

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY KINH GIỚI Ở VIỆT NAM

Đến tòa soạn 20-3-2017

Trần Phúc Đạt

Trường Đại học Lâm Nghiệp Hà Nội

Đỗ Thị Việt Hương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Chu Nhật Huy

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam

Phùng Thị Thanh Hương

Khoa Tự Nhiên, Đại học Hoa Lư, Ninh Bình

SUMMARY

STUDY ON THE CHEMICAL COMPONENTS AND BIOACTIVITIES OF *ELSHOLTZIA CILIATA* IN VIETNAM

Thirty four compounds were identified in both n-hexane (EH) and ethyl acetata (EE) extracts of Elsholtzia ciliata, including fatty acids (both saturated fatty acids and unsaturated fatty acid), terpenoids and steroids by GC-MS. The total phenolic and flavonoid contents in EH and EE extract were investigated, the results showed that total phenolic index were 79,20 and 48,98 mg galic acid /100g dry sample; total flavonoid index were 23,15 mg và 10,42 mg catechin/100g dry sample. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of both n-hexane (EH) and ethyl acetata (EE) extracts were over 256 ppm while Acarbose (reference) with IC₅₀ of 176,86 ppm.

Keyword(s): *Elsholtzia ciliata, chemical constituents, total phenolic, total flavonoid, enzyme α -glucosidase.*

1. MỞ ĐẦU

Chi kinh giới (*Elsholtzia*) là chi thực vật thuộc họ Lamiaceae với khoảng 40 loài được công nhận, phân bố chủ yếu tại các quốc gia khu vực Đông Nam Á, Trung Quốc, Nga...[1,3]. Tại Việt

Nam, loài *Elsholtzia ciliate* (*E. ciliate*) được biết đến như một loại rau thơm, cũng như vị thuốc chữa bệnh. Kinh giới sao đen, tạo viên dùng làm thuốc chữa cảm cúm, chảy máu cam ở trẻ em. Kinh giới tươi dùng cũng gừng hoặc hương

nhu, ngải cứu dùng làm thuốc xông [2]. Các thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy kinh giới có khả năng kháng virus, kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, bảo vệ cơ tim [4-7]. T.G.Hul và các cộng sự nghiên cứu thấy sự khác nhau về các thành phần hóa học trong tinh dầu các phần thân, lá và hoa của loài *E. ciliate*; theo đó, lá của loài *E. ciliate* có lượng terpenoid cao có khả năng hạn chế hoạt động của sáu loại vi khuẩn trong nghiên cứu [5]. Mặc dù đã có những nghiên cứu về thành phần hóa học, cũng như hoạt tính sinh học của loài *E. ciliata* tại một số quốc gia như Trung Quốc, Nga nhưng tại Việt Nam thì vẫn chưa có những nghiên cứu cụ thể về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây kinh giới đang được dùng phổ biến ở Việt Nam. Trong công trình này, nhóm tác giả mong muốn khảo sát thành phần hóa học của cây kinh giới của Việt Nam, đồng thời các thí nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và khảo sát mức độ ảnh hưởng của dịch chiết cây kinh giới với enzyme α -glucosidase của kinh giới cũng được tiến hành.

2. THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Lấy mẫu nghiên cứu

Mẫu thực vật tươi được thu thập từ siêu thị địa phương vào tháng 9 năm 2015. Mẫu thực vật được xác định là cây kinh giới (*Elsholtzia ciliate*). Lá và thân kinh giới được rửa sạch bằng nước, tráng bằng nước cất khử ion, được phơi khô cho ráo nước trong bóng râm, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 45°C, cuối cùng được xay thành bột mịn.

2.2. Chuẩn bị dịch chiết

1,5 kg nguyên liệu khô được ngâm trong dung môi metanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng, ba ngày lọc lấy dịch chiết một lần. Cô quay loại bỏ dung môi ở áp suất thấp (Büchi, Rotavapor R215). Tiến hành chiết dịch metanol với hai dung môi có độ phân cực khác

nhau: n-hexan và etylacetat. Các phần chiết này được cô quay ở áp suất thấp để loại bỏ dung môi thu được các cặn chiết tương ứng ký hiệu là: cặn chiết n-hexan, ký hiệu là EH - 5,6 gram; cặn chiết etylacetat, ký hiệu là EE - 15,5 gram.

