

# KHẢO SÁT THÀNH PHẦN BAY HƠI, XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ALKALOID VÀ PROANTHOCYANIDIN TOÀN PHẦN TRONG LÁ CÂY CHÙM RUỘT (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, Euphorbiaceae)

• Huỳnh Anh Duy<sup>(\*)</sup>, Tiết Thanh Phong<sup>(\*)</sup>, Lâm Thị Ngọc Giàu<sup>(\*\*)</sup>

## Tóm tắt

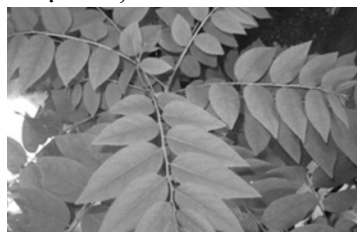
Nghiên cứu cho thấy lá Chùm ruột có chứa những nhóm hợp chất chính như alkaloid, flavonoid, triterpenoid, tannin, saponin, steroid và đường khử. Từ cao ethanol lá Chùm ruột khi phân tích bằng phương pháp GC-MS thấy có chứa 16 cấu tử bay hơi, trong đó các cấu tử chiếm nhiều nhất là 3-Hexen-2-one (32,67%), 4-Butoxy-2-butanone (20,70%), 3,3-Dimethyl-2-hexanone (10,66%). Ngoài ra, khi định lượng bằng phương pháp quang phổ UV-Vis, lá Chùm ruột có chứa hàm lượng alkaloid toàn phần là 1,64 mg caffein/g bột dược liệu và proanthocyanidin toàn phần là 46,88 mg catechin/g bột dược liệu. Những kết quả trên lần đầu tiên được báo cáo từ lá cây Chùm ruột.

Từ khóa: Alkaloid toàn phần, chất bay hơi, GC-MS, *Phyllanthus acidus*, proanthocyanidin toàn phần.

## 1. Đặt vấn đề

Cây Chùm ruột, một loại cây phổ biến ở Việt Nam cũng như các nước ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới có tên khoa học là *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels họ Thầu dầu (Euphorbiaceae), có nguồn gốc từ Madagascar. Ở nước ta, lá cây Chùm ruột được dùng nấu nước tắm chữa lở ngứa và mề đay. Vỏ thân được dùng để chữa các bệnh ngoài da: tiêu hạch độc, ung nhọt, tiêu đờm, trừ tích ở phổi, dùng bôi ngoài, chữa ghẻ, loét, vết thương sứt da chảy máu; ngâm chữa đau răng và đau họng. Từ lâu, các nhà khoa học trên thế giới đã có những nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài Chùm ruột. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu tại Việt Nam về các thành phần hóa học dễ bay hơi của dược liệu này. Bên cạnh đó, các tài liệu cũng cho biết rằng, alkaloid là nhóm hợp chất tự nhiên chứa nitơ quan trọng từ thực vật, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y dược học, vì rất nhiều hoạt chất thuộc nhóm này có khả năng chữa bệnh cao và độc đáo. Trong khi đó, proanthocyanidin là các flavonoid oligomeric, một nhóm các polyphenol được tìm thấy trong nhiều loại thực vật với những hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, bảo vệ gan... [6]. Trên những cơ sở đó, bài báo tập trung khảo sát các thành phần bay hơi, cũng như xác định hàm

lượng alkaloid và proanthocyanidin toàn phần từ lá cây Chùm ruột (*Phyllanthus acidus* L.).



Hình 1. Cây Chùm ruột

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Lá cây Chùm ruột được thu hái tại huyện Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng vào tháng 08/2017. Mẫu được định danh bởi Lâm Thị Ngọc Giàu, Bộ môn Dược liệu, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu, có so sánh với tài liệu tham khảo [3]. Sau đó, mẫu được phơi khô, xay thành bột mịn để dùng cho quá trình nghiên cứu.

### 2.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất: Caffein chuẩn (Sigma Chemical, Bangalore), vanillin, bromocresol xanh, methanol, chloroform, ethanol và các hóa chất thường quy khác.

Thiết bị: Máy đo quang phổ UV-Vis và các thiết bị thường quy khác.

