

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT FLAVONOID TỪ LÁ CỦA CÂY ĐƠN LÁ ĐỎ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour)

TRỊNH NGỌC NAM¹, NGUYỄN VĂN DŨNG¹, DƯƠNG QUỐC CƯỜNG^{1,2*}

¹*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại Học Công Nghiệp thành phố Hồ Chí Minh*

²*Khoa Sinh học- Công nghệ Sinh học, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG Tp.HCM*

Tác giả liên hệ*: duongquoccuong09cdsh@gmail.com

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v65i05.4961>

Tóm tắt: Lá của cây đơn lá đỏ có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như flavonoid, tannin, saponin, coumarin, phytosterol, đường tự do... Trong đó, flavonoid giữ vai trò bảo vệ tế bào, chống oxy hóa và có kháng khuẩn.... Mục tiêu là khảo sát phương pháp ngâm dầm và phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm, với các điều kiện như dung môi chiết (nước, ethanol, methanol), nhiệt độ, thời gian siêu âm để thu nhận flavonoid hiệu quả. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết. Kết quả, phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm cho hiệu quả thu nhận flavonoid cao nhất với thời gian ngâm dầm là 15 giờ, thời gian siêu âm là 20 phút, nhiệt độ là 60°C. Phân tích dịch chiết flavonoid bằng HPLC/MS có 14 peak, phân tích khối phổ ESI-Micro TOF-Q đã xác định được 3 chất là kaempferol 7-o-glucosid, kaempferol và acid palmitic. Định lượng kaempferol trong mẫu dựa trên chất chuẩn kaempferol (Sigma-Aldrich) bằng phương pháp HPLC/UV và hàm lượng kaempferol trong mẫu là 680,5 µg/g. Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết flavonoid từ lá cây đơn lá đỏ tương đối cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của cây đơn lá đỏ trong dược liệu và thực phẩm chức năng.

Từ khóa. Flavonoid; kaempferol; kháng oxy hóa; kháng khuẩn; sóng siêu âm.

I. GIỚI THIỆU

Cây đơn lá đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour hay *Excoecaria cochinchinensis* Lour) có tên thường gọi là đơn mặt trời, đơn đỏ, đơn tướng quân... [1, 2]. Cây mọc nhiều nơi như Long An, Tiền Giang, Hậu Giang, Đồng Tháp, Đồng Nai... và trồng ở làng hoa Ngọc Hà (Hà Nội) để làm thuốc. Ngoài ra, cây trồng nhiều ở Quảng Tây, Văn Nam (Trung Quốc) [1]. Trong nhân gian cây đơn lá đỏ dùng làm thuốc chữa mẩn ngứa, mụn nhọt, tiêu chảy lâu ngày không khỏi, lỵ, tiêu ra máu... [1].

Một số cây thuốc trong dân gian được nhiều người quan tâm đến vì là nguồn tài nguyên có giá trị trong phòng và chữa bệnh. Các loài cây thuốc Việt Nam chiếm khoảng 11% trong số 35000 loài cây thuốc được biết đến trên toàn thế giới [3]. Theo Nguyễn Duy Thuần ở Việt Nam, nhu cầu sử dụng dược liệu rất lớn khoảng 50000 tấn/năm và thuốc y học cổ truyền chiếm 27% [4]. Trung Quốc hàng năm sử dụng 700000 tấn dược liệu, tách chiết các hoạt chất để sản xuất khoảng 7000 mặt hàng, đạt doanh thu trên 18 tỉ USD. Ấn Độ buôn bán dược liệu để tách chiết các hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc đạt khoảng 60 tỉ Rupee một năm, cung cấp 12% nhu cầu dược liệu cho thế giới [4].

Flavonoid còn có những tác dụng khác như chống dị ứng, chống co giật, giảm đau, nghẽn mạch, nghẽn phế quản, lợi mật, diệt nấm [5-7]. Flavonoid là những chất ngăn chặn quá trình oxy hóa do các gốc tự do, có thể là nguyên nhân làm cho tế bào hoạt động khác thường. Các gốc tự do sinh ra trong quá trình trao đổi chất thường là các gốc tự do như OH•, ROO• (là các yếu tố gây biến dị, huỷ hoại tế bào, ung thư, tăng nhanh sự lão hoá) [8, 9]. Dẫn xuất flavonoid với hoạt tính gây độc tế bào ung thư Hela tương đối mạnh [10]. Kaempferol có khả năng bắt các gốc tự do như HO, ROO, tăng tuần hoàn máu trong động mạch, tĩnh mạch và mao mạch, chống viêm, chống dị, ức chế sự hình thành và phát triển khối u trên da chuột [9, 11]. Nguyễn Thái An và cộng sự (2002) đã chiết tách và phân lập được 2 acid polyphenol là acid gallic và acid ellagic, 2 flavonoid là kaempferol 7-o-glucosid và kaempferol từ lá khô của cây đơn lá đỏ [12]. Nguyễn Viết Tự và cộng sự (2003) đã phân tích hợp chất phenolic từ đơn lá đỏ [13]. Thái Nguyễn Hùng Thu và cộng sự (2010) đã nghiên cứu chiết xuất tinh chế kaempferol từ đơn lá đỏ bằng phương pháp chiết nóng và chiết lạnh với dung môi ethanol ở 3 nồng độ (500, 700 và 900) khác nhau [14]. Nguyễn Tường Vân (2019) đã nghiên cứu quy trình phân lập kaempferol và xác định hàm lượng kaempferol trong các chế phẩm từ Bạch quả [15].

Lai Hop Hieu và cộng sự (2019) đã xác định Rhamnofolane và một dẫn xuất phenolic mới, cùng với mười một hợp chất, được phân lập từ lá của *E. cochinchinensis* Lour [16]. Honghui Luo và cộng sự (2019) đã nghiên cứu các chất chuyển hóa phenolic có thể ảnh hưởng đến sự ổn định và thoái hóa sắc tố ở *Excoecaria cochinchinensis* thông qua so sánh với *Osmanthus fragrans* [17]. Nguyễn Phú Hùng và cộng sự (2020) đã nghiên cứu nghiên cứu dịch chiết từ ethanol của lá cây đơn lá đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) để ức chế di chuyển và chu kỳ phân chia của tế bào ung thư MKN45 [18]. Tuy nhiên, nhìn chung các nghiên cứu về cây đơn lá đỏ để thu nhận flavonoid và kaempferol còn ít hơn so với các cây dược liệu khác, người dân trồng chủ yếu để làm cảnh chứ chưa biết được trong lá đơn lá đỏ có nhiều chất có giá trị về y học. Với mong muốn tìm hiểu một phần về cây đơn lá đỏ, nhất là các thành phần có trong lá như flavonoid. Nên trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ tiến hành tách chiết flavonoid từ lá khô bằng hai phương pháp là ngâm dầm và ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm. Từ đó, có thể chọn được một phương pháp hiệu quả để thu nhận flavonoid. Phân tích vài hợp chất trong dịch chiết bằng HPLC/MS và khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm *Candida*.

