

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HOÁ HỌC THỰC VẬT CỦA HẠT XAY NHUNG *DIALIUM COCHINCHINENSIS* PIERRE

Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 22/3/2022; Ngày phản biện 29/3/2022; Chấp nhận đăng 15/4/2022

Liên hệ Email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.02.296>

Tóm tắt

Xay nhung (*Dialium cochinchinensis* Pierre) là loài cây đặc hữu của Việt Nam, được sử dụng như thực phẩm, gỗ và thuốc trong y học dân tộc. Tuy nhiên đến nay trong nước vẫn chưa có các dữ liệu khoa học xác thực về hoạt tính sinh học của cây này. Trong bài này, thành phần hóa thực vật của hạt xay nhung đã được nghiên cứu và kết quả cho thấy có sự hiện diện của alkaloids, coumarin, flavonoids, polyphenols, saponin, đường khử, glycoside tim và polyuronid trong hạt xay nhung. Nhóm hợp chất polyphenols và flavonoids đã được bán định lượng bằng phản ứng Folin – Ciocalteu (F-C) và phản ứng tạo phức nhôm và kết quả cho thấy hàm lượng của hai thành phần này trong hạt lần lượt là $15,58 \pm 0,33$ mg GAE/g và $26,49 \pm 2,70$ mg RUE/g bột khô được liệu.

Từ khóa: *Dialium cochinchinensis*, flavonoids, Folin–Ciocalteu, hạt xay nhung, polyphenols

Abstract

INVESTIGATION OF PHYTOCHEMICAL FROM SEED OF *DIALIUM COCHINCHINENSIS* PIERRE

Dialium cochinchinensis Pierre is a Vietnamese native plant that is widely used as a source of wood, food, and material in folk medicine. There have been relatively few reports of bio-effects on these subjects thus far. The phytochemical constituents of *D. cochinchinensis* seed were identified in this article. These constituents included alkaloids, coumarin, flavonoids, polyphenols, saponin, reducting sugar, cardiac glycoside, and polyuronid. Additionally, the polyphenols and flavonoids contents were determined using the Folin–Ciocalteu (F-C) and aluminum complexation reactions at concentrations of $15,58 \pm 0,33$ mg GAE/g and $26,49 \pm 2,70$ mg RUE/g (d.w).

1. Đặt vấn đề

Việc sử dụng dược liệu trong các phương thức điều trị bệnh đã được sử dụng rất lâu đời với nhiều loài dược liệu được sử dụng. Song hiện tại y học dân tộc vẫn gặp nhiều

thách thức về cơ sở khoa học cho việc sử dụng chúng trong y học chính thống (Schmidt và nnk., 2007). Các cây thuốc có chứa các thành phần hoạt tính sinh học chữa bệnh đã được chứng minh là có giá trị như một liệu pháp trị bệnh chính hoặc sử dụng kết hợp (Halberstein, 2005). Thực vật có khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp đã được đánh giá về tiềm năng chữa bệnh, bao gồm alkaloid, coumarin, saponin và flavonoid, trong đó, flavonoid có thể được biết đến nhiều nhất do đặc tính chống oxy hóa của chúng (Havsteen, 2002). Gần đây, cây dược liệu dần trở thành đối tượng nghiên cứu chính trong các đề tài và dự án về hoạt tính sinh học với mục tiêu tìm kiếm nguồn cung nguyên liệu tự nhiên cho các ngành dược phẩm, mỹ phẩm và các ngành công nghiệp liên quan khác mà có thể khai thác lâu dài và ít tác dụng phụ (Gupta, 2018). Việc khảo sát được thành phần hoạt tính có trong mẫu dược liệu có ý nghĩa lớn trong việc định hướng nghiên cứu và ứng dụng của chúng (Han và nnk., 2018).