### 2.3. Định tính sơ bộ các nhóm chức trong lá Chùm ruột

Tiến hành định tính theo phương pháp của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) [6], kết hợp với các tài liệu khác [4].

(\*) Trường Đại học Cần Thơ.

(\*\*) Trường Cao Đẳng Y tế Bạc Liêu.

#### 2.4. Khảo sát các thành phần bay hơi trong lá Chùm ruột

Cao chiết ethanol của lá Chùm ruột được gửi đến Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng Cần Thơ, phân tích thành phần bay hơi bằng phương pháp GC-MS có tham khảo tài liệu [7], với các thông số như sau: Cột DB-5 ms (30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Khí mang helium (99,999%) với tốc độ dòng không đổi là 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu là 2  $\mu\text{L}$ . Nhiệt độ buồng tiêm mẫu là 250°C, nhiệt độ nguồn ion là 250°C. Nhiệt độ lò được lập trình từ 50°C (giữ đẳng nhiệt trong 2 phút), tăng 5°C/phút đến 100°C, sau đó tăng 10°C/phút đến 150°C, tiếp tục tăng 25°C/phút đến nhiệt độ 250°C. Tổng thời gian chạy sắc ký là 22 phút. Tỷ lệ phần trăm tương đối của mỗi thành phần được tính bằng cách so sánh diện tích đỉnh trung bình của nó với tổng diện tích. Phổ khối của các thành phần chưa biết được so sánh với phổ của các thành phần đã biết được lưu trữ trong thư viện NIST.

#### 2.5. Định lượng alkaloid toàn phần

##### 2.5.1. Nguyên tắc

Các alkaloid sẽ phản ứng với bromocresol xanh tạo thành phức có màu vàng. Đo độ hấp thụ của phức này ở bước sóng 470 nm và dựa vào đường chuẩn caffeine tính ra hàm lượng alkaloid toàn phần có trong mẫu phân tích.

##### 2.5.2. Cách tiến hành

Dựa theo phương pháp của Biju J. và cộng sự (2014) [2]. Chất đối chứng được sử dụng là caffeine.

##### Chuẩn bị các dung dịch thuốc thử

Dung dịch bromocresol xanh (BCG) được điều chế bằng cách đun nóng 69,8 mg bromocresol xanh với 3 mL NaOH 2 N và 5 mL nước cất cho đến khi tan hoàn toàn và dung dịch được pha loãng đến 1 L bằng nước cất.

Dung dịch đệm phosphate (pH 4,7) được điều chế bằng cách điều chỉnh pH của sodium phosphate 0,2 M (71,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  trong 1 L nước cất) đến 4,7 với 0,2 M acid citric (42,02 g acid citric trong 1 L nước cất).

##### Xây dựng đường chuẩn caffeine

Dung dịch chuẩn caffeine 0,1 mg/mL: Hòa tan 1 mg caffeine chuẩn trong 10 mL nước cất.

Quy trình thực hiện: Hút lượng dung dịch chứa caffeine 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 bromocresol xanh vào từng phễu, lắc mỗi hỗn hợp lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform. Các chiết xuất chloroform được thu thập trong bình định mức 10 mL và sau đó pha loãng đến vạch với chloroform. Độ hấp thụ của phức hợp trong chloroform được đo ở 470 nm đối với mẫu trắng được chuẩn bị như trên nhưng không có caffeine.

#### Xác định hàm lượng alkaloid toàn phần từ lá Chùm ruột

Bột lá Chùm ruột (100 g) được chiết ngâm dầm bằng methanol trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc và cô quay cho bay hơi hết methanol ở 45°C. Cao chiết được hòa tan trong HCl 2 N và sau đó được lọc. Một (01) mL dung dịch này được chuyển sang một phễu tách và rửa sạch bằng 10 mL chloroform (3 lần). Độ pH của dung dịch này được điều chỉnh tới trung tính với 0,1 N NaOH. Sau đó, thêm 5 mL dung dịch BCG và 5 mL dung dịch đệm phosphate vào dung dịch này. Hỗn hợp được lắc và chiết lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform bằng cách lắc mạnh. Các dịch chiết được cho vào bình định mức 10 mL và bổ sung đến vạch với chloroform. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm. Mẫu trắng như trên nhưng không có cao chiết.

$$\text{- Cách tính kết quả: } A = \frac{C.V.a}{m}$$

Trong đó, A: hàm lượng alkaloid toàn phần có trong mẫu; C: nồng độ caffeine quy ra từ phương trình hồi quy chuẩn; V: thể tích ban đầu (mL); a: khối lượng cao từ 100 (g) bột được liệu; m: khối lượng bột được liệu 100 (g).

