

FLAVONOID TỪ PHẦN TRÊN MẶT ĐẤT THUỘC CÂY HUYỀN TINH *TACCA LEONTOPETALOIDES* (L) KUNTZE

● NGUYỄN KIM MINH TÂM - LÊ XUÂN TIẾN - TRẦN MINH THỰC VI - LAI THỊ MỸ TIÊN

TÓM TẮT:

Huyền tinh, *Tacca leontopetaloides* (L) Kuntze, là một thực vật có thân củ được dùng để sản xuất tinh bột đã có từ lâu đời ở tỉnh An Giang. Các nghiên cứu tiền đề cho thấy cao chiết ethyl acetate từ lá huyền tinh cho hoạt tính sinh học *in vitro* tốt nhất. Quá trình sắc ký cột phân đoạn ethyl acetate bằng hệ dung môi hexane - ethyl acetate thu được 1 flavonoid. Phổ NMR và MS xác định flavonoid này là luteolin, có hoạt tính kháng oxy hóa xấp xỉ vitamin C.

Từ khóa: huyền tinh, tinh bột, tỉnh An Giang, vitamin C.

1. Đặt vấn đề

Huyền tinh *Tacca leontopetaloides* Kuntze (*Dioscoreaceae*) là một loại cây lâu năm, chịu hạn, thuộc nhóm thực vật một lá mầm. Lá chia thùy thành 3 phiến, thân rễ dạng củ. Tại Việt Nam, huyền tinh là một loại cây đặc hữu ở vùng Bảy Núi (An Giang) thường được nông dân trồng xen canh dưới tán rừng. Bộ phận dùng của huyền tinh là củ. Các nghiên cứu về *Tacca leontopetaloides* chủ yếu tập trung vào việc khảo sát thành phần hóa học của củ huyền tinh và tác dụng sinh học cũng như ứng dụng của tinh bột huyền. Phần trên mặt đất của *Tacca leontopetaloides*, vốn bị coi là phụ phẩm khi nông dân thu hoạch củ huyền chưa từng được nghiên cứu ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Các nghiên cứu tiền đề cho thấy cao EtOAc từ lá huyền tinh có hoạt tính sinh học vượt trội hơn các cao phân đoạn khác [1].

2. Thí nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Lá huyền tinh tươi thu hoạch từ Nhà Bàng (Tịnh Biên, An Giang). Lá sau khi thu hái được loại bỏ phần hư hỏng dập nát, rửa sạch bụi đất, để ráo. Nguyên liệu được phơi trong bóng râm. Lá khô được xay nhỏ 1 - 3 cm. Bột lá được trữ trong các lọ kín để bảo quản và chuẩn bị cho quá trình thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận cao chiết

Bột lá huyền tinh được chiết bằng ethanol 96% ở nhiệt độ 55 - 60°C, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:5 g/mL, trong hệ thống bình chiết dung tích 50 L, có cánh khuấy, dung môi được thay sau mỗi 2 giờ. Dịch chiết ethanol được cô đặc, lắc với n-hexane để loại bớt chất béo và chlorophyll. Phần không tan trong n-hexane được lắc với ethyl

acetate (EtOAc), cô quay dịch chiết thu được để có cao EtOAc.

2.2.2. Đánh giá hoạt tính sinh học in vitro

2.2.2.1. Hoạt tính kháng oxy hóa thông qua khả năng đánh bắt gốc tự do DPPH

Dựa theo phương pháp của Rao cải tiến (Sreejayan *et al.*, 1996) [2].

Các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH, làm dung dịch chứa DPPH chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt và giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại (517 nm). Giá trị mật độ quang (OD) càng thấp chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do DPPH càng cao.

Chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO theo các nồng độ khác nhau. 500 μ l dung dịch thử (trong DMSO) hay 500 μ l dung dịch chuẩn (ascorbic acid) được cho vào 750 μ l dung dịch DPPH (0.02 μ g/ml). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 min. Đo độ hấp thụ của các dung dịch ở 517 nm.

% đánh bắt gốc tự do DPPH được tính bằng $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$. Trong đó, A_0 là OD của mẫu trắng (DMSO) và A_1 là OD của mẫu thử, A_2 là OD của mẫu không có DPPH.

