

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN BAY HƠI, HÀM LƯỢNG ALKALOID TOÀN PHẦN VÀ PROANTHOCYANIDIN TOÀN PHẦN CAO CHIẾT METHANOL TỪ LÁ ME (*Tamarindus indica* L., Fabaceae)

¹Huỳnh Anh Duy, ¹Nguyễn Thị Trúc Linh

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

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát thành phần bay hơi, xác định hàm lượng alkaloid và proanthocyanidin toàn phần của cao chiết methanol lá Me (me). **Phương pháp:** Các thành phần dễ bay hơi của cao methanol lá Me được xác định bằng phương pháp sắc ký khí-khối phổ (GC-MS). Alkaloid toàn phần và proanthocyanidin toàn phần được định lượng bằng phương pháp quang phổ với thuốc thử thích hợp. **Kết quả:** Từ cao methanol lá Me phát hiện được 46 cấu tử, trong đó, các cấu tử chiếm số lượng nhiều nhất gồm 3-hexene-2-one (33,80%), 1-(3-ethyloxiranyl)-ethanone (15,04%) và 2-nitro-hexene (8,62%). Lá Me chứa hàm lượng alkaloid tương đối thấp là 2,11 mg/g bột dược liệu quy về caffein và hàm lượng proanthocyanidin khá cao là 15,1mg/g bột dược liệu quy về catechin. Những kết quả này lần đầu được báo cáo về lá Me tại Việt Nam.

Từ khóa: Alkaloid toàn phần, GC-MS, Me, proanthocyanidin toàn phần, thành phần bay hơi.

1. GIỚI THIỆU:

Cây Me có tên khoa học *Tamarindus indica* L. thuộc họ Đậu (đậu) (Fabaceae) có giá trị sử dụng cao, các bộ phận của cây Me đều được sử dụng đặt biệt là dùng trong các bài thuốc dân gian. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy lá Me có hoạt tính kháng nấm, kháng viêm, khả năng hạ lipid huyết, hạ glucose huyết [3]. Tại Việt Nam, cây Me được trồng ở nhiều nơi, lá Me được sử dụng làm thuốc nhưng chỉ dựa vào kinh nghiệm dân gian mà chưa được nghiên cứu đầy đủ [2]. Ngoài ra, alkaloid là nhóm hợp chất tự nhiên quan trọng về nhiều mặt, đặc biệt trong lĩnh vực y học, vì một số chất này có khả năng chữa bệnh khá cao và độc đáo. Proanthocyanidin là flavonoid oligomeric, là một nhóm các polyphenol được tìm thấy trong nhiều loại thực vật. Chúng có khả năng nâng cao tính bền của thành mạch máu, chống dị ứng, chống co giật, giảm đau, nghẽn mạch, nghẽn phế quản, lợi mật, diệt nấm. Kết quả nghiên cứu về thành phần bay hơi, hàm lượng alkaloid toàn phần và proanthocyanidin toàn phần từ lá cây Me, là

cơ sở khoa học cho việc sử dụng nguồn dược liệu của Việt Nam một cách hiệu quả.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu:

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá Me (*Tamarindus indica* L.) được thu hái ở quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ vào tháng 11/2017. Mẫu được định danh bởi ThS.DS. Lâm Thị Ngọc Giàu, bộ môn Dược liệu, trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu, có kiểm tra lại bằng tài liệu tham khảo[2].

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: Caffein (99,9%, viện kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh). Catechin (85,2%, viện kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh). Thuốc thử vanillin, bromo cresol green (BCG) và các thuốc thử thông dụng khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu lá Me tươi (4 kg) sau khi thu hái, làm sạch, cắt nhỏ và sấy ở 60°C đến khi mẫu khô, xay thành bột mịn (1,1 kg). Bột lá Me được chiết ngâm dần đến kiệt với methanol, thu dịch methanol, cô dưới áp suất thấp để loại dung môi, thu được cao methanol (105 g) để tiến hành phân tích thành phần bay hơi, xác định proanthocyanidin toàn phần và alkaloid toàn phần. Lượng dược liệu dùng cho mỗi lần thử nghiệm là 100g.

