

Khảo sát một số hoạt tính sinh học của loài địa tiền *Marchantia polymorpha* L. thu hái tại Đà Lạt, Lâm Đồng

Trần Quốc Tân, Lương Thiện Tâm, Phan Ngô Hoang, Quách Ngô Diễm Phương

Tóm tắt— Địa tiền *Marchantia polymorpha* L. được sử dụng trong y học dân gian Ấn Độ, Trung Quốc... để điều trị viêm loét, các vết thương hở, lợi tiểu... Hiện nay, thế giới đã có những nghiên cứu về các hoạt chất và hoạt tính sinh học của loài địa tiền này. Trong khi đó, các nghiên cứu về đài thực vật (thực vật không mạch) ở Việt Nam còn khá mới mẻ. Do đó, bài báo tập trung vào các hoạt tính sinh học và khảo sát sự hiện diện của một số nhóm hợp chất thứ cấp của các cao chiết từ loài *Marchantia polymorpha* L. thu hái tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Trong bốn phân đoạn (n-hexane, chloroform, ethyl acetate và ethanol) thì cao chiết chloroform có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn và ức chế tăng sinh dòng tế bào MCF-7 tốt nhất. Cao chiết ethyl acetate có khả năng ức chế enzyme tyrosinase và α -glucosidase tốt nhất. Các nhóm hợp chất thứ cấp hiện diện chủ yếu là phenolic, steroid và các dẫn xuất glycoside. Kết quả giúp làm rõ được một số ứng dụng trong điều trị của dân gian và những tiềm năng mới của loài địa tiền này.

Từ khóa— đài thực vật, địa tiền, *Marchantia polymorpha* L., bisbenzyl, Marchantin

1. GIỚI THIỆU

Marchantia polymorpha L. (viết gọn là *M. polymorpha* L.) là loài địa tiền điển hình thuộc ngành Rêu tản (Marchantiophyta), một trong ba ngành lớn của nhóm đài thực vật (thực vật không mạch) [3]. Cũng như hầu hết các loài trong nhóm đài thực vật, *M. polymorpha* L. mọc phổ biến ở những vùng có khí hậu mát mẻ, ôn hòa, ẩm ướt và cường độ ánh sáng thấp [16]. Từ lâu, chúng đã được sử dụng trong dân gian ở các nước Ấn Độ, Trung Quốc, dùng điều trị các trường hợp viêm, vết thương hở, vết cắn của côn trùng, rắn độc, lợi tiểu và một số chứng bệnh về

gan...[2]. Các hoạt tính sinh học của loài địa tiền này cũng đã được báo cáo trên thế giới gồm: kháng oxy hóa, kháng khuẩn, chống béo phì, kháng phân bào trên một số dòng tế bào ung thư, thư giãn cơ bắp... Các nghiên cứu chỉ ra rằng loài *M. polymorpha* L. thu hái ở những quốc gia khác nhau thường có những thành phần hóa học khác nhau [1].

Hiện nay trên thế giới, nhóm đài thực vật, đặc biệt là ngành địa tiền đang được nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học vì sự phong phú trong ứng dụng và giúp tìm ra các hợp chất mới có giá trị sinh học từ nhóm thực vật này. Tuy nhiên, ở Việt Nam, chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chúng. Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát sơ bộ thành phần hóa học và đánh giá một số hoạt tính sinh học như: khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, ức chế enzyme tyrosinase, enzyme α -glucosidase, kháng phân bào của loài *M. polymorpha* L. thu hái tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu địa tiền *M. polymorpha* L. được thu hái vùng ven Nam Thiên, phường 4, thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng (Hình 1). Mẫu địa tiền được phân loại dựa trên hệ thống của Crandall-Stotler và cộng sự [3], [4].



Hình 1. A: Địa tiền *Marchantia polymorpha* L. với các thể giao tử đực (hình dù) và giao tử cái (hình sao) đan xen. B: Các tản *M. polymorpha* L. với nhiều chén truyền thể

Ngày nhận bản thảo 24-11-2017, ngày chấp nhận đăng 17-01-2018, ngày đăng 20-11-2018

Trần Quốc Tân, Lương Thiện Tâm, Phan Ngô Hoang, Quách Ngô Diễm Phương – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

*Email: qndphuong@hcmus.edu.vn

Các chủng vi khuẩn: *Acetobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* do Bộ môn Vi sinh, Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM cung cấp.

Điều chế cao chiết phân đoạn

Phương pháp điều chế cao phân đoạn được thực hiện theo kỹ thuật chiết ngâm dầm (maceration) [18], 2, [12]. Mẫu sau khi thu hái được tách khỏi các loại đài thực vật khác và rửa sạch đất cát dưới vòi nước máy nhiều lần. Tiếp theo, phơi khô mẫu ở nhiệt độ 45°C đến khối lượng không đổi và xay nhuyễn tạo bột khô. Bột cây được ngâm lần lượt trong các dung môi có tính phân cực tăng dần: *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate và ethanol. Dịch chiết được lọc sau 48 giờ, tiếp tục ngâm thêm nhiều lần đến khi chiết kiệt. Dịch chiết cùng 1 phân đoạn được gộp chung và cô quay áp suất thấp để thu cao chiết.