#### 2.6. Định lượng proanthocyanidin toàn phần

##### 2.6.1. Nguyên tắc

Các proanthocyanidin sẽ phản ứng với vanillin-methanol trong dung dịch acid chlorhydric tạo sản phẩm có màu. Đo độ hấp thụ của phức này ở bước sóng 500 nm và dựa vào đường chuẩn catechin tính ra hàm lượng proanthocyanidin toàn phần có trong mẫu phân tích.

##### 2.6.2. Cách tiến hành

Dựa trên phương pháp của Osamuyimen O.I. và cộng sự (2011). Chất đối chứng là catechin [5].

##### Đường chuẩn catechin

Đường chuẩn catechin được dùng theo tài liệu tham khảo của Osamuyimen O.I. và cộng sự (2011):

$y = 0,5825x$ ,  $R^2 = 0,9277$ . Trong đó,  $x$  là độ hấp thụ và  $y$  là lượng catechin tương đương.

### Xác định hàm lượng proanthocyanidin toàn phần từ lá Chùm ruột

Lá Chùm ruột (100 g) được chiết ngâm đậm bằng methanol trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc và cô quay cho bay hơi hết methanol ở 45°C, thu được cao methanol. Cân 1 mg cao hòa tan trong 10 mL methanol, lọc, thu được dung dịch cao chiết có nồng độ 0,1 mg/mL. Hút 0,5 mL dung dịch chiết xuất 0,1 mg/mL được trộn với 3 mL dung dịch vanillin trong methanol 4% và 1,5 mL dung dịch HCl 2 N. Hỗn hợp được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 500 nm.

$$\text{Cách tính kết quả: } P = \frac{C.V.p}{m}$$

Trong đó,  $P$ : hàm lượng proanthocyanidin toàn phần có trong mẫu;  $C$ : nồng độ catechin quy ra từ phương trình hồi quy chuẩn;  $V$ : thể tích ban đầu (mL);  $p$ : khối lượng cao từ 100 (g) bột được liệu;  $m$ : khối lượng bột được liệu 100 (g).

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Định tính các hợp chất từ lá Chùm ruột

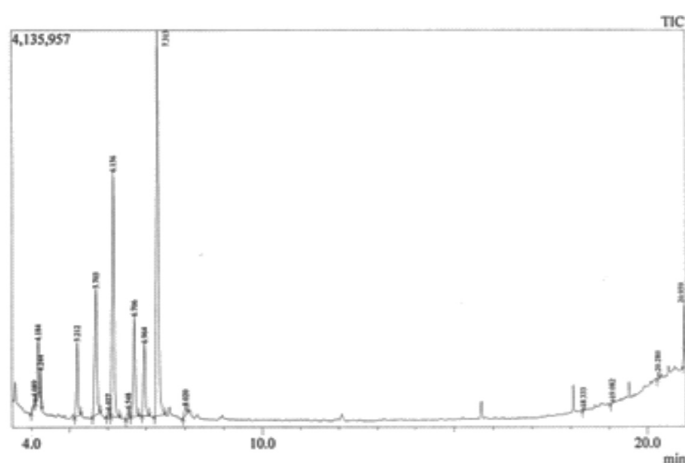
Cao ethanol lá cây Chùm ruột có chứa: alkaloid, flavonoid, triterpenoid, tannin, saponin, steroid và đường khử. Kết quả được thể hiện chi tiết trong Bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất từ cao ethanol lá Chùm ruột**