2.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật

Các thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật được tiến hành trên môi trường Mueller-Hinton agar (MHA). Vi sinh vật thử nghiệm sau khi hoạt hóa 6 - 8h ở 37°C được pha loãng bằng dung dịch NaCl 0.9% (w/v) để có mật độ tế bào 10^8 CFU/ml [3].

Các chủng vi sinh vật được sử dụng bao gồm 3 vi khuẩn Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300) và 3 vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028).

Thử nghiệm được thực hiện trên đĩa petri $\varnothing 90$ mm, mỗi đĩa chứa 20 mL môi trường. 200 μ L vi sinh vật đã pha loãng được trải trên bề mặt thạch bằng que bông vô trùng.

Cho lần lượt 50 μ L dung dịch mẫu thử nghiệm (nồng độ 0.5 mg/mL DMSO) và mẫu đối chứng (Gentamicin 0.5 mg/mL) vào các lỗ đục trong thạch bằng ống thép vô trùng.

Ủ ở 37°C trong 24 h. Quan sát và đo đường kính vòng ức chế.

2.2.3. Tách chiết hợp chất

Tiến hành khảo sát để lựa chọn hệ dung môi thích hợp cho quá trình tách chiết hợp chất bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC). Sắc ký cột silica gel sau đó thực hiện với hệ dung môi được chọn nhằm tách riêng từng chất dựa trên độ phân cực khác nhau giữa các chất. Các phân đoạn từ quá trình sắc ký cột được hứng vào các ống nghiệm và được kiểm tra lại bằng sắc ký bản mỏng, nếu cho vết giống nhau sẽ được gộp chung lại, cô quay chân không đuổi dung môi để thu hợp chất. Nếu cần, tiếp tục sắc ký cột tách các phân đoạn nhỏ hơn đến khi thu được hợp chất tinh khiết [4].

Cột sắc ký có kích thước 40 mm x 600 mm, silica gel nhồi cột 230 - 400 mesh (Merck).

Các vết trên sắc ký bản mỏng sau khi giải ly được soi dưới đèn UV 254 nm và 365 nm để xác định vị trí các hợp chất trên bản. Sau đó, kiểm tra định tính sự hiện diện của hợp chất bằng dung dịch FeCl_3 10% trong EtOH, H_2SO_4 10% hay vanillin trong H_2SO_4 .

2.2.4. Xác định cấu trúc và tính chất

Xác định cấu trúc hợp chất thu được thông qua phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, và DEPT) và 2 chiều (COSY, HSQC và HMBC) trên Ascend™ 600 (Bruker), đồng thời xác định khối lượng phân tử nhờ khối phổ trên LC/MSD Trap SL (Agilent 1100 Series).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tách chiết hợp chất từ cao ethyl acetate của lá huyền tỉnh

3.1.1. Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC)

Cao EtOAc được chạy sắc ký lớp mỏng với 9 hệ dung môi khác nhau (Bảng 1).

Trên sắc ký đồ thu được, các hệ dung môi đều tách cao chiết thành ít nhất 4 dải. Trong đó, hệ S6 và S7 (hexane/ethyl acetate) tách được nhiều vạch nhất và các vạch tách nhau rõ ràng. Nên hệ hexane/ethyl acetate được lựa chọn là hệ dung môi chủ yếu để tiến hành quá trình sắc ký cột. (Bảng 1)

Bảng 1. Các hệ dung môi dùng chạy sắc ký lớp mỏng

Hệ dung môi	Thành phần	Tỷ lệ
S1	EtOAc/Methanol	9.5 : 0.5
S2	EtOAc/Methanol/Formic acid	9.5 : 0.5 : 0.1
S3	EtOAc/Ethanol	9.5 : 0.5
S4	EtOAc/Ethanol/Formic acid	9.5 : 0.5 : 0.1
S5	Chloroform/Methanol	9 : 1
S6	Hexane/EtOAc	9 : 1
S7	Hexane/EtOAc	2 : 8
S8	EtOAc/Ethanol	9 : 1
S9	EtOAc/Ethanol/Formic acid	9 : 1 : 0.1

3.1.2. Kết quả sắc ký cột thô

12.53g cao EtOAc được hòa tan trong một lượng ethanol tối thiểu trước khi nhồi cột. Tốc độ dung môi qua cột 10 mL/phút. Hệ dung môi được chọn để giải ly là hexane : EtOAc : EtOH tỷ lệ lần lượt như sau 10:0:0, 9:1:0, 8:2:0, 7:3:0, 6:4:0, 5:5:0, 4:6:0, 2:8:0, 0:1:0, 0:8:2, 0:6:4, 0:4:6, 0:0:10.