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa

Đánh giá năng lực khử sắt của các phân đoạn [13]

Hút 1 mL dung dịch chất thử nghiệm vào ống nghiệm, tiếp tục bổ sung 2,5 mL dung dịch đệm phosphate 0,2 M pH 6,6 và lắc đều. Bổ sung thêm 2,5 mL dung dịch $K_3[Fe(CN)_6]$ 1% cho vào hỗn hợp trên. Phản ứng được ổn định ở 50°C, trong 20 phút. Sau khi làm nguội, hút 2,5 mL trichloroacetic acid 1% cho vào từng ống nghiệm trên. Ly tâm dung dịch ở điều kiện 7000 vòng/phút trong 2 phút, thu dịch nổi. Hút 1 mL dịch nổi vào từng ống nghiệm sạch riêng biệt, thêm 2 mL nước cất, 0,5 mL dung dịch $FeCl_3$ 1%. Lắc đều hỗn hợp trong vòng 5 phút. Ghi nhận kết quả độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm. Vitamin C (0,5 mg/mL) làm chứng dương, cao chiết phân đoạn được hòa tan trong đệm DMSO (dimethyl sulfoxide) 10% để đạt nồng độ ban đầu 2 mg/mL.

Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH [10]

Cao chiết phân đoạn được hòa tan trong ethanol 10% DMSO tạo thành một dãy nồng độ chất thử nghiệm khác nhau. Hút 0,5 mL chất thử nghiệm vào mỗi ống nghiệm riêng lẻ. Thêm lần lượt vào mỗi ống 3 mL ethanol tuyệt đối. Thêm vào 0,5 mL dung dịch DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,6 mM được pha trong ethanol tuyệt đối. Lắc đều hỗn hợp, ủ tối trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ (OD-optical density) ở bước sóng 517 nm. Chứng âm là ethanol 10% DMSO. Mẫu có độ hấp thụ bước sóng 517

nm càng cao thì khả năng trung hòa càng thấp và ngược lại. Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH được tính theo công thức:

$\% EC$ (Efficiency concentration) = $(1 - OD \text{ mẫu} / OD \text{ chứng âm}) \times 100$.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá thông qua phương pháp khuếch tán giếng thạch [9]. Vi khuẩn được hoạt hoá và nuôi cấy trong môi trường LB (Luria-Bertani broth) cho đến khi đạt được OD 625 nm $\geq 0,5$. Dịch vi khuẩn được điều chỉnh sao cho độ hấp thụ OD bước sóng 625 nm trong khoảng 0,1 đến 0,15, trải 100 μ L dịch vi khuẩn lên đĩa môi trường LB rắn. Đục các giếng thạch có đường kính 6 mm và đặt 50 μ L dung dịch chất thử nghiệm vào từng giếng. Chứng dương kanamycine có nồng độ 30 μ g/giếng, cao phân đoạn là 1 mg/giếng và chứng âm là nước cất chứa 10% DMSO.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase

Thí nghiệm được tiến hành dựa theo phương pháp của Nguyễn Thị Mỹ Hạnh và cộng sự năm 2017 [5]. 70 μ L dung dịch cao chiết được pha trong đệm potassium phosphate 50 mM (pH 6,8), DMSO 5% được nạp vào đĩa 96 giếng, 30 μ L dung dịch enzyme tyrosinase (124,61 U/mL). Hỗn hợp được ổn định ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó, bổ sung 110 μ L cơ chất L-tyrosine (2 mM). Tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm. Mẫu blank là mẫu không chứa enzyme và mẫu chứng âm là mẫu không chứa cao chiết. Phần trăm ức chế được tính theo công thức:

$\% IC$ (Inhibition concentration) = $[1 - (OD \text{ mẫu} - OD \text{ blank mẫu}) / (OD \text{ chứng âm} - OD \text{ blank âm})] \times 100$ (**)

Cao chiết các phân đoạn được chuẩn bị ở nồng độ 2 mg/mL và chứng dương là kojic acid 200 μ g/mL.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được tiến hành dựa trên phương pháp của Hogan và cộng sự (2010) [7]. 50 μ L dung dịch cao chiết được pha trong đệm sodium phosphate 100mM, (pH 6,8), DMSO 5 % được nạp lên đĩa 96 giếng, 40 μ L dung dịch enzyme α -glucosidase 0,2 U/mL, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng 20 phút. Tiếp tục bổ sung 40 μ L cơ chất *p*-NPG (*p*-nitrophenyl glucopyranoside) 5mM, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng 130 μ L dung dịch Na_2CO_3 0,2 M được đặt vào giếng để dừng phản ứng. Tiến

hành đo độ hấp thu 405 nm. Mẫu blank là mẫu không chứa enzyme, mẫu chứng âm là mẫu không chứa cao chiết. Phần trăm ức chế được tính theo công thức (**).

Cao chiết phân đoạn được so sánh khả năng ức chế enzyme α -glucosidase ở nồng độ 1 mg/mL. Mẫu chứng dương là acarbose nồng độ 10 mg/mL.