2. VẬT LIỆU-PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Lá cây đơn lá đỏ được trồng tại vườn nhà huyện Xuân Lộc, Tỉnh Đồng Nai. Lá tươi được rửa sạch và sấy khô ở 60°C cho đến khi đạt độ ẩm $\leq 13\%$, nghiền thành bột có kích thước < 0.8 mm (ray qua sàng có kích thước 0,8 mm). Bột lá được đóng gói chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. Khảo sát dung môi và thời gian tách chiết flavonoid thô bằng phương pháp ngâm dầm

Lấy 10 gram bột lá khô hòa tan vào dung môi khảo sát như nước, ethanol 96⁰ và Methanol trong thời gian ngâm dầm là 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ. Lọc và thu dịch, cô cạn dịch chiết bằng cô quay chân không. Chiết flavonoid theo quy trình Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) [6]. Hòa tan cao chiết với dung môi etyl acetat, chiết lỏng-lỏng với dung dịch kiềm Na₂CO₃ 10%. Thu pha nước kiềm và acid hóa bằng H₂SO₄ 2%. Thực hiện chiết lỏng-lỏng với etyl acetat. Thu pha hữu cơ, loại pha nước và đuổi dung môi thu được cao thô chứa flavonoid toàn phần. Hàm lượng flavonoid xác định bằng UV-Vis.

2.3. Khảo sát điều kiện tách chiết flavonoid bằng phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm

Phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm: 10 gram bột lá hòa tan trong dung môi MeOH trong khoảng thời gian siêu âm là 15 phút và nhiệt độ 40°C (khảo sát 1 yếu tố và cố định các yếu tố còn lại). Khảo sát thời gian ngâm dầm là 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 15 giờ và 18 giờ. Khảo sát thời gian thực hiện sóng siêu âm là 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 30 phút. Khảo sát nhiệt độ siêu âm từ 30°C đến 80°C (cách nhau 10°C). Thu dịch lọc, cô cạn bằng máy cô quay chân không. Tiếp tục chiết flavonoid theo quy trình Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) [6] (tương ứng mục 2.2). Hàm lượng flavonoid xác định bằng UV-Vis.

2.4. Định tính flavonoid trong dịch chiết

Các phương pháp định tính flavonoid được thực hiện theo Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) và Trần Hùng (2004) [6, 19].

Bảng 1: Phương pháp định tính flavonoid

Phản ứng định tính	Kết quả phản ứng
Phản ứng Cyanidin của Wilstatter	Nếu dịch chiết có chứa flavonoid cho màu đỏ đậm, flavonol và flavanon cho màu hồng nhạt hoặc không màu.
1% NaOH/ethanol	Flavon, isoflavon, isoflavanon, flavanon, chalcon. Leucoantocyanidin sẽ có màu vàng. Flavonol cho màu từ vàng đỏ đến vàng cam. Auron cho màu đỏ đến tím.
Tác dụng với H ₂ SO ₄ đậm đặc	Flavon và flavonol cho màu vàng đậm đến vàng cam và có phát huỳnh quang đặc biệt. Chalcon, auron cho màu đỏ hoặc màu xanh. Flavanon cho từ màu cam đến đỏ.
Phản ứng kiềm loãng	Kết quả flavonoid có màu vàng sáng.
Tác dụng FeCl ₃	Tạo phức màu xanh hay xanh đen.

2.5. Phân tích bằng HPLC và ESI-Micro TOF-Q

Chuẩn bị mẫu: Cân chính xác 0,1 g cao chiết và hòa tan trong 1,0 ml methanol. Lọc qua syring (0,22 µm) và đem phân tích định tính bằng ESI-Micro TOF-Q và định lượng bằng HPLC.

Định lượng dùng phương pháp HPLC/UV pha đảo đảo [14]: Cột sắc ký là C18.

Hệ dung môi chạy phân tích là pha động đệm phosphate 10 mM với pH là 2,5, acetonitril (60:40). Tốc độ dòng là 1,2 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu là 50 µl. Thời gian chạy sắc ký là 30 phút.

Xây dựng đường chuẩn kaempferol bằng HPLC/UV: Kaempferol của hãng Sigma-Aldrich (độ tinh khiết 94,4%) được hòa tan trong methanol để được nồng độ từ 2,5 ppm đến 10 ppm.

Hàm lượng kaempferol trong mẫu dựa theo diện tích peak kaempferol trong cao chiết và tương ứng với đường kaempferol chuẩn.

Định tính bằng phân tích khối phổ ESI-Micro TOF-Q: Cột sắc ký C18; tốc độ dòng 0,3 ml/phút; thể tích tiêm mẫu là 1,0 µl; nhiệt độ buồng cột: 35°C. Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI; loại ion dương; nhiệt độ nguồn ion hóa là 300°C.

2.6. Hoạt tính kháng oxy hóa

Pha loãng flavonoid đạt nồng độ 25 µg/ml, 50 µg/ml 75 µg/ml và 100 µg/ml. Cho 1 ml mẫu và 1,5 ml DPPH (20 µg/ml), lắc đều và ủ tối 30 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Vitamin C được sử dụng làm chứng dương và dung môi pha loãng làm đối chứng âm. Dựng đồ thị biểu thị tương quan giữa mật độ quang OD_{517 nm} và nồng độ của chất khảo sát, đồ thị dạng $y = ax + b$ với y là mật độ quang, x là nồng độ mẫu. Tính giá trị IC₅₀ theo từng mẫu và so sánh chúng với nhau [20, 21].

2.7. Hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch: Hòa tan flavonoid trong 10% DMSO để đạt nồng độ 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml. Đối chứng âm là 10% DMSO. Đối chứng dương là kháng sinh tetracyclin (10 mg/ml). Dịch vi khuẩn được pha loãng trong nước muối sinh lý ($\geq 0,5$ Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL)) và trải đều trên môi trường LB agar. Hút 50 µl dung dịch thử nghiệm cho vào các lỗ thạch (đường kính 5 mm). Các thao tác phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Ủ các đĩa Petri trong 24 giờ (37°C). Quan sát kết quả dựa vào vòng kháng khuẩn. Chủng vi khuẩn nghiên cứu là *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm *Candida*. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần [20, 22].

2.8. Xác định hàm lượng flaovonoid

Hàm lượng flavonoid được tính theo (Arvouet, A., B. Vennat, A. Pourrat and Legret, 1994) [23].

$$Q (\%) = \frac{At \cdot Cc \cdot k}{Ac \cdot a \cdot 100(100 - h)}$$

Trong đó: Ac: là độ hấp thụ dung dịch chuẩn, At: độ hấp thụ của dịch thử, Cc: Nồng độ (µg/ml) dung dịch chuẩn, a: khối lượng được liệu (µg), h: hàm ẩm được liệu, k: độ pha loãng mẫu thử.

Hàm lượng flavonoid toàn phần (F%) trong được liệu được tính bằng công thức:

$$F (\%) = Q (\%) \times 2,51$$

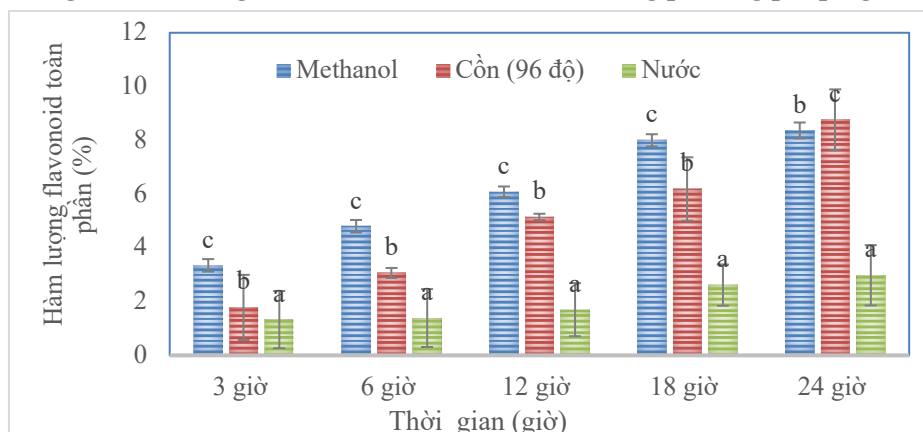
Trong đó: 2,51: Hệ số chuyển đổi từ flavonol sang flavonol glycoside (flavonoid)

2.9. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình. Các số liệu được xử lý và xác định ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2015 và phần mềm. Statgraphics (Statistics graphics system). Phân tích ANOVA có sự khác biệt và có ý nghĩa (Probability = 0,05).

