



NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC CÁC CHẤT TRONG CAO PETROLEUM ETHER VÀ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CỦA LÁ CÂY MẮM ỎI (*AVICENNIA MARINA*)

Lê Thanh Phước¹ và Lê Hương Nhi¹

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 14/09/2012

Ngày chấp nhận: 25/03/2013

Title:

Study on chemical components, biological activities from the petroleum ether extract and nutrition components of the leaves of *Avicennia marina*

Từ khóa:

Lá Mắm ổi *Avicennia marina*, thành phần hóa học, hoạt tính sinh học, thành phần dinh dưỡng, lupeol, betulin

Keywords:

Avicennia marina, chemical components, biological activities, nutrition components, lupeol, betulin

ABSTRACT

Study on the chemical ingredients from the leaves of *Avicennia marina*, collected in Dong Hai district, Bac Lieu province, we have isolated and identified two compounds: lupeol ($C_{30}H_{50}O$) and betulin ($C_{30}H_{50}O_2$) from the petroleum ether extract. Structures of these compounds had been elucidated by modern spectroscopic methods: 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT NMR and compared with published data. In this study, we tested and determined some biological activities of lupeol and betulin. As result, lupeol showed significant activity against human Hepatocellular carcinoma cells with an IC_{50} value of 93,53 $\mu g/mL$. Betulin was against human Lung cancer cells with an IC_{50} value of 25,84 $\mu g/mL$. Furthermore, when we tested nutrition of the leaves of *Avicennia marina*, we found out a lot of amino acids with high content, this explained why shrimp farmers have been using the leaves of *Avicennia marina* as natural food for shrimp. The study has been continued.

TÓM TẮT

Khảo sát thành phần hoá học lá cây Mắm ổi được thu hái tại huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu, chúng tôi đã cô lập và định danh được hai chất: lupeol và betulin từ dịch chiết petroleum ether. Cấu trúc hóa học các chất này đã được làm sáng tỏ dựa vào những phương pháp phổ hiện đại 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT NMR và so sánh với tài liệu đã công bố. Trong đó, chúng tôi đã khảo sát và tìm ra những hoạt tính sinh học của lupeol và betulin. Kết quả là, lupeol có khả năng kháng tế bào ung thư gan với IC_{50} có giá trị là 93,53 $\mu g/mL$. Betulin cũng có khả năng chống lại tế bào ung thư phổi với IC_{50} có giá trị là 25,84 $\mu g/mL$. Hơn thế nữa, khi tiến hành nghiên cứu thành phần dinh dưỡng của lá Mắm, chúng tôi nhận thấy lá Mắm có nhiều amino acid với hàm lượng cao, điều này lý giải tại sao người nông dân nuôi tôm lại sử dụng lá Mắm làm nguồn thức ăn tự nhiên cho tôm. Nghiên cứu vẫn đang được tiếp tục.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mắm ổi có tên khoa học là *Avicennia marina*, thuộc họ Mắm (Verbenaceae) (Phạm

Hoàng Hộ, 2000). Cây Mắm có thể nhanh chóng sinh sản, lớn lên và phát triển tốt ở vùng giáp ranh giữa đất và nước mặn. Vai trò lớn nhất của loài Mắm là cố định đất, do bộ rễ được

cấu trúc vững chắc ăn sâu xuống đất, nó có sức chịu đựng được sóng và gió, chịu được nước mặn ngập quanh năm. Theo một số tài liệu dân gian trên thế giới, lá của cây Mắm trị bệnh đau dạ dày, bệnh nấm ở phụ nữ, trị các loại ung nhọt (P. Thirunavukkarasu *et al.*, 2010). Vỏ của cây Mắm dùng để làm thuốc trị ghẻ và chữa bệnh phong, chữa vết thương hoại thư, diệt chấy rận, diệt giun sán và có tác dụng ngừa thai (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Nó còn có khả năng chữa bệnh ung thư. Vì vậy, cây Mắm không phải là chỉ là loại cây giúp chống lở đất, cung cấp gỗ tạp mà còn là cây thuốc quý cần được bảo vệ và nghiên cứu sâu hơn. Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học trên lá Mắm ổi. Ở nước ta, người dân thường có thói quen sử dụng lá Mắm để trị bệnh theo kinh nghiệm dân gian tuy nhiên vẫn chưa có những nghiên cứu về thành phần hóa học của lá Mắm. Cho nên việc nghiên cứu về thành phần hóa học của lá Mắm ổi (*Avicennia marina*) trong điều kiện hiện nay là cần thiết đối với hóa học và đời sống.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Lá cây Mắm ổi được thu hái tại xã Định Thành, huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu, chọn những lá tươi đã trưởng thành, sau đó rửa sạch, cắt nhỏ, phơi khô.

