

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA PECTIN PHÂN LẬP TỪ LÁ CÚC QUỲ (*TITHONIA DIVERSIFOLIA*)

STUDY OF CHEMICAL COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PECTIN ISOLATED FROM *TITHONIA DIVERSIFOLIA*

Bùi Vũ Thục Uyên¹, Giang Thị Kim Liên², Trần Văn Hiếu³, Trần Thị Thanh Thủy³

¹Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

²Đại học Đà Nẵng; giangkimlien@gmail.com

³Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam

Tóm tắt - Pectin là một polysaccharide phức tạp được tìm thấy trên thành tế bào của hầu hết các tế bào thực vật và ảnh hưởng của nó đối với sức khỏe ngày càng được quan tâm. Các nghiên cứu cho thấy, dịch chiết nước của cây cúc quỳ là dịch chiết chứa nhiều polysaccharide, cụ thể là pectin, có nhiều hoạt tính đáng quan tâm. Trong nghiên cứu này, pectin có mức độ este hóa thấp được phân lập từ lá của cây cúc quỳ. Pectin phân lập được xác định bằng phương pháp FTIR, ¹H và ¹³C NMR, GPC. Cấu trúc của pectin được tạo nên từ các các đơn vị (1→2)- rhamnose và (1→4)-galacturonic acid tạo nên mạch chính. Mạch nhánh có mặt của các đơn vị (1→5)-arabinose. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá bằng khả năng quét gốc hydroxyl tự do.

Từ khóa - cây Cúc quỳ; pectin; polysaccharide; hoạt tính quét gốc hydroxyl tự do; hoạt tính chống oxy hóa.

Abstract - Pectin is a heterogeneous complex polysaccharide found in the primary cell wall of most cells and its effects on health has received growing interest. Studies show that water extract from *tithonia diversifolia* has been polysaccharide-rich extract. Particularly, pectin has many interesting effects. In this work, low-methoxyl pectin is isolated from *Tithonia diversifolia*. The isolated low-DE pectin is characterized by FTIR, ¹H and ¹³C NMR, GPC. The structure of pectin includes units (1 → 2)-rhamnose and (1 → 4)-galacturonic acid which form the main chain and units of (1 → 5)-arabinose branched chain. Its antioxidant activity is also evaluated through hydroxyl radical scavenging activity.

Key words - *Tithonia diversifolia*; pectin; polysaccharide; hydroxyl radical scavenging activity; antioxidant activity.

1. Đặt vấn đề

Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) họ Cúc (Asteraceae) là một trong những cây thuốc được sử dụng trong y học cổ truyền của châu Mỹ để điều trị nhiều bệnh khác nhau như sốt rét, chống u... Cây có nguồn gốc từ Mexico, hiện nay phân bố rộng khắp trong các khu vực cận nhiệt đới và nhiệt đới, chẳng hạn như châu Phi, Trung Mỹ và Đông Nam Á. Ở Việt Nam, cây cúc quỳ hiện nay đã được tự nhiên hóa, mọc phổ biến ở rất nhiều nơi, đặc biệt là ở vùng Tây Nguyên [1]. Nhiều nghiên cứu đã xác định được rằng, bên cạnh các dịch chiết dung môi hữu cơ (chứa các lớp chất đã được nghiên cứu sâu như flavonoid, sesquiterpen) thì dịch chiết nước lá của cúc quỳ là dịch chiết chứa nhiều polysaccharide, cũng có nhiều hoạt tính đáng chú ý như hoạt tính chống ung thư, chống tiểu đường, hạ mỡ máu [2]...

Hiện nay, các polysaccharide đang thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trong các ứng dụng y dược học một mặt nhờ vào các hoạt tính sinh học quý báu. Mặt khác, các polysaccharide không có tác dụng phụ, không gây hại đến các tế bào bình thường [3]. Pectin, loại polysaccharide có mặt trong thành tế bào của thực vật cũng là một trong các polysaccharide đã và đang được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi [4, 5]. Hiện nay, các nhà khoa học cho rằng, pectin chủ yếu chứa các đơn vị galacturonic acid (GalA). Rhamnose (Rha) là thành phần nhỏ trong mạch chính của pectin, trong khi các đường khác như arabinose (Ara), galactose (Gal) và xylose (Xyl) nằm trên các mạch nhánh. Tùy vào thành phần đường chiếm ưu thế ở mạch nhánh mà tên gọi của mạch nhánh sẽ tương ứng là arabinan, galactan hay xylan [5]. Phân mảnh điển hình của pectin là mạch có vài trăm đơn vị α-(1-4)-GalA với mức độ este hóa (DE) khác nhau. Các đặc điểm cấu trúc của pectin có thể biến đổi tùy thuộc từng loài thực vật và nguồn