Khảo sát hoạt tính kháng phân bào trên dòng tế bào MCF-7

Thử nghiệm kháng phân bào được thực hiện bằng phương pháp sulforhodamine B (SRB) [11]. Tế bào ung thư vú MCF-7 sau 24 giờ nuôi cấy được trải lên đĩa 96 giếng để đạt mật độ 10^4 tế bào/100 μ L/giếng. Cắm ứng mẫu thử nghiệm ở nồng độ 100 μ g/mL, song song với mẫu chứng âm DMSO 0,25% và chứng dương là camptothecin 0,05 μ g/mL. Sau 48 giờ cắm ứng với chất thử nghiệm, tế bào được rửa và cố định bằng trichloroacetic acid 50%. Tiến hành nhuộm sulforhodamine B (SRB) 0,2 % trong 20 phút, rửa nhuộm bằng acetic acid 1% và hòa tan SRB bằng Tris 10 mM. Ghi nhận giá trị OD 492 nm và 620 nm. Tỷ lệ ức chế phân bào được tính theo công thức:

$$\% \text{ IC} = [1 - (\text{OD mẫu} / \text{OD chứng âm})] \times 100$$

Trong đó, giá trị OD mẫu và chứng âm được tính như bảng:

$$(\text{OD } 492 \text{ nm} - \text{OD } 620 \text{ nm}) \text{ mẫu} - (\text{OD } 492 \text{ nm} - \text{OD } 620 \text{ nm}) \text{ blank mẫu.}$$

Mẫu được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào có tỷ lệ ức chế phân bào ≥ 60 % ở nồng độ 100 μ g/mL.

Định tính sự hiện diện một số nhóm chất thứ cấp có trong cao chiết

Tiến hành các thí nghiệm định tính nhằm nhận diện các nhóm hợp chất tự nhiên có trong các phân đoạn bằng các thuốc thử: nhóm hợp chất phenol (FeCl_3 5%), quinone và coumarin (KOH 5%/Methanol), tannin (gelatin mặn), nhóm alkaloid (thuốc thử Wagner), flavonoid (H_2SO_4 đậm đặc, NaOH 1%/Ethanol, AlCl_3 2%/Ethanol, chỉ acetate 10%, thử nghiệm cyanidin Wilstatter với bột magnesium kim loại hoặc bột kẽm), terpenoid-steroid (Roseinheim và Salkowski), saponin (phản ứng tạo bọt trong dung dịch HCl 0,1N, NaOH 0,1N), dẫn xuất glycoside (thuốc thử Molisch) và các hợp chất lactone vòng 5 (thuốc thử Baljet) [12]. Thí nghiệm được tiến hành song song giữa mẫu cao chiết có nồng độ 2 mg/mL và mẫu chứng âm là ethanol 10% DMSO.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3 Service Pack 4 dành cho hệ điều hành Window, đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và số liệu trình bày dưới dạng: trung bình \pm độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức P (p-value) $< 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu hái và định danh

Mẫu địa tiền sau khi thu hái được định danh dựa trên khóa phân loại của Crandall và Stotler-cộng sự, cụ thể như sau:

Marchantia polymorpha L.

Giới: Plantae

Ngành: Marchantiophyta (Stotler & Crand. - Stotl.)

Lớp: Marchantiopsida (Cronquist, Takht. & W. Zimm.)

Bộ: Marchantiales (Limpr.)

Họ: Marchantiaceae (Lindl.)

Chi: *Marchantia* L.

Loài: *Marchantia polymorpha* L.

Tên tiếng Việt: địa tiền, địa tiền

Tên tiếng Anh: umbrella liverwort, marchantia liverwort

Loài địa tiền này được tìm thấy ở những vùng có khí hậu mát mẻ, ẩm ướt và cường độ ánh sáng thấp [16]. Theo Asakawa và cộng sự (2013), *M. polymorpha* L. có chứa terpenoid, đặc biệt là các hợp chất sesqui- và diterpene. Ngoài ra còn một số nhóm hợp chất khác gồm: flavonoid glycoside, hợp chất aromatic và các bis(bi)benzyl [1]. Các hợp chất này được lưu trữ trong các khoang chứa đặc biệt được gọi là thể dầu. Ở Ấn Độ, Trung Quốc và một số nước châu Âu, trong các bài thuốc dân gian, người ta sử dụng loài địa tiền này cho các trường hợp bị viêm, được sử dụng như thuốc lợi tiểu, dùng cho các bệnh về gan, vết thương hở, ung nhọt, gãy xương, côn trùng và rắn cắn [2].

Điều chế cao chiết

Các phân đoạn được điều chế theo các dung môi có độ phân cực tăng dần. Sau khi cô quay chân không và hút ẩm đến khối lượng không đổi, ethyl acetate là phân đoạn cho khối lượng cao và hiệu suất thu cao nhất (Bảng 1). Qua đó, có thể đánh giá về tỷ lệ các nhóm hợp chất: cây chứa nhiều các hợp chất có tính phân cực khá, tiếp đến là các nhóm chất có tính phân cực trung bình và mạnh, cuối cùng là các hợp chất có tính không phân cực.

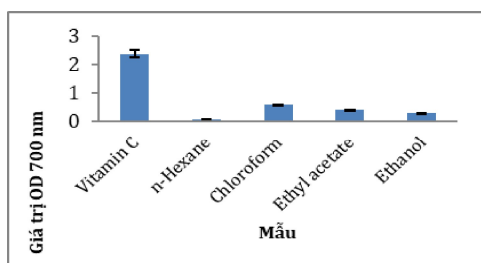
Bảng 1. Hiệu suất thu cao của các phân đoạn thu được từ *M. polymorpha* L.