2.3. Phân tách các phân đoạn

Các cặn chiết được phân tách thành các phân đoạn trên cột sắc ký nhồi silicagel. Tiến hành gradient với các hỗn hợp dung môi khác nhau và triển khai sắc ký lớp mỏng TLC để gom các phân đoạn giống nhau: cặn chiết EH, n-hexan/etylacetat (20:1→1:20, v/v), thu được 7 nhóm phân đoạn, ký hiệu EH1-EH7; cặn chiết EE n-hexan/etylacetat/axit acetic (20:1:1→1:20:1, v/v), thu được 8 nhóm phân đoạn, ký hiệu EE1-EE8.

2.4. Khảo sát định tính các nhóm phân đoạn trên hệ thống GC/MS

Một lượng nhỏ của từng nhóm phân đoạn được hòa tan trong dung môi aceton. Điều kiện làm việc của thiết bị GC/MS (Agilent-6890N/5973i, MSD 6890; cột tách mao quản HP-5MS 30m x 0.25mm ID, 0.25 μ m): khí mang He (99.999%); thể tích mẫu bơm 1 μ l, chế độ bơm split (15:1); nhiệt độ injector là 250°C; nhiệt độ detector là 280°C; chương trình nhiệt độ lò: 50°C giữ trong 2 phút, tăng 40°C/phút đến 250°C tổng thời gian chạy là 60 phút. Năng lượng ion hóa 70 eV, chế độ làm việc scan (0.5 giây) ở vùng m/z 45-550. Sắc đồ chạy GC của phân đoạn EH2 được trình bày ở Hình 1. Các thành phần hóa học có trong mẫu được nhận dạng bằng cách so sánh phổ khối lượng MS của các chất với phổ MS của các chất chuẩn có trong hai thư viện phổ Wiley 7n.1 and NIST.

2.5. Khảo sát hoạt tính sinh học

Xác định tổng hàm lượng phenolic

Xác định tổng lượng phenolic bằng phương pháp phân tích với thuốc thử

Folin- Ciocalteux [8] Lấy chính xác 1 mL dịch chiết hoặc dung dịch chuẩn của axit galic (nồng độ: 60, 80, 100, 120 và 140 mg/L) vào bình định mức 25 mL đã có sẵn 9 mL nước cất. Thêm 1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteux lắc đều. Sau 5 phút, thêm 10 mL dung dịch Na₂CO₃ 7% vào hỗn hợp. Định mức bằng nước cất. Bình định mức được giữ ở nhiệt độ phòng 90 phút. Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 750 nm. Tổng lượng phenolic được tính bằng mg axit galic (GAE)/100 g khối lượng nguyên liệu khô ban đầu.

Xác định tổng hàm lượng flavonoid

Lấy chính xác 1mL dịch chiết hoặc dung dịch chuẩn catechin (nồng độ 60, 80, 100, 120, 140 mg/L) vào bình định mức có chứa 4 mL nước cất. Thêm 0,3 mL dung dịch NaNO₂ 5%. Sau 5 phút, thêm chính xác 0,3 mL dung dịch AlCl₃ 10%. Ở phút thứ 6 thêm 2 mL dung dịch NaOH 1M. Định mức bằng nước cất. Lắc đều và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 510 nm. Tổng lượng flavonoid được xác định bằng số mg catechin/100 g khối lượng nguyên liệu khô ban đầu.

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện trên đĩa 96 giếng với tổng thể tích phản ứng là 200 μ l/giếng. Mẫu thử được pha loãng bằng DMSO 100% hoặc nước cất vô trùng đến nồng độ cuối cùng trong phản ứng là 256; 64; 16; 4; 1; 0,25 μ g/ml. Acarbose được sử dụng làm chất tham khảo [9,10].

Các thành phần phản ứng bao gồm: 40 μ l đệm phosphate 100 mM pH 6,8; 25 μ l α -glucosidase 0,4 U/ml; 10 μ l mẫu thử; 25 μ l *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside 2,5 mM.