gốc phân bố. Các nghiên cứu về polysaccharide nói chung và pectin nói riêng đang thu hút sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học trên thế giới. Nhiều công trình về pectin và các dẫn xuất của chúng từ nhiều loài thực vật khác nhau như chè xanh, lá hồng... cũng đã được công bố. Các ứng dụng trong y học cổ truyền và các nghiên cứu hiện đại đều cho thấy dịch chiết nước của cúc quỳ có nhiều hoạt tính đáng chú ý, gợi ý rằng pectin phân lập từ dịch chiết nước của cây này là đối tượng nghiên cứu hứa hẹn mang lại nhiều kết quả triển vọng.

Các nghiên cứu về thành phần hóa học của *Tithonia diversifolia* hiện nay mới chỉ tập trung ở các phân đoạn chiết ít phân cực như phân đoạn etyl axetat, phân đoạn diclometan. Thành phần hóa học của phân đoạn chiết nước còn chưa được khảo sát nhiều. Do vậy, cho đến nay, cấu trúc và hoạt tính sinh học của pectin từ cúc quỳ hiện vẫn chưa được công bố.

Bài báo này nghiên cứu quá trình phân lập, xác định thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa của pectin từ lá cúc quỳ Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Mẫu thực vật

Mẫu thực vật được thu hái tại tỉnh Gia Lai vào tháng 4 năm 2014. Tiêu bản được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ lọc hóa dầu. Mẫu lá được rửa sạch, phơi, sấy khô.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Các dung môi: nước cất, n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), dichloromethane, methanol (MeOH), etanol...

Phổ hồng ngoại FT-IR được đo dưới dạng viên nén KBr bằng máy IMPACT-410, Nicolet-Carl Zeiss Jena (Đức).

Phổ NMR của mẫu nghiên cứu được đo trên máy

Bruker AVANCE 500MHz ở nhiệt độ 70°C, sử dụng dung môi D₂O với chế độ đo khử tín hiệu của nước.

Sắc ký thẩm thấu gel GPC được thực hiện trên máy HPLC Agilent 1100. Pha động 0,1N NaNO₃, tốc độ dòng 1ml/phút. Đầu dò RID.

Các dụng cụ thiết bị khác: thiết bị chưng cất lôi cuốn hơi nước, máy cô quay chân không, cân phân tích, cốc thủy tinh, các loại pipet, giấy lọc, cột sắc ký, túi thẩm tách, phễu lọc, phễu chiết, máy ly tâm...

2.3. Phân lập và tính chất pectin

Mẫu thực vật sau khi thu hái được thái nhỏ, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 40 - 45°C, sau đó đem nghiền nhỏ. 100 g bột lá cúc quỳ được ngâm chiết với 2 lít etanol (12h) x3 lần để loại bỏ chất béo, các chất hữu cơ phân tử lượng thấp.

Mẫu thực vật sau khi loại bỏ chất béo và các chất hữu cơ phân tử lượng thấp được đun với 2 lít nước cất trong 3h (3 lần). Tiến hành lọc dung dịch chiết bằng phễu Bunches, tiếp tục cô đuổi dung môi thu dung dịch đặc, sau đó kết tủa bằng etanol với tỷ lệ thể tích 4:1, để lắng dung dịch sau 12h. Tiếp tục tiến hành ly tâm, lọc, sấy để thu được 5,06g pectin thô.

Dung dịch Sevag được pha theo tỷ lệ thể tích diclometan : butanol = 4:1. Pectin thô được hòa tan vào nước cất, tiếp tục tách loại protein bằng phương pháp Sevag. Cho dung dịch Sevag : dung dịch mẫu theo tỷ lệ thể tích 1:1 vào phễu lọc, thu lấy lớp phía trên, tiếp tục kết tủa với etanol theo tỷ lệ thể tích 1:4. Sau đó tách loại chất bằng các chất hấp phụ như than hoạt tính rồi tiếp tục được tinh chế qua màng thẩm tách, thu được 3,24 g pectin tinh chế.