2.2.1. Xác định các hợp chất bay hơi trong cao chiết methanol

Cao chiết methanol lá Me được phân tích GC-MS với các thông số như sau: Hệ thống máy GC/MS-QP2010 (Shimadzu, Nhật Bản) với cột DB-5 ms (30m x 0,25 μm x 0,25 μm), khí mang là Helium, tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm là 2 μL, nhiệt độ buồng tiêm mẫu và nhiệt độ nguồn ion là 250°C, nhiệt độ lò được lập trình từ 50 °C, áp suất 112,1 kPa, tổng thời gian chạy sắc ký là 22 phút.

2.2.2. Phương pháp xác định alkaloid toàn phần

Tiến hành thực nghiệm theo phương pháp của Biju John và cộng sự (2014) có hiệu chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [1].

Chuẩn bị các dung dịch

- Dung dịch bromocresol green (BCG): đun nóng 69,8 mg BCG + 3 mL NaOH + 5 mL nước cất đến khi tan và pha loãng đến 1000 mL bằng nước cất.

- Dung dịch đệm phosphate (pH 4,7): điều chế bằng cách điều chỉnh pH của sodium phosphate 0,2 M (71,6 g Na₂HPO₄ trong 1000 mL nước cất) đến 4,7 với acid citric 0,2 M (42,02 g acid citric trong 1000 mL nước cất).

- Dung dịch chuẩn caffeine: hòa tan 1 mg caffeine tinh khiết trong 10 mL nước cất.

Tiến hành thí nghiệm

Mẫu chuẩn: Dung dịch caffeine được hút một cách chính xác (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 mL) vào từng phễu chiết khác nhau. Sau đó, thêm 5 mL dung dịch đệm phosphate pH 4,7 và 5 mL dung dịch BCG vào từng phễu, lắc mỗi hỗn hợp lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform. Các dịch chiết chloroform được thu trong bình định mức 10 mL và định mức đến vạch với chloroform. Độ hấp thụ của phức hợp trong chloroform được đo ở 470 nm. Từ đây, thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ (C) và độ hấp thụ (A).

Mẫu trắng: được chuẩn bị như trên nhưng không có caffeine.

Mẫu thử: Hòa tan 100 mg cao chiết trong HCl 2N, sau đó lọc và định mức tới 10 mL, được nồng độ cao chiết là 10 mg/mL. Một mL dung dịch này rửa sạch với chloroform (10 mL x 3 lần). Độ pH dung dịch này điều chỉnh đến trung tính với 0,1 N NaOH. Sau đó, thêm 5 mL BCG và 5 mL đệm phosphate. Lắc và chiết lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform. Các dịch chiết chloroform được thu trong bình định mức 10 mL và định mức đến vạch với chloroform. Độ hấp thụ của phức hợp trong chloroform được đo ở 470 nm.

Cách tính kết quả:

$$A = \frac{C \times V \times a}{m} \quad (1)$$

Trong đó, A: hàm lượng alkaloid toàn phần có trong mẫu; C: nồng độ alkaloid toàn phần suy ra từ phương trình hồi quy chuẩn, quy về cho caffeine; V: thể tích ban đầu (mL); a: khối lượng cao methanol (g); m: khối lượng bột dược liệu (g).

2.2.3. Phương pháp xác định proanthocyanidin toàn phần

Tiến hành thực nghiệm theo phương pháp của Sun và cộng sự (1998), tham khảo thêm của Osamuyimen và cộng sự (2011) [4], [6].

Chuẩn bị các dung dịch

- Dung dịch vanillin-methanol 4%: hòa tan 4 g vanillin vào 120 mL methanol (D = 0,8 g/mL).

- Dung dịch chuẩn catechin: hòa tan 1 mg catechin tinh khiết trong 10 mL nước cất.

Tiến hành thí nghiệm

Mẫu chuẩn: Hút chính xác dung dịch chuẩn catechin lần lượt là 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mL vào từng cốc nhỏ, sau đó thêm 3 mL dung dịch vanillin-methanol 4% và 1,5 mL dung dịch HCl 2 N lần lượt vào từng cốc trên, hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng 15 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 500 nm và thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ (C) và độ hấp thụ (A).