Quá trình sắc ký cột với cao EtOAc thu được 125 ống mẫu, mỗi ống chứa 50 mL dung môi. Tất cả các ống được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi hexane/EtOAc (2:8) và được hiện màu với vanillin/H₂SO₄.

Các mẫu có kết quả sắc ký lớp mỏng tương tự nhau được gom lại thành một phân đoạn sau đó cô quay để đuổi dung môi. Tổng cộng thu được 10 phân đoạn, trong đó phân đoạn VI có khối lượng 0,7 g cho 2 vạch rõ nhất khi giải ly với hệ dung môi hexane/EtOAc (2:8) nên được ưu tiên chọn để tiến hành sắc ký cột lần tiếp theo.

3.1.3. Tinh sạch phân đoạn VI

Tiến hành sắc ký cột lần 2 trên phân đoạn VI với cột sắc ký có đường kính trong 20 mm. Hệ dung môi chloroform/methanol được chọn để giải ly, tỷ lệ các hệ dung môi lần lượt như sau: 100:0, 99:1, 98.5:1.5, 95:5, 93:7, 90:10, 0:100.

Quá trình sắc ký cột kết thúc với 143 ống mẫu, mỗi ống chứa 10 mL dung môi. Tất cả các mẫu

được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi giải ly là chloroform/methanol (70:3), được hiện màu với thuốc thử vanillin/H₂SO₄. Các mẫu cho kết quả sắc ký tương tự nhau cũng được gom lại thành một phân đoạn sau đó cô quay để đuổi dung môi.

Tổng cộng thu được 8 phân đoạn, trong đó phân đoạn VI.7 sau khi dung môi bay hơi được một phần thì thấy xuất hiện một chất kết tinh màu vàng, ánh kim bám vào thành và đáy của ống nghiệm. Kết quả TLC cho thấy phân đoạn này xuất hiện 1 vạch rõ ràng, hiện màu vàng với thuốc thử vanillin/H₂SO₄, ngoài ra chỉ còn một

vạch mờ. Đây là phân đoạn sạch nhất nên được sử dụng để phân tách được hợp chất tinh khiết.

Do TLC vẫn còn cho 2 vết khi soi dưới đèn UV 254 nm và 365 nm, phân đoạn VI.7 thu được có khối lượng 0.2401 g tiếp tục được tinh sạch qua cột sắc ký lần III với hệ dung môi hexane/EtOAc (60:40), với dung môi khởi đầu cột là hexane, và dung môi kết thúc cột là EtOAc.

Phân đoạn VI.7.3 được giải ly với hệ dung môi hexane/EtOAc trên sắc ký bản mỏng, tỷ lệ lần lượt 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 0:10. Kết quả TLC khi soi dưới đèn UV và khi hiện màu với thuốc thử vanillin/H₂SO₄ chỉ hiện một vạch duy nhất. Phân đoạn này được cho bay hơi dung môi, thu được chất rắn màu vàng (mẫu VI).

Kết quả giải ly bản mỏng ở các hệ dung môi có tính phân cực khác nhau: i) Hexane/EtOAc 7:3, ii) Hexane/EtOAc 3:7, iii) Hexane/EtOAc 0:10 cho thấy mẫu VI chỉ cho một vạch rõ ràng, không có lẫn vết tạp mẫu VI là chất tinh khiết. Khối lượng chất VI thu được là 94.2 mg.

VI sau đó được xác định cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phân tích khối lượng bằng khối phổ MS, xác định nhiệt độ nóng chảy và tính tan trong 1 số dung môi thông dụng.