Dung môi	Khối lượng cao (g)	Hiệu suất thu cao so với khối lượng khô (330,54 g) (%)
<i>n</i> -Hexane	0,67	0,20
Chloroform	1,66	0,50
Ethyl acetate	4,96	1,42
Ethanol	1,30	0,39

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của các cao phân đoạn

Đánh giá năng lực khử sắt

Kết quả khảo sát năng lực khử cho thấy các loại cao chiết đều có khả năng kháng oxy hóa. Trong đó, phân đoạn chloroform có năng lực khử cao nhất ($0,58 \pm 0,03$), theo sau là ethyl acetate ($0,39 \pm 0,03$), ethanol ($0,28 \pm 0,02$). Phân đoạn *n*-hexane thể hiện năng lực khử yếu nhất trong bốn phân đoạn ($0,08 \pm 0,00$). Ở nồng độ 2 mg/mL các cao chiết không có sự nổi trội về khả năng khử sắt so với chứng dương vitamin C ($2,38 \pm 0,12$) (Hình 2).



Hình 2. Biểu đồ thể hiện năng lực khử của các cao phân đoạn và vitamin C thông qua độ hấp thụ OD 700nm

Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của các cao phân đoạn

Các loại cao chiết cùng chứng dương vitamin C được tiến hành xác định khả năng trung hòa gốc tự do DPPH thông qua EC₅₀ (Half-maximal efficiency concentration). Tỷ lệ phần trăm trung hòa gốc tự do thông qua cơ chế làm mất màu dung dịch DPPH được thể hiện qua hình 3, với vitamin C (tại dãy nồng độ 0; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125 µg/mL) và cao chiết phân đoạn chloroform, ethyl acetate và ethanol (tại dãy nồng độ 0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL).

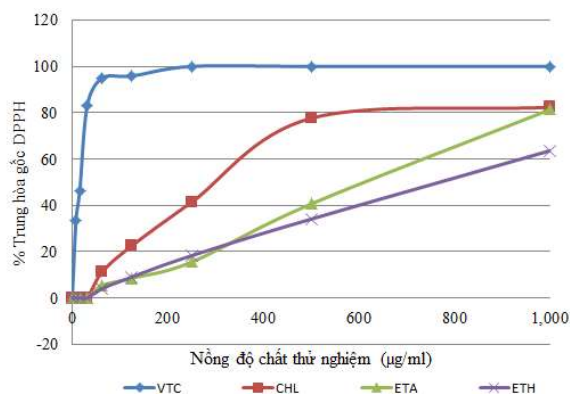
Kết quả ở Bảng 2 cho thấy có sự trùng khớp với kết quả của thí nghiệm khảo sát năng lực khử sắt: cao chloroform là cao có EC₅₀ thấp nhất ($358,35^b \pm 8,68$ µg/mL), phân đoạn này có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn ba phân đoạn còn lại. Năng lực trung hòa gốc tự do của *n*-hexane rất yếu với EC₅₀ > 5000 µg/mL. Có thể thấy rằng các hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa tập trung ở các phân đoạn có tính phân cực trung bình và mạnh, nổi bật nhất là phân đoạn chloroform.

Remya Krishnan và cộng sự (2013) đã tiến hành khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của *M. polymorpha* L. thông qua nhiều mô hình khác nhau. Nhóm nghiên cứu nhận định rằng loài địa tiền này là một nguồn dược liệu tự nhiên tiềm năng vì có hoạt tính trung hòa các gốc tự do, bảo vệ DNA và chứa các hợp chất đóng vai trò chất cho electron tự thân giúp chặn đứng chuỗi oxy hóa khử [14]. Dù khả năng kháng oxy hóa ở mức trung bình nhưng vẫn không thể phủ nhận tiềm năng kháng oxy hóa của loài địa tiền này.

Bảng 2. Các giá trị EC₅₀ của 4 phân đoạn cao chiết và vitamin C

	Vitamin C	<i>n</i> -Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Ethanol
EC ₅₀ (µg/mL)	17,76 ^a ± 3,63	> 5000	358,35 ^b ± 8,68	578,35 ^c ± 4,66	693,82 ^d ± 65,26

Các ký tự a, b, c, d thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với mức P (p-value) < 0,05.



Hình 3. Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH của các mẫu thử nghiệm. Các ký hiệu: VTC (vitamin C), CHL (chloroform), ETA (ethyl acetate) và ETH (ethanol).

Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn với hàm lượng cao chiết của mỗi giống thạch là 1 mg, chứng dương kanamycin là 30 μg . *n*-Hexane là phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn yếu nhất, chỉ có khả năng kháng lại 2 chủng là *Staphylococcus aureus* và *Acetobacterium* sp. (Bảng 3). Ba phân đoạn còn lại (chloroform, ethyl acetate và ethanol) đều có khả năng kháng tốt đối với tất cả chủng vi khuẩn. Trong đó, hai phân đoạn có tính phân cực trung bình là chloroform và ethyl acetate cho thấy khả năng kháng tốt nhất. Đường kính vòng vô khuẩn của hai loại cao chiết này dao động từ khoảng 6 đến 11 mm tương đương với đường kính của chứng dương (từ khoảng 7 đến 12 mm). Các chủng vi khuẩn gram dương dễ dàng bị tác động hơn với các chủng gram âm. Asakawa và cộng sự (2013) nhấn mạnh khả năng kháng khuẩn,

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của các loại cao chiết và kanamycin trên 7 chủng vi khuẩn khác nhau