Mẫu trắng: hỗn hợp 3 mL dung dịch vanillin-methanol 4% và 1,5 mL dung dịch HCl 2 N.

Mẫu thử: Cân 10 mg cao hòa tan trong 10 mL methanol, lọc, thu được dung dịch cao chiết có nồng độ 1,0 mg/mL. Hút 1 mL dung dịch trên, thêm tiếp 3 mL dung dịch vanillin-methanol 4% và 1,5 mL dung dịch HCl 2 N. Hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 500 nm.

Cách tính kết quả:

$$P = \frac{C \times V \times a}{m} \quad (2)$$

Trong đó, P: hàm lượng proanthocyanidin toàn phần có trong mẫu; C: nồng độ proanthocyanidin toàn phần suy ra từ phương trình hồi quy, quy về catechin; V: thể tích ban đầu (mL); a: khối lượng cao methanol; m: khối lượng bột được liệu (g).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần bay hơi trong cao methanol lá Me

Từ kết quả phân tích GC-MS trong bảng 1 cho thấy, cao methanol lá Me phát hiện được 46 cấu tử. Trong đó, cấu tử chiếm hàm lượng nhiều nhất là 3-hexene-2-one (33,8%) tương ứng thời gian lưu là 7,280 phút trên sắc ký đồ. Tiếp theo là hợp chất 1-(3-ethyloxiranyl)-ethanone (15,04%), ứng với thời gian lưu 6,120 phút và 2-nitro-hexene (8,62%) ứng với thời gian lưu là 5,665 phút

Bảng 1. Kết quả phân tích cao methanol lá Me bằng GC-MS

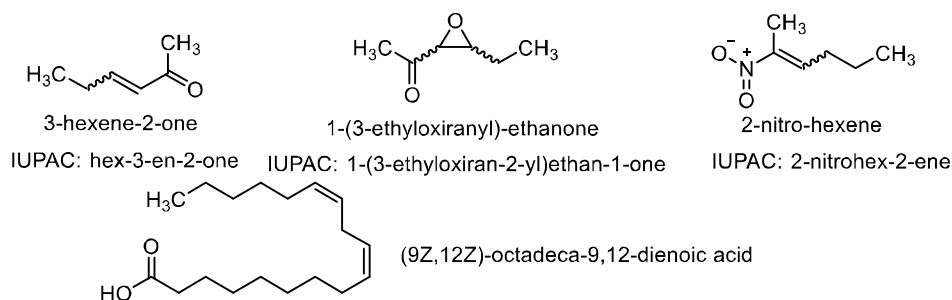
STT	Thời gian lưu	% Diện tích peak	Tên hợp chất
1	4,161	0,96	3-methyl-cyclopentanone
2	4,233	3,53	3-methyl-cyclopentanol
3	4,320	1,62	3-methyl-cyclopentanone
4	4,754	0,27	Hexyl chloroformate
5	5,156	0,15	2-bromo-hexene
6	5,273	2,73	<i>o</i> -xylene
7	5,328	0,13	Cyclohexanone
8	5,665	8,62	2-nitro-hexene
9	5,806	0,37	Vinyl butyrate
10	5,936	0,27	2-nitro-hexene
11	6,120	15,04	1-(3-ethyloxiranyl)-ethanone
12	6,250	0,17	2-cyclohexen-1-one
13	6,474	0,57	1-methylhexyl hydroperoxide
14	6,580	0,52	1-methylhexyl hydroperoxide
15	6,640	5,12	2-nitro-hexene
16	6,899	4,83	<i>sec</i> -butyl nitrite
17	7,280	33,80	3-hexene-2-one
18	7,909	0,80	1-nonen-4-ol
19	7,955	0,95	1,1,2,2-tetra methyl cyclopropane
20	8,031	1,01	1,1,2,2-tetra methyl cyclopropane
21	8,230	0,61	1,1,2,2-tetramethyl cyclopropane
22	18,288	0,12	1,11-bis(trimethylsiloxy)undecane
23	18,430	0,14	<i>Z,Z</i> -5,16-octadecadien-1-ol acetate
24	18,695	0,11	2-propenoic acid, 5-methyl-2-(1-methylethyl)cyclohexyl ester
25	19,060	0,18	(<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-octadecatrienoic acid, 2-[[trimethylsilyl]oxy]-1-[[trimethylsilyl]oxy]methyl ester