3. KẾT QUẢ

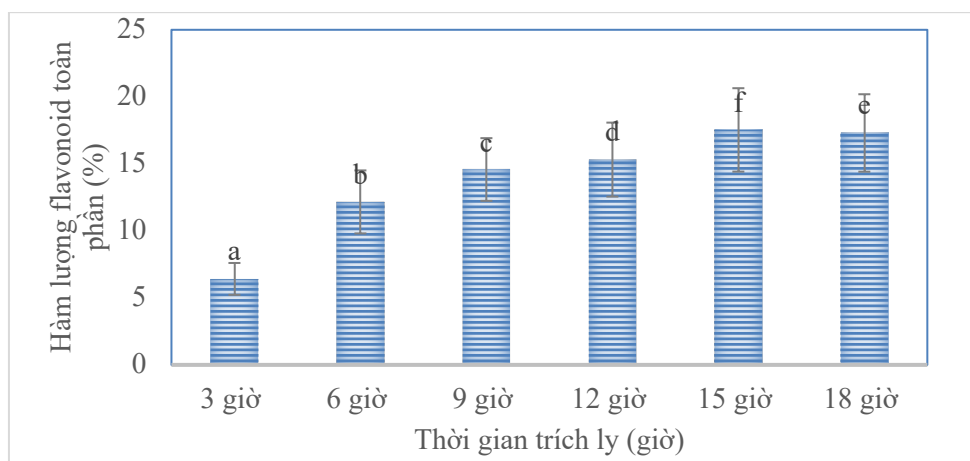
3.1. Kết quả dung môi và thời gian tách chiết flavonoid thô bằng phương pháp ngâm dầm



Hình 1: Hàm lượng flavonoid tương ứng với ba dung môi. Biểu đồ là giá trị trung bình (\pm SE) của ba lần lặp lại ($n = 3$) và tuân theo one-way ANOVA. Các ký tự khác nhau thể hiện sự thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$).

Kết quả (Hình 1) cho thấy dung môi nước cho hàm lượng flavonoid toàn phần (%) thấp nhất trong 2 dung môi còn lại là methanol và ethanol 96⁰. Vì vậy không dùng dung môi nước để chiết flavonoid. Với ethanol 96⁰ và methanol thì methanol cho kết quả flavonoid toàn phần trung bình cao nhất. Cả 3 dung môi cho kết quả tách chiết flavonoid với thời gian ngâm dầm 24 giờ là cao nhất. Nếu dùng ethanol 96⁰ và nước để chiết thì thời gian 24 là hiệu quả nhất để thu nhận flavonoid. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi chọn dung môi methanol tại thời gian là 18 giờ vì kết quả hàm lượng flavonoid toàn phần giữa 18 giờ và 24 giờ chiết từ dung môi methanol chênh lệch rất ít và không đáng kể vì vậy chọn 18 giờ giúp rút ngắn thời gian trích ly và thu nhận hàm lượng flavonoid hiệu quả.

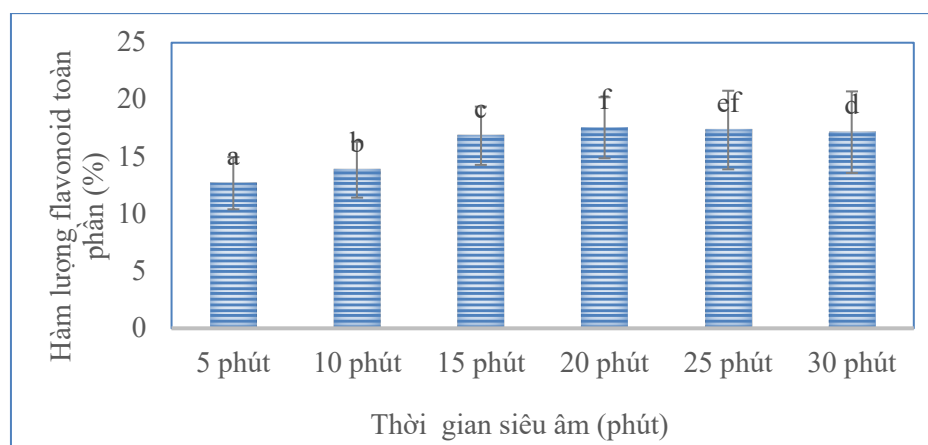
3.2. Kết quả thời gian trích ly flavonoid bằng phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm



Hình 2: Hàm lượng flavonoid tương ứng thời gian trích ly. Các biểu đồ là giá trị trung bình (\pm SE) của ba lần lặp lại ($n = 3$) và tuân theo one-way ANOVA. Các ký tự khác nhau thể hiện sự thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$).

Kết quả (Hình 2) cho thấy 15 giờ và 18 giờ cho hàm lượng flavonoid toàn phần lần lượt là 17,531% và 17,302% cao nhất trong khoảng thời gian còn lại. Do đó chúng tôi chọn thời gian trích ly siêu âm là 15 giờ là nghiệm thức tốt nhất cho thí nghiệm này vì rút ngắn thời gian trích ly và hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất.

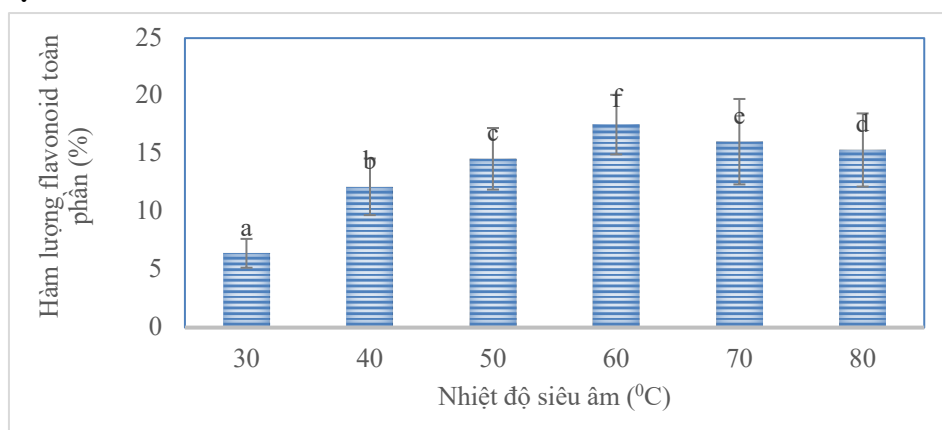
3.3. Thời gian siêu âm



Hình 3: Hàm lượng flavonoid tương ứng với thời gian siêu âm. Biểu đồ là giá trị trung bình (\pm SE) của ba lần lặp lại ($n = 3$) và tuân theo one-way ANOVA. Các ký tự khác nhau thể hiện sự thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$).

