

Nghiên cứu phân lập hợp chất mangiferin từ lá cây xoài

Study on Isolation of Mangiferin from *Mangifera Indica* L. Leaves

Lê Huyền Trâm*, Nguyễn Văn Thông, Đinh Thị Thu Hiền

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội - Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Đến Tòa soạn: 08-3-2019; chấp nhận đăng: 20-01-2020

Tóm tắt

Xoài có tên khoa học *Mangifera indica* L. thuộc họ Đào lộn hột (*Anacardiaceae*) là loại cây nhiệt đới phân bố phổ biến ở Việt Nam. Mangiferin (1) được phân lập từ lá cây xoài (*Mangifera indica* L.), bằng các phương pháp chiết hồi lưu và chiết siêu âm. Cấu trúc của 1 được nhận dạng bằng các phương pháp phổ bao gồm phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Hợp chất 1 thể hiện hoạt tính chống oxi hóa quét gốc tự do DPPH và hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên bốn dòng tế bào ung thư người gồm ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (LU-1) và ung thư vú (MCF7) với các giá trị IC_{50} tương ứng là 11,95; 13,75, 15,65 và 16,84 $\mu\text{g/ml}$.

Từ khóa: *Mangifera indica*, *Anacardiaceae*, mangiferin, xanthone, DPPH, chống oxi hóa.

Abstract

Mango (*Mangifera indica* L.) belongs to the family of *anacardiaceae*, which is a popular tropical plant distributed in Vietnam. Mangiferin (1) was isolated from the leaves of *Mangifera indica* L. by reflux extraction and ultrasound-assisted extraction methods. Chemical structure of compound 1 was identified by means of spectroscopic methods including electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Compound 1 showed DPPH scavenging activity with SC_{50} value of 15.94 $\mu\text{g/ml}$ and moderate cytotoxic activity on four human cancer cell lines including mouth epidermal carcinoma (KB), liver hepatocellular carcinoma (Hep-G2), lung carcinoma (LU-1) and breast cancer (MCF7) with IC_{50} values of 11.95, 13.75, 15.65 and 16.84 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

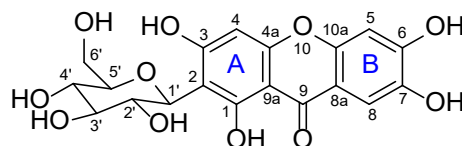
Keywords: *Mangifera indica*, *Anacardiaceae*, mangiferin, xanthone, DPPH, antioxidant.

1. Đặt vấn đề

Cây xoài có tên khoa học là *Mangifera indica* L. thuộc họ Đào lộn hột (*Anacardiaceae*). Cây thích nghi với khí hậu nóng ẩm nên được trồng ở các nước nhiệt đới Á Đông như Ấn Độ, Myanma, Malaysia, Thái Lan. Cây cũng phân bố cả ở các nước nhiệt đới thuộc châu Phi, châu Mỹ và một số nước Châu Âu. Ở nước ta, cây xoài được trồng phổ biến khắp miền Nam. Tại miền Bắc nhiều nơi như Sơn La cũng đã trồng. Người ta thường trồng cây để lấy quả ăn. Quả, vỏ quả, lá, vỏ thân cây xoài có vị chua, ngọt, tính mát. Theo Đông y, quả xoài dùng để trị ho, tiêu hóa không bình thường, vỏ quả dùng trị kiết lỵ, lá dùng để trị các bệnh đường hô hấp như ho, viêm phế quản mạn tính hay cấp tính, dùng ngoài trị viêm da, vỏ thân dùng trị ho, đau sưng họng và đau răng; nhựa từ vỏ dùng trị kiết lỵ, ỉa chảy, bệnh ngoài da, bạch đới, kinh nguyệt quá nhiều [1].

