

THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG JATRORRHIZINE BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC/MS CÓ TRONG THÂN CÂY MẬT GẤU (*MAHONIA NEPAULENSIS* DC.) Ở ĐẠI TỪ - THÁI NGUYÊN

Lê Thị Giang*, Nguyễn Thị Mỹ Ninh
Trường Đại học Y Dược – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây mật gấu (*Mahonia nepaulensis* DC.) là một trong nhiều cây thuốc quý ở Việt Nam. Trong nội dung nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tiến hành khảo sát các lớp chất, thử hoạt tính sinh học và xác định hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu. Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng bao gồm phương pháp ngâm chiết để thu dịch chiết, phương pháp hóa học để khảo sát các lớp chất từ dịch chiết cây mật gấu, phương pháp thử hoạt tính sinh học, phương pháp xây dựng đường chuẩn để xác định hàm lượng phần trăm jatrorrhizine. Kết quả cho thấy trong cặn chiết ethanol của thân cây mật gấu có alkaloids, steroids, coumarin, cardiac glycosides. Cặn chiết ethanol có khả năng kháng yếu đối với chủng nấm mốc *Fusarium oxysporum* (200 µg/mL), cặn n-butanol có khả năng kháng yếu đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (149,3 µg/mL). Hàm lượng jatrorrhizine có trong cây mật gấu là 0,682203%. Việc xác định hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu có ý nghĩa quan trọng trong việc mở ra hướng nghiên cứu thuốc chữa bệnh tiểu đường, bệnh vẩy nến và bệnh Alzheimer.

Từ khóa: *Mahonia nepaulensis* DC.; Cây mật gấu; xác định hàm lượng; tiểu đường; vẩy nến.

Ngày nhận bài: 20/3/2020; Ngày hoàn thiện: 21/5/2020; Ngày đăng: 21/5/2020

TESTING BIOACTIVE AND DETERMINATION OF JATRORRHIZINE CONTENT BY USING LC/MS METHOD IN THE STEM OF *MAHONIA NEPAULENSIS* DC. IN DAI TU, THAI NGUYEN

Le Thi Giang*, Nguyen Thi My Ninh
TNU - University of Medicine and Pharmacy

ABSTRACT

Mahonia nepaulensis DC. is one of many valuable medicinal herbs in Vietnam. In this study, we have conducted a survey of substance layers, tested bioactive and determined of jatrorrhizine content in the stem of *M. nepaulensis*. The research methods used include extraction method to obtain the extract, chemical methods for surveying layers of the extracted liquid of the *M. nepaulensis*, bioactive test method and a standardized method for calibration line to determine jatrorrhizine content was used in this study. Phytochemical analysis showed the presence of alkaloids, steroids, coumarin and cardiac glycosides in the ethanol extract of the stem of this plant. The ethanol extract showed weak resistance to the *Fusarium oxysporum* (200 µg/mL), and n-butanol showed weak resistance to the *Staphylococcus aureus* (149.3 µg/mL). The content of jatrorrhizine in the *M. nepaulensis* is 0.682203%. The determination of the jatrorrhizine content in the stem of this species is an important significance in researches for the treatment of diabetes, psoriasis and alzheimer.

Key words: *Mahonia nepaulensis* DC.; the bitter plant; content determination; diabetes; psoriasis.

Received: 20/3/2020; Revised: 21/5/2020; Published: 21/5/2020

* Corresponding author. Email: giangtrhanoi@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Cây mật gấu có tên khoa học là *Mahonia nepaulensis* DC.. thuộc họ Hoàng liên gai (*Berberidaceae*), chi Hoàng liên oro (*Mahonia*) [1], [2]. Cây mật gấu có vị rất đắng, trong dân gian được sử dụng làm thuốc chữa nhiều bệnh như kiết lỵ, tiêu chảy, đau mắt, viêm gan, hạ huyết áp... [3]. Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy, cây mật gấu có chứa nhiều jatrorrhizine đang được nghiên cứu điều chế thuốc chữa bệnh tiểu đường, bệnh vẩy nến và bệnh alzheimer [4], [5]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả khảo sát định tính các lớp chất, thử hoạt tính sinh học và xác định hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho phép ta tách chiết jatrorrhizine phục vụ cho việc nghiên cứu một số thuốc sử dụng trong y học.