26	19,101	0,12	9-octadecenoic acid, 2- [[trimethylsilyl]oxy]-1- [[trimethylsilyl]oxy]met hyl] ethyl ester
27	19,220	1,02	1,1-dichloro-2,2,3,3- tetramethylcyclopropane
28	19,309	0,30	Cyclobutanecarboxylic acid, undec-10-enyl ester
29	19,374	0,16	1-heptafluorobutyryloxy- 10 undecene
30	19,508	2,32	1-cyclohexyldimethyl silyoxy butane
31	19,594	3,61	(Z,Z)-9,12- octadecadienoic acid, trimethylsilyl ester
32	19,848	1,30	(Z,Z)-9,12- octadecadienoic acid
33	19,918	1,45	1- cyclohexyldimethylsilylo xy butane
34	20,010	0,24	2,6,6-trimethyl-3- (phenylthio) cyclohept-4- enol
35	20,065	0,18	levo-menthoxyacetic acid
36	20,110	0,35	1-(4-hydroxy-6- hydroxymethyltetrahydro pyran-2-yl)-1H- pyrimidine-2,4-dione
37	20,222	1,06	7-trimethylsilyloxy-7- methyloctanoic acid, trimethylsilyl ester
38	20,246	0,55	4,5-diphenylocta-1,7- diene(meso)
39	20,346	0,50	1- (dimethyl(chloromethyl)si lyoxy) butane
40	20,395	0,42	10,10-dimethyl- 5,8,12,15- tetraoxanonadecane
41	20,424	0,16	(Z,Z)-9,12- octadecadienoic acid
42	20,535	0,12	Hexen-1-ylcyclohexane
43	20,589	0,42	11,14-eicosadienoic acid, trimethylsilyl ester
44	20,665	0,58	4-cyanobenzoic acid, undec-10-enyl ester
45	20,831	1,17	16-trimethylsilyloxy-9- octadecenoic, methyl ester
46	20,946	0,23	2-(2-propenyl) cyclohexanone

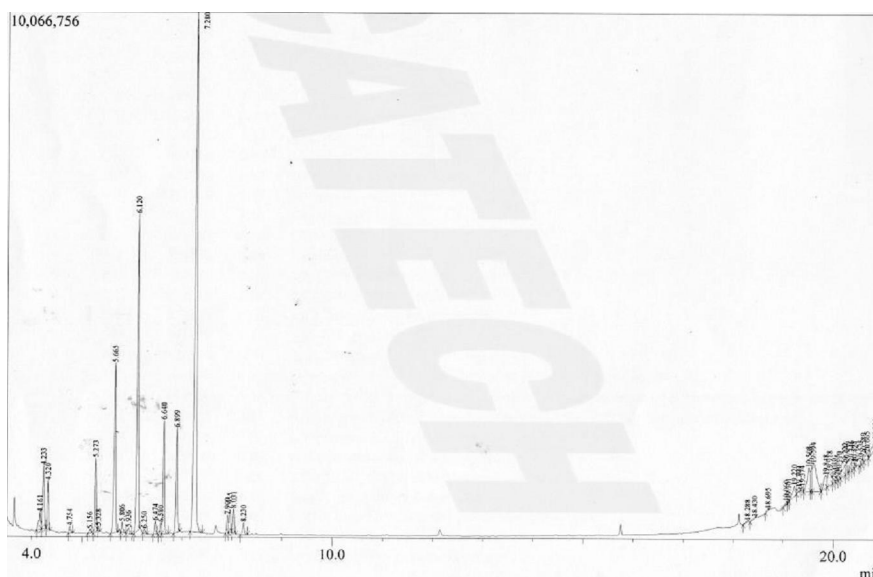
Theo kết quả phân tích GC-MS, cho thấy các thành phần dễ bay hơi của lá Me chủ yếu là các hợp chất hydrocarbon. Bên cạnh đó, phát hiện được một cấu tử đáng lưu ý là (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid

tuy chiếm tỷ lệ thấp (1,3%), ứng với thời gian lưu 19,848 phút, nhưng nó là một acid quan trọng có khả năng chống oxy hóa và có hoạt tính chống ung thư [5]. Kết quả này cũng khác biệt so với những nghiên

cứu khác về thành phần bay hơi từ lá Me được công bố.