3.2. Xác định cấu trúc hợp chất VI

Các thí nghiệm xác định cấu trúc được thực

hiện tại phòng NMR, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.2.1. Khối phổ

Kết quả khối phổ của mẫu V1 cho thấy V1 có 1 đỉnh $[M+H]^+$ ở vị trí 286.8 và $[M-H]^-$ ở vị trí 284.8 tương đương với trọng lượng phân tử của $C_{15}H_{10}O_6$ là 286.24.

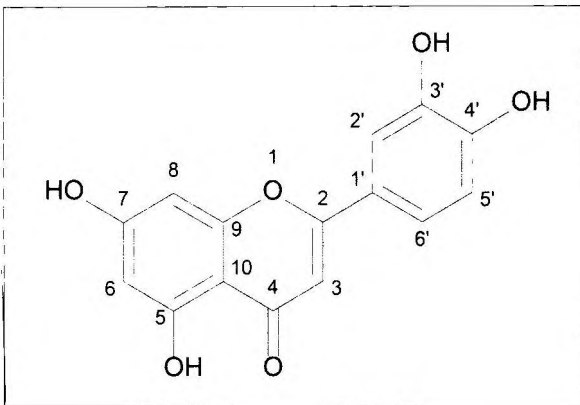
3.2.2. Phổ NMR

Phổ 1H -NMR (500 MHz, DMSO) xuất hiện 6 tín hiệu proton trên vòng thơm tại δ 6.65 (1H, s), 6.19 (1H, d, $J_{meta} = 2$ Hz), 6.44 (1H, d, $J_{meta} = 2$ Hz), 7.42 (1H, d, $J_{meta} = 2$ Hz), 6.89 (1H, d, $J_{ortho} = 8$ Hz), 7.40 (1H, dd, $J_{ortho} = 8$ Hz, $J_{meta} = 2$ Hz) (s = singlet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet of doublet). Từ dữ liệu này, hợp chất V1 được dự đoán có khung cơ bản là flavone.

Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO) cho 15 tín hiệu của carbon olefin trong khung flavone tại các vị trí δ (102.8, 98.8, 93.8, 113.3, 1156.0, 118.9, 163.8, 181.6, 161.4, 164.1, 157.2, 103.6, 121.4, 145.7, 149.7).

Từ dữ liệu phân tích phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR, V1 được dự đoán là luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone, một flavonoid thuộc nhóm flavone) (Hình 1).

Hình 1: Cấu trúc của luteolin



Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của V1 trùng khớp với dữ liệu phổ của luteolin [5].

3.3. Hoạt tính sinh học in vitro của luteolin

3.3.1. Khả năng kháng oxy hóa in vitro của luteolin

Dựa vào phần trăm gốc tự do DPPH mà các

mẫu thử nghiệm đánh bắt được, tính được IC_{50} (Bảng 2)

Bảng 2. IC_{50} của vitamin C, cao EtOAc và luteolin trên DPPH

Mẫu	DPPH ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamin C	46.26 \pm 0.7
Luteolin	52.75 \pm 2.5
Ethyl acetate	70.13 \pm 2.2

Luteolin có khả năng bắt gốc tự do DPPH gần tương tự so với vitamin C và tốt hơn cao EtOAc. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Nazari và cộng sự (2013), luteolin (1-100 $\mu\text{g/mL}$) và vitamin C (1-100 $\mu\text{g/mL}$) pha loãng trong MetOH và thử hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt các gốc tự do DPPH thì IC_{50} của luteolin thấp hơn IC_{50} của vitamin C [6]. Sự khác biệt này có thể do dung môi sử dụng để pha loãng đã ảnh hưởng tới hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của mẫu thử.

3.3.2. Khả năng kháng khuẩn in vitro của luteolin

Chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO đến nồng độ 0.5 mg/mL.

50 μL dung dịch của từng cao trong DMSO và của Gentamicin được cho vào lỗ thạch, đo đường kính vòng ức chế.