Nhóm chức	Tên thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	Wagner	Kết tủa nâu	+
	Mayer	Kết tủa trắng, dung dịch vàng nhạt	+
Flavonoid	Phản ứng cyanidin	Dung dịch màu đỏ	+
	FeCl <sub>3</sub> 5%	Kết tủa đen	+
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Dung dịch màu đỏ	+
	NaOH loãng	Dung dịch màu vàng	+
Tannin	Stiasny	Kết tủa màu hồng	+
	FeCl <sub>3</sub> 1%	Kết tủa đen	+
	Đồng acetate 1%	Dung dịch màu vàng nâu	+
	Gelatin mặn	Kết tủa bông trắng	+
Triterpen và Steroid	Salkowski	Dung dịch màu xanh hơi đen	+
Đường khử	Fehling	Kết tủa màu đỏ gạch	+
Saponin	Lắc với nước	Bọt bền sau 15 phút	+

#### 3.2. Phân tích các thành phần bay hơi từ cao ethanol lá Chùm ruột

Kết quả phân tích GC-MS cho thấy cao ethanol lá Chùm ruột có chứa 16 cấu tử dễ bay hơi, trong đó, thành phần chiếm nhiều nhất là 3-hexen-2-one (32,67%), với thời gian lưu là 7,313 phút. Tiếp theo là 4-butoxy-2-butanone (20,70%), ứng với thời gian lưu 6,156 phút và 3,3-dimethyl-2-hexanone (10,66%) ứng với thời gian lưu là 5,703 phút. Sắc ký đồ cao chiết lá Chùm ruột khi phân tích bằng GC-MS thể hiện trong Hình 2 và kết quả chi tiết các thành phần bay hơi trình bày trong Bảng 1.



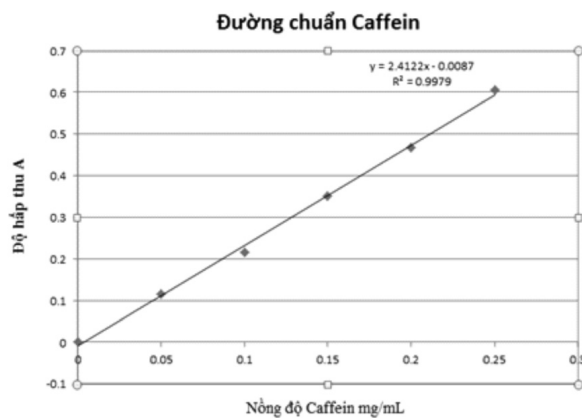
**Hình 2. Sắc ký đồ GC-MS cao ethanol lá Chùm ruột**

**Bảng 2. Kết quả phân tích GC-MS cao ethanol lá Chùm ruột**

STT	Thời gian lưu	Diện tích đỉnh (%)	Chiều cao đỉnh (%)	Tên hợp chất
1	4,089	0,64	0,67	2-Methylcyclopentanone
2	4,184	3,79	4,51	2-Methylcyclopentanol
3	4,244	0,99	2,29	3-Methylcyclopentanone
4	5,212	4,99	6,28	1,3-Dimethylbenzene
5	5,703	12,30	10,66	3,3-Dimethyl-2-hexanone
6	6,027	0,49	0,49	2,5-Hexanedione
7	6,156	20,86	20,70	4-Butoxy-2-butanone
8	6,548	0,67	0,70	1-Methylhexyl-hydroperoxide
9	6,706	8,53	8,43	2-Nitro-hexane
10	6,964	6,20	6,09	3,3-Dimethyl-2-hexanone
11	7,313	37,36	32,67	3-Hexen-2-one
12	8,020	0,95	0,74	1-Nonen-4-ol
13	18,333	0,09	0,23	1-Iodo-hexadecane
14	19,082	0,29	0,35	3-Butyl-1,2,4-cyclopentanetrione
15	20,280	0,32	0,60	3,7,11,15-Tetramethyl-hexadecyl acetate
16	20,959	1,53	4,59	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

### 3.3. Hàm lượng alkaloid toàn phần

Phương trình hồi quy tuyến tính của đường chuẩn caffeine được xây dựng là  $y = 2,4122x - 0,0087$  ( $R^2 = 0,9979$ ) được trình bày trong Hình 3.