Khoảng thời gian 5 phút đến 20 phút thì hàm lượng flavonoid toàn phần (%) thu được tăng đều và nhanh từ 12,703% đến 17,551%. Nhưng sau đó hàm lượng flavonoid toàn phần giảm nhẹ ở 25 phút là 17,357%, 30 phút là 17,169%. Theo kết quả (Hình 3) cho thấy rằng thời gian siêu âm 20 phút là cần thiết để tách chiết flavonoid. Trong khoảng thời gian 25 phút và 30 phút cho thấy hàm lượng flavonoid toàn phần (%) không tăng mà có xu hướng giảm nhẹ. Có thể giải thích là do siêu âm có khả năng làm tăng tốc độ phá vỡ thành tế bào và mô thực vật cũng như tốc độ truyền khối vì vậy thời gian xử lý siêu âm càng kéo dài sẽ càng tăng lượng các hợp chất cao phân tử được giải phóng ra từ đó có thể gây tắc các kênh dẫn dịch chiết trong khối nguyên liệu [24]. Đó là nguyên nhân làm hàm lượng flavonoid toàn phần (%) trong dịch chiết giảm nhẹ khi tăng thời gian xử lý từ 25 đến 30 phút.

3.4. Nhiệt độ siêu âm



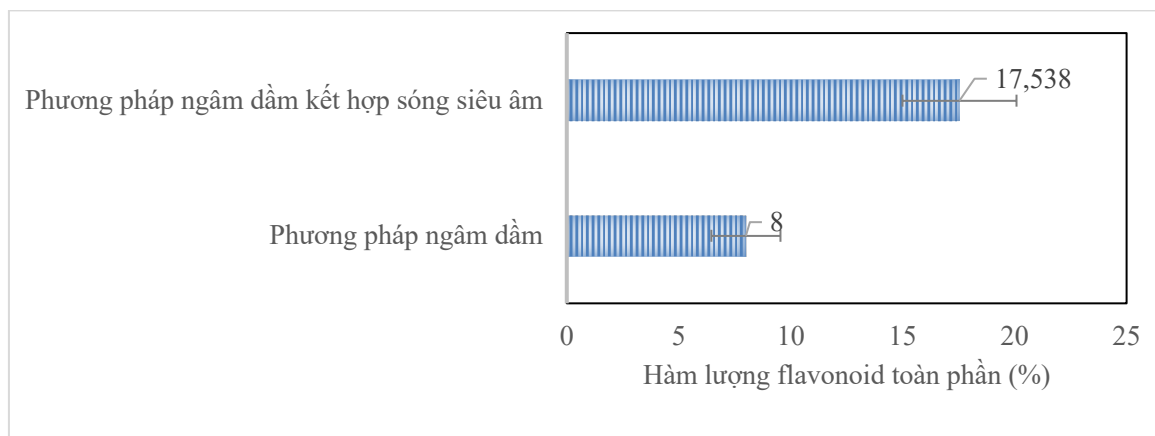
Hình 4: Hàm lượng flavonoid tương ứng với nhiệt độ siêu âm. Biểu đồ là giá trị trung bình (\pm SE) của ba lần lặp lại ($n = 3$) và tuân theo one-way ANOVA. Các ký tự khác nhau thể hiện sự thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$).

Kết quả (Hình 4) cho thấy khi tăng nhiệt độ siêu âm thì hàm lượng flavonoid toàn phần (%) trong dịch chiết tăng. Tại 60°C thì hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất 17,530%, nhiệt độ 70°C, 80°C thì hàm lượng flavonoid toàn phần giảm dần. Khi tăng nhiệt độ thì tốc độ truyền khối tăng, độ hòa tan trong dung môi cũng tăng và độ nhớt dung môi giảm. Khi nhiệt độ tăng quá cao, thì số lượng bong bóng được tạo ra từ siêu âm bị giảm nên kết quả trích ly không tăng. Hơn nữa, tăng nhiệt độ sẽ làm tăng chi phí năng lượng cho quá trình xử lý, đồng thời một số chất không bền với nhiệt sẽ bị phân hủy đem lại hiệu quả trích ly thấp [24]. Khi nhiệt độ tăng thì chuyển động các phân tử tăng, nên dung môi thẩm thấu nhanh vào bên trong tế bào màng làm tăng áp suất nội bào, đến một thời điểm nhất định làm cho thành tế bào vỡ ra từ đó làm thoát

các chất bên trong thành tế bào ra ngoài dung môi dẫn đến kết quả tách chiết flavonoid cao nhất. Từ kết quả trên chúng tôi chọn nhiệt độ siêu âm để trích ly flavonoid từ lá cây đơn lá đỏ là 60°C .

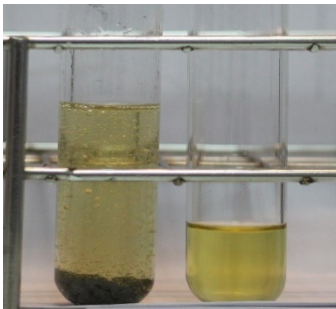
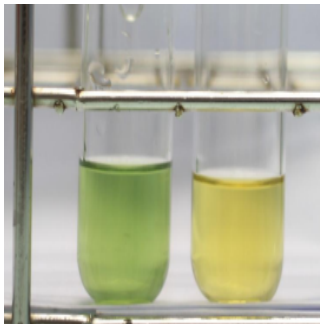
3.5. Hàm lượng flavonoid thu được từ hai phương pháp tách chiết

Trong quá trình khảo sát phương pháp ngâm dầm và phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm (Hình 5). Cả hai phương pháp đều được khảo sát với các điều kiện để tách chiết flavonoid tối ưu. Nhưng phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm đem lại hiệu quả tách chiết flavonoid cao nhất, giảm được thời gian và dung môi từ đó tăng năng suất chiết xuất. Phương pháp tách chiết flavonoid trong lá cây đơn lá đỏ là ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm với các điều kiện: Thời gian ngâm dầm 15 giờ, thời gian thực hiện sóng siêu âm 20 phút, nhiệt độ siêu âm 60°C , dung môi MeOH.



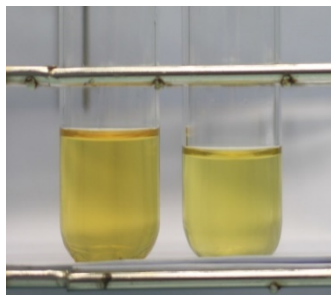
Hình 5: Hàm lượng flavonoid của hai phương pháp tách chiết. Các biểu đồ là giá trị trung bình (\pm SE) của ba lần lặp lại ($n = 3$) và tuân theo one-way ANOVA. Các ký tự khác nhau thể hiện sự thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$).

3.6. Định tính flavonoid

Phản ứng định tính	Kết quả phản ứng	Phản ứng định tính	Kết quả phản ứng
Phản ứng Cyanidin của Wilstatter: Flavonol và flavanon cho màu hồng nhạt hoặc không màu.		Tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc: Kết quả thay đổi từ màu vàng thành màu xanh	
	Thí nghiệm Đối chứng		Thí nghiệm Đối chứng

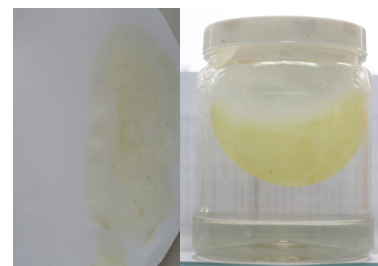
1% NaOH/ethanol:
Flavon, isoflavon,
isoflavanon, flavanon,
chalcon.

Leucoantocyanidin sẽ
có màu vàng. Flavonol
cho màu từ vàng đỏ
đến vàng cam.



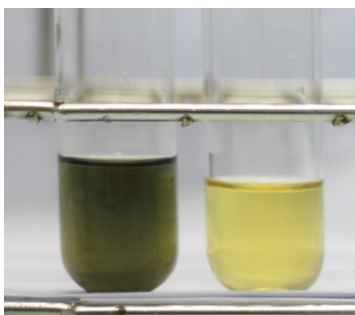
Thí nghiệm Đối chứng

Phản ứng kiềm
loãng: flavonoid
có màu vàng sáng.