Phương pháp: Chiết hoạt chất: Lá Mắm ổi được ngâm trong cồn 96°, phần dịch chiết cô quay loại dung môi thu được cao cồn. Sau đó lấy cao cồn chiết với dung môi petroleum ether (PE) cô quay loại dung môi thu được cao PE.

Phân lập chất từ cao PE: thực hiện quá trình sắc ký cột, chất hấp phụ là silica gel, theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký bản mỏng (thin layer chromatography TLC), giải ly cột bắt đầu từ PE sau đó tăng độ phân cực bằng dung dịch PE với ethyl acetate (EtOAc) theo tỷ lệ thích hợp. Thuốc thử hiện vết là dung dịch sulfuric acid (H₂SO₄) 10% trong methanol (MeOH) và sấy bản mỏng ở 110°C. Các phân đoạn thể hiện R_f giống nhau trên TLC được gom lại. Tiến hành sắc ký cột tiếp tục đối với các phân đoạn có vết đặc trưng và khối lượng đáng kể, sau

đó tinh chế các chất đã cô lập thu được các chất sạch.

Xác định cấu trúc của chất tinh khiết đã phân lập được: sử dụng các phương pháp phổ nghiệm: ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT NMR và các tài liệu liên quan để xác định cấu trúc các chất phân lập được. Phổ NMR được đo trên máy Bruker Advance 500 MHz (Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội).

Silica gel dùng cho sắc ký cột pha thường cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel KG 60 F₂₅₄. Các hóa chất tinh khiết khác có xuất xứ từ Trung Quốc.

2.2 Hoạt tính kháng ung thư

Phép thử được thực hiện tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Xác định hoạt tính kháng ung thư đối với 3 dòng tế bào Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma - ung thư gan), Lu (Lung cancer - ung thư phổi) và RD (Rhabdo sarcoma - ung thư màng tim) được cung cấp bởi viện vệ sinh dịch tễ trung ương.

Phương pháp xác định: Theo phương pháp của Skehan và *ctv.* (1990) và Likiwitayawuid và *ctv.* (1993), chất chuẩn chứng dương tính: Dùng chất chuẩn có khả năng diệt tế bào: Ellipiticin, Vinblastine hoặc Taxol pha trong dimethyl sulfoxide (DMSO), đọc trên máy ELISA ở bước sóng 495- 515 nm, xác định CS% (% tế bào sống sót) và IC₅₀.

2.3 Thành phần dinh dưỡng

Việc xác định thành phần dinh dưỡng trong lá cây Mắm ổi được thực hiện tại Phòng thí nghiệm chuyên sâu - Đại học Cần Thơ. Thành phần dinh dưỡng được xác định là hàm lượng amino acid có trong lá Mắm.

Phương pháp xác định: sử dụng phương pháp Faast Amino Acid Analysis Hydrolysates bằng liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) với qui trình và bộ kit do Phenomenex ZE: faastTM, Hoa Kỳ cung cấp. Các thành phần amino acid mỗi gồm có arginine, histidine,

isoleucine, leucine, lysine, hydroxylysine, methionine, phenylalanine, tryptophan, valine, alanine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, glycine, serine, proline, tyrosine, cysteine và threonine.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả sắc ký cột

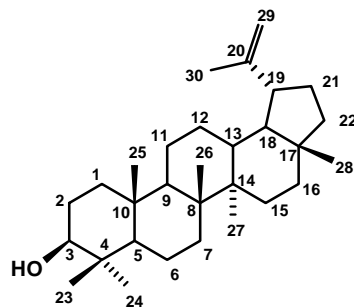
Từ 10,0 g cao petroleum ether tiến hành sắc ký cột thường với hệ dung môi giải ly PE:EtOAc và EtOAc:MeOH có độ phân cực tăng dần. Kết quả ở phân đoạn PE:EtOAc = 100:0 thu được 1,007 g một hợp chất tinh khiết có tinh thể hình kim màu trắng đục, hiện vết trên TLC cho một vết tròn màu hồng tím có $R_f = 0,43$ (PE:EtOAc = 75:25) khi dùng thuốc thử là H_2SO_4 10% trong MeOH. Ký hiệu hợp chất này là PHUOC-NHI-01. Ở phân đoạn PE:EtOAc = 95:5 kết quả thu được 0,278 g một hợp chất tinh khiết, có dạng tinh thể màu trắng, hiện trên TLC một vết tròn màu nâu xám có $R_f = 0,47$ (CH_2Cl_2 :EtOAc = 90:10). Ký hiệu hợp chất này là PHUOC-NHI-02.