Kết quả: trong các loại cao chỉ có cao n-hexane và cao ethyl acetate cho vòng ức chế vi khuẩn. (Bảng 3)

Cao ethyl acetate cho vòng ức chế trên cả 6 chủng vi sinh vật thử nghiệm, trong khi luteolin chỉ cho vòng ức chế ở 3/6 chủng vi khuẩn thử nghiệm và chỉ kháng các vi khuẩn Gram (+). Điều này chứng tỏ trong cao ethyl acetate có chứa hợp chất ức chế vi khuẩn Gram (-) và cần được nghiên cứu thêm. Cao ethyl acetate có vòng ức chế vi khuẩn Gram (+) lớn hơn so với vòng ức chế các chủng Gram (-). Sự khác biệt về khả năng tác động trên 2 nhóm vi khuẩn là do cấu trúc thành tế bào vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) khác nhau, vi khuẩn Gram (-) có lớp lipopolysaccharide và các enzyme

Bảng 3. Đường kính vòng ức chế của cao chiết trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Chủng vi sinh vật thử nghiệm	Đường kính vòng ức chế (mm)		
	Gentamicin	Luteolin	Cao EtOAc
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	11	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	13	16
MRSA	21	11	15
<i>E. coli</i>	22	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	-	15
<i>Salmonella enterica</i>	23	-	12

trong lớp gian bào giúp chống đỡ tác động của các chất kháng vi sinh vật.

Theo Lv và cộng sự (2009), cấu trúc của luteolin ảnh hưởng trực tiếp lên tính thấm của màng tế bào vi khuẩn [7]. Trong nghiên cứu hoạt động kháng khuẩn của luteolin trên *S. aureus*, Wang và cộng sự (2010) chỉ ra rằng, luteolin ảnh hưởng đến tính thấm của tế bào vi khuẩn nhưng

không phá hủy tính toàn vẹn của màng [8].

4. Kết luận

Luteolin được phân tách từ cao ethyl acetate có khối lượng 0.094g, đạt hiệu suất 0.004% tính theo dược liệu khô. Luteolin cho khả năng kháng oxy hóa gần bằng với vitamin C trong khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và thể hiện sự ức chế trên các chủng vi khuẩn Gram (+) thử nghiệm ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu được Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh tài trợ trong khuôn khổ đề tài mã số C2018-20-19. Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ phương tiện và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn, KMT. (2019). Thành phần sơ bộ hóa thực vật và một số hoạt tính sinh học của phần trên mặt đất thuộc cây Huyền tinh *Tacca leontopetaloides* (L) Kuntze, *Tạp chí Công Thương*, 11, 13-19.
2. Sreejayan N. (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids, *Arzneimitt. Forsch*, 46, 169-171.
3. Lalitha M. K. (2011). *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vellore, Tamil Nadu, India: Department of Microbiology, Christian Medical College.
4. Nguyễn, KPP. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
5. Park, Y. et. Al. (2007). 1H and 13C-NMR data of hydroxyflavone derivatives. *Magnetic Resonance in chemistry*, 45(8), 674-679.
6. Nazari, Q. A. (2013). Protective effect of luteolin on an oxidative-stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *Journal of pharmacological sciences*, 122(2), 109-117.

7. Lv, P. C. (2009). Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *European journal of medicinal chemistry*, 44(2), 908-914.

8. Wang, Q. (2010). Antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 50(9), 1180-1184.

Ngày nhận bài: 5/9/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 5/10/2021

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/10/2021

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN KIM MINH TÂM

2. LÊ XUÂN TIẾN

3. TRẦN MINH THỤC VI

4. LAI THỊ MỸ TIÊN

Khoa Kỹ thuật Hóa học

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

A FLAVONOID FROM *TACCA LEONTOPELALOIDES* (L.) KUNTZE AERIAL PARTS

● **NGUYEN KIM MINH TAM**¹

● **LE XUAN TIEN**¹

● **TRAN MINH THUC VI**¹

● **LAI THI MY TIEN**¹

¹Faculty of Chemical Engineering
Ho Chi Minh City University of Technology
Vietnam National University - Ho Chi Minh City

ABSTRACT:

Tacca leontopetaloides (L.) Kuntze tubers have been used for years in An Giang Province as a source of starch. Previous researches on *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze aerial parts have revealed that the ethyl acetate extract from this plant has the highest *in vitro* bioactivities. From this extract, luteolin was isolated. The chemical structure was determined by ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectroscopy.

Keywords: *Tacca leontopetaloides*, starch, An Giang Province, vitamin C.