Đối chứng Thí nghiệm

Tác dụng FeCl_3 : Tạo
phức màu xanh hay
xanh đen



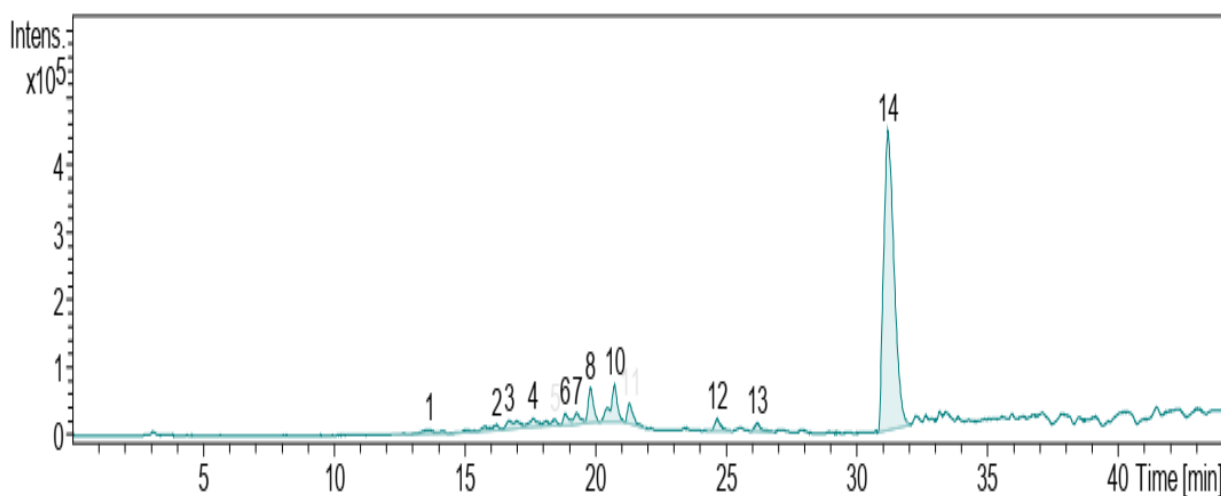
Thí nghiệm Đối chứng

Bảng 2: Kết quả định tính flavonoid từ lá cây đơn lá đỏ

Stt	Phản ứng định tính	Kết quả phản ứng
1	Phản ứng Cyanidin của Wiltatter	+
2	1% NaOH/ethanol	+
3	Tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc	+
4	Phản ứng kiềm loãng	+
5	Tác dụng FeCl_3	+