Xay nhung, tên danh pháp là *Dialium cochinchinensis* Pierre, thường được sử dụng làm thuốc trong y học dân tộc trong các bài thuốc thuộc các dân cư khu vực Tây Nguyên (Đỗ Huy Bích và nnk., 2006). Từ năm 1996, xay nhung được đưa vào sách đỏ Việt Nam để phục vụ cho công tác bảo tồn và sử dụng hợp lý loài cây này (Đỗ Huy Bích và nnk., 2006). Hiện nay có khoảng 10 loài *Dialium* xuất hiện tại khu vực Đông Nam Á, riêng *D. cochinchinensis* là loài xuất hiện duy nhất tại Việt Nam (Hợp, 1997). Do đó, các công trình nghiên cứu khoa học trên đối tượng này là rất hạn chế. Xay nhung là loại thực phẩm được sử dụng như món ăn vật được nhiều bạn trẻ ưa chuộng do có vị chua ngọt kích thích vị giác đồng thời cũng là nguyên liệu dùng cho công nghiệp sản xuất rượu, thân cây dùng làm gỗ loại một, riêng phần hạt của quả xay vẫn chưa được sử dụng như một nguồn nguyên liệu. Mục tiêu của bài nghiên cứu này đặt ra là khảo sát một số thành phần mang hoạt tính sinh học có trong hạt của quả xay, đặt tiền đề cho các nghiên cứu về hoạt tính từ đó giúp hỗ trợ cho các công tác sử dụng, bảo vệ và nhân giống loài cây quý này trong tương lai.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và chuẩn bị nguyên liệu

Quả xay (*D. cochinchinensis* Pierre) được thu hái từ khu dự trữ sinh quyển Kon Chư Răng thuộc địa phận huyện K'Bang, tỉnh Gia Lai đầu mùa ra trái của cây, vào khoảng tháng 7 đến cuối tháng 8. Phần vỏ quả và thịt quả được loại bỏ, phần hạt xay được thu nhận lại sau khi mẫu thực vật được chuyển đến phòng thí nghiệm. Hạt xay được tiến hành làm sạch với nước cất hai lần và để ráo nước trước khi tiến hành sấy khô ở 45°C. Trong suốt quá trình sấy, hạt xay được kiểm tra khối lượng định kì hai lần một ngày nhằm đảm bảo hạt khô hoàn toàn. Mẫu hạt khô được tiến hành nghiền thành bột mịn và chia thành từng gói nhỏ để dự trữ -20°C cho tới khi sử dụng.

2.2. Định tính một số thành phần hoạt tính nổi bật

Quá trình định tính một số thành phần chuyển hoá thứ cấp được tiến hành theo mô tả của Ioan Ciulei và cộng sự (1993). Bột dược liệu được gói vào giấy whattman và tiến hành

soxhlet lần lượt qua ba loại dung môi có độ phân cực từ thấp đến cao ở điều kiện 40°C để thu được ba phân đoạn dịch chiết diethyl ether, ethanol và nước. Phản ứng định tính được tiến hành trên nghiệm thức nghiệm thức mẫu, nghiệm thức chứng âm, cụ thể như sau:

Định tính alkaloids (trên cả 3 phân đoạn): Nhỏ 2 giọt thuốc thử Wagner vào mẫu thử và quan sát hiện tượng đổi màu; Nhỏ 1-2 giọt HCl 5N lắc đều, bổ sung 2 giọt thuốc thử Mayer và quan sát hiện tượng tủa.

Định tính coumarin (trên phân đoạn diethyl ether, ethanol): Mẫu thử được nhỏ thành giọt thấm có đường kính từ 0,5-0,8cm trên giấy lọc whattman được cắt thành hình chữ nhật phù hợp với số lượng nghiệm thức, khoảng cách giữ hai giọt thấm là 0,5cm. Sau khi mẫu thử trên giấy lọc khô, soi giấy lọc dưới ánh sáng UV có bước sóng 365nm và quan sát hiện tượng phát quang.

Định tính Flavonoids (trên phân đoạn ethanol, nước): Quan sát hiện tượng tủa khi mẫu thử tiếp xúc với dung dịch kiềm NaOH 10% và đổi màu khi tiếp xúc dung dịch H₂SO₄ đậm đặc.

Định tính polyphenols (trên phân đoạn nước, ethanol): Nhỏ 3 giọt FeCl₃ 5% và quan sát hiện tượng đổi màu.

Định tính glycosides tim (trên phân đoạn ethanol, nước): Phản ứng Keller-Kiliani được tiến hành bằng cách nhỏ 2-3 giọt FeCl₃ (pha trong CH₃COOH) vào 500μl dịch chiết, đặt nghiêng ống nghiệm 45°, cho từ từ 500μl H₂SO₄ đậm đặc lên thành ống nghiệm. Quan sát sự tách lớp dung dịch và thay đổi màu giữ mặt phân cắt.