Ở mẫu đối chứng âm, mẫu thử được thay bằng đệm phản ứng. Thí nghiệm

được ủ ở nhiệt độ 37° C. Sau 30 phút, phản ứng được dừng bằng 100 μ l Na₂CO₃. Độ hấp thụ của phản ứng được xác định trên máy Tecan GENios với bước sóng 405 nm (A).

Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử được xác định bằng công thức:

$$\text{Độ ức chế (\%)} = [A_{(\text{đối chứng âm})} - A_{(\text{mẫu thử})}] / A_{(\text{đối chứng âm})} \times 100\%$$

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) là nồng độ chất thử ức chế 50% hoạt động của enzyme α -glucosidase.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học

Thành phần hóa học có trong dịch chiết của cây kinh giới được gieo trồng ở Việt Nam được liệt kê trong bảng 1. Kết quả phân tích GC-MS nhận biết được 34 hợp chất với 7 axit béo, 4 flavonoid, 20 terpenoid và steroid và một số hợp chất khác. Thành phần chính gồm terpenoid và steroid như phytol (35,42%), β -sitosterol (15.18%) và nerolidol (9.07%).

Bảng 1. Thành phần hóa học trong dịch chiết kinh giới

TT	Hợp chất	Thành phần %
1	phytol	35,42
2	β -sitosterol	15,18
3	nerolidol	9,07
4	farnesol	9,01
5	limonene	7,99
6	(Z)- β -farnesene	6,58
7	α -pinene	3,19
8	β -caryophyllene	2,76
9	geraniol	2,14
10	p-cymene	1,80
11	1,8-cineole	1,41
12	Selinene	0,94
13	8,11-octadecadienoic acid	0,84
14	palmitic acid	0,74
15	2,3-octadecadienoic acid	0,64
16	α -humulene	0,45
17	heneicosylic acid	0,29
18	sabinene	0,28
19	β -cubebene	0,25

TT	Hợp chất	Thành phần %
20	β -bisabolene	0,22
21	linoleic acid	0,19
22	oleic acid	0,19
23	germacrene B	0,16
24	β -pinene	0,11
25	eicosanoic acid	0,07
26	t-murolol	0,04
27	(Z)- β -ocimene	0,04
28	1-Octen-3-ol	<0,01
29	3-octanol	<0,01
30	3-octanone	<0,01
31	acacetin	v
32	apigenin	v
33	luteoin	v
34	5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone	v

(“v”: chất phân tích dạng vết)

Axit oleic, axit linoleic, axit octadecadienoic và acid 8,11-octadecadienoic là bốn axit béo không no được tìm thấy trong mẫu nghiên cứu. Axit oleic đã được chứng minh là có tác dụng trong việc làm chậm lại sự phát triển của bệnh tim, thúc đẩy quá trình sản sinh ra các chất chống oxy hóa trong cơ thể [11]. Palmatic axit, heneicosylic axit, ecosanoic axit là các axit béo no được nhận dạng trong mẫu cây kinh giới. Một nghiên cứu trên chuột bị gây bệnh béo phì cho thấy, khi bổ sung 20% Palmatic acid vào khẩu phần ăn của chuột trong một thời gian dài cho thấy sự thay đổi ở hệ thần kinh trung ương trong việc điều tiết insulin và làm giảm sự cảm giác thèm ăn tự nhiên [12]. Acacetin, apigenin, luteoin and 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone là 4 flavonoid được tìm thấy trong dịch chiết cây kinh giới ở dạng vết. Apigenin là một hợp chất được sử dụng nhiều trong công nghiệp dược phẩm dùng trong điều trị ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng [13,14].

3.2. Tổng hàm lượng Phenolic

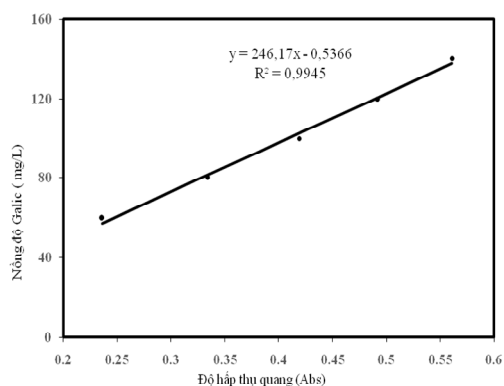
Hàm lượng phenolic trong dịch chiết kinh giới được tiến hành tương tự, kết quả thu được như Hình 2. Kết quả thực

nghiệm cho thấy, các hợp chất phenolic đều có thể tan vào trong etylacetat và n-hexan.