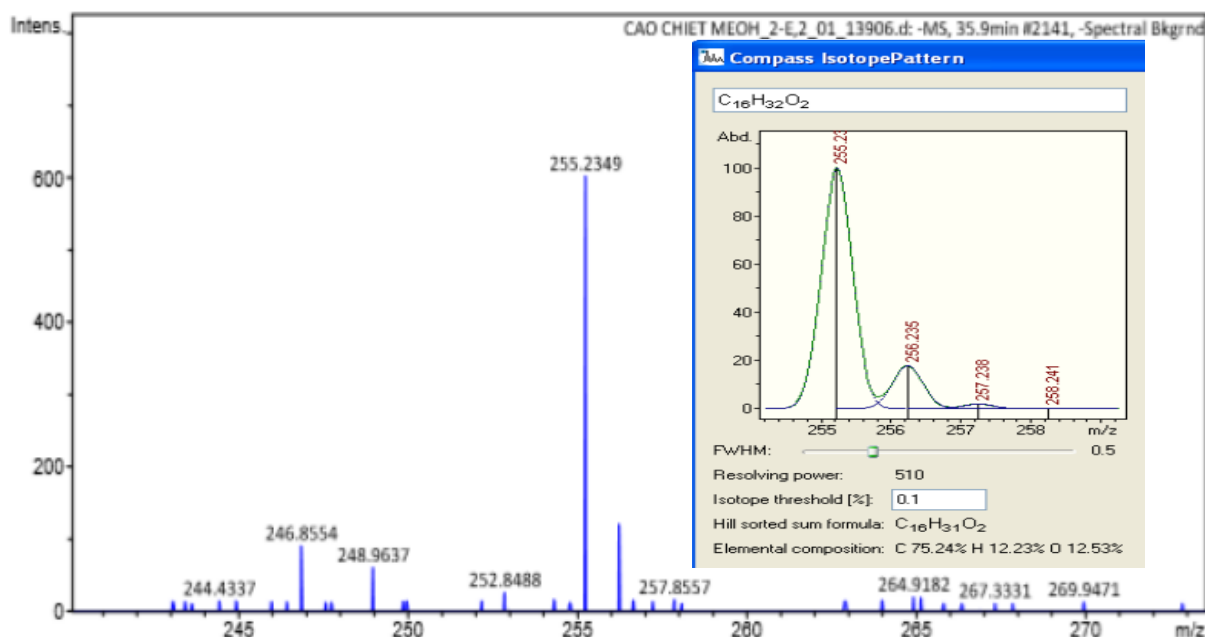
Ghi chú: (+) có, (-) không có

3.7. Kết quả phân tích bằng HPLC và ESI-Micro TOF-Q

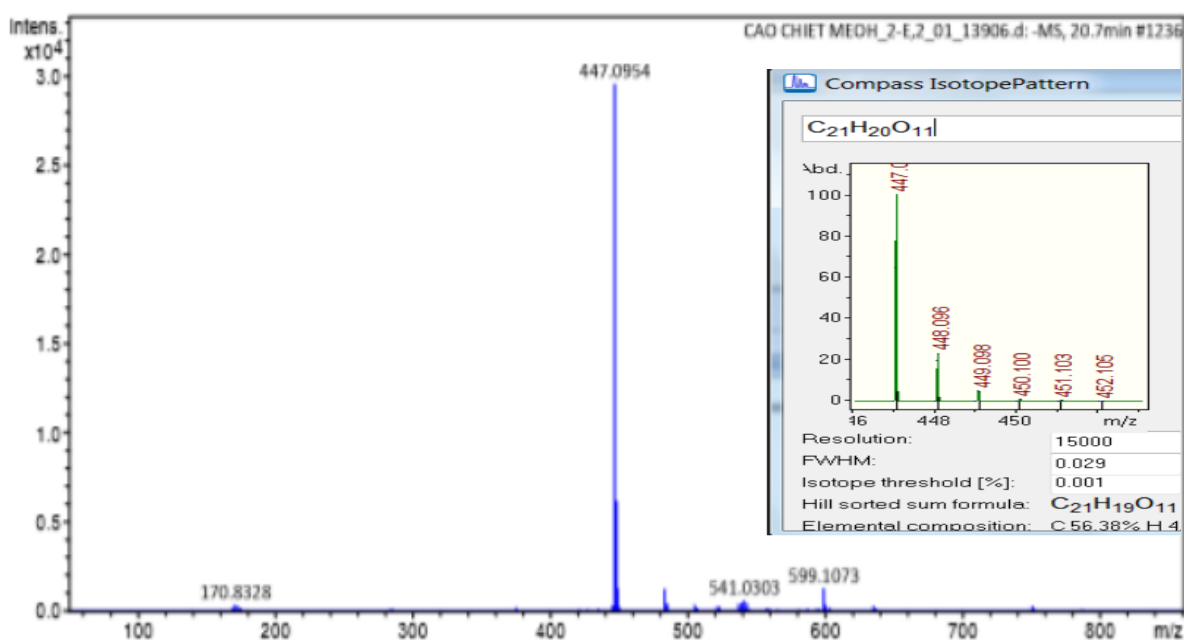


Hình 6: Một số peak trong mẫu phân tích

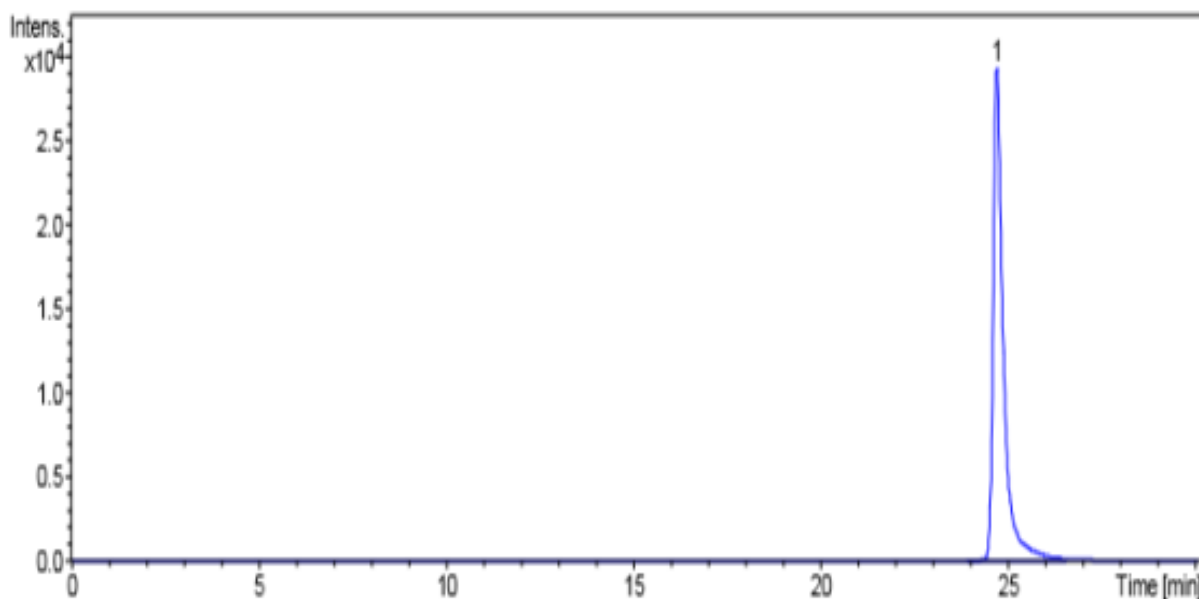
Kết quả phân tích khối phổ ESI-Micro TOF-Q (Hình 7 và Hình 8) đã xác định trong mẫu flavonoid thô có acid palmitic (tỷ lệ khối lượng trên điện tích là 255,2349) và kaempferol 7-o-glucosid (tỷ lệ khối lượng trên điện tích là 447,0954).



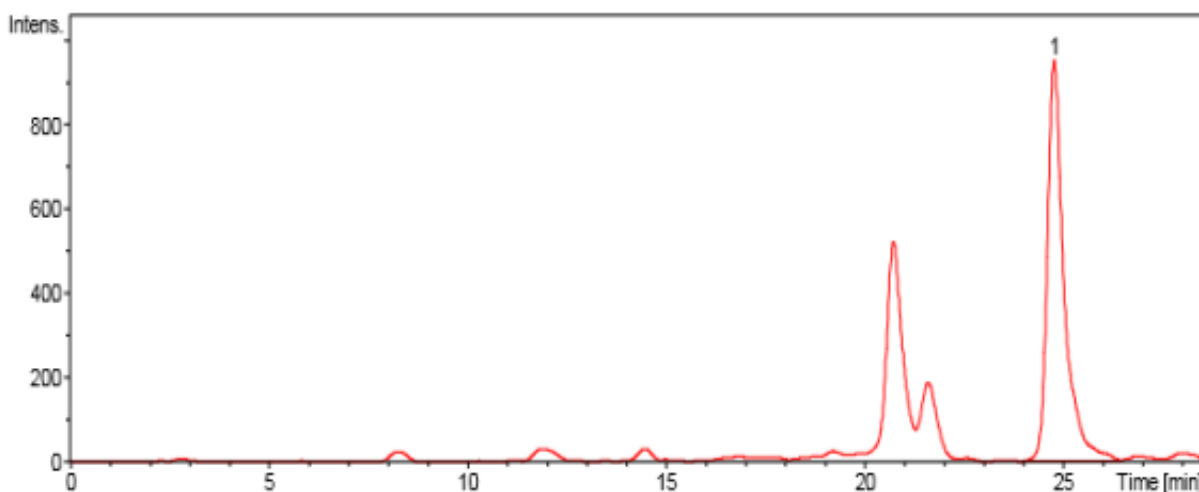
Hình 7: Phổ MS và m/z (tỷ lệ khối lượng trên điện tích) của acid palmitic



Hình 8: Phổ MS và m/z (tỷ lệ khối lượng trên điện tích) của kaempferol 7-o-glucosid



Hình 9: Sắc ký đồ kaempferol chuẩn phân tích bằng HPLC



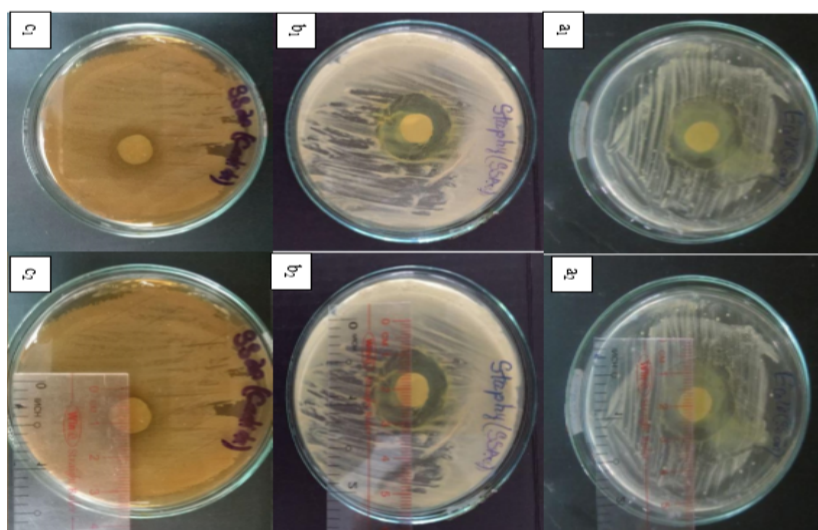
Hình 10: Sắc ký đồ mẫu cao chiết được phân tích bằng HPLC