2. Thực nghiệm

2.1. Ngâm chiết thân cây mật gấu để thu cặn chiết

Mẫu cây mật gấu được thu hái tại huyện Đại Từ - tỉnh Thái Nguyên, có tên khoa học là *Mahonia nepaulensis* DC [6].

Cây mật gấu được thu hái vào tháng 11 năm 2019 tại huyện Đại Từ - tỉnh Thái Nguyên. Mẫu thân cây mật gấu được nghiền nhỏ, phơi khô trong râm, chia thành 2 phần bằng nhau.

Phần 1: ngâm chiết 4 bằng ethanol 96⁰ ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được cất thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được cặn chiết. Phần cặn chiết được dùng để xác định định tính các lớp chất, thử hoạt tính sinh học và xác định hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu.

Phần 2: ngâm trong dung dịch HCl 1M, dịch chiết được trung hòa bằng dung dịch NH₃ 25% đến pH = 7 - 8. Dung dịch thu được sau khi trung hòa được chiết trong dung dịch n-butanol nhiều lần, cất quay đuôi dung môi ta thu được cặn chiết. Phần cặn chiết được dùng để thử hoạt tính sinh học.

2.2. Khảo sát định tính các lớp chất

2.2.1. Định tính Steroid

Mẫu thử được hòa tan trong dung dịch NaOH 10%, đun cách thủy đến khô, cặn được hòa tan trong dung dịch clorofom, thêm từ từ thuốc thử Lieberman burchard, nếu xuất hiện màu xanh bên giữa 2 lớp dung dịch là dương tính.

2.2.2. Định tính Alkaloid

Mẫu thử được hòa tan trong dung dịch H₂SO₄ 5%, lọc qua giấy lọc. Thử bằng thuốc thử Dragendoff, nếu xuất hiện màu da cam là dương tính. Thử bằng thuốc thử Mayer, nếu xuất hiện kết tủa trắng là dương tính. Thử bằng thuốc thử Wagner, nếu xuất hiện kết tủa nâu là dương tính.

2.2.3. Định tính Flavonoid

Hòa tan mẫu thử trong methanol, đun nóng và lọc qua giấy lọc. Thêm thuốc thử Shinoda, nếu dung dịch chuyển từ màu vàng sang màu đỏ là dương tính.

2.2.4. Định tính Coumarin

Hòa tan mẫu thử trong methanol, đun nóng và lọc qua giấy lọc. Lấy dịch lọc vào 2 ống nghiệm, thêm vào một trong 2 ống dung dịch NaOH 10%. Đun sôi cả 2 ống nghiệm, để nguội, thêm nước cất vào cả 2 ống. Nếu chất lỏng trong ống nghiệm chứa NaOH trong hơn có thể coi là dương tính. Acid hóa ống nghiệm chứa NaOH bằng HCl đậm đặc, nếu dung dịch vẫn đục trở lại là dương tính.

2.2.5. Định tính Saponin

Hòa tan mẫu thử trong methanol, đun nóng và lọc qua giấy lọc, thêm nước cất và lắc mạnh trong 5 phút, nếu xuất hiện cột bọt bền vững trong 15 phút là dương tính.

2.2.6. Định tính Tanin

Hòa tan mẫu thử trong nước cất, đun sôi khoảng 5 phút, thêm vài giọt FeCl₃ 5%, nếu có kết tủa màu xanh đen là dương tính.

2.2.7. Định tính cardiac glycoside

Hòa tan mẫu thử trong methanol, đun nóng và lọc qua giấy lọc. Thêm từ từ thuốc thử Keller – Kiliani dọc theo thành ống nghiệm, nếu

xuất hiện màu đỏ hay màu đỏ nâu giữa 2 lớp thuốc thử là dương tính.

2.3. Thử hoạt tính sinh học

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện bằng phương pháp Vanden Bergher và Vlietlinkh tiến hành trên phiến vi lượng 96 giếng, kháng sinh kiểm định bao gồm: với Ampixilin với vi khuẩn gram(+), Tetracylin với vi khuẩn gram(-), Amphoterin B và Nystatin đối với nấm sợi và nấm men.