Thành phần hóa học của cây xoài cũng rất phong phú. Quả xoài tỉ lệ thịt quả chiếm 60–70 %, thịt

xoài chứa nhiều chất đường 16–20 %, chất bột, chất gồm, acid hữu cơ chủ yếu là acid citric, các carotenoid chủ yếu là β -caroten (121–363,8 mg/1000g), các hợp chất phenolic đơn giản (như acid ellagic, acid gallic, acid digallic và acid trigallic) và polyphenol (anthocyanin, mangiferin, quercetin, isoquercetin, tannin), các vitamin nhóm B và C... Nhựa xoài chứa 16% gồm và 81% nhựa; gồm gồm 22% pentose, 38% hexose, 24,1% anhydrit uronic, D-galactose, L-arabiose, L-rhamnose, acid glucuronic. Lá và vỏ thân cây cũng giàu các hợp chất polyphenol thuộc các nhóm flavonoid và xanthon thiên nhiên, đặc biệt chứa hàm lượng cao hợp chất mangiferin (1,6% trong lá và 3% trong vỏ thân) [2,3] (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc của hợp chất mangiferin.

Mangiferin (hay 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthon-C-2- β -D-glucoside) có tên gọi khác là alpizarine. Đây là một hợp chất polyphenol thuộc nhóm xanthon-C-

* Địa chỉ liên hệ: Tel.: (+84) 912.783.355.

Email: tram.lehuyen@hust.edu.vn

glycoside thiên nhiên, chủ yếu phân bố ở các thực vật bậc cao, có nhiều hoạt tính sinh học thú vị như hoạt tính kháng virus HIV và tăng cường khả năng miễn dịch [4], kháng virus Herpes [5,6], hoạt tính chống tiểu đường [7,8] và hoạt tính chống ung thư [9,10]. Ở Việt Nam, mangiferin đã được nghiên cứu ở dạng bào chế thuốc nhỏ mắt hỗn dịch chứa mangiferin 2% để điều trị bệnh về mắt do virus *Herpes simplex* gây ra [11]. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi công bố nghiên cứu về việc phân lập, xác định cấu trúc hóa học và thử hoạt tính sinh học của hợp chất mangiferin phân lập được từ lá cây xoài Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1 Mẫu thực vật

Mẫu lá cây xoài thu hái tại xã Vĩnh Quỳnh, huyện Thanh Trì, Hà Nội vào tháng 10/2017 và đã được TS. Trần Huy Thái, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.2 Thiết bị, hóa chất

Thiết bị chiết siêu âm Elmasonic S120 H (Elma - Đức); Thiết bị cô quay chân không Hei-VAP Value G3 (Heldoft - Đức);

Các dung môi methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetone được làm khan và chưng cất lại;

Điểm nóng chảy (M_p) được xác định bằng máy đo điểm nóng chảy Mel-Temp 3.0 (Thermo Scientific). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ghi bằng máy Bruker AM500 FT-NMR spectrometer với chất chuẩn nội là tetramethylsilane. Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) đo trên hệ máy AGILENT 1200 series LC-MSD Ion Trap. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được tiến hành trên bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) độ dày 0,2mm, phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm, kết hợp cất rìa bản mỏng hiện màu vết chất bằng thuốc thử vanillin/H₂SO₄ và FeCl₃ 5% trong ethanol.

2.3 Chiết tách và phân lập mangiferin (1)

Sau khi thu hái, lá xoài tươi được thái nhỏ, phơi khô trong bóng râm, sấy ở 40-45°C đến khô giòn, rồi nghiền thành bột.

Tiến hành chiết tách mangiferin từ bột lá xoài theo hai phương pháp chiết hồi lưu và chiết siêu âm với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Quá trình chiết tách được thực hiện như sau:

Cân 250 g bột lá xoài cho vào bình cầu dung tích 2L và thêm 1L dung môi (methanol, ethanol, acetone). Tiến hành chiết đun hồi lưu trong 2 lần, mỗi lần 2 giờ. Quá trình chiết siêu âm cũng thực hiện 2 lần, mỗi lần trong 0,5 giờ. Lọc bỏ bã, thu các

dịch lọc. Làm lạnh các dịch lọc đến khi xuất hiện tinh thể. Lọc hút dịch lọc để thu tinh thể thô thứ nhất. Sau đó, các dịch lọc thu được đem cô quay loại bớt dung môi, rồi làm lạnh dịch sau cô quay, lọc hút thu được tinh thể thô thứ hai. Các tinh thể thô thứ nhất và tinh thể thô thứ hai được gộp lại với nhau, rồi tiến hành kết tinh lại trong dung môi methanol. Sử dụng than hoạt tính để tẩy màu trong quá trình kết tinh lại thu được sản phẩm là hợp chất **1** với hiệu suất thu nhận khác nhau phụ thuộc vào dung môi chiết xuất sử dụng ban đầu.