Bảng 3: Hàm lượng kaempferol trong flavonoid thô

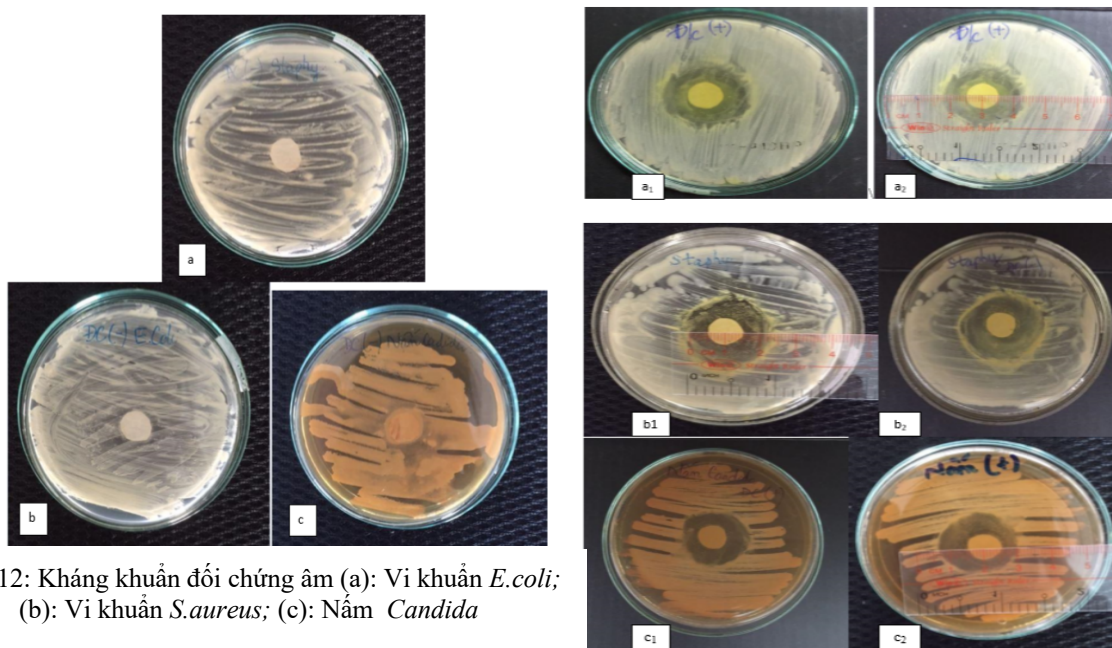
STT	Tên mẫu	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả	Phương pháp
01	Cao chiết lá đơn lá đỏ	Keampferol	µg/g	680,5	LC-UV

Kết quả sắc ký đồ (Hình 9 và Hình 10) cho thấy, thời gian lưu (Retention time) của chất chuẩn kaempferol tương ứng với thời gian lưu kaempferol trong cao chiết là ở phút thứ 24,7. Sắc ký đồ đã xác định được sự tồn tại của kaempferol trong lá của cây đơn lá đỏ và kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Thái nguyên Hùng Thu và cộng sự (2010) [9]. Kết quả định lượng kaempferol trong lá cây đơn lá đỏ bằng LC-MS là 680,5 µg/g. Kaempferol là chất có hoạt tính quan trọng nhất trong cây đơn lá đỏ vì kaempferol có khả năng dập tắt các gốc tự do HO, ROO, tăng tuần hoàn máu trong động mạch, tĩnh mạch và mao mạch, chống viêm, chống dị ứng, đặc biệt ức chế sự hình thành và phát triển khối u trên da chuột nhắt trắng gây ra bởi enzyme benzo-pyren, ức chế enzyme cyclooxygenase và quá trình hóa lipid [25, 26].

3.8. Kết quả kháng khuẩn và kháng oxi hóa của flavonoid toàn phần tách chiết từ lá cây đơn lá đỏ



Hình 11: Hoạt tính kháng khuẩn mẫu flavonoid toàn phần tách bằng dung môi MeOH kết hợp sóng siêu âm (a₁, a₂): Vi khuẩn *E.coli*; (b₁, b₂): Vi khuẩn *S.aureus*; (c₁, c₂): Nấm *Candida*



Hình 12: Kháng khuẩn đối chứng âm (a): Vi khuẩn *E.coli*; (b): Vi khuẩn *S.aureus*; (c): Nấm *Candida*

(a₁, a₂): Vi khuẩn *E.coli*; (b₁, b₂): Vi khuẩn *S.aureus*; (c₁, c₂): Nấm *Candida*

Bảng 4: Đường kính vòng kháng khuẩn mẫu flavonoid toàn phần tách bằng các dung môi

Vi sinh vật	ĐC (-) (DMSO)	ĐC (+) (Tetracyclin 10mg/ml)	Các dung môi chiết tách			
			Methanol kết hợp sóng siêu âm	Methanol	Ethanol 96 ⁰	Nước
<i>S.aureus</i> (+)	0	25 ± 0,23 ^a	23 ± 0,36 ^b	20 ± 0,24 ^c	17 ± 0,11 ^d	14 ± 0,15 ^e

<i>E. coli</i> (-)	0	26 ± 0,36 ^a	22 ± 0,32 ^b	20 ± 0,30 ^c	19 ± 0,20 ^d	16 ± 0,22 ^e
Nấm <i>Candida</i>	0	21 ± 0,17 ^a	16 ± 0,21 ^b	15 ± 0,19 ^c	14 ± 0,11 ^d	12 ± 0,15 ^e
Khả năng kháng khuẩn	-	+++	+++	++	++	+

Chú thích: (+++: kháng khuẩn mạnh; ++: kháng khuẩn trung bình; +: kháng khuẩn kém). ĐC (-): đối chứng âm. ĐC (+): đối chứng dương

Dịch chiết lá đơn lá đỏ chứa flavonoid đó là hợp chất chủ yếu quyết định khả năng kháng khuẩn của mẫu thử nghiệm. Kết quả (Bảng 4) cho thấy khả năng kháng khuẩn dịch chiết flavonoid thu nhận bằng methanol kết hợp sóng siêu âm tạo vòng kháng khuẩn mạnh nhất, tiếp đến là methanol, ethanol và thấp nhất là nước. Flavonoid ức chế enzyme và gắn lên màng bảo tương của vi khuẩn, làm thay đổi tính thấm chọn lọc của màng bảo tương. Vì vậy, làm một số chất cần thiết cho vi khuẩn lọt qua màng bảo tương và ra ngoài. Tác động lên quá trình tổng hợp protein và tác động DNA khuôn, ức chế tổng hợp RNA của vi khuẩn [27].

Bảng 5: Giá trị IC₅₀ của mẫu vitamin C và các mẫu

Vitamin C	Mẫu chiết nước	Giá trị IC ₅₀		
		Mẫu chiết ethanol 96 ⁰	Mẫu chiết methanol	Mẫu chiết methanol kết hợp sóng siêu âm
12,49	76,6	67,33	54,4	20,63

Giá trị IC₅₀ càng thấp thì khả năng kháng oxy hóa càng cao [20]. Flavonoid toàn phần tách bằng methanol kết hợp sóng siêu âm có IC₅₀ là 20.63 µg thấp nhất so với các dung môi còn lại (Bảng 5). Bên cạnh đó, khả năng ức chế 50% DPPH ở mẫu flavonoid toàn phần tách bằng methanol kết hợp sóng siêu âm cũng khá cao (bằng 60,54% so với IC₅₀ của vitamin C). Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc bổ sung các chất chống oxy hóa tự nhiên có nguồn gốc cây đơn lá đỏ thông qua con đường thực phẩm để chống lão hóa hoặc thay thế các chất chống oxy hóa nhân tạo trong bảo quản thực phẩm. Thái nguyên Hùng Thu và cộng sự (2010) đã phân lập được kaempferol trong cây đơn lá đỏ. Đó là hợp chất có khả năng kháng oxy hóa rất mạnh vì kaempferol có khả năng dập tắt các gốc tự do như HO, ROO [9]. Nguyễn Việt Tựu và cộng sự (2002) cũng phân tách được acid gallic, ethyl gallat và liquiritigenin [28], chúng có khả năng hấp thu các gốc tự do bằng cách nhường điện tử cho các gốc tự do làm chúng trở nên bền vững hơn hoặc có thể kết hợp với các ion kim loại để vô hiệu hóa hệ thống dẫn chuyển điện tử trong phản ứng oxy hóa.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được flavonoid trong lá cây đơn lá đỏ thông qua định tính bằng phản ứng Cyanidin, phản ứng với H₂SO₄, phản ứng với kiềm và tác dụng với FeCl₃ và định lượng kaempferol trong mẫu bằng HPLC/UV với chất chuẩn kaempferol (Sigma-Aldrich). Tách và thu nhận được flavonoid thô bằng phương pháp ngâm dầm và ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm (Nhiệt độ 60⁰C, thời gian trích ly 15 giờ, thời gian siêu âm 20 phút). Trong đó phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm là phương pháp hiệu quả để thu nhận flavonoid. Phân tích khối phổ ESI-Micro TOF-Q đã xác định được Kaempferol-7-o-glucoside và acid palmitic. Hàm lượng kaempferol trong mẫu cao chiết là 680,5 µg/g được định lượng bằng HPLC/UV. Khả năng bắt gốc tự do và kháng khuẩn tương đối cao so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Hồ, P.H., *Cây cỏ Việt Nam*. Vol. quyển 1. 2003: Nhà xuất bản trẻ. 288.
- [2]. Chi, V.V., *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. 1997: NXB Y Học.
- [3]. Huyền, Đ.N., L.X.Đ., Vũ Đình Duy, Phạm Mai Phương, *Đa dạng nguồn cây dược liệu khu di tích k9 - đá chông và vùng phụ cận*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới, 2020. **20**.
- [4]. Thuần, N.D., *Vài nét về thị trường dược liệu và triển vọng phát triển*. Hội nghị toàn quốc lần thứ 1, 2003: p. 257-257.