3.2 Kết quả dữ liệu phổ

Hợp chất PHUOC-NHI-01

Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,68 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-5); 0,76 (s, 3H, CH_3 -24); 0,79 (s, 3H, CH_3 -28); 0,83 (s, 3H, CH_3 -25); 0,94 (s, 3H, CH_3 -27); 0,97 (s, 3H, CH_3 -23); 1,03 (s, 3H, CH_3 -26); 1,68 (s, 3H, CH_3 -30); 1,87-1,96 (m, H-21); 2,37 (m, 1H, $J = 6,0$ và 5,5 Hz, H-19); 3,19 (dd, 1H, $J = 5,0$ và 4,5 Hz, H-3); 4,57 (br s, 1H, H-29); 4,69 (br s, 1H, H-29).

So sánh phổ 1H -NMR của hợp chất PHUOC-NHI-01 với phổ 1H -NMR của hợp chất PHUOC-TR-01 (lupeol) của Lê Thanh Phước và Phạm Thị Thùy Trang, 2010 và kết hợp với những dữ kiện trên thì PHUOC-NHI-01 được nhận danh là lupeol (Hình 1). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của M.S. Ali *et al.*, 2007.



Hình 1: Công thức cấu tạo của lupeol

Lupeol có thể tiêu diệt tế bào ung thư đầu, cổ và ngăn chặn sự lan truyền của chúng một cách hiệu quả. Hợp chất lupeol có hoạt tính gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), A-431, H-4IIE (El Deed K.S. *et al.*, 2003). Thí nghiệm trên chuột do Đại học Hong Kong thực hiện cho thấy hợp chất trên chứng tỏ tác dụng hữu hiệu nhất khi được áp dụng kèm theo phương pháp hóa trị và hầu như không gây tác dụng phụ. Thậm chí, lupeol có thể giảm kích thước khối u một cách nhanh chóng và hiệu quả hơn cả những loại thuốc đang được sử dụng để trị ung thư như cisplatin. Theo các nhà khoa học, lupeol đã ngăn chặn protein NFkB, vốn giúp tế bào ung thư hồi phục và tăng trưởng. Bên cạnh đó, lupeol giúp người bệnh giữ nguyên trọng lượng, không gây sút cân trầm trọng như khi sử dụng phương pháp hóa trị. Ngoài ra lupeol còn là chất chống oxy hoá và kháng viêm (Fernandez M.A. *et al.*, 2001).

Theo kết quả nghiên cứu của Lê Thanh Phước và Phạm Thị Thùy Trang, hàm lượng lupeol trong rễ cây Mắm ôi khá cao (khoảng 0,21%), trong khi đó hàm lượng lupeol trong lá cây Mắm ôi chiếm khoảng 0,23%. Do đó, chúng ta có thể tách được chất lupeol với lượng lớn nhằm mục đích chữa bệnh vì cây Mắm có rất nhiều, dễ thu hái và xử lý.

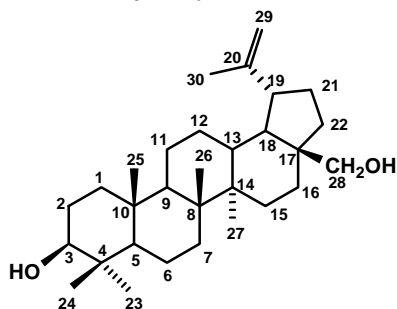
Hợp chất PHUOC-NHI-02

Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,68 (t, 1H, H-5); 0,76 (s, 3H, CH_3 -24); 0,82 (s, 3H, CH_3 -26); 0,98 (s, 3H, CH_3 -27); 0,97 (s, 3H, CH_3 -23); 1,02 (s, 3H, CH_3 -25); 1,68 (s, 3H, CH_3 -30); 2,38 (dt, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-19); 3,18 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz, H-3); 3,33 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H-28); 3,80 (dd, 1H, $J = 11,0$ và 1,5 Hz, H-

28); 4,58 (t, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-29); 4,68 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-29)

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3), δ (ppm): δ 14,8 (C-27); 15,4 (C-24); 16,0 (C-26); 16,1 (C-25); 18,3 (C-6); 19,1 (C-30); 20,9 (C-11); 25,2 (C-12); 27,1 (C-15); 27,4 (C-2); 28,0 (C-23); 29,2 (C-16); 29,8 (C-21); 34,0 (C-22); 34,3 (C-7); 37,2 (C-10); 37,3 (C-13); 38,7 (C-1); 38,9 (C-4); 40,9 (C-8); 42,7 (C-14); 47,8 (C-17, C-19); 48,7 (C-18); 50,4 (C-9); 55,3 (C-5); 60,6 (C-28); 79,0 (C-3); 109,7 (C-29); 150,5 (C-20).

