

SÀNG LỌC VÀ THU NHẬN HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA TỪ DỊCH CHIẾT CÂY *DROSERA INDICA* L. NUÔI CÂY *IN VITRO*

Quách Ngô Diễm Phương, Hoàng Thị Thanh Minh, Lê Phi Yến, Nguyễn Kim Phi Phụng,

Bùi Văn Lê

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 01 tháng 06 năm 2011)

TÓM TẮT: Dịch chiết các loài *Drosera* đã từng được chứng minh về khả năng kháng oxy hóa từ rất nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng như từ khả năng trị liệu trong những bài thuốc dân gian. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc và ly trích thành công một hợp chất flavonoid từ phân đoạn cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa từ sinh khối cây *Drosera indica* L. nuôi cấy *in vitro*. Hợp chất được tinh sạch bằng các phương pháp sắc ký và xác định cấu trúc là quercetin bằng các kỹ thuật ^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT và COSY, HSQC, HMBC. Hàm lượng hoạt chất này trong cây cũng đã được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC.

Từ khóa: *Drosera indica* L., hợp chất kháng oxy hóa, quercetin

GIỚI THIỆU

Trong cơ thể con người có rất nhiều loại gốc tự do, mà các gốc nguy hiểm hơn cả là superoxide, ozone, hydrogen peroxide, lipid peroxide và hydroxyl radical. Theo các nhà khoa học, gốc tự do có thể là thủ phạm gây ra tới trên 100 bệnh, đáng kể nhất gồm có: bệnh xơ vữa động mạch, ung thư, Alzheimer, Parkinson, đục thủy tinh thể, tiểu đường, cao huyết áp không nguyên nhân, xơ gan. Mặc dù đã có hệ thống kháng oxy hóa nội sinh giúp cơ thể chống lại những tác nhân oxy hóa gây hại, nhưng hệ thống này tỏ ra không hiệu quả, nhất là khi con người ở giai đoạn cuối cuộc đời. Do đó, phương pháp hiệu quả nhất chính là bổ sung các chất có hoạt tính kháng oxy hóa vào cơ thể qua con đường tiêu hóa.

Drosera là họ cây thuốc quý được nghiên cứu nhiều trên thế giới về giá trị dược tính và khả năng ứng dụng. Từ xa xưa, *Drosera* đã được dùng trong y học cổ truyền để chữa các bệnh: kháng lao, chống ung thư, chữa phong, chống hen suyễn, kháng viêm, kháng oxy hóa... Ở Việt Nam, hiện nay có 3 loài *Drosera* được tìm thấy: *D.burmanni* Vahl, *D.peltata* J.E.Sm. và *D.indica* L., nhưng vẫn chưa được quan tâm đúng mức với số lượng nghiên cứu rất hạn chế. Trong khi, nhiều loài *Drosera* đã trở thành loài có nguy cơ tuyệt chủng cao trên thế giới, trong đó có cả 2 loài *D.burmanni* và *D. indica*. Vì lý do đó, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm sàng lọc và thu nhận hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa từ cây *D.indica* L. *in vitro* với mục đích góp phần làm sáng tỏ giá trị dược tính của loài này và khả năng thu nhận hợp chất thứ cấp từ nguyên liệu nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Điều chế và sàng lọc cao**

Nguồn nguyên liệu là cây *D. indica* L. *in vitro* do phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật - trường Đại học Khoa học Tự nhiên cung cấp.

Toàn cây tươi đem sấy khô ở 50⁰C, xay nhuyễn được bột cây khô. Bột cây khô lần lượt đem ngâm dầm trong các loại dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan, chloroform, ethyl acetate, aceton, ethanol ở nhiệt độ phòng, sau ít nhất 24 giờ đem lọc. Dịch lọc tổng cộng sau nhiều lần ngâm chiết (thu lấy đến khi dịch lọc gần như trong suốt) được cô quay chân không thu được các loại cao.