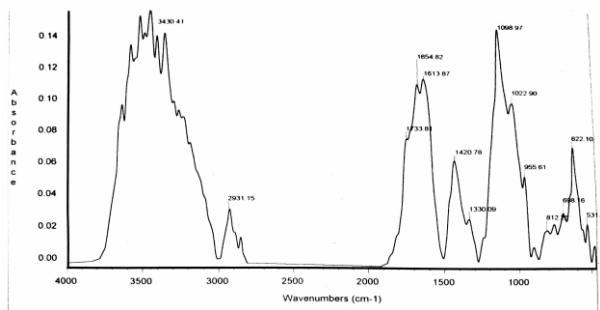
2.4. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa

Phương pháp thử hoạt tính quét gốc hydroxyl tự do được xác định theo phương pháp của Vissotto và cộng sự [6]: 0,5 ml dung dịch mẫu ở các nồng độ khác nhau được trộn đều với 1,5 ml dung dịch 2mM FeSO₄, tiếp theo là 1,5 ml dung dịch H₂O₂ 6 mM, và 1,5 ml dung dịch natri salicylat nồng độ 6mM. Hỗn hợp được ngâm trong bể điều nhiệt ở 37°C trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang của hỗn hợp ở bước sóng 510 nm sau khi làm nguội hỗn hợp về nhiệt độ phòng. Vitamin C được sử dụng làm đối chứng dương.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phổ hồng ngoại của pectin

Phổ hồng ngoại của pectin phân lập từ lá cúc quỳ được trình bày trên Hình 1.



Hình 1. Phổ hồng ngoại của pectin từ lá cúc quỳ

Đối với pectin, vùng dao động trong khoảng 1.200 – 1.800 cm⁻¹ trên phổ IR được xem là vùng “vân tay” của mẫu. Tại đây, ta có thể quan sát trạng thái đặc trưng của

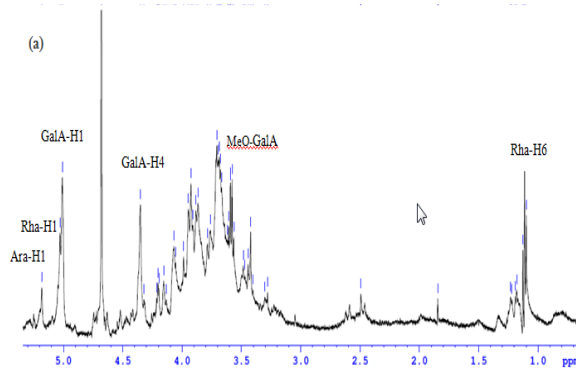
các nhóm carboxylic (khoảng 1.750 – 1.350 cm⁻¹) [7].

Dải dao động ở vùng 1.733 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động kéo căng của nhóm C=O của gốc carboxylic acid không được ion hóa (tồn tại dưới dạng methyl hóa hay gốc acid). Sự ion hóa gốc này (tạo thành muối) dẫn đến việc suy giảm tín hiệu này trên phổ và làm xuất hiện tín hiệu dao động kéo căng của COO⁻ tương ứng trong vùng 1.600 – 1.650 (bất đối xứng) và 1.400 – 1.450 cm⁻¹ (đối xứng) [7].

Mức độ ester hóa (DE) được định nghĩa là tỷ số giữa số lượng nhóm ester so với tổng số nhóm acid và nhóm ester, được đánh giá trực quan thông qua cường độ tín hiệu của dải 1733 cm⁻¹. Hình 1 cho thấy pectin thu được từ lá cúc quỳ là loại pectin có mức độ este hóa (mức độ methyl hóa) thấp.

3.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H NMR và ¹³C NMR của pectin

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton của mẫu pectin thu được từ lá cúc quỳ được trình bày trên Hình 2 có rất nhiều điểm tương đồng với phổ ¹H-NMR của polysaccharide giàu arabinan phân lập từ *Opuntia ficus-indica* [8].