Từ những dữ kiện trên thì hợp chất ký hiệu là PHUOC-NHI-02 được nhận danh là betulin (Hình 2). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Seyed Abdolmajid Ayatollahi *et al.*, 2009.



Hình 2: Công thức cấu tạo của betulin

Betulin là một hợp chất được tìm thấy phổ biến ở thực vật, có tính kháng khuẩn, kháng viêm, kháng sốt rét và kháng ung thư. Betulin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng HeLa và Hep-G2 với cùng giá trị IC_{50} là 40 $\mu\text{g/mL}$. Betulin cũng thể hiện hoạt tính chống HIV với giá trị IC_{50} là 6,1 $\mu\text{g/mL}$ (El Deed K.S *et al.*, 2003). Các nghiên cứu của Miura còn cho thấy betulin có tác dụng bảo vệ gan và làm giảm khả năng gây độc của CdCl_2 ở nồng độ thấp 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Tác dụng bảo vệ của betulin đặc biệt rõ ràng khi thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào Hep-G2 trước khi cho CdCl_2 . Hơn nữa, khi tế bào Hep-G2 được ủ với betulin trước khi cho CdCl_2 thì tác dụng độc hại của cadmium được giảm, cơ chế có thể là do betulin thúc đẩy sự tổng hợp các protein có tác dụng bảo vệ các tế bào Hep-G2 khỏi ảnh hưởng của CdCl_2 (N. Miura *et al.*, 1999).

3.3 Kết quả khảo sát hoạt tính kháng ung thư

Theo kết quả trên thì hợp chất lupeol vừa cô lập được (kí hiệu PHUOC-NHI-01) có hoạt tính kháng ung thư gan (Hep-G2) với giá trị IC_{50} là 93,53 $\mu\text{g/mL}$ và hợp chất betulin (kí hiệu là PHUOC-NHI-02) có hoạt tính kháng ung thư phổi với giá trị IC_{50} là 25,84 $\mu\text{g/mL}$ (Lu). Như vậy, hoạt tính đối với dòng Hep-G2 của hợp chất lupeol (kí hiệu PHUOC-NHI-01) và hợp chất betulin (kí hiệu PHUOC-NHI-02) là yếu.

Bảng 1: Kết quả thử hoạt tính khả năng kháng ung thư của các chất

| STT | Tên mẫu | Kết quả: Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) của mẫu thử trên dòng tế bào | |
|-----|--------------|---|-----------|
| | | Lu | Hep-G2 |
| 1 | PHUOC-NHI-01 | Không thử | 93,53 |
| 2 | PHUOC-NHI-02 | 25,84 | Không thử |

3.4 Kết quả khảo sát thành phần dinh dưỡng

Protein là thành phần chất hữu cơ chính của cơ thể các loài thủy sản và các amino acid là thành phần cấu tạo nên protein. Có một số amino acid thiết yếu động vật thủy sản không thể tổng hợp được mà chúng phải lấy từ thức ăn như: arginin, histidin, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenyllalanine, threonine, tryptophan và valine. Lá Mắm có chứa đầy đủ các loại amino acid thiết yếu trên với hàm lượng mỗi loại khá cao. Thực tế, một số loại rau thường sử dụng trong chăn nuôi hiện nay như rau muống có hàm lượng amino acid thấp hơn so với lá Mắm, rau khoai lang không chứa các amino acid thiết yếu giống lá Mắm như arginin, histidin, isoleucine, leucine, phenyllalanine, threonine và valine (Nguyễn Công Khẩn *et al.*, 2007). Chính vì vậy, đã có một số nghiên cứu đưa lá Mắm vào làm thức ăn cho tôm với kết quả rất khả quan (trọng lượng tôm tăng lên đến 12,3% so với nuôi tôm bằng các loại thức ăn tự nhiên khác) vì lá Mắm có đầy đủ các loại amino acid thiết yếu cần thiết cho động vật thủy sản (S. Athithan and V. Ramadhas, 2000).