Định tính anthocyanin: Quan sát sự đổi màu của dung dịch chiết ở pH kiềm và acid hình thành bằng cách bổ sung HCl 10% và NaOH 10%.

Định tính saponin (trên phân đoạn nước, ethanol): Kiểm tra hiện tượng tạo bọt bền sau 15 phút khi lắc mẫu thử với nước.

Định tính đường khử (trên phân đoạn nước, ethanol): Phản ứng Fehling được tiến hành bằng cách bổ sung thuốc thử Fehling A và Fehling B vào mẫu với tỉ lệ 1:1:1. Dung dịch thủy hỗn hợp trong 10 phút và quan sát tủa đỏ bám đáy ống nghiệm.

Định tính acid hữu cơ (trên phân đoạn nước, ethanol): Quan sát hiện tượng tạo bọt khí khi bổ sung muối Na₂CO₃ vào mẫu thử.

Định tính polyuronide (trên phân đoạn nước): Bổ sung một thể tích ethanol 90% gấp 5 lần thể tích mẫu và quan sát hiện tượng tủa bông.

2.3. Định lượng hàm lượng polyphenols tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu.

Thuốc thử Folin-Ciocalteu là hỗn hợp của acid phosphotungstic và acid phosphomolybdic tham gia phản ứng với các gốc hydroxyl của hợp chất polyphenol có trong dịch chiết tạo thành cấu trúc oxid vonfram và molybden có màu xanh lam hấp thụ quang phổ cực đại tại 756nm. Quy trình định lượng được tiến hành theo mô tả của Marsha

J.Lewis được sửa đổi theo Nunzia Cicco và cộng sự (Cicco và nnk., 2011). 200 μ l thuốc thử F-C 100% được cho phản ứng với 200 μ l mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút. Bổ sung 1600 μ L Na₂CO₃ 5% và tiếp tục ủ hỗn hợp trong 20 phút ở 40°C. Đo độ hấp thụ quang phổ của dung dịch tại 765nm. Gallic acid được dùng làm chất chuẩn cho phản ứng với dãy nồng độ 0 đến 500 μ g/ml. Mẫu dịch chiết ở 1000 μ g/ml để tiến hành phản ứng và tính toán hàm lượng polyphenols.

2.4. Định lượng hàm lượng flavonoids tổng bằng phương pháp tạo phức với muối nhôm

Flavonoid được xác định nhờ vào khả năng tạo phức acid bền và có màu với ion Al³⁺ trong muối AlCl₃ hấp thụ quang phổ cực đại ở bước sóng 510nm. Quy trình tiến hành theo Samatha và cộng sự với sự thay đổi nhỏ về chất chuẩn cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm (Samatha và nnk., 2012). Đường chuẩn rutin 6 điểm nồng độ từ 0 đến 500 μ g/mL được chuẩn bị bằng cách pha loãng 500 μ l dung dịch chất chuẩn với 2ml nước cất hai lần sau đó bổ sung 150 μ l NaNO₂ 5%, hỗn hợp được trộn đều bằng máy vortex hoặc đảo ống mẫu từ 10-15 lần sau đó ủ tối 6 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp sau ủ được tiến hành tạo phức với Al³⁺ bằng cách bổ sung 150 μ l AlCl₃ 10%, vortex và tiếp tục ủ tối 6 phút ở nhiệt độ phòng. 2ml NaOH 4% (w/v) được bổ sung vào hỗn hợp sau đó là 200 μ l nước cất hai lần, hỗn hợp được trộn đều và ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ tại bước sóng 510nm. Mẫu dịch chiết ở nồng độ 1000 μ g/mL được tiến hành phản ứng và tính toán nồng độ.

