

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT NHÓM PHENOLIC
VÀ ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA IN-VITRO
CỦA CÂY MẮM ỎI (*Avicennia marina* L.)

Nguyễn Thị Ngọc Vân^{1*}, Nguyễn Huỳnh Kim Ngân²,
Bùi Thảo Nguyên¹, Lê Thị Nhân Duyên¹, Bùi Thị Bích Hằng³

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Công ty cổ phần Warrantek

3. Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ntnv@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Mắm ổi (*Avicennia marina*) là một loài thực vật ngập mặn thuộc chi Mắm (*Avicennia* L.), được nghiên cứu để đánh giá sơ bộ tính kháng oxy hóa của dịch chiết lá. **Mục tiêu nghiên cứu:** (1) Xây dựng quy trình chiết xuất và điều kiện sắc ký cho nhóm phenolic trong dịch chiết lá cây mắm; (2) Đánh giá tác dụng kháng oxy hóa invitro của các dịch chiết lá trong cây Mắm ổi. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Lá cây mắm ổi thu hái tại Cà Mau được chiết siêu âm với bốn loại dung môi bao gồm: ethylacetate, dichloromethane, ethylacetate:methanol (7:3), methanol:nước (7:3). Nhóm phenolic trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp năng lực khử sắt FRAP. **Kết quả:** Dịch chiết Ethylacetate chiết được nhóm phenolic trong lá cây Mắm ổi với hiệu suất cao nhất. Sơ bộ đánh giá khả năng kháng oxy hóa của hai dịch chiết ethylacetate và dichloromethane cao hơn các dịch chiết khảo sát. **Kết luận:** Có mối liên quan giữa tác dụng kháng oxy invitro và hàm lượng chất chiết được trong dịch chiết ethylacetate của lá cây mắm ổi.

Từ khóa: Mắm ổi, nhóm phenolic, kháng oxy hóa

ABSTRACT

RESEARCH ON THE EXTRACTION PHENOLIC COMPOUND AND PRE-EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AVICENNIA MARINA L.

Nguyen Thi Ngoc Van^{1*}, Nguyen Huynh Kim Ngan²,
Bui Thao Nguyen¹, Le Thi Nhan Duyen¹, Bui Thi Bich Hang³

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Warrantek Joint Stock Company

3. Can Tho University

Background: *Avicennia marina* of the family *Avicenniaceae* is a mangrove tree, were studied to pre-evaluate antioxidant activity of leaves extract. **Objectives:** (1) Research on extraction and chromatography condition of leaves extract; (2) evaluation antioxidant activity of compound extracted of leaves were explored. **Materials and methods:** Leaves collected from Ca Mau were extracted by sonication with ethyl-acetate, dichloromethane, ethyl-acetate: methanol (7:3), methanol: water (7:3). Phenolic compound was determined by High- Performance Liquid Chromatography and evaluated antioxidant activity with reducing power FRAP assay. **Results:** Ethyl-acetate extract had phenolic compounds in *Avicennia* leaves with the highest yields. Pre-evaluate antioxidant activity of ethyl-acetate and dichloromethane extracts was higher than researched

extracts. **Conclusion** The relevance between antioxidant activity and content compound extracted in ethylacetate extract of *Avicennia* leaves were explored.

Keywords: *Avicennia marina*, phenolic compound, antioxidant.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mắm ổi (*Avicennia marina*) là một loài thực vật ngập mặn thuộc chi Mắm ổi (*Avicennia* L.) phân bố ở các vùng bờ biển nhiệt đới và cận nhiệt đới như Thái Lan, Indonesia, Philipin, Ấn Độ, Myanma, Trung Quốc,... [8]. Từ những năm 1960, cây mắm đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu, chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, được sử dụng trong điều trị bệnh, nhiều hợp chất hữu cơ quan trọng từ cây mắm như: flavonoid, acid phenolic, terpenoid, tanin,... [7].