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)				
	Kanamycin	<i>n</i> -Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Ethanol
<i>E. coli</i>	11,33 ^a ± 0,76	-	9,17 ^{bc} ± 1,53	10,00^b ± 1,00	8,50 ^c ± 0,00
<i>P. aeruginosa</i>	10,83 ^a ± 0,76	-	6,83 ^b ± 0,58	6,67 ^b ± 0,29	6,33 ^b ± 0,76
<i>S. typhi</i>	9,17 ^a ± 1,44	-	10,00^a ± 0,00	10,17^a ± 1,53	8,97 ^a ± 0,45
<i>B. subtilis</i>	11,00 ^a ± 1,50	-	11,17^a ± 2,57	10,83 ^{ab} ± 1,26	8,00 ^{bc} ± 1,73
<i>S. aureus</i>	12,00 ^a ± 0,00	2,33 ^d ± 2,00	11,33^{ab} ± 1,12	11,17^{ab} ± 1,04	9,50 ^b ± 1,00
<i>Acetobacterium</i> sp.	9,83 ^a ± 1,04	2,00 ^b ± 2,00	10,33 ^a ± 1,53	10,00 ^a ± 1,00	8,67 ^a ± 1,04
<i>Streptococcus</i> sp.	7,116 ^{ab} ± 0,763	-	8,00^a ± 0,00	8,17^a ± 0,29	6,50 ^b ± 0,50

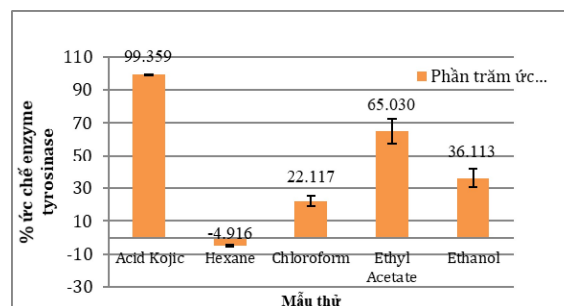
Chủ thích: (-): không có khả năng kháng khuẩn; Đường kính vòng kháng khuẩn = Đường kính vòng vô khuẩn - mẫu chứng âm (dung môi hòa tan cao chiết). Kết quả so sánh theo hàng ngang. Các số trung bình với các ký tự khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa với mức *P* (*p*-value) < 0,05.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase

Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của các phân đoạn được trình bày ở biểu đồ Hình 4.

Với phần trăm ức chế nhỏ hơn 0, có thể thấy phân đoạn *n*-hexane hoàn toàn không có khả năng ức chế tyrosinase. Cả 3 phân đoạn còn lại đều có hoạt tính. Trong đó ethyl acetate là phân đoạn ức chế tốt nhất (65,030^b±7,607 %). Ethanol có hoạt tính ức chế trung bình (36,113±5,310 %), cuối cùng là chloroform (22,117±3,058 %). Ở mức 2 mg/mL, so với chứng dương là kojic acid ở 200 μg /mL, thì các phân đoạn có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase ở mức thấp. Các nghiên cứu trên thế giới vẫn chưa đề cập tới hoạt tính này của loài *Marchantia polymorpha* L. Nhìn chung, các hoạt chất có khả năng ức chế tyrosinase tập trung ở phân đoạn có tính phân cực trung bình và mạnh.

kháng nấm và virus HIV của các hợp chất thuộc nhóm bisbenzyl, đại diện là marchantin A và C được tìm thấy trong nhiều loài *Marchantia*. MIC-nồng độ ức chế tối thiểu của hai hợp chất này đối với các loài gram dương như *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*... dao động từ 2,0 μg /mL đến 50 μg /mL; đối với các loài gram âm như *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*... dao động từ 25 μg /mL đến 100 μg /mL [1]. Kết quả thu được cho thấy khả năng ứng dụng theo hướng kháng khuẩn của loài địa tiền này cũng như khả năng hỗ trợ của loài địa tiền này khi điều trị cho các vết thương hở mà dân gian một số nước hay sử dụng. Vì vậy cần tiến hành thêm các mô hình khác để tiếp tục đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn tiềm năng.



Hình 4. Phần trăm ức chế enzyme tyrosinase của các cao chiết phân đoạn

Khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase

Enzyme α -glucosidase ở trong ruột của động vật tham gia vào quá trình phân cắt oligosaccharide và giải phóng glucose vào máu. Việc ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase là biện pháp trong việc kiểm soát lượng đường huyết do làm chậm sự hấp thu glucose sau bữa ăn. Các hợp chất có khả năng ức chế enzyme này càng cao, thì càng có

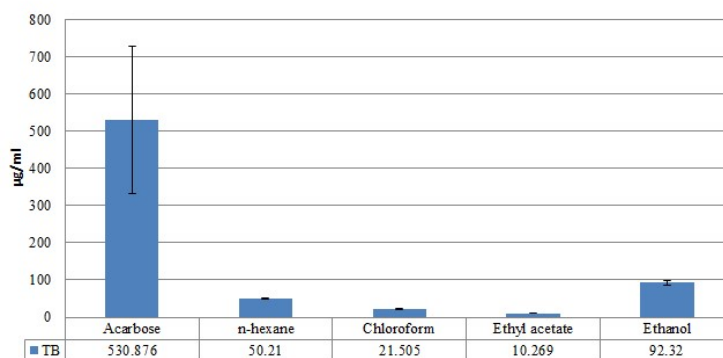
tiềm năng trong việc điều trị bệnh đái tháo đường tuýp 2.