Mangiferin (1): tinh thể hình kim màu vàng nhạt, M_p : 278-280°C; R_f 0,65 (TLC, silica gel, MeOH:H₂O (9:1, v/v); hiện màu với UV: màu vàng; với các thuốc thử vanillin/H₂SO₄: màu nâu; FeCl₃: màu xanh thẫm. IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3367, 2938, 1650, 1621, 1492, 1296, 1193, 1075, 1032, 879, 753. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 3,18 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'); 3,69 (d, 1H, H-6a'); 3,42 (d, 1H, H-6b'); 4,04 (t, 1H, H-2'); 4,44 (s, 1H, 6'-OH); 4,60 (d, 1H, H-1'); 4,81 (s, 2H, 3',4'-OH); 6,37 (s, 1H, H-4); 6,86 (s, 1H, H-5); 7,38 (s, 1H, H-8); 9,80 (s, 1H, OH-3); 10,55 (s, 2H, OH-6,7); 13,74 (s, 1H, OH-1). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 161,6 (C-1); 107,5 (C-2); 163,7 (C-3); 93,3 (C-4); 156,1 (C-4a); 102,5 (C-5); 153,9 (C-6); 143,6 (C-7); 108,0 (C-8); 111,7 (C-8a); 179,0 (C-9); 101,2 (C-9a); 150,7 (C-10a); 73,0 (C-1'); 70,5 (C-2'); 78,9 (C-3'); 70,2 (C-4'); 81,5 (C-5'); 61,4 (C-6'). ESI-MS: m/z 423 [M+H]⁺.

2.4 Đánh giá hoạt tính chống oxi hóa

Hoạt tính chống oxi hóa của hợp chất **1** được đánh giá bằng khả năng quét gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) theo phương pháp của Gorinstein S. và cộng sự [12]. Mẫu thử pha trong DMSO 100% ở các nồng độ khác nhau được trộn với 190 mM DPPH trong ethanol và đưa lên phiến 96 giếng. Phiến được bọc kín để tránh ánh sáng môi trường và ủ trong tủ ấm 37°C trong 2 giờ. Đọc kết quả trên máy Elisa ở bước sóng 515nm. Khả năng quét gốc tự do SC₅₀ (Scavenging Capacity) là nồng độ cần thiết của mẫu để quét 50% gốc DPPH. Đối chứng âm tính là 10 μ l DMSO 10% +190 μ l DPPH trong ethanol, đối chứng dương tính là 10 μ l mẫu + 190 μ l DPPH trong ethanol và mẫu trắng gồm 10 μ l mẫu +190 μ l ethanol.

2.5 Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **1** được thực hiện dựa trên phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] giá hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư người là biểu mô (KB), gan (Hep-G2), phổi (LU-1) và vú (MCF-7). Giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (nồng độ

mẫu thử ức chế được 50% sự phát triển của tế bào). Elicipticine được sử dụng làm chất đối chứng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Chiết tách hợp chất mangiferin (1)

Dựa vào tính chất vật lý là độ hòa tan của mangiferin trong các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau [14] mà nghiên cứu lựa chọn các dung môi chiết xuất phổ biến là methanol, ethanol và acetone. Bên cạnh đó, các phương pháp chiết xuất khác nhau là chiết đun hồi lưu và chiết siêu âm cũng được lựa chọn để tiến hành chiết xuất mangiferin. Mục đích của việc lựa chọn dung môi và phương pháp chiết xuất nhằm thu nhận được hợp chất mangiferin từ bột lá xoài với hiệu suất (so với khối lượng bột nguyên liệu) cao nhất. Kết quả chiết tách thu nhận hợp chất 1 được chỉ ra ở Bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất thu nhận hợp chất 1 từ lá xoài

Dung môi	Hiệu suất thu hợp chất 1 (%)	
	Chiết hồi lưu	Chiết siêu âm
Acetone	1,02	1,51
Ethanol	2,66	3,48
Methanol	4,81	6,46

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy việc sử dụng phương pháp chiết siêu âm với dung môi methanol cho hiệu suất thu nhận hợp chất 1 là cao nhất (6,46%). Điều này được giải thích là do dung môi methanol có khả năng hòa tan tốt các hợp chất polyphenol, trong đó có xanthone và sự có mặt của sóng siêu âm cũng làm thúc đẩy đáng kể hiệu quả chiết xuất.