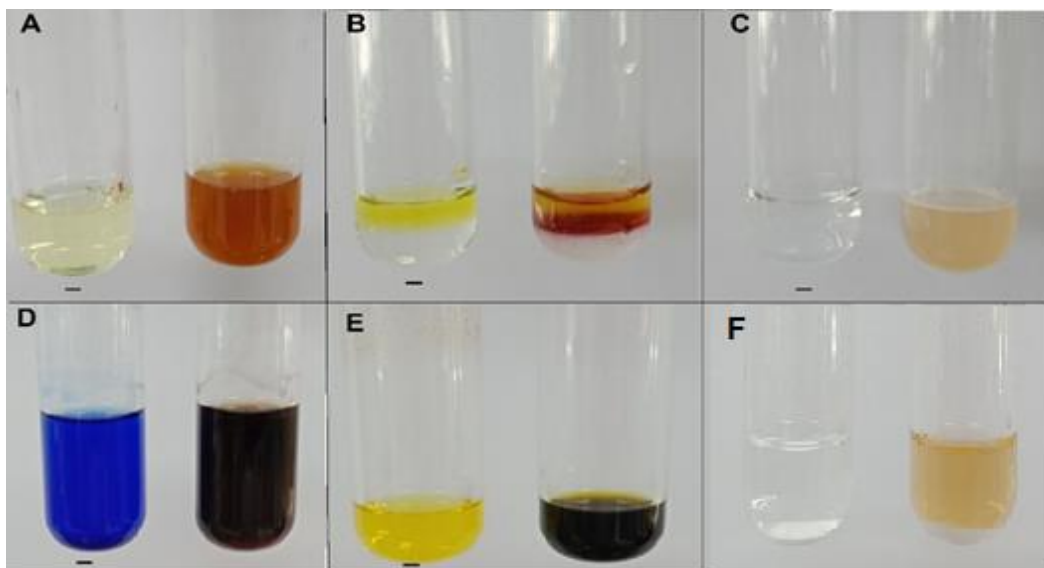
2.5. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành độc lập và lặp lại ít nhất 3 lần. Phương pháp hồi quy tuyến tính được tiến hành để xây dựng đường chuẩn cho định lượng polyphenols và flavonoids bằng phần mềm Graphpad Prism 9.0.0. Kết quả so sánh được tiến hành bằng kiểm định T-test với giá trị alpha là 0,05.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hoạt tính có trong mẫu dược liệu

Các phản ứng hoá học được sử dụng phù hợp cho từng phân đoạn cao chiết theo phương pháp tách của Cuilei nhằm xác định chính xác thành phần xuất hiện. Theo đó, hợp chất coumarin có cấu trúc vòng thơm nên không hoà tan tốt trong dung môi phân cực mạnh vì vậy không cần thiết tiến hành trên phân đoạn nước (Poumale và nnk., 2013). Tương tự vậy, các hợp chất polyphenol, saponin, đường khử, glycoside tim và acid hữu cơ cũng là các hợp chất không tan tốt trong ether vì vậy việc kiểm tra trên dịch chiết này là không cần thiết. Các thí nghiệm được thiết kế gồm ba ống nghiệm riêng biệt là phản ứng của mẫu, phản ứng của dung môi dùng làm đối chứng âm và một ống nghiệm chứa dịch chiết nhằm loại bỏ ảnh hưởng của màu dịch chiết trong phản ứng về mặt cảm quan (Hình 1). Đối với các hợp chất định tính bằng hai phản ứng, cần có kết quả dương tính cả hai phản ứng thì mới xác nhận là dương tính