Hình 1. Công thức một số cấu tử bay trong quan trọng từ cao methanol lá Me



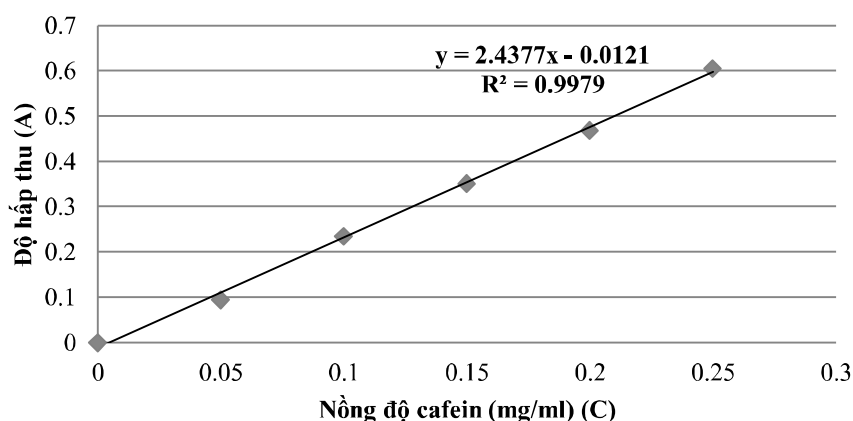
Hình 2. Sắc ký đồ phân tích cao methanol lá Me bằng GC-MS

3.2. Hàm lượng alkaloid toàn phần

Phương trình hồi quy tuyến tính của đường

chuẩn caffein được xây dựng là $y = 2,437x - 0,012$ với hệ số $R^2 = 0,997$, được trình bày trong hình 1.

Đường chuẩn caffeine



Hình 3. Đồ thị tương quan giữa độ hấp thu và nồng độ chất chuẩn caffein

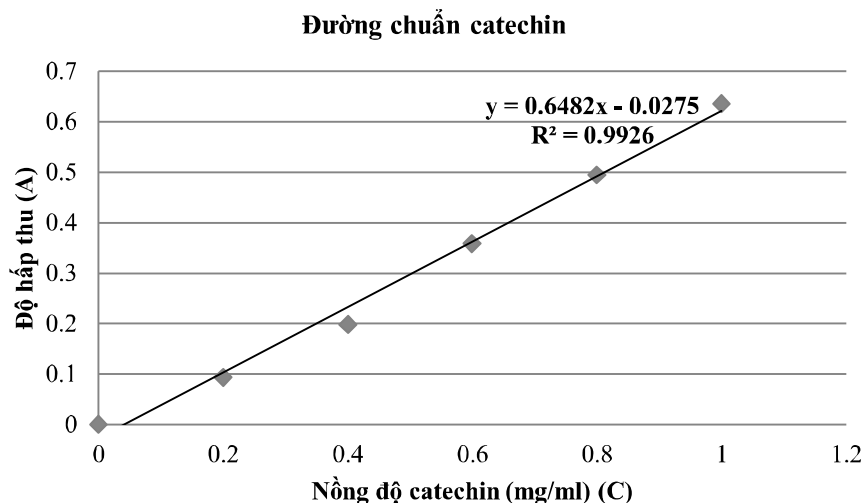
Theo quy trình thực hiện, mẫu thử cao methanol lá Me đo được độ hấp thu là 0,8346 ở bước sóng 470 nm. Thế vào phương trình hồi quy

của caffein $y = 2,437x - 0,012$, suy ra tương ứng với 0,347 mg/mL caffein. Từ những dữ liệu trên, tính toán theo công thức (1), thu được hàm lượng

alkaloid toàn phần có trong 1 g bột dược liệu là 2,11 mg/g bột dược liệu quy về caffein. Từ kết quả trên cho thấy hàm lượng alkaloid có trong lá Me là khá thấp như vậy sẽ rất khó trong việc phân lập các hợp chất tinh khiết.