- [5]. Liệu, V.D., *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*,. Vol. 1. 2004: Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội. 818-819.
- [6]. Phụng, N.K.P., *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. 2007: Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. 73-78,91-98.
- [7]. Hòa, N.T.H & N.T.L.P., *Khảo sát điều kiện trích ly flavonoid từ lá diếp cá (Houttuynia Cordata)*. Tạp chí công thương, 2020. **18**: p. 18-21.
- [8]. Ban, Đ.D., *Các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học dùng làm thuốc chữa bệnh*. 2008: Nhà xuất bản Viện khoa học công nghệ Việt Nam, Hà Nội.
- [9]. Alam, W., et al., *Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: Current therapeutic standing*. Molecules, 2020. **25**(18): p. 4073.
- [10]. Thủy, B.P.T., P.V.T., et al., *Nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư của kaempferol-1, daidzin từ zingiber zerumbet sm và glucine max l sử dụng các tham số mô tả phân tử 2d và 3d* Tạp chí khoa học và công nghệ, Trường Đại học Khoa học, ĐH Huế, 2017. **10**(1).
- [11]. Bangar, S.P., et al., *Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: p. 1-25.
- [12]. An, N.T., P.X.S., *Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của lá Đơn Lá Đỏ*. Tạp chí dược liệu, 2002. **7**: p. 35-37.
- [13]. Tựu, T.V., N.M.Đ., *Hợp chất phenolic từ đơn lá đỏ*. Tạp chí Dược liệu, 2003. **8**(1): p. 16-18.
- [14]. Thu, T.N.H., N.T.A., et al., *Nghiên cứu chiết xuất tinh chế kaempferol từ đơn lá đỏ để làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm*. Tạp chí dược liệu, 2010. **408**.
- [15]. Vân, N.T., *Nghiên cứu quy trình phân lập kaempferol và xác định hàm lượng kaempferol trong các chế phẩm từ Bạch quả* Tạp chí Khoa học & Công nghệ, 2019. **7**.
- [16]. Hieu, L.H., et al., *Metabolites from Excoecaria cochinchinensis Lour*. Phytochemistry Letters, 2020. **37**: p. 116-120.
- [17]. Luo, H., et al., *In planta high levels of hydrolysable tannins inhibit peroxidase mediated anthocyanin degradation and maintain abaxially red leaves of Excoecaria Cochinchinensis*. BMC plant biology, 2019. **19**(1): p. 1-20.
- [18]. Nguyễn, P.H. and t.t.h. lê, *dịch chiết ethanol từ lá cây đơn mặt trời (excoecaria cochinchinensis lour.) ức chế sự di trú và làm dừng chu kỳ phân chia của tế bào ung thư dạ dày MKN45*. 2021.
- [19]. Hùng, T., *Giáo trình phương pháp nghiên cứu dược liệu*. Trường Đại học Y dược TP.HCM, 2004: p. 29-45.
- [20]. Vinh, T.Q and N.Đ.N., et al., *Study on extraction and antioxidant, antibacteria activities of astaxanthin extraction from Rhodosporidium sp. by DMSO*. Trường Đại học Tây Nguyên, 2021. **47**: p. 86-92.
- [21]. Đạt, B.T., P.V.T., et al, *Xây dựng quy trình thử hoạt tính kháng oxy hóa DPPH và sàng lọc một số cao chiết từ cây cỏ Việt Nam*. Tuyển Tập Công Trình Nghiên Cứu Khoa Học và Công Nghệ, 2003: p. 150-155.
- [22]. Thuốc, T.L., *Phương pháp phân tích vi sinh vật học trong nước, thực phẩm, mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
- [23]. Arvouet-Grand, A., et al., *Standardisation of an extract of propolis and identification of the major compounds*. J. Pharm. Belg, 1994. **49**: p. 462-468.
- [24]. An, L.N.T. & H.T.N.N., *A study on the impacts of ultrasonic assisted and microwave assisted extraction methods on the extraction of saponins from licorice soil (Scoparia dulcis L.)*. Tạp chí công thương, 2021. **2**: p. 293-297.
- [25]. Rho, H.S., et al., *Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties*. Molecules, 2011. **16**(4): p. 3338-3344.
- [26]. Gikas, E., et al., *Quantitation of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in the Leaves of Trigonella foenum-graecum by High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detection*. Analytical letters, 2011. **44**(8): p. 1463-1472.
- [27]. Phương, N.N.T., et al., *Khảo sát hàm lượng flavonoid, alkaloid và khả năng kháng khuẩn của cao chiết cỏ màn trâu (Eleusine indica)*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 2017(53): p. 54-60.
- [28]. Tựu. N.V., N.M.Đ., Vĩnh Định, *Flavanol từ đơn lá đỏ*. Tạp chí Dược liệu, 2002. **6**(7): p. 165-169.

RESEARCH ON COLLECTION AND INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF FLAVONOID EXTRACT FROM LEAVES OF *Excoecaria cochinchinensis* Lour

NAM NGOC TRINH¹, DŨNG NGUYỄN VĂN¹, CUONG DUONG QUOC^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam*

²*Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam*

Abstract: Leaves of *Excoecaria cochinchinensis* Lour contain many biologically active compounds such as flavonoids, tannins, saponins, coumarins, phytosterols, free sugars... Among them, flavonoids are cell protective, antioxidant and antibacterial. The objective is to investigate maceration extraction and maceration extraction combined with ultrasound method, with conditions such as extraction solvent (water, ethanol, methanol), temperature, and ultrasonic time to obtain effective flavonoids. The extract was tested for antioxidant and antibacterial activity. The result showed that maceration extraction combined with ultrasound method obtained the highest flavonoids with maceration time of 15 hours, ultrasonic time for 20 minutes, an temperature of 60°C. Analysis of the extract by HPLC/MS detected 14 peaks, and ESI-Micro TOF-Q mass spectrometry analysis identified kaempferol 7-o-glucoside and kaempferol, and palmitic acid. Quantification of kaempferol in the sample was based on the kaempferol standard (Sigma-Aldrich) by the HPLC/UV method. The kaempferol content was 680.5 µg/g. The antioxidant and antibacterial activities of the extract were relatively high. Research results show the potential application of *Excoecaria cochinchinensis* Lour in medicinal herbs and functional foods.

Keywords: Flavonoid; kaempferol, antioxidant, antibacterial, ultrasound.

Ngày nhận bài: 21/11/2022

Ngày chấp nhận đăng: 06/02/2023