Các loại cao được thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp dựa trên tính khử của Yen và Duh (1993). Lặp lại 2 lần cho mỗi nghiệm thức

Phương pháp của Yen và Duh (1993)

Hút 1ml chất thử nghiệm; 2,5ml dung dịch đệm sodium phosphate 0,2M pH 6,6; 2,5ml dung dịch potassium ferricyanide 1%; ổn định ở 20⁰C sau 20 phút; thêm 2,5ml acid trichloroacetic 10%; ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút; thu dịch nổi; hút 1ml dịch nổi qua ống nghiệm khác; thêm 2ml nước cất và 0,5ml dung dịch FeCl₃ 1%; lắc đều rồi để yên sau 5 phút; đo ở bước sóng 700nm. Giá trị hấp thụ càng cao thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh.

Trích ly và cô lập hợp chất kháng oxy hóa

Từ cao có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất, tiến hành cô lập hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa bằng các phương pháp: sắc ký

cột silicagel với hệ dung môi giải ly là (chloroform: ethyl acetate), sắc ký gel sephadex với hệ dung môi (chloroform: methanol) cho đến khi sản phẩm thu được chỉ có 1 vệt tròn rõ khi kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa sau khi cô lập

Hợp chất được thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa theo 2 phương pháp: Thiobarbituric acid (TBA) và Ferric thycynate (FTC). Lặp lại 2 lần cho mỗi thí nghiệm.

Phương pháp Thiobarbituric acid (TBA)

Phương pháp này dựa theo phương pháp ức chế quá trình peroxide hóa lipid của Ottolenghi (1959) và nhóm tác giả Kikuzaki (1993), với cơ sở: trong suốt quá trình oxy hóa, peroxide được phân hủy dần thành các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp hơn. Một trong những hợp chất như vậy là malonaldehyde, có thể được đo lường bằng phương pháp TBA vào ngày cuối của chu kỳ ù (1 ngày sau khi mẫu đối chứng đạt cực đại). Malonaldehyde là sản phẩm chính khi lipid bị oxy hóa, nó phản ứng với TBA cho phức chất có màu đỏ, hấp thụ cực đại ở 532nm. Do đó, phương pháp tiến hành như sau: hòa tan 4mg mẫu thử trong 4ml ethanol 96%, thêm 4,1ml acid linoleic + 8ml đệm phosphate 0,05M với pH7 + 3,9ml nước cất; đem hỗn hợp ù trong tối ở 400C. Cho vào một ống nghiệm: 1ml hỗn hợp + 2ml TCA 20% + 2ml TBA 20%, đặt ống nghiệm trong bể nước sôi trong 10 phút, sau đó làm lạnh, đem ly tâm 3000 vòng/phút trong 20 phút, dịch nổi sau ly tâm

được đo độ hấp thu ở 532nm sau mỗi 24 giờ. Đo đến sau khi mẫu chứng âm đạt cực đại một ngày.

Phương pháp Ferric thyocynate (FTC)

Cũng là một trong những phương pháp phổ biến được sử dụng để đo mức độ per-oxy hóa trong suốt giai đoạn đầu tiên của sự oxy hóa chất béo: hòa tan 4mg mẫu thử trong 4ml ethanol 96%, thêm 4,1ml acid linoleic + 8ml đệm phosphate 0,05M với pH7 + 3,9ml nước cất; đem hỗn hợp ủ trong tối ở 40⁰C. Cho vào một ống nghiệm: 0,1ml hỗn hợp + 9,7ml ethanol 75% + 0,1ml FeCl₂ 0,02M; để yên ống nghiệm trong 3 phút, đo độ hấp thu ở 500nm sau mỗi 24 giờ. Đo đến sau khi mẫu chứng âm đạt cực đại một ngày.

Chỉ tiêu đánh giá của 2 phương pháp

- Giá trị hấp thu càng thấp thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh.

- Phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa: AI (%) = 100 X (A₀ – A) / A₀

Trong đó, A₀ là độ hấp thu của phản ứng đối chứng (phản ứng không chứa chất kiểm tra) và A là độ hấp thu của mẫu cần kiểm tra hoạt tính chống oxy hóa.