Ở Việt Nam có 3 loài là Mắm trắng (*A. alba*), Mắm đen (*A. officinalis*) và Mắm ổi (*A. marina*). Chúng phân bố trong các dải rừng ngập mặn ven biển từ Quảng Ninh đến Kiên Giang, trong đó mắm ổi là loài phổ biến hơn cả. *Avicennia marina* là một trong những loài cây ngập mặn có nhiều tính chất khác nhau trong y học cổ truyền. Chiết xuất của lá có hoạt tính chống ung thư và chống vi rút, bảo vệ men gan và tác dụng hỗ trợ điều trị đái tháo đường [4]. Một số nghiên cứu đã công bố cho thấy các tác dụng dược lý nêu trên là do một số hợp chất chính quyết định. Hoạt tính kháng oxy hóa của cây Mắm ổi là do hàm lượng cao các hợp chất phenolic và flavonoid cụ thể là quercetin [10], hoạt tính kháng ung thư do các flavonoid như isoquercitrin [3], luteolin 7-O-methylether 3'-O- β -D-galactoside [5], hoạt tính trị đái tháo đường do sự có mặt của flavonoid, tanin, phenols, ... Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về cây Mắm ổi, trong đó đa phần theo hướng phân lập các chất có trong cây. Trong đề tài nghiên cứu của Lê Thanh Phước và Lê Hương Nhi (2012) [1] nghiên cứu về thành phần hóa học cây Mắm ổi cho kết quả phân lập được 3 chất gồm taraxerol, taraxerone và betulin. Trong một nghiên cứu khác của Phạm Thị Thùy Trang (2010) [2] đã phân lập và xác định được 4 hợp chất: lupeol, stigmasterol, kaemferol và esculetin. Tuy nhiên, vẫn chưa có công bố về hàm lượng hoạt chất trong cây. Do đó bài báo bước đầu nghiên cứu nhằm:

1. Xây dựng quy trình chiết xuất và điều kiện sắc ký cho nhóm phenolic trong dịch chiết lá cây mắm ổi.
2. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa invitro của các dịch chiết lá cây mắm ổi.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu thực hiện trên lá cây mắm ổi được thu hái ở tỉnh Cà Mau. Cây mắm ổi được rửa sạch, phơi khô, xay thành dạng bột, dùng rây để tạo nên bột có độ mịn phù hợp.

2.2. Hóa chất, dung môi, thiết bị

Hóa chất, dung môi

2, 4, 6-tripirydyl-striazine, natri acetate, acid acetic, axit clohydrid, ethyl-acetate (EtOAc), methanol (MeOH), Dichloromethane (DCM), nước, n-hexan, acetonitrile (MeCN), ammonium acetate, acid formic đạt tiêu chuẩn sắc ký.

Thiết bị

Hệ thống HPLC Agilent 1100, đầu dò DAD G1315B. Máy quang phổ UV Vis Multiskan FC Wo/Inc (Thermo Fisher Scientific), cân phân tích 4 số OHAUS, cân phân tích 5 số ABT 220-5DM, bể siêu âm WUC- D06H (Daihan), máy cô quay Heidolph.

2.3. Phương pháp nghiên cứu**2.3.1. Quy trình chiết nhóm phenolic trong lá cây mã ổi****Khảo sát dung môi chiết**

Qua xem xét điều kiện nghiên cứu thực tế, đề xuất phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm vì phương pháp này có nhiều ưu điểm, phù hợp cho quy mô kiểm nghiệm. Từ các nhóm yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất, lựa chọn ra các yếu tố khả thi để khảo sát nhằm tìm ra điều kiện chiết phù hợp, hiệu quả và kinh tế. Yếu tố được lựa chọn trong nghiên cứu này là loại dung môi chiết. Dung môi loại tạp được lựa chọn là n-hexan.

Dựa trên tài liệu tham khảo được và quy trình chiết nhóm kháng oxy hóa [9]. Bốn loại dung môi được lựa chọn cho nghiên cứu bao gồm: EtOAc, DCM, EtOAc:MeOH (7:3), MeOH:H₂O (7:3).

Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa trên cấu trúc hóa học của các nhóm chất trong nghiên cứu và các tài liệu đã tham khảo, kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo với hệ dung môi phân cực đã được áp dụng. Trong quá trình thực nghiệm, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách và độ chọn lọc của phương pháp đã được khảo sát như pH, tỷ lệ dung môi pha động. Điều kiện tối ưu là các pic tách nhau hoàn toàn với $R_s \geq 1,5$ và hệ số bất đối các pic nằm trong khoảng 0,8 - 1,5.

Thành phần pha động: tiến hành khảo sát tỉ lệ các dung môi MeCN, MeOH, nước có hoặc không có các chất điều chỉnh pH như ammonium acetate, acid formic.

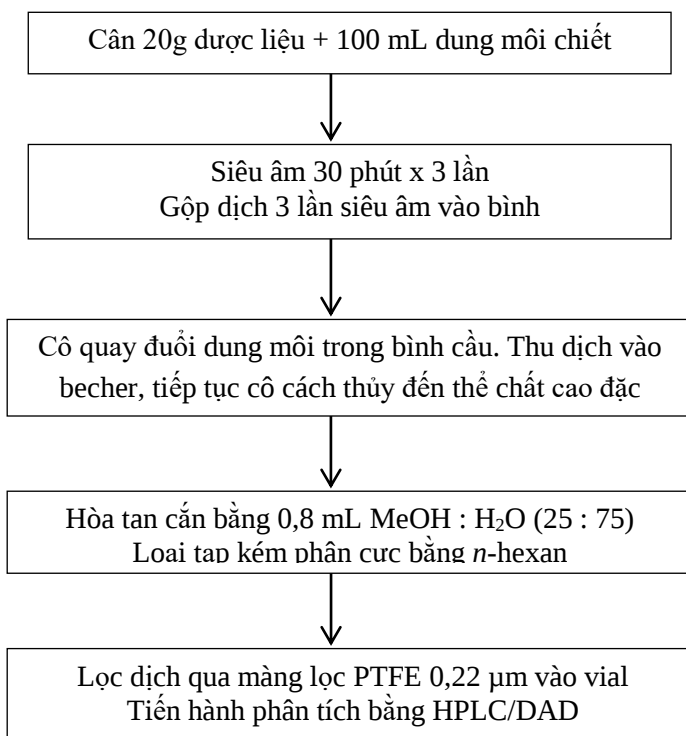
Các yếu tố còn lại được cố định như sau:

- + Cột sắc ký Kromasil C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m).
- + Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- + Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.
- + Nhiệt độ cột: 30°C

2.3.2. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa in-vitro

Khả năng khử sắt FRAP được thực hiện theo Benzie et al. (1996) có hiệu chỉnh [6]. Tiến hành cho 10 μ L cao chiết (có nồng độ từ 10, 20, 50, 80, 100 μ g/mL) vào 990 μ L dung dịch FRAP. Các hỗn hợp trên được ủ ở 37°C trong 10 phút, sau đó tiến hành đo giá trị độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 593 nm.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**3.1. Kết quả khảo sát quy trình chiết xuất nhóm phenolic trong lá cây mã ổi****Kết quả tối ưu hóa quy trình chiết**