**Hình 3. Đường chuẩn caffeine xác định alkaloid toàn phần**

Sau khi thực hiện theo quy trình, đo được độ hấp thụ cao chiết methanol lá Chùm ruột ở nồng độ 10 mg/mL là 0,5643. Từ đó, dựa vào phương trình hồi quy caffeine chuẩn, tính toán được kết quả **hàm lượng alkaloid toàn phần trong 1 g bột dược liệu là 1,64 mg quy về caffeine.**

Bromocresol xanh (BCG) có thể phản ứng với một nhóm alkaloid nhất định (những alkaloid có chứa nitơ bên trong cấu trúc của chúng), còn các alkaloid amin hoặc amide không phản ứng với thuốc thử này. Do đó phương pháp này có thể được sử dụng để xác định một nhóm alkaloid chuyên biệt [1].

### 3.4. Hàm lượng proanthocyanidin toàn phần

Phương trình hồi quy catechin dựa theo tài liệu tham khảo là  $y = 0,5825x$ ,  $R^2 = 0,9277$ .

Sau khi thực hiện theo quy trình, đo được độ hấp thụ cao chiết methanol lá Chùm ruột ở nồng độ 1,0 mg/mL là 0,3125. Tính toán kết quả, ta thu được kết quả **hàm lượng proanthocyanidin toàn phần trong 1 g bột dược liệu là 46,88 mg quy về catechin.** Kết quả cho thấy lá Chùm ruột là nguồn dược liệu giàu proanthocyanidin, tiềm năng cho tác dụng kháng oxy hóa tốt.

### 4. Kết luận

Lá cây Chùm ruột có chứa các hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin, triterpen, steroid, đường khử và saponin. Từ cao ethanol lá Chùm ruột phát hiện được 16 cấu tử bay hơi, trong đó các chất 3-hexen-2-one; 4-butoxy-2-butanone; 3,3-dimethyl-2-hexanone chiếm tỉ lệ nhiều nhất.

Bên cạnh đó, xác định trong lá Chùm ruột có hàm bột dược liệu và hàm lượng proanthocyanidin là lượng alkaloid là 1,64 mg tương đương caffein/g 46,88 mg tương đương catechin/g bột dược liệu./

#### Tài liệu tham khảo

- [1]. Amanlou, M. et al. (2007), “Determination of buprenorphine in raw material and pharmaceutical products using ion-pair formation”, *Bull. Korean Chem. Soc.*, (28), p. 183-190.
- [2]. Biju, J. et al. (2014), “Spectrophotometric Estimation of Total Alkaloids in selected Justicia Species”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5), p. 975-1491.
- [3]. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội.
- [4]. Khoa Dược, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh (2013), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, tr. 7-8.
- [5]. 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), p. 2958-2971.
- [6]. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 80-147.
- [7]. Rohan, S. P. et al. (2016), “Phytochemical Composition of Methanolic Extract of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels Fresh Leaves by GC/MS Analysis”, *Research J. Pharm. and Tech.*, 9 (5), p. 974-3618.

### INVESTIGATING VOLATILE COMPONENTS, ESTIMATING TOTAL ALKALOID AND TOTAL PROANTHOCYANIDIN IN THE LEAVES OF *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, Euphorbiaceae

#### Summary

The study shows that the leaves of *Phyllanthus acidus* contain major substances such as alkaloid, flavonoid, triterpenoid, tannin, saponin, steroid and reducing sugar. Ethanolic extracts from *Phyllanthus acidus* leaves analyzed by GC-MS are comprised of 16 volatile constituents, of which the most ones are 3-Hexen-2-one (32.67%), 4-Butoxy-2-butanone (20.70%), and 3,3-Dimethyl-2-hexanone (10.66%). In addition, by UV-Vis spectrophotometric method, total alkaloid content is 1.64 mg caffein/g, while total proanthocyanidin content is 46.88 mg catechin/g. These study results are the first ones reported from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.

Keywords: Total alkaloid, volatile component, GC-MS, *Phyllanthus acidus*, total proanthocyanidin.  
Ngày nhận bài: 05/3/2018; Ngày nhận lại: 28/6/2018; Ngày duyệt đăng: 12/7/2018.