Xác định cấu trúc và đo hàm lượng hợp chất đã cô lập

Dùng phối hợp các phương pháp hóa lý hiện đại: phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều ¹H-NMR, ¹³C-NMR; phổ 2 chiều ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC, và kỹ thuật DEPT (thực hiện trên máy cộng hưởng từ hạt nhân BRUKER AC.500 tần số cộng hưởng 500 MHz cho ¹H và 125 MHz cho ¹³C-NMR). Hàm lượng hợp chất cô lập được có trong cao ban đầu được xác định bằng phương pháp qui về 100% diện tích trong sắc ký lỏng cao áp (HPLC) với chất chuẩn là hợp chất cô lập từ cây đã xác định cấu trúc, với cột Hypersil 5 ODS, pha động là chloroform: methanol (9:1), tốc độ chảy 1 ml/phút, nhiệt độ phòng, detector phát hiện ở bước sóng 336nm, thể tích bơm là 25µl.

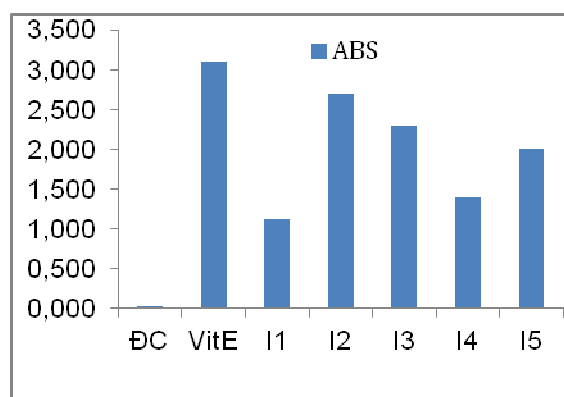
KẾT QUẢ-BIỆN LUẬN

Điều chế và sàng lọc cao có hoạt tính kháng oxy hóa

Sau khi hút ẩm và sấy khô các loại cao đến khối lượng không đổi, so sánh với khối lượng khô ban đầu và thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa, kết quả cho thấy cao chloroform là cao có năng suất thu được cao nhất đồng thời có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất.

Bảng 1. Năng suất các loại cao thu được từ Drosera indica L. với khối lượng khô ban đầu là 503,58 g

Dung môi	Khối lượng cao (g)	Thu suất cao so với khối lượng khô (%)
n-hexan	9,71	1,93
Chloroform	54,07	10,74
Ethyl acetate	17,92	3,56
Aceton	12,50	2,48
Ethanol	35,56	7,06



Hình 1. Biểu đồ thể hiện tính khử của các loại cao

ĐC: đối chứng, VitE: vitamin E, I1-I5: các loại cao *D.indica* L. theo thứ tự: n-hexan, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol

Trích ly và cô lập hợp chất kháng oxy hóa

Cao chloroform được sắc ký cột silicagel với hệ dung môi chloroform và ethyl acetate với độ phân cực tăng dần: ethyl acetate có nồng độ từ 0% - 100% trong chloroform, sắc ký gel

sephadex LH-20 với hệ dung môi chloroform: methanol (1:1). Hợp chất sau khi kết tinh lại trong chloroform: ethyl acetate (3:7) là tinh thể hình kim dài màu vàng (Hình 2), có điểm nóng chảy 316⁰C.

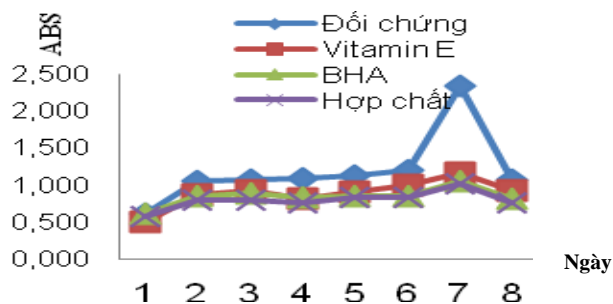


Hình 2. Tinh thể hình kim dài của hợp chất cô lập và vệt chất khi giải ly bằng hệ dung môi chloroform: acetone (1:1) + 7 giọt acid acetic