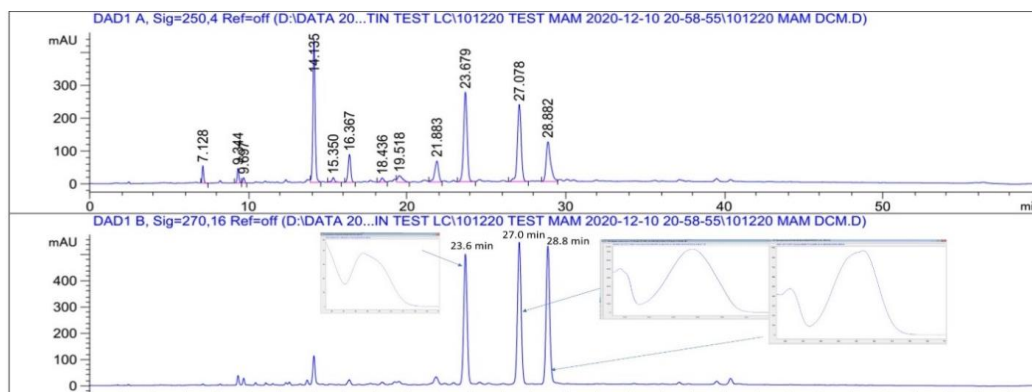


Hình 1. Sơ đồ tối ưu hóa quy trình chiết nhóm phenolic

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

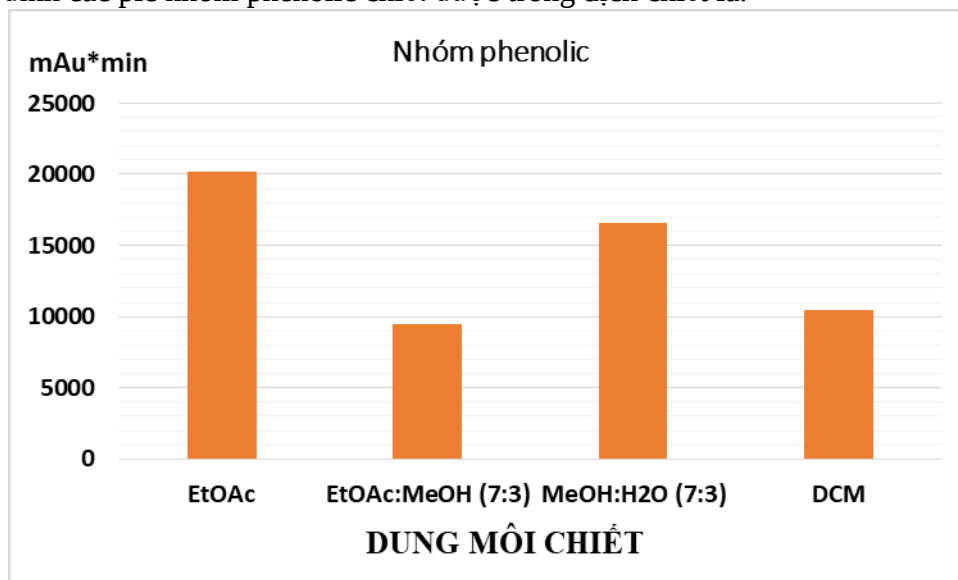
Qua tham khảo một số tài liệu có liên quan về việc tách và định lượng các acid phenolic, nhận thấy có sự tương đồng giữa các nghiên cứu về hệ thống sắc ký, đầu dò, loại pha tĩnh và nhiệt độ cột, đồng thời cần nhắc đến nền mẫu phức tạp là lá cây, nghiên cứu tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký tối ưu dựa trên việc thăm dò các yếu tố quan trọng: thành phần và tỉ lệ pha động. Do việc định lượng nhiều hoạt chất trên nền mẫu phức tạp do đó chương trình rửa giải gradient được ưu tiên lựa chọn khảo sát thay vì chương trình rửa giải isocratic như các nghiên cứu định lượng trên tân dược.

Thành phần pha động được lựa chọn dựa trên cấu trúc hóa học của các chất trong nghiên cứu và các tài liệu đã tham khảo: A: MeOH; B: 0.2% amonium acetate 0.1% acid formic/nước, C: MeCN 0,1% acid formic. Hình 2 minh họa sắc ký đồ dịch chiết DCM của lá cây mãm với hệ pha động trên.