Ở nồng độ 1 mg/mL thì cả bốn loại cao chiết đều cho kết quả ức chế enzyme đến 100%. Trong khi đó đối với chứng dương acarbose với nồng độ 5 mg/mL thì mới ức chế được $69,00 \pm 2,92$ %. Chúng tôi tiến hành xác định IC_{50} , để thuận lợi cho việc so sánh giữa các phân đoạn đó, kết quả được thể hiện ở Hình 5. Cả bốn phân đoạn đều có IC_{50} thấp hơn nhiều so với acarbose. Trong 4 phân đoạn, cao ethanol có hoạt tính thấp nhất (với IC_{50} cao nhất, $92,320 \pm 6,592$ $\mu\text{g/mL}$) và ethyl acetate có hoạt tính mạnh nhất (IC_{50} thấp nhất, $10,269 \pm 0,346$ $\mu\text{g/mL}$).

Hoạt tính kháng α -glucosidase là một điểm quan trọng khi đánh giá tiềm năng ứng dụng để điều trị đái tháo đường tuýp 2. Acarbose hiện nay được xem là một chất ức chế enzyme α -glucosidase điển hình. Người ta thấy các cao chiết từ các loại thực vật được sử dụng trong dân gian cũng có hoạt tính ức chế tương đương acarbose hoặc hơn. Nguyễn Xuân Hải và cộng sự (2015) đã báo cáo về cao

chiết methanol từ thân cây gòn (*Ceiba pentandra* L.) và thân cây dâu tằm (*Morus alba* L.)- 2 đối tượng nổi bật trong 20 loài thực vật dược liệu từ Đồng Tháp với IC_{50} thấp hơn chứng dương acarbose từ 22 đến 29 lần [6]. Báo cáo của Đái Thị Xuân Trang trên cây nhàu, cho thấy cao chiết ethanol của các bộ phận hoặc toàn cây đều mạnh hơn chứng dương, đặc biệt là cao chiết từ rễ mạnh gấp 24,3 lần [17]. Một báo cáo trên lá ổi, cao chiết ethanol cũng mạnh hơn chứng dương 1,36 lần [18]. Trong báo cáo này, thì cao chiết ethyl acetate của *M. polymorpha* là cao chiết nổi bật hơn cả, kết quả IC_{50} cho thấy hoạt tính mạnh hơn chứng dương khoảng 53 lần.

Trên thế giới, các nghiên cứu về ức chế enzyme α -glucosidase của các loài thực vật bậc thấp vẫn còn rất hạn chế. Kết quả ở trên cho thấy loài địa tiền *Marchantia polymorpha* L. có khả năng ức chế tốt enzyme này. Phân đoạn ethyl acetate là phân đoạn tiềm năng, cần được tìm hiểu sâu hơn để tìm ra các hợp chất có khả năng ứng dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường tuýp 2.



Hình 5. Biểu đồ thể hiện IC_{50} ức chế enzyme α -glucosidase của các loại cao chiết và acarbose

Khảo sát hoạt tính kháng phân bào trên dòng tế bào MCF-7

Thí nghiệm khảo sát được tiến hành ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ cho bốn cao chiết và đi cùng với chứng dương camptothecin nồng độ 0,05 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ % ức chế phân bào của các loại cao chiết và camptothecin

Mẫu thử	Tỷ lệ % ức chế
Camptothecin	$65,14^a \pm 3,26$
n-Hexane	$-8,64^d \pm 4,42$
Chloroform	$65,56^a \pm 1,58$
Ethyl acetate	$48,87^b \pm 2,14$
Ethanol	$4,64^c \pm 5,14$

Các số trung bình với các ký tự khác nhau thì có sự khác biệt ý nghĩa với mức P (p -value) < 0,05.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phân đoạn n-hexane hoàn toàn không có khả năng ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào MCF-7. Trong khi đó, mẫu cao chloroform có tỷ lệ phần trăm ức chế cao nhất ($65,56 \pm 1,58$ %) và không có sự khác biệt với kết quả của camptothecin ($65,14 \pm 3,26$ %), tiếp theo là ethyl acetate với $48,87 \pm 2,14$ %. Phân đoạn ethanol ức chế rất yếu. Trong bốn phân đoạn ở cùng nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ thì chỉ có phân đoạn chloroform là có khả năng gây độc và ức chế sự tăng trưởng của dòng tế bào ung thư vú MCF-7.

Trong quá trình sàng lọc ở *Marchantia polymorpha* L. và một số loài khác thuộc chi *Marchantia*, người ta thấy bên cạnh các hợp chất thuộc nhóm terpenoid thì các hợp chất aromatic-bis(bi)benzyl đặc trưng có tác động mạnh đến các dòng tế bào ung thư. Các hợp chất này gây độc, ức

chế tăng sinh và gây chết theo chu trình apoptosis trên một số dòng tế bào như: ung thư biểu mô, bạch cầu (Marchantin A), tuyến tiền liệt (Marchantin M, H) ... [1]. Huang và cộng sự (2010) đã báo cáo hợp chất marchantin A có khả năng gây độc tế bào ung thư vú MCF-7 với IC₅₀ là 4 µg/mL. Hợp chất này gây cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào MCF-7 thông qua con đường phụ thuộc caspase [8]. Có thể phân đoạn chloroform là phân đoạn tập trung nhiều hợp chất nhóm marchantin cùng một số hợp chất khác có khả năng gây độc tế bào. Vì vậy, cần đánh giá thêm

hoạt tính kháng phân bào của phân đoạn chloroform để thấy được tiềm năng trong ức chế tế bào ung thư của loài *Marchantia polymorpha* L.