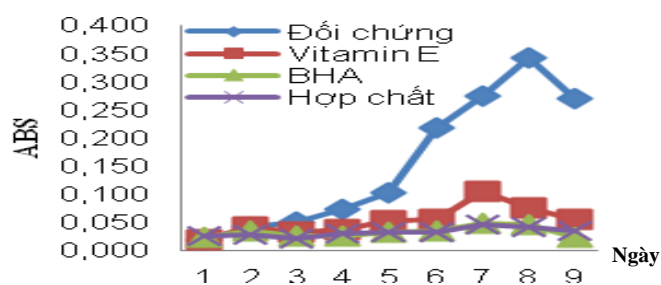
Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất sau khi cô lập

Hợp chất thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa mạnh ở cả hai phương pháp FTC và TBA (hoạt

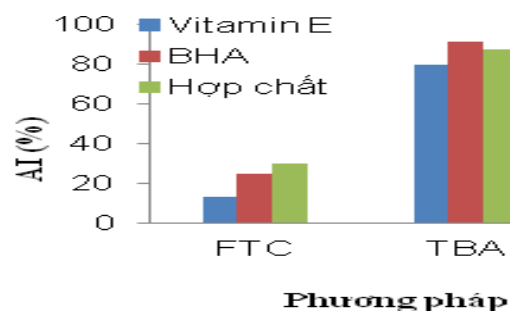
tính kháng oxy hóa cao hơn chất chuẩn vitamin E) (Hình 3 -5).



Hình 3. Đồ thị thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất theo phương pháp FTC



Hình 4. Đồ thị thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất theo phương pháp TBA



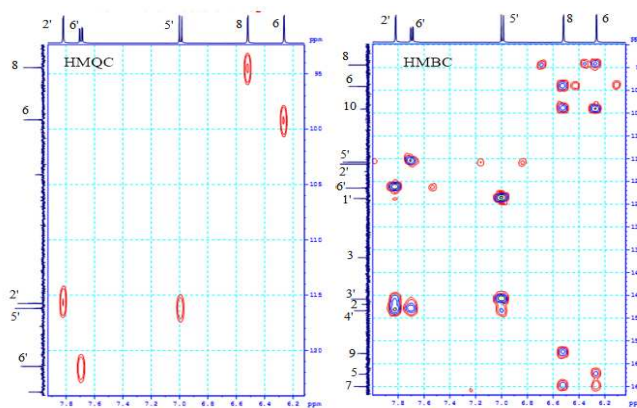
Hình 5. Biểu đồ thể hiện phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất

Xác định cấu trúc và đo hàm lượng hợp chất naphthoquinone đã cô lập

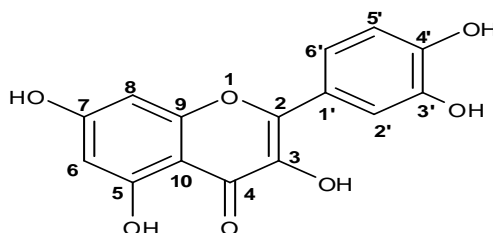
Xác định cấu trúc

Kết quả phổ ^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT và COSY, HSQC, HMBC (hình 6 và bảng 2) cho

biết hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa cô lập được chính là 2-(3,4-dihydrophenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (quercetin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, $M=302.226$) (Hình 7).



Hình 6. Kết quả chạy phổ HSQC, HMBC (CDCl₃)



Hình 7. Cấu trúc hóa học của hợp chất cô lập

Bảng 2. Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và HMBC của hợp chất cô lập được

Vị trí	¹ H-NMR (CDCl ₃) (δ ppm, J Hz)	¹³ C-NMR (CDCl ₃) (δ ppm)	HMBC (¹ H → ¹³ C)
2		146,97	
3		136,76	
4		176,57	
5		162,32	
6	6,26 (1H, d, J=2,5)	99,16	5, 7, 10
7		165,02	
8	6,52 (1H, d, J=2,0)	94,45	7, 9, 10
9		157,78	
10		104,12	
1'		123,76	
2'	7,82 (1H, d, J=2)	115,76	4', 6'
3'		145,85	
4'		148,36	
5'	7,00 (1H, d, J=8,5)	116,21	1', 3', 4'
6'	7,70 (1H, dd, J=8,5 và 2,5)	121,45	2', 4'
5-OH	12,15 (1H, s)		

Xác định hàm lượng

Cây tươi *D.indica* L. *in vitro* được khảo sát bằng HPLC, qua so sánh với mẫu chuẩn, cho thấy sự hiện diện của quercetin với hàm lượng là 0,058 mg/g (FW) trong cây *D. indica* L. *in vitro* (mũi thứ 11, thời gian lưu là 6,622, chiếm % diện tích là 5,42%).