Ta có thể dự đoán các dịch chiết từ hai dung môi này đều có khả năng chống oxy hóa. Chỉ số tổng phenolic của dịch chiết etylacetat và n-hexane tương đối cao, lần lượt là 79,20 và 48,98 mg axit galic/100g nguyên liệu khô.

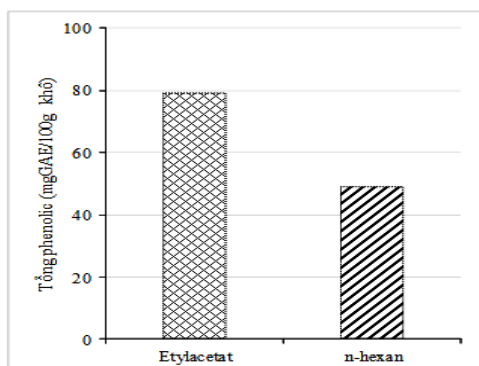
Bảng 2. Kết quả độ hấp thụ quang trong thí nghiệm khảo sát hàm lượng phenolic

Nồng độ galic (mg/l)	60	80	100	120	140
Độ hấp thụ quang	0,236	0,334	0,419	0,492	0,561



Hình 1. Đường chuẩn phenolic

Ta có thể dự đoán các dịch chiết từ hai dung môi này đều có khả năng chống oxy hóa. Chỉ số tổng phenolic của dịch chiết etylacetat và n-hexane tương đối cao, lần lượt là 79,20 và 48,98 mg axit galic/100g nguyên liệu khô. Tổng lượng phenolic của loài *E. ciliata* trong nghiên cứu này nhiều hơn so với loài *E. densa* trong nghiên cứu của Misba Khan và cộng sự với tổng lượng cao nhất là trong dịch chiết etanol 50% là 77,5 mg. Mặc dù vậy, khi so sánh với loài *E. cilata* trong nghiên cứu của Xiangping Liu và cộng sự lại thấp hơn rất nhiều [15,16].



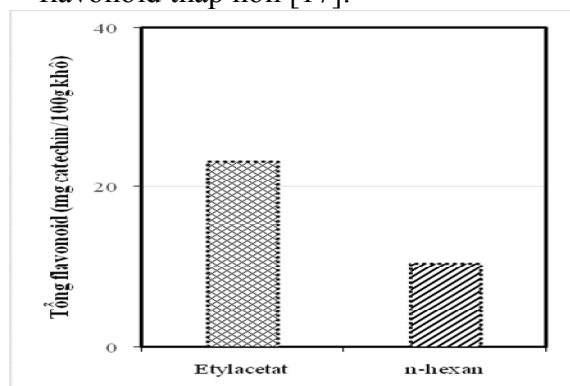
Hình 2. Tổng phenolic của các dịch chiết từ kinh giới

3.3. Tổng hàm lượng flavonoid

Bảng 3. Kết quả độ hấp thụ quang trong thí nghiệm khảo sát hàm lượng phenolic

Nồng độ Catechin (mg/l)	60	80	100	120	140
Độ hấp thụ quang	0,236	0,334	0,419	0,492	0,561

Phương trình xác định tổng lượng flavonoid bằng chất chuẩn: $y = 312,84x + 3,897$ (giá trị $R^2 = 0,984$). Kết quả xác định tổng lượng flavonoid của hai dịch chiết lần lượt là 23,15 mg và 10,42 mg catechin/100 g mẫu khô (Hình 3). Kết quả cho thấy sự phù hợp với tổng lượng phenolic. Có thể nhận thấy sự phân bố của các flavonoid trong etylacetat cao hơn so với n-hexan. So sánh với hàm lượng flavonoid trong loài *E. blanda* theo nghiên cứu của O. Gangarani Devi, thì loài *E. ciliata* có tổng hàm lượng flavonoid thấp hơn [17].



Hình 3. Tổng lượng flavonoid trong dịch chiết kinh giới.