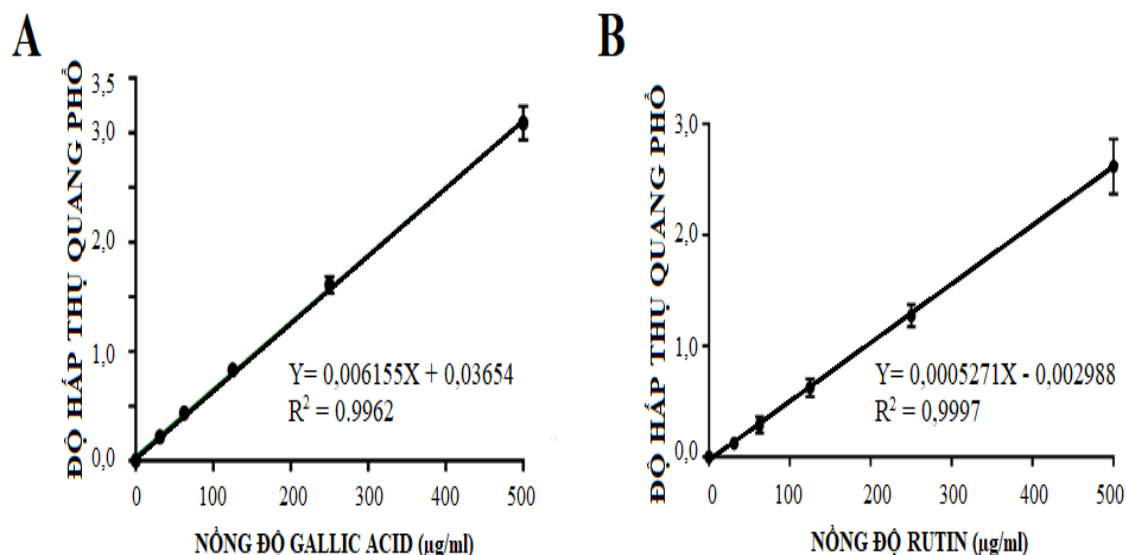


Hình 1. Kết quả định tính Alkaloid (thuốc thử Mayer - A); Glycosid tim (B); Saponin (C); Đường khử (D); Polyphenol (E) và acid hữu cơ (F)

Mặc dù không đóng vai trò mang ý nghĩa sống còn trong đời sống của thực vật, song các hợp chất chuyển hoá thứ cấp lại giữ nhiều vai trò quan trọng trong hoạt động xua đuổi hoặc dẫn dụ côn trùng cần thiết cho quá trình thụ phấn hoặc phát tán hạt, bên cạnh đó chúng còn tham gia vào các hoạt động tương tác của thực vật với loài sinh vật khác (Wink, 2008). Nhờ mang cấu trúc không no cùng sự có mặt của nhiều nhóm thế, đa số các hợp chất thứ cấp có thể tham gia như nguồn cung điện tử trong các phản ứng oxi hoá khử (Chiocchio và nnk., 2021). Vai trò khử của các hợp chất này thực tế mang lại nhiều lợi ích trong hoạt động tế bào như duy trì cân bằng thế oxi hoá – khử từ đó ngăn ngừa sự khởi phát và tiến triển của ung thư (Kasote và nnk., 2015). Việc xác định được sự có mặt của các thành phần hoạt tính mang ý nghĩa lớn trong các nghiên cứu sàng lọc (Sasidharan và nnk., 2011). Kết quả ghi nhận được sự đa dạng trong thành phần hoạt tính trong cao chiết hạt xay nhưng bao gồm alkaloids, coumarin, flavonoids, polyphenols, saponin, đường khử, glycoside tim và polyuronid. Sự đa dạng trong thành phần hoá học trong lá cây xay nhưng cũng lần đầu tiên được phân tích cụ thể bởi tác giả Vũ Thị Huyền cùng các cộng sự trong báo cáo về 5 hợp chất phát hiện và xây dựng cấu trúc gồm lupeone, β -sitostenone, β -sitosterol, daucosterol và dihydrokaempferide (Vu Thi Huyen, 2021).

3.2. Kết quả định lượng sơ bộ thành phần polyphenols và flavonoids trong mẫu được liệu

Thành phần polyphenols là một nhóm các hợp chất lớn và có độ đa dạng cao trong thực vật với hơn 8000 cấu trúc hợp chất được ghi nhận trong đó khoảng 50% là các flavonoids, nhóm hợp chất này mang lại nhiều hoạt tính về mặt sinh học đặc biệt là khả năng cho điện tử từ đó dễ dàng tham gia nhiều con đường tín hiệu trong tế bào (Ghani, 2020). Bằng các phản ứng hoá học, hàm lượng polyphenols và flavonoids được xác định theo đường lượng Gallic acid và Rutin từ đường chuẩn được thiết lập (Hình 2).



Hình 2. Phương trình đường chuẩn Gallic acid (A) và Rutin (B)