3.2 Xác định cấu trúc của mangiferin (1)

Hợp chất 1 có dạng bột, màu vàng nhạt, điểm nóng chảy ở nhiệt độ 278-280°C. Trên phổ hồng ngoại IR xuất hiện đỉnh hấp thụ rộng ν_{max} 3411 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm -OH, đỉnh hấp thụ ν_{max} 1645 cm^{-1} đặc trưng cho liên kết C=O. Phổ ESI-MS cho pic ion phân tử tại m/z 423 ($[M+H]^+$) chứng tỏ hợp chất 1 khối lượng phân tử là 422 ứng với công thức phân tử $C_{19}H_{18}O_{11}$. Trên phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xuất hiện các tín hiệu phổ cộng hưởng cho phép dự đoán hợp chất 1 có chứa một khung xanthone bị thế ở các vị trí 1,3,6,7. Cấu trúc của vòng A được xác định bằng tín hiệu NMR ở δ_H 6,37 (1H, s, H-4) và δ_C 93,3 (C-4) với một nhóm hydroxy ở C-1 [δ_H 13,76 (1H, s, 1-OH)].

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính chống oxi hóa của mangiferin theo phương pháp DPPH

STT	Mẫu	Nồng độ mẫu ($\mu g/ml$)	SC%	SC ₅₀	Kết quả
1	Chứng (+)	50	68,5 ± 0,0	26,64	Dương tính
2	Chứng (-)	50	0,0 ± 0,0	-	Âm tính
3	Mangiferin (1)	50	82,13 ± 0,5	15,94	Dương tính

Vòng thơm B có cấu trúc được xác định bằng tín hiệu NMR ở δ_H 6,86 (1H, s, H-5) và 7,38 (1H, s, H-8); δ_C 102,5 (C-5) và 108,0 (C-8). Tín hiệu của một carbon carbonyl >C=O trên khung xanthone xuất hiện trên phổ ^{13}C -NMR ở δ_C 179,0 (C-9). Các phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất 1 cũng cho thấy các tín hiệu của một đơn vị đường glucose [δ_H 4,04 (H-2'); 3,68 (H-6a'); 3,42 (H-6b'); 3,18 (m, 3H, H-3', H-4', H-5') và δ_C 81,5 (C-5'); 78,9 (C-3'); 70,5 (C-2'); 70,2 (C-4'); 61,4 (C-6')]. Một tín hiệu ở δ_H 4,04 (1H, d) trên phổ 1H -NMR và một tín hiệu của nhóm -CH ở δ_C 73,0 ppm trên phổ ^{13}C -NMR đặc trưng cho vị trí 1' của phân đường. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của một carbon bậc bốn tại C-2 (δ_C 107,5 ppm) chứng tỏ đây là một C-glycoside và phân đường phải gắn vào khung xanthone ở vị trí C-2. So sánh các giá trị phổ NMR của hợp chất 1 với các giá trị phổ tương ứng của hợp chất 2-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-9-one hay mangiferin đã công bố cho thấy có sự phù hợp hoàn toàn [15]. Từ đó có thể khẳng định hợp chất 1 là mangiferin với công thức đã nêu trong Hình 1.

3.3 Kết quả thử hoạt tính sinh học của hợp chất mangiferin (1)

Kết quả thử hoạt tính chống oxi hóa

Mangiferin (1) đã được thử hoạt tính chống oxi hóa bằng phương pháp quét gốc tự do DPPH theo phương pháp thử nêu ở mục 2.4. Kết quả thử ở Bảng 2 cho thấy mangiferin có hoạt tính chống oxi hóa quét gốc tự do DPPH với giá trị SC₅₀ là 15,94 $\mu g/ml$. Hoạt tính này có thể do sự có mặt của 4 nhóm hydroxyl (-OH) ở vòng A và vòng B của khung xanthone trong cấu trúc của mangiferin.