Hình 2. Sắc ký đồ dịch chiết DCM của lá cây mãm

Theo lý thuyết về phổ UV của các acid phenolic được phát triển bởi Campos và Markham (2007) [12], trên cơ sở số dải hấp thụ, cường độ, hình dạng dải cũng như số lượng, vị trí của các đỉnh hấp phụ, có thể đánh giá sơ bộ các hợp chất xuất hiện trong dịch chiết lá cây mấm ổi thuộc nhóm phenolic. Hiệu suất chiết được đánh giá thông qua tổng diện tích đỉnh các pic nhóm phenolic chiết được trong dịch chiết lá.



Hình 3: Đồ thị biểu diễn kết quả khảo sát dung môi chiết

3.2. Kết quả sơ bộ đánh giá khả năng kháng oxy hóa in-vitro của dịch chiết lá cây mấm

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng kháng oxy hóa in-vitro của dịch chiết lá cây mấm ở các nồng độ khác nhau

Mật độ quang (OD) \ Nồng độ cao chiết (µg/mL)					
	10	20	50	80	100
EtOAc:MeOH (7:3)	1,279	1,699	1,365	1,630	1,838
EtOAc	1,412	1,598	1,733	1,961	2,096
MeOH:H ₂ O (7:3)	1,060	1,198	1,329	1,548	1,750
DCM	1,527	1,495	1,758	2,189	2,352

Nhận xét: Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết lá mấm ổi ở các dung môi khảo sát dựa vào phương pháp đánh giá khả năng khử FRAP [6]. Nguyên tắc của phương pháp này dựa trên việc giảm phức hợp ferric-tripyridyltriazine, đo độ hấp thụ ở bước sóng 593nm, giá trị mật độ quang OD phản ánh khả năng khử của mẫu. Giá trị mật độ quang OD càng cao chứng tỏ năng lực khử của mẫu càng cao.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Kết quả khảo sát quy trình chiết

Cây mấm ổi đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu chiết xuất ra các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, được sử dụng trong điều trị bệnh, nhiều hợp chất hữu cơ quan trọng từ cây mấm như: phenolic, flavonoid, steroid, terpenoid, iridoid, ...[7]. Trong

đó, những hợp chất phenolic đóng một vai trò không nhỏ trong việc thể hiện tính kháng oxy hóa ở thực vật, đặc biệt là những thực vật được dùng làm thuốc hoặc làm thực phẩm. Đối với cơ thể người, các hợp chất này còn có khả năng chống lại các gốc tự do, hạn chế sự lão hóa và tổn thương của tế bào. Kết quả khảo sát cho thấy, hàm lượng phenolic trong dịch chiết EtOAc > MeOH:H₂O (7:3) > EtOAc:MeOH (7:3) > DCM. Đáng chú ý là hàm lượng phenolic trong dịch chiết EtOAc cao gần gấp 2 lần so với dịch chiết lá trong DCM. Cho thấy sơ bộ dịch chiết EtOAc có hiệu suất cao khi chiết nhóm phenolic trong lá cây mắm ôi. Kết quả tương đồng với nghiên cứu của Cheng Huang và cộng sự (2015) cho thấy dịch chiết EtOAc của lá cây mắm ôi có hàm lượng phenolic tổng cao nhất trong các dịch chiết (nước, ethanol, methanol, EtOAc) [9].

4.2. Kết quả sơ bộ đánh giá khả năng kháng oxy hóa *in-vitro* của dịch chiết lá cây mắm

Kết quả khảo sát cho thấy, năng lực khử của dịch chiết lá mắm ôi trong dung môi DCM > EtOAc > EtOAc:MeOH (7:3) > MeOH:H₂O (7:3). Giá trị mật độ quang OD của dịch chiết dung môi EtOAc và DCM cao hơn hẳn so với hai dung môi còn lại. Cho thấy sơ bộ đánh giá khả năng oxy hóa của hai dịch chiết này cao hơn các dịch chiết khảo sát. Từ đó sơ bộ kết luận có mối liên quan giữa tác dụng kháng oxy invitro và hàm lượng chất chiết được trong dịch chiết EtOAc của lá cây mắm ôi. Kết quả nghiên cứu có sự khác biệt với nghiên cứu của Nymathullah Sharief Md và cộng sự (2014) về khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết lá cây mắm ôi ở Andhra Pradesh, Ấn Độ, dịch chiết Methanol có kết quả cao nhất khi khảo sát cùng các dịch chiết EtOAc, acetone, ethanol [11]. Điều này chứng minh được rằng sự khác biệt về phân bố địa lý có ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất kháng oxy hóa chứa trong cây mắm ôi. Bên cạnh đó, sự khác nhau về phương pháp chiết, thời gian chiết và thể tích dung môi/lượng được liệu cũng dẫn đến sự khác biệt về hàm lượng hợp chất chiết.