Định tính sự hiện diện một số nhóm hợp chất thứ cấp trong các phân đoạn

Kết quả định tính cho thấy, *Marchantia polymorpha* L. ngoài tự nhiên có chứa các hợp chất phenol, quinone, coumarin, flavonoid (flavone, flavonol, aurone, chalcone...), steroid, các hợp chất glycoside và lacton vòng 5 (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả định tính sự hiện diện của một số nhóm hợp chất thứ cấp có trong bốn phân đoạn cao chiết

Nhóm hợp chất	Thuốc thử	<i>n</i> -Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Ethanol
Phenol	FeCl ₃	-	+(xanh nhạt)	+(xanh nhạt)	++ (xanh)
Quinone, coumarin	Bortrager	-	+(vàng)	+(vàng)	+(vàng)
Tanin	Gelatin mặn	-	-	-	-
Alkaloid	Wagner	-	-	-	-
Flavonoid	H ₂ SO ₄ đđ	-	+(nâu đen)	+(nâu đỏ)	+(đỏ)
	NaOH 1%/ Ethanol	-	++ (vàng)	+(vàng nhạt)	+(vàng nhạt)
	AlCl ₃ 2%/ Ethanol	-	+(xanh nhạt)	-	-
	Chỉ acetate 10%	-	+(tủa đục)	+(tủa đục)	+(tủa đục)
	Wilstatter-Mg	-	-	-	-
Terpenoid-Steroid	Wilstatter-Zn	-	-	-	-
	Roseinheim	-	-	-	-
Saponin	Salkowshi	-	+(xanh)	+(đỏ)	+(nâu)
	Tạo bọt (Saponin)	-	-	-	-
Glycoside	Molisch	+(hơi đỏ)	++ (đỏ đậm)	++	+
Lacton vòng 5	Baljet	-	+(vàng)	+(vàng)	+(vàng cam)

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính. Số lượng dấu (+): cao có nhiều hợp chất cần khảo sát dựa trên mức độ của phản ứng.

Phân đoạn *n*-hexane hầu như không có sự hiện diện của tất cả các hợp chất trên. Điều thú vị của phân đoạn này là mùi hăng và tanh nồng, rất có thể phân đoạn này có các hợp chất lipophilic terpenoid-nhóm hợp chất tạo mùi đặc trưng cho các loài địa tiền [1], [15]. Người ta còn tìm thấy nhiều acid béo lạ ở loài *Marchantia polymorpha* L., có thể những acid béo này cũng góp phần tạo mùi cho phân đoạn này [15]. Khả năng khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học ở phân đoạn này tương đối thấp, nhưng nó lại mang tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực tạo mùi, điều hương trong mỹ phẩm và trị liệu.

Ở ba phân đoạn còn lại có sự hiện diện đầy đủ về các nhóm hợp chất, nhưng phản ứng dương tính ở các nhóm lại khác nhau. Điều này cho thấy phổ phân cực phong phú của các hợp chất có trong loài địa tiền *M. polymorpha* L. thu hái ngoài tự nhiên. Các hợp chất có hoạt tính sinh học tiềm năng của loài địa tiền này tập trung nhiều ở phân đoạn

chloroform và ethyl acetate, kết quả thu nhận cao một lần nữa xác định cho nhận định này. Bên cạnh đó từ các kết quả hoạt tính và dự đoán phía trên, nhóm hợp chất bis(bi)benzyl đặc trưng có thể tập trung nhiều ở phân đoạn chloroform, góp phần vào hoạt tính kháng khuẩn và kháng phân bào nổi trội của phân đoạn này.

4. KẾT LUẬN

Thông qua các khảo sát, kết quả cho thấy *Marchantia polymorpha* L. ở thu hái ở Đà Lạt, Lâm Đồng có khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, ức chế tyrosinase, α -glucosidase và kháng phân bào. Các nhóm hoạt chất của loài địa tiền này tương đối đơn giản, tập trung chính vào nhóm các hợp chất phenolic (các hợp chất quinone, coumarin, flavonoid, bis(bi) benzyl), terpenoid (steroid, một số nhóm terpene tạo mùi) và dẫn xuất glycoside. Các hoạt chất có hoạt tính hầu như tập trung ở phân đoạn chloroform, ethyl acetate và