Bảng 2: Kết quả khảo sát thành phần amino acid trong lá Mắm

| STT | Tên chỉ tiêu | Phương pháp thử | Kết quả thử nghiệm % trong lá Mắm |
|-----|---------------|-----------------|-----------------------------------|
| 01 | Arginine | EZ: faast | 0,5259 |
| 02 | Serine | Amino Acid | 0,2479 |
| 03 | Glycine | Analysis of | 0,3988 |
| 04 | Threonine | protein | 0,2753 |
| 05 | Alanine | Hydrolysates | 0,4858 |
| 06 | Methionine | by LCMS | 0,0454 |
| 07 | Proline | (Phân tích | 0,3939 |
| 08 | Lysine | Amino Acid | 0,4424 |
| 09 | Aspartic acid | của protein | 0,7968 |
| 10 | Histidine | thủy phân | 0,3589 |
| 11 | Valine | bằng LCMS) | 0,9970 |
| 12 | Glutamic acid | | 0,9119 |
| 13 | Isoleucine | | 0,5679 |
| 14 | Leucine | | 0,3719 |
| 15 | Phenylalanine | | 0,3413 |
| 16 | Cystine | | 0,0311 |
| 17 | Tyrosine | | 0,2547 |

4 KẾT LUẬN

Trong quá trình khảo sát thành phần hóa học trong cao petroleum ether của lá cây Mắm ôi (thu hái tại huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu), bước đầu chúng tôi đã cô lập và định danh được hai chất lupeol và betulin. Khảo sát hoạt tính kháng ung thư thì lupeol có hoạt tính kháng ung thư gan (Hep-G2) và betulin có hoạt tính kháng ung thư phổi (Lu). Khảo sát thành phần dinh dưỡng trong lá Mắm thì các thành phần amino acid thiết yếu đều có trong lá Mắm với hàm lượng khá cao. Nhờ có hàm lượng amino acid cao hơn nhiều so với các loại thức ăn khác cho động vật thủy sản như: rau muống, rau khoai lang và các loại lá rừng khác nên lá Mắm ngày càng được các hộ nông dân nuôi tôm đưa vào làm thức ăn cho tôm với hiệu quả kinh tế rất cao. Tuy nhiên, nếu thả lá Mắm với mật độ quá dày sẽ làm cho lượng oxy hòa tan trong nước sẽ giảm đi và môi trường nuôi tôm sẽ bị ô nhiễm. Vì vậy, mật độ thả thế nào và bao nhiêu là thích hợp, thì cần có công trình nghiên cứu rộng và sâu hơn nữa.

Chính vì những lí do trên mà cây Mắm ôi nói riêng và các cây Mắm nói chung ngày càng được các nhà hóa học về hợp chất tự nhiên tiếp

tục nghiên cứu sâu sắc hơn về thành phần hóa học, thành phần dinh dưỡng và hoạt tính sinh học của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. El Deed K.S., Al-Haidari R.A., Mossa J.S., Abdel Monem A.A., 2003. Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*, *Journal Saudi Pharmaceutical*. 11 (4), 184-191.
2. Fernandez M.A., De las Heras B., Garcia M.D., Saenz M.T., Villar A., 2001. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpen lupeol, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (11), 1533-1539.
3. Lê Thanh Phước và Phạm Thị Thùy Trang, 2010. Khảo sát thành phần hóa học của rễ cây Mắm (*Avicennia marina*), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Số 15(b), 9-14.
4. M.S. Ali and S. Waseemuddin Ahmed Shehla Imam, Iqbal Azhar, M. Mohtasheemul Hasan, 2007. "Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus Indica* Linn", *J. Pharm. Sci.* Vol 20 (2), 125-127.
5. Nguyễn Công Khẩn, Hà Thị Anh Đào, Lê Hồng Dũng và Nguyễn Thị Lâm, 2007. Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam, NXB Y Học, 158-165.
6. N. Miura, Y. Matsumoto, S. Miyairi, S. Nishiyama, A. Naganuma, 1999. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells, *Molecular Pharmacology* 56 (6), 1324-1328.
7. Phạm Hoàng Hộ, 2000. Cây cỏ Việt Nam, NXB Trẻ, TP Hồ Chí Minh (II), 844-845.
8. P. Thirunavukkarasu, T. Ramanathan, L. Ramkumar and R. Shanmugapriya, 2010. Anti ulcer effect of *Avicennia officinalis* leaves in Albino Rats, *World Applied Sciences Journal* 9 (1), 55-58.
9. S. Athithan and V. Ramadhas, 2000. Bioconversion Efficiency and Growth in the White Shrimp, *Penaeus indicus* (Milne Edwards), Fed with Decomposed Mangrove Leaves, *The ICLARM Quarterly* Vol 23(1), 17-18.
10. Seyed Abdolmajid Ayatollahi, Asie Shojaii, Farzad Kobarfard, Mitra Nori, Mohammad Fathi and Mohammad Iqbal Choudhari, 2009. Terpens from aerial parts of *Euphorbia splendida*, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(9), 660-665.