V. KẾT LUẬN

Hàm lượng nhóm phenolic trong dịch chiết EtOAc cao nhất trong các dịch chiết khảo sát. Kết quả này tương đồng với kết quả đánh giá invitro khả năng kháng oxy hóa của các dịch chiết. Từ đó sơ bộ kết luận mối liên quan giữa tác dụng kháng oxy invitro và hàm lượng chất chiết được trong dịch chiết EtOAc của lá cây mắm ôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thanh Phước, Lê Hương Nhi (2013), “Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học các chất trong cao petroleum ether và thành phần dinh dưỡng của lá cây mắm ôi (*Avicennia marina*)” Khoa học & Bản tin. Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường, số 25 tr 22-26.
2. Phạm Thị Thùy Trang, Lê Thanh Phước (2010), “Khảo sát thành phần hóa học của rễ cây mắm (*Avicennia marina*)”, Tạp chí Khoa học 2010:15b, tr 9-14.
3. Arumugam, S., Bandil, K., Proksch, P., Murugiyana, K., Bharadwaj, M., (2017), “Effects of *A. marina*-derived isoquercitrin on TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor (TRAIL-R) expression and apoptosis induction in cervical cancer cells”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 182 (2), 697–707.
4. Anam, Khairul & Susilo, Dwi & Kusriani, Dewi & Aminin, Agustina. (2016), “Chemical Constituents and Inhibition Xanthine Oxidase Activity of *Avicennia marina* Exudate”. *Research Journal of Medicinal Plants.* 11. 19-24. 10.3923/rjmp.2017.19.24.
5. Behbahani, Mandana & Zadeh, Mehrnaz & Kar, Hassan. (2013). “Evaluation of Antiherpetic Activity of Crude Extract and Fractions of *Avicennia marina*, in vitro”. *Antiviral research.* 97. 10.1016/j.antiviral.2013.01.001.

6. Benzie, I., Strain, J., (1996), “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*. 239(1): pp 70-76.
7. Dhayanithi, Nagarajan Balachandran and *et al.* (2015), “Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract on immune protection and disease resistance in *Amphiprion sebae* against *Vibrio alginolyticus*.” *Fish & shellfish immunology* vol. 45,1, pp 52-58.
8. Feng Zhu, Xin Chen, Yihua Yuan, Meizhen Huang, Huili Sun, Wenzhou Xiang (2009), “The Chemical Investigations of the Mangrove Plant *Avicennia marina* and its Endophytes! TI2” - *The Open Natural Products Journal*.
9. Huang, Cheng and *et al.* (2016), “Polyphenol-rich *Avicennia marina* leaf extracts induce apoptosis in human breast and liver cancer cells and in a nude mouse xenograft model.” *Oncotarget* vol. 7,24: 35874-35893.doi:10.18632/oncotarget. 8624
10. Jia, R.; Guo, Y. W.; Hou, H. X. (2004), “Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina*”. *Chin. J. Nat. Med.*, 2, 16-19.
11. Nymathullah Sharief Md.1 and Uma Maheswara Rao (2014), “Antibacterial and antioxidant activity of *Avicennia marina* Leaf”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(10), pp 252-256.
12. Campos MG and Markham KR (2007), *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids*, Coimbra University Press, Coimbra, Portugal, pp. 11 – 29.

(Ngày nhận bài: 25/11/2020 - Ngày duyệt đăng: 28/12/2020)
