hiệu lực kìm hãm rõ rệt độ hoạt động của peroxydaza máu người.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Quốc Bình (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã giám định mẫu thực vật, TS. Lê Mai Hương (Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam), TS. Đào Thị Kim Nhung (Viện nghiên cứu đào tạo và tư vấn khoa học công nghệ) đã giúp thử hoạt tính sinh học các phần chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam* (An Illustrated Flora of Vietnam), tập III, Nhà xuất bản Trẻ, 2001.
2. Lã Đình Mối, Lưu Đàm Cư, Trần Minh Hợi, Trần Huy Thái, Ninh Khắc Bản, *Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam* (Essential oil plant resources in Vietnam), tập II, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 2000.
3. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1997.
4. L. J. Goad and T. Akihisa, *Analysis of Sterol*, p. 378, p. 380, Blackie Academic & Profesional, First edition, 1997.
5. D. A. Vanden Bergher, A. J. Vlietlink (1991), *Method in plant biochemistry*, 6, pp. 47-68.
6. Алексенко П. И., *Методы определения активности протеолитических ферментов в "Современные методы в биохимике"*, Изд. Медицина, Москва, с.115-190, 1996