ethanol. Phân đoạn chloroform nổi trội ở các hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn và ức chế tăng sinh dòng tế bào MCF-7. Bên cạnh đó, phân đoạn ethyl acetate lại có hoạt tính kháng enzyme tyrosinase tốt nhất và nổi bật ở hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với $IC_{50} = 10,269 \pm 0,346$ μ g/mL, thấp hơn nhiều lần so với chứng dương acarbose. Các kết quả giúp hiểu thêm cách sử dụng của dân gian một số nước trong điều trị bệnh và thấy được những tiềm năng ứng dụng mới của *Marchantia polymorpha* L. đối với một số bệnh phổ biến hiện nay. Vì vậy cần tiếp tục tìm hiểu thêm về thành phần hoạt chất, đi sâu vào các hoạt tính đã khảo sát cũng như tiến hành thêm các hoạt tính sinh học khác của loài địa tiền này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia - TP. Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số C2017-18-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Y. Asakawa, A. Ludwiczuk, F. Nagashima, "Phytochemical and biological studies of bryophytes", *Phytochemistry*, vol. 91, pp. 52–80, 2013.
- [2]. S. Chandra, D. Chandra, A. Barh, R.K. Pandey, and I.P. Sharma, "Bryophytes: Hoard of remedies, an ethnomedicinal review", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 7, no. 1, 94-98 (2017).
- [3]. B. Crandall-Stotler, R.E. Stotler and D.G. Long, "Morphology and classification of the Marchantiophyta", In B. Goffinet & A. J. Shaw (eds.), *Bryophyte Biology*, pp. 1–54, 2009.
- [4]. B. Crandall-Stotler, R.E. Stotler and D.G. Long, "Phylogeny and classification of the Marchantiophyta", *Edinburgh Journal of Botany*, vol. 66, pp. 155–198, 2009.
- [5]. N.T.M. Hanh, N.K.P. Phung, and Q.N.D. Phuong, "Studying on tyrosinase inhibition activity of some Vietnamese folk plants aims to use in skin-whitening cosmetics", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 8, 1319–1328, 2017.
- [6]. N.X. Hải, N.T.T. Mai, "Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số cây thuốc Đồng Tháp", *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, vol. 20, no. 4, pp. 289–296, 2015.
- [7]. S. Hogan, L. Zhang, J. Li, S. Sun, C. Canning, K. Zhou, "Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase", *Nutrition & Metabolism*, vol. 7, pp. 71–79, 2010.
- [8]. W.J. Huang, C.L. Wu, C.W. Lin, L.L. Chi, P.Y. Chen, C.J. Chiu, C.Y. Huang, C.N. Chen, "Marchantin A, a cyclic bis(bibenzyl ether), isolated from the liverwort *Marchantia emarginata* subsp. *tosana* induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells", *Cancer Lett.*, vol. 291, pp. 108–119, 2010.
- [9]. N.T.H. Lan, B.Q. Thuật, L.D. Tuyên, N.T.N. Duyên, "Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu lá tía tô", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, vol. 13, no. 2, pp. 245–250, 2015.
- [10]. P. Molyneux, "The use of the Stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004.
- [11]. N.T.M. Nuong, H.H.T. Duong, "Selective cytotoxicity of a Vietnamese traditional formula, Nam Dia Long, against MCF-7 cells by synergistic effects", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, p. 220, 2016.
- [12]. N.K.P. Phụng "Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ", Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 2007.
- [13]. Q.N.D. Phuong, H.T.T. Minh, L.P. Yến, N.K.P. Phụng và B.V. Lê, "Sàng lọc và thu nhận hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa từ dịch chiết cây *Drosera indica* L. nuôi cấy *in vitro*", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, vol. 14, 30–37, 2011.
- [14]. R. Krishnan and K. Murugan, "Polyphenols from *Marchantia polymorpha* L. a bryophyte: a potential source as antioxidants", *World journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 2, no. 6, 5182–5198, 2013.
- [15]. S. Marko, B. Aneta, G. Dragoljub, "Bryophytes as a potential source of medicinal compounds", *LEK. SIROW* (Vol.XXI), no 21, pp. 17–29, 2001.
- [16]. M. Shimamura, "*Marchantia polymorpha*: taxonomy, phylogeny and morphology of a model system", *Plant and Cell Physiology*, vol. 57, no. 2, pp. 230–256, 2015.
- [17]. Đ.T.X. Trang, N.T.L. Phương, "Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trong điều trị bệnh đái tháo đường của cao chiết cây nhàu *Morinda citrifolia* L.", *Y học Thực hành*, no. 944, pp. 77–80, 2014.
- [18]. Đ.T.X. Trang, P.T.L. Anh, T.T. Mến và B.T. Anh, "Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá ổi *Psidium guajava* L.", *Tạp chí Khoa học*, trường ĐH Cần Thơ, no. 22b, 163–171, 2012.
- [19]. B. Trusheva, D. Trunkova and V. Bankova, "Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study", *Chemistry Central Journal*, vol. 7, pp. 1–13, 2007.

Biological activities of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. collected at Da Lat, Lam Dong province

Tran Quoc Tan, Luong Thien Tam, Phan Ngo Hoang, Quach Ngo Diem Phuong
University of Science, VNU-HCM

Corresponding author: tqtan.herb@gmail.com

Received 24-11-2017; Accepted 17-01-2018; Published 20-11-2018

Abstract—*Marchantia polymorpha* L. is used as a folk medicine in India, China and some European countries for the treatment of inflammation, cure cuts, wounds, diuretics, etc. Natural compounds and biological activities of this liverwort have been studied in the world for few years. At present time, the studies on bryophytes (non-vascular plants) are quite limited, especially in Vietnam. Therefore, this research focused on investigating some biological activities and analyzing of major secondary metabolites of *M. polymorpha* L. collected at Da Lat, Lam Dong. Among four extracted fractions (n-hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol), the chloroform extract exhibited the best antioxidant,

antibacterial, anti-proliferation of MCF-7 cell line activities. The ethyl acetate extract exhibited better activity of tyrosinase and α -glucosidase inhibition than others. Main secondary compounds in this species were phenolics, steroids and glycoside-derivatives. These results were scientific evidences that might help us to understand rigorously about the utilization of *Marchantia* liverwort in the traditional treatment and new potential applications in the contemporary medicine.

Keywords—bisbenzyl, bryophytes, liverwort, Marchantin, *Marchantia polymorpha* L.