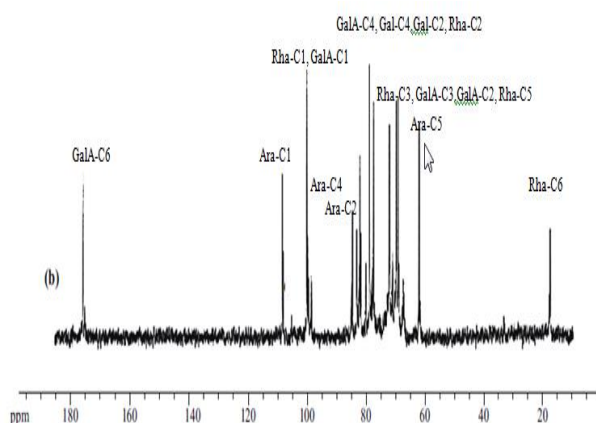
Hình 2. Phổ ¹H NMR của pectin từ lá cúc quỳ

Vùng các tín hiệu anome trên phổ cho thấy các tín hiệu ở độ dịch chuyển hóa học 5,18; 5,03 và 5,01 được gán tương ứng cho α-(1→5) arabinofuranosyl, α-(1→2) rhamnopyranosyl, và α-(1→4)-galactopyranosylacid. Sự có mặt của proton H6 của các đơn vị rhamnose thể hiện qua các tín hiệu cộng hưởng ở độ dịch chuyển 1,12 và 1,23. Tín hiệu ở 1,12 ppm tương ứng với gốc rhamnose liên kết (1→2) với một galacturonic acid, còn tín hiệu ở 1,23 ppm là của gốc rhamnose liên kết (2→1) với một galacturonic acid và tạo nhánh ở O-4. Tín hiệu có cường độ cao ở 3,70 ppm là tín hiệu của nhóm methyl liên kết với gốc GalA.

Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã xác định rằng, thành phần cấu trúc của pectin chủ yếu chứa các đơn vị galacturonic acid (GalA). Rhamnose (Rha) là thành phần nhỏ trong mạch chính của pectin, trong khi các đường khác như arabinose (Ara), galactose (Gal), và xylose (Xyl) nằm trên các mạch nhánh [8].

Phổ ¹³C NMR của pectin cho thấy các tín hiệu anome đặc trưng của rhamnose và galacturonic acid trong các khối cấu tạo của mạch chính rhamnagalacturonan ở 100,1 và 98,6 ppm, được gán tương ứng cho C1 của các đơn vị (1→2)- rhamnose và (1→4)-galacturonic acid. Các tín hiệu ở 175,9 và 175,2 ppm đặc trưng cho các nhóm chức carboxylic C6 tương

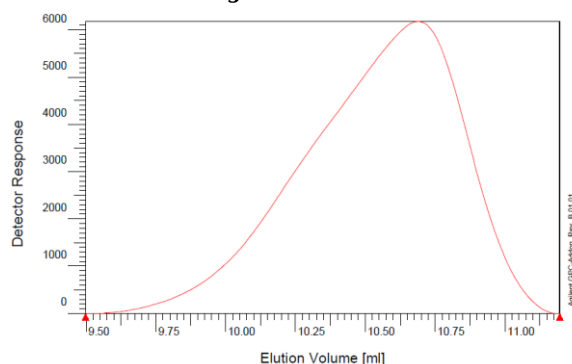
ứng của các đơn vị (1 →4)-galacturonic acid và galacturonic acid (1→2)-rhamnose. Trong khi đó, tín hiệu ở 17,2 ppm đặc trưng cho các nhóm methyl của các đơn vị rhamnose. Bên cạnh đó, phổ ^{13}C NMR của pectin còn thể hiện những tín hiệu đặc trưng của các đơn vị (1 →5) arabinose qua các cộng hưởng có độ dịch chuyển hóa học 108,5; 83,4; 78,3; 84,9 và 67,6 ppm tương ứng với C-1 – C-5.



Hình 3. Phổ ^{13}C NMR của pectin từ lá cúc quỳ

Kết quả thu được cho thấy, pectin từ lá cúc quỳ là loại pectin giàu arabinan với các dữ liệu phù hợp với các nghiên cứu trước đây, đã xác định rằng thành phần cấu trúc của pectin chủ yếu chứa các đơn vị galacturonic acid (GalA). Rhamnose (Rha) là thành phần nhỏ trong mạch chính của pectin và arabinose (Ara) là thành phần đường có hàm lượng đáng kể ở mạch nhánh [8, 9].