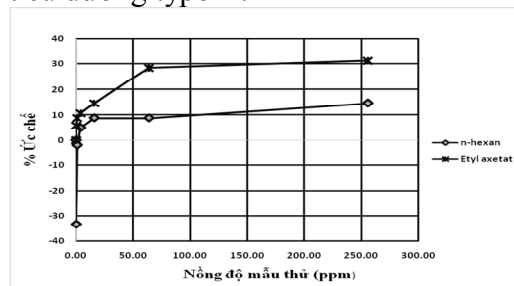
3.4. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Cặn chiết etyl axetat và n-hexan đóng vai trò là mẫu thử được khảo sát hoạt tính tại các giá trị nồng độ là 0; 0,25; 1,0; 4,0; 16; 64; 256 ppm. Kết quả độ hấp thụ quang thu được như bảng 3:

Bảng 4. Kết quả độ hấp thụ quang trong thí nghiệm khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Nồng độ chất ức chế (ppm)	etyl axetat		n-hexan	
	Abs	% Ức chế	Abs	% Ức chế
0.00	0.102	0	0.102	0
0.25	0.096	5.88	0.136	-33.33
1.0	0.093	8.82	0.104	-1.96
4.0	0.091	10.78	0.097	4.90
16	0.087	14.71	0.093	8.82
64	0.073	28.43	0.093	8.82
256	0.070	31.37	0.087	14.71

Giá trị ức chế 50% của mẫu thử thu được qua đồ thị sự phụ thuộc của nồng độ mẫu thử với phần trăm ức chế. Giá trị IC_{50} của chất tham chiếu arcabose là 175,89 ppm. Từ kết quả khảo sát đối với cả hai cặn chiết etyl axetat và n-hexan của kinh giới cho thấy khả năng ức chế của enzym α -glucosidase khá thấp, với nồng độ của vượt quá 256 ppm nhưng vẫn chưa đạt được khả năng ức chế 50%. Điều này chứng tỏ, cả hai cặn chiết của kinh giới đều có tiềm năng rất thấp cho tác dụng điều trị bệnh tiểu đường type II.



Hình 4. Đồ thị khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy,

loài kinh giới ở Việt Nam là nguồn cung cấp các chất chống oxy hóa rất tiềm năng, có thể sử dụng cây kinh giới để sản xuất các loại trà thảo mộc có tác dụng an thần, cải thiện sự lão hóa của cơ thể, hỗ trợ điều trị các bệnh do sự oxy trong cơ thể gây nên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi. (1999) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, 611-613.
2. Võ Văn Chi. (2000) *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học, 520-523.
3. Z.Guo, Z.Liu, X.Wang, W.Liu, R.Jiang, R. Cheng, G.She. (2012) *Elsholtzia: Phytochemistry and biological activities*. Chemistry central journal, vol 6.
4. A.Liu, S.M.Y. Lee, Y.Wang, G.H.Du. (2007) *Elsholtzia: review of tradutuibak uses, chemistry and pharnacology*. J. of Chin. Pharm. Scien., vol 2, 73-78.
5. Tian Guang-hui. (2013) *Chemical constituents in essential oils from Elsholtzia ciliata and their antimicrobial activities*. Chinese herbal medicines, vol 5(2), 104-108.
6. Elena A. Korolyuk, Wilfried Konig, Alexey V.Tkachev. (2002) *Composition of essential oil of Elsholzia ciliata (Thunb.) Hyl. From the Novosibirsk region, Russia*. Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya, vol 1, 31-36.
7. Hu HB, Zheng XD, Hu HS, Zhang YQ. (2006) *Studies on chemical constituents from Elsholzia bodinieri vaniot in Ganzu. China*. J. Baoji Univ Arts Sci. Vol 26, 196-199.
8. Marinova D., Ribarova F., Altanassova. (2005) *Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables*. Journal of the university of Chemical Technology and Metallurgy, vol 40, 255-260.
9. Haimin Chen, Xiaojun Yan, Wei Lin, Li Zheng, Weiwei Zhang. (2004) *A*

New Method for Screening α -Glucosidase Inhibitors and Application to Marine Microorganisms. Pharmaceutical Biology, 42(6), 416–421.