KẾT LUẬN

Drosera indica L. nuôi cấy *in vitro* có chứa 1 hợp chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh được cô lập từ cao chloroform bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi chloroform: ethyl acetate (3:7) và sắc ký cột sephadex với hệ dung môi chloroform: methanol (1:1), hợp chất được xác định là quercetin. Hợp chất này có hàm lượng 0,058mg/g cây *in vitro* tươi khi xác định bằng HPLC.

SCREENING AND ISOLATING AN ANTIOXIDANT FROM IN VITRO DROSERA INDICA L. EXTRACT

**Quach Ngo Diem Phuong, Hoang Thi Thanh Minh, Le Phi Yen, Nguyen Kim Phi Phung,
Bui Van Le**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACTS: Extracts from *Drosera* species have been published as therapeutics, especially as antioxidants. In this research, quercetin was screened and isolated for antioxidant properties from *D. indica* L. *in vitro* plantlets. Its structure has been elucidated on the basis of its spectral data mainly, ¹H-, ¹³C-NMR, DEPT and COSY, HSQC, HMBC. HPLC also has been applied for quantitative analysis of quercetin.

Key words: *Drosera indica* L., antioxidants, quercetin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Budzianowski J, Skrypczak L, Kukulczanka K. (1993). Phenolic compounds of *Drosera intermedia* and *Drosera spathulata* from *in vitro* cultures. *Acta Horti* 330. Pp. 277-280.
- [2]. Culham A, Gornall RJ. (1994). The taxonomic significance of naphthoquinones in the Droseraceae. *Biochem System Ecol* 22. Pp. 507-515.
- [3]. Crouch, Finnie JF & Staden VJ (1990). Studies on isolation of plumbagin from *in vitro* and *in vivo* grown *Drosera* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.21. Pp. 79-82.
- [4]. Dalva TF, César CA, Helha OS, Terezinha JF, Elisangela V, Kátia EC,

- Juliana Feijó SD, Sílvia L, Dennis PS, Raimundo BF (2004). Antimicrobial Activity and Chemical Investigation of Brazilian *Drosera*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Vol. 99. No. 7. Pp 753-755.
- [5]. Grevenstuck T, Goncalves S, Almeida S, Coelho N, Quintas C, Gaspar MN, Romano A (2009), Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of *in vitro* cultured *Drosera intermedia* extracts, *Nat. Prod. Commun.* Vol. 4. Pp. 1063-1068.
- [6]. Houli LI, Guangxi Z, Weiwei Z, Yukun M, Lingbing L (2006). Studies on the preparation of quercetin solid lipid nanoparticles and oral absorption in mice, *Nanoscience* vol. 11, pp. 306-310.
- [7]. Kolodziej H, Pertz HH, Humke A (2002). Main constituents of a commercial *Drosera* fluid extract and their antagonist activity at muscarinic M3 receptors in guinea-pig ileum, *Die Pharmazie* vol. 57, pp. 201-203.
- [8]. Melzig MF, Pertz HH, Krenn L (2001). Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae* herba, *Phytomedicine* vol. 8, pp. 225-259.
- [9]. Repcak M, Galambosi B (1996). Flavonoids in some *Drosera* species. *Biologia 51*. Pp. 98-99.
- [10]. Mohd Z, Abdul-Hamid A, Osman A (2002). Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit, leaf, *Food Chemistry* vol. 78, pp. 227-231.
- [11]. Zuofa Z, Jie jin, Liangen S (2008). Antioxidant activities of the derivatives of polysaccharide extracted from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*), *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 14, pp. 160-168.