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Mangiferin (1) đã được thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư người (KB, Hep-G2, LU-1 và MCF-7) theo phương pháp thử nêu ở mục 2.5. Kết quả được chỉ ra ở Bảng 3 cho thấy hợp chất mangiferin (1) thể hiện hoạt tính trung bình trên cả bốn dòng tế bào ung thư thử nghiệm với các giá trị IC₅₀ từ 11,95 – 16,84 $\mu g/ml$. Các kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của mangiferin gợi ý cho việc sử dụng hợp chất này làm nguyên liệu để bào chế các dạng thuốc và thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của mangiferin

STT	Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)			
		KB	Hep-G2	LU	MCF7
1	Mangiferin (1)	11,95	13,75	15,65	16,84
2	Elipticine	1,28	1,45	1,93	2,05

4. Kết luận

Bằng phương pháp chiết siêu âm sử dụng dung môi methanol đã phân lập được hợp chất mangiferin từ lá cây xoài (*Mangifera indica* L) với hiệu suất 6,46%. Cấu trúc của hợp chất này đã được xác định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối phun mù điện tử ESI-MS. Hợp chất mangiferin thể hiện hoạt tính chống oxy hóa quét gốc tự do DPPH với giá trị SC₅₀ là 15,94 µg/ml và hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên các dòng tế bào ung thư KB, Hep-G2, LU-1, MCF-7 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 11,95; 13,75; 15,65; 16,84 µg/ml.

Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí của Đề tài cấp Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, mã số T2017-PC-23. Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Võ Văn Chi, Từ điển cây thuốc Việt Nam, Tập 2, Nhà xuất bản Y học (2012) 1214-1215.
- [2] R.N. Tharanathan, H.M. Yashoda, T.N. Prabha, Mango (*Mangifera indica* L.), the king of fruits – A review. *Food Reviews International*, 22 (2006) 95–123.
- [3] A.J.N. Sells, H.T.V. Castro, J. A. Agero, J.G. González, F. Naddeo, F. De Simone, L. Rastrelli, Isolation and quantitative analysis of phenolic constituents, free sugars, fatty acids and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 762–766.
- [4] S. Guha, S. Ghosal, U. Chattopadhyay, Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, *Chemotherapy*, 42(6) (1996) 443–451.
- [5] M.S. Zheng, Z.Y.Lu, Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus, *Chinese Medical Journal*, 10(1) (1989) 85–90.
- [6] Y.X.M. Zhu, J.X. Song, Z.Z. Huang, Y.M. Wu, M.J. Yu, Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 14(5) (1993) 452–454.
- [7] H. Ichiki, T. Miura, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, K. Tanigawa, M. Okada, New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside, *Biol. Pharm. Bull.*, 21(12) (1998)1389–1390.
- [8] T. Miura, H. Ichiki, I. Hashimoto, N. Iwamoto, M. Kato, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, M. Okada, T. Ishida, K. Tanigawa, Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin, *Phytomedicine*, 8(2) (2001) 85-87.
- [9] P.B. Pal, K. Sinha, P.C.Sil, Mangiferin, a natural xanthone, protects murine liver in Pb(ii) induced hepatic damage and cell death via MAP Kinase, NF-kB and mitochondria dependent pathways; *PLoS One*, 8 (2013) e56894.
- [10] S. Agarwala, K. Mudholkar, R. Bhuwania, B.S. Satish Rao, Mangiferin, a dietary xanthone protects against mercury-induced toxicity in HepG2 cells, *Environmental Toxicology*, 27 (2012) 117–127.
- [11] Trần Hữu Dũng, Nghiên cứu khả năng kích ứng của thuốc nhỏ mắt hỗn dịch mangiferin trên mắt thỏ, *Tạp chí Dược học*, 53 (2013) 44-49.
- [12] S. Gorinstein, O. Martin-Bellos, E. Katrich, A. Lojek, M. Cíz, N. Gligelmo-Miguel, R. Haruenkit, Y.S. S.T. Park, Jung, S. Trakhtenberg, Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests, *J. Nutr. Biochem.* 14 (2003) 154-159.
- [13] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65 (1983) 55–63.
- [14] Acosta J., Sevilla I., Salomón S., Nuevas L., Romero A., Amaro D., Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry, *Journal Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4 (2016) 49-53.
- [15] S. Faizi, S. Zikr-Ur-Rehman, M. Ali, A. Naz, Temperature and solvent dependent NMR studies on mangiferin and complete NMR spectral assignments of its acyl and methyl derivatives, *Magn. Reson. Chem.*, 44(9) (2006) 838-844.