10. Hakamata W, Kurihara M, Okuda H, Nishio T, Oku T. (2009) *Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information*. Curr. Top. Med. Chem., 9(1), 3-12.
11. Lukas S., Georg H. (2012) *Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses*. Nutrients, 4(12), 1989-2007.
12. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre AL, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, Niswender K, Irani BG, Holland WL, Clegg DJ. (2009) *Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents*. J. of Clin. Invest. 119 (9), 2577–2587.
13. Shukla S., Bhaskaran N., Babcook MA., Fu P., MacLennan G.T., Gupta S. (2014) *Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway*. Carcinogenesis, 35(2), 452-60.
14. Margaret A. G., Allison F. V., Shelley S. T., Bernard R., Linda T.E., Susan E. H., Daniel W. C. (2009) *Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study*. Int. J. Cancer, 124(8), 1918-1925.
15. Misa K., Showkat A.G., Ishfak H.W., Bashir A.G., Akbar M., Mohmmad A.A., Akhter H.,M., Rabia H. (2012) *Free radical Scavenging activity of Elsholtzia densa*. J. of Acupuncture and Meridian studies, vol 5, 104-111.
16. Xiangping L., Jia J., Lei Y.,

Fengjian Y., Hongshuang G., Chunjian Zhao, Lin Zhang and Yuangang Zu (2012), "Evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts and fractionation of different parts of *Elsholtzia ciliata*", *Molecules*, vol 17, pp. 5430-5441.

17. O. Gangarani Devi, T. Chand Singh, O. Ibeton Devi, E. J. Singh. (2016) *Phytochemical analysis of six aromatic plants. International journal of scientific research*, vol 5, pp. 389-391.

PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC SẢN PHẨM(tiếp theo tr. 127)

13. Salleh, N. H. M., Daud, M. Z. M., Arbain, D., Ahmad, M. S., and Ismail, K. S. K. (2011) *Optimization of alkaline hydrolysis of paddy straw for ferulic acid extraction, Industrial Crops and Products* 34, 1635-1640.

14. Liu, Z., Wang, J., Shen, P., Wang, C., and Shen, Y. (2006) *Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from Radix Angelicae sinensis, Separation and Purification Technology* 52, 18-21.

15. Torre, P., Aliakbarian, B., Rivas, B., Domínguez, J. M., and Converti, A. (2008) *Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis, Biochemical Engineering Journal* 40, 500-506.

16. Zhao, S., Yao, S., Ou, S., Lin, J., Wang, Y., Peng, X., Li, A., and Yu, B. *Preparation of ferulic acid from corn bran: Its improved extraction and purification by membrane separation, Food and Bioproducts Processing*.

17. Bhalerao, U. T., Chaudhuri, A., Das, P. K., and Kaimal, T. N. B. (1999) *Process for the isolation of oryzanols from crude dark acid oil (rice bran), Google Patents*.

18. Hayashi, C., Kato, K., Minami,

S., Nomura, E., Taniguchi, H., and Tsuno, T. (1994) *Method of manufacturing ferulic acid, Google Patents*.

19. Krishna, A. G. G., Khatoon, S., Shiela, P. M., Sarmandal, C. V., Indira, T. N., and Mishra, A. (2001) *Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil, Journal of the American Oil Chemists' Society* 78, 127-131.

20. Cho, J.-Y., Lee, H. J., Kim, G. A., Kim, G. D., Lee, Y. S., Shin, S. C., Park, K.-H., and Moon, J.-H. (2012) *Quantitative analyses of individual γ -Oryzanol (Steryl Ferulates) in conventional and organic brown rice (Oryza sativa L.), Journal of Cereal Science* 55, 337-343.

21. Weon, J. B., Ma, J. Y., Yang, H. J., and Ma, C. J. (2012) *Simultaneous determination of ferulic acid, hesperidin, 6-gingerol and glycyrrhizin in Insam-pa-dok-san by HPLC coupled with diode array detection, Journal of Analytical Chemistry* 67, 955-959.

22. Santos, H. M., Lodeiro, C., and Capelo-Martínez, J.-L. (2009) *The Power of Ultrasound, In Ultrasound in Chemistry*, pp 1-16, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.