Kết quả hồi quy tuyến tính xác định hàm lượng polyphenols và flavonoids trong mẫu cao chiết hạt xay lần lượt là $133,50 \pm 2,87$ mg GAE/g và $227,00 \pm 23,20$ mg RUE/g cao chiết, trong đó GAE và RUE là đương lượng Gallic acid và Rutin, tương đương với $15,58 \pm 0,33$ mg GAE/g và $26,49 \pm 2,70$ mg RUE/g bột khô được liệu. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenols có trong bột hạt xay là khá cao khi so sánh với các sản phẩm thương mại nổi tiếng về hàm lượng polyphenol như trà xanh (khoảng từ $14,32 \pm 0,45$ đến $21,02 \pm 1,54$ mg GAE/g) (Anesini và nnk., 2008). Hàm lượng polyphenols và flavonoids cao phản ánh tiềm năng về hoạt tính sinh học của cao chiết hạt xay nhưng có thể mang lại. Nhiều bằng chứng khoa học cho thấy tác động tích cực của các hợp chất polyphenol thực vật trong điều trị ung thư, kháng khuẩn, kháng oxi hóa, kháng viêm mạnh cùng với khả năng nhắm đích một số con đường sinh hóa của tế bào (Zhou và nnk., 2016). Trong hoạt động kháng oxi hóa, các hợp chất flavonoid có thể tham gia như tác nhân trực tiếp thu gom các gốc oxi hóa nguồn gốc oxy (ROS) hay tạo phức với cation kim loại hoặc tham gia gián tiếp bằng việc ức chế enzyme pro-oxidase như NADPH oxidase, lipoxygenase,... hoặc kích hoạt hệ thống phòng thủ stress oxi hóa như GDx, SOD, GSH,.. (Kopustinskiene và nnk., 2020). Trên thực tế hàm lượng flavonoids được tính toán cao hơn hàm lượng polyphenols trong cao chiết thực vật vẫn thường xảy ra trong các nghiên cứu khác (Shi và nnk., 2018). Sự chênh lệch này được xem xét như một yếu điểm trong phản ứng sinh hoá định lượng nói chung khi còn nhiều yếu tố ngoại cảnh có thể tác động, bên cạnh đó hệ thống chất chuẩn vẫn chưa đại diện hoàn toàn được cho tất cả các hợp chất có thể có trong nhóm hợp chất quan tâm (Badhani và nnk., 2015; Bencze và nnk., 1957). Tuy nhiên cho tới hiện tại, các phản ứng sinh hoá như F-C hay tạo phức kim loại vẫn là các phương pháp phổ biến để định lượng sơ bộ thành phần hoá học thực vật cần thiết cho sự so sánh trong nghiên cứu sàng lọc hay định hướng nghiên cứu chuyên sâu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anesini, C., Ferraro, G. E., & Filip, R. (2008). Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J Agric Food Chem*, 56(19), 9225-9229.
- Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications [10.1039/C5RA01911G]. *RSC Advances*, 5(35), 27540-27557.
- Bencze, W. L., & Schmid, K. (1957). Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins. *Analytical Chemistry*, 29(8), 1193-1196.
- Cicco, N., & V. L. (2011). The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 840-848
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., & Poli, F. (2021). Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules*, 26(2).
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, . . . Toàn, T. (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập 1*. Nxb Khoa Học và Kỹ Thuật.
- Ghani, U. (2020). Chapter three - Polyphenols. In U. Ghani (Ed.), *Alpha-Glucosidase Inhibitors* (pp. 61-100). Elsevier.
- Gupta, R. (2018). Cosmeceutical role of Medicinal plants / Herbs: A Review on commercially available Cosmetic ingredients. *Vol 3*, 70-73.
- Halberstein, R. A. (2005). Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol*, 15(9), 686-699.
- Han, K., Zhang, L., Wang, M., Zhang, R., Wang, C., & Zhang, C. (2018). Prediction Methods of Herbal Compounds in Chinese Medicinal Herbs. *Molecules*, 23(9).
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 96(2-3), 67-202.
- Hợp, T. (1997). *100 loài cây bản địa tại Tây Nguyên*.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982-991.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- Poumale, H. M. P., Hamm, R., Zang, Y., Shiono, Y., & Kuete, V. (2013). 8 - Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 261-300). Elsevier.
- Samatha, T., Shyamsundarachary, R., Srinivas, P., & Nanna, R. S. (2012). *Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of Oroxylum indicum L.Kurz* (Vol. 5).

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 8(1), 1-10.
- Schmidt, B. M., Ribnicky, D. M., Lipsky, P. E., & Raskin, I. (2007). Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 360-366.
- Shi, P., Du, W., Wang, Y., Teng, X., Chen, X., & Ye, L. (2018). Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. *Food science & nutrition*, 7(1), 148-154.
- Vu Thi Huyen, D. T. T. A., Nguyen Thi Hien. (2021). Chemical constituents of leaves *Dialium cochinchinense* Pierre. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 1131-1136.
- Wink, M. (2008). Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. *Natural Product Communications*, 3.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.