3.3. Sắc kí thẩm thấu gel GPC



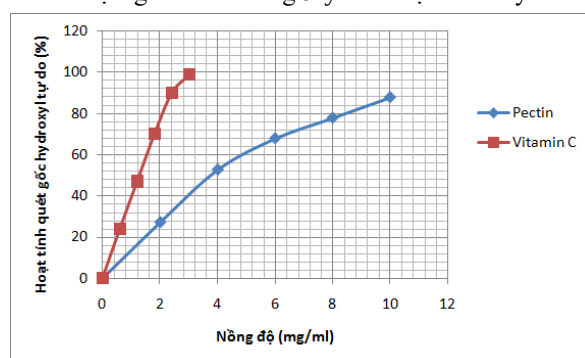
Hình 4. Sắc kí đồ thẩm thấu gel- GPC của mẫu pectin từ lá cúc quỳ

Sắc kí đồ thẩm thấu gel của mẫu pectin được trình bày trên Hình 4. Kết quả GPC của mẫu pectin cho phép xác định các thông số cấu trúc quan trọng bao gồm khối lượng phân tử trung bình $M_w = 1,39 \times 10^4$ g/mol, khối lượng phân tử trung bình $M_n = 1,15 \times 10^4$ g/mol, khối lượng phân tử trung bình $M_z = 1,74 \times 10^4$ g/mol và đặc trưng về chỉ số phân tán $PDI = M_w/M_n = 1,2$. Điều này cho thấy độ phân tán khối lượng của pectin từ cúc quỳ có tương đối nhỏ.

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Đồ thị biểu diễn khả năng quét gốc hydroxyl tự do của pectin từ lá cúc quỳ được trình bày trên Hình 5.

Khi nồng độ pectin tăng, khả năng quét gốc tự do của pectin tăng dần và đạt đến 88% khi nồng độ pectin đạt 10 mg/ml. Giá trị IC_{50} tương ứng của pectin và vitamin C lần lượt là 4,73 mg/ml và 1,30 mg/ml. Kết quả này cho thấy có thể xem pectin là một nguồn chất chống oxy hóa từ tự nhiên đầy hứa hẹn.



Hình 5. Khả năng quét gốc hydroxyl tự do của pectin từ lá cúc quỳ

4. Kết luận

Pectin phân lập từ lá cúc quỳ thuộc loại pectin có mức độ este hóa thấp, có khối lượng phân tử trung bình là $1,39 \times 10^4$ g/mol.

Cấu trúc của pectin được tạo nên từ các đơn vị (1→2)- rhamnose và (1 →4)-galacturonic acid tạo nên mạch chính. Mạch nhánh của pectin thuộc loại mạch giàu arabinan được tạo nên từ các đơn vị (1 →5) arabinose. Pectin từ lá cúc quỳ có khả năng quét gốc hydroxyl tự do với giá trị IC_{50} là 4,73 mg/ml, hứa hẹn có thể sử dụng là nguồn chất chống oxy hóa dồi dào từ thiên nhiên.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2013.49.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hộ P. H., *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, 1999.
- [2] Chagas-Paula DA, Oliveira RB, Rocha BA, Da Costa FB. Ethnobotany, "Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae)", *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2012 pp. 210-35.
- [3] Liu J, Willför S, Xu C, "A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5, 2015, pp. 31-61.
- [4] Duan J, Zheng Y, Dong Q, Fang J, "Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki*", *Phytochemistry*, 65, 2004, pp. 609-15.
- [5] May CD, "Industrial pectins: Sources, production and applications", *Carbohydrate Polymers*, 12, 1990, pp. 79-99.
- [6] Vissotto LC, Rodrigues E, Chisté RC, Benassi MdT, Mercadante AZ, "Correlation, by multivariate statistical analysis, between the scavenging capacity against reactive oxygen species and the bioactive compounds from frozen fruit pulps", *Food Science and Technology*, 33, 2013, pp. 57-65.
- [7] M.P.F, "Practical infrared spectroscopy of pectic substances", *Food Hydrocolloids*, 6, 1992, pp. 115-142.
- [8] Zhi Z, Chen J, Li S, Wang W, Huang R, Liu D, et al., "Fast preparation of RG-I enriched ultra-low molecular weight pectin by an ultrasound accelerated Fenton process", *Scientific Reports*, 7, 2017, pp. 541.
- [9] Habibi Y, Heyraud A, Mahrouz M, Vignon MR, "Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits *Carbohydr Polym.*, 60, 2005, pp. 319-329.