3.3. Hàm lượng proanthocyanidin toàn phần

Phương trình hồi quy tuyến tính của đường chuẩn catechin được xây dựng là $y = 2,648x - 0,027$ với hệ số $R^2 = 0,992$, được trình bày trong hình 2.



Hình 4. Đồ thị tương quan giữa độ hấp thu và nồng độ chất chuẩn catechin

Theo quy trình thực hiện, mẫu thử cao methanol lá Me đo được độ hấp thu là 0,1261 ở bước sóng 500 nm. Thế vào phương trình hồi quy của catechin $y = 0,648x - 0,027$, suy ra tương ứng với 0,237 mg/mL catechin. Từ những dữ liệu trên, tính toán theo công thức (2), thu được hàm lượng proanthocyanidin toàn phần có trong 1 g bột dược liệu là 15,1 mg/g bột dược liệu quy về catechin. Kết quả cho thấy lá Me là nguồn dược liệu giàu proanthocyanidin, tiềm năng cho tác dụng kháng oxy hóa tốt.

4. KẾT LUẬN

Từ cao methanol lá Me, phát hiện được 46 cấu tử bay hơi, trong đó các chất chiếm tỷ lệ nhiều nhất lần lượt là 3-hexene-2-one (33,80%), 1-(3-ethyloxiranyl)-ethanone (15,04%) và 2-nitro-hexene (8,62%). Xác định trong lá Me có hàm lượng alkaloid toàn phần là 2,11 mg/g bột dược liệu quy về caffein và hàm lượng proanthocyanidin là 15,1 mg/g bột dược liệu quy về catechin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Biju, J., et. al., 2014. Spectrophotometric Estimation of Total Alkaloids in selected Justicia Species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(5): 647-648.
- [2]. Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB y học, tr. 102.
- [3]. Nyadoi, P., et. al., 2009. Tamarinds' (Tamarindus indica L.) niche tree species diversity characterisation reveals conservation needs and strategies. *International Journal of Biodiversity and Conservation. Tropical Ecology*. 55(1): 19-32.
- [4]. Osamuyimen, O.I., et. al., 2011. Polyphenolic Contents and Antioxidant Potential of Stem Bark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 2958-2971.
- [5]. Suheyli, K., et. al., 2012. Fatty Acid Profile and Biological Data of Four Endemic Cephalaria Species Grown in Turkey. *Records of Natural Product*. 6(2): 151-155.
- [6]. Sun, B. S., et. al., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4267-4274.

INVESTIGATION ON VOLATILE COMPONENTS, TOTAL ALKALOID AND TOTAL PROANTHOCYANIDIN FROM METHANOLIC EXTRACT OF TAMARIND LEAVES (*Tamarindus indica* L., Fabaceae)

Huynh Anh Duy, Nguyen Thi Truc Linh

College of Natural Sciences, Can Tho University

ABSTRACT

Objective: Investigation on volatile components and determination of total alkaloid and proanthocyanidin in methanolic extracts of T. indica L. leaves. Methods: Volatile components of methanolic extract of T. indica L. leaves were determined by GC-MS. Total alkaloid and proanthocyanidin were estimated by appropriate reagent and UV-Vis method. Results: 22 volatile compounds were determined from methanolic extract. Among them, 3-hexene-2-one (33,80%), 1-(3-ethyloxiranyl)-ethanone (15,04%), 2-nitro-hexene (8,62%) were known as the main components. Whereas, total alkaloid was 2,11 mg/g powder equivalent caffein and total proanthocyanidin was 15,1 mg/g powder equivalent catechin. This is the first report on chemical constituents of T. indica L. leaves in Vietnam.

Keyword: Alkaloid, GC-MS, Me, proanthocyanidin