Các chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm đại diện các nhóm:

- +) Vi khuẩn gram (+): *B.subtilis*, *S.aureus*
- +) Vi khuẩn gram (-): *E.coli*, *P.aeruginosa*
- +) Nấm mốc: *Asp.niger*, *F.oxysporum*
- +) Nấm men: *S.serevisiae*, *C.albicans*

Nấm và vi khuẩn được duy trì trong môi trường dinh dưỡng: trypcase soya borth (TSB) cho vi khuẩn, Sabouraud detrose borth cho nấm. Các chủng kiểm định được hoạt hóa trước khi tiến hành thử nghiệm trong môi trường dinh dưỡng dịch thể (24 h đối với vi khuẩn, 48 h đối với nấm).

Mẫu thử được hòa tan trong dung môi DMSO 100 %; 4-10 thang nồng độ sẽ được pha loãng từ dịch gốc rồi nhỏ vào phiến vi lượng, vi sinh vật sau khi hoạt hóa được pha loãng bằng môi trường dinh dưỡng cho có nồng độ 0 đơn vị McLad (khoảng 10^8 vi sinh vật/mL), ủ ấm $37^{\circ}\text{C}/24$ h cho vi khuẩn, ở $30^{\circ}\text{C}/48$ h cho nấm.

Thử nghiệm được tiến hành tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4. Phương pháp xác định hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu

Hàm lượng jatrorrhizine có trong cây mật gấu được xác định bằng phương pháp LC/MS. Việc phân tích định lượng được thực hiện trên máy LC - MSD – Trap- SL - Agillent, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cân 118,4450 g mẫu thân cây mật gấu đã được phơi khô, nghiền nhỏ, ngâm trong dung môi ethanol, thu dịch chiết, cất quay đuổi dung môi, lặp lại nhiều lần thu được 4,1504 g cặn chiết.

Pha cặn phân tích với nồng độ chính xác 1mg/mL [4].

Mẫu chuẩn là tinh thể jatrorrhizine được pha chính xác với các nồng độ 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 mg/mL. Chạy các nồng độ trên qua LC/MS. Ở mỗi nồng độ x_i ta thu được diện tích pic y_i với thời gian lưu R_i .

Xác định đường chuẩn theo phương trình hồi quy tuyến tính $y = ax + b$

Các hệ số a, b được tính theo biểu thức:

$$a = \frac{m \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (1)$$

$$b = \frac{\sum y_i - a \sum x_i}{m} \quad (2)$$

Trong đó:

x_i : nồng độ các chất chuẩn (mg/mL)

y_i : diện tích pic ứng với nồng độ x_i (mAU*s)

m: số lần thí nghiệm ($m > 2$)

Hệ số tương quan biểu thị mối tương quan giữa hai đại lượng x và y, r là đại lượng không thứ nguyên và biến thiên trong khoảng (-1;1). Hệ số tương quan r được tính theo biểu thức sau:

$$r = \frac{\sum m x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{[\sum m x_i^2 - (\sum x_i)^2][\sum m y_i^2 - (\sum y_i)^2]} \quad (3)$$

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả định tính các lớp chất có trong thân cây mật gấu

Kết quả khảo sát định tính các lớp chất cho thấy, trong thân cây mật gấu bao gồm các lớp chất alkaloids, steroids, coumarin và cardiac glycosides. Kết quả này phù hợp với kết quả được công bố trong tài liệu [3].

Bảng 1. Kết quả định tính các lớp chất có trong thân cây mật gấu

STT	Nhóm chất	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết quả
1	Alkaloid	Dragendoff	Màu da cam	(+)
2	Steroid	Lieberman -Burchard	Màu xanh bền	(+)
3	Flavonoid	Shinoda	Không xuất hiện màu	(-)
4	Coumarin	NaOH 10%, HCl đậm đặc	Ống chứa NaOH vẫn đục khi thêm HCl	(+)
5	Saponin	Tạo bọt	Không xuất hiện bọt	(-)
6	Tanin	FeCl ₃	Không xuất hiện màu	(-)
7	Cardiac glycoside	Keller – Kiliani	Xuất hiện màu đỏ nâu	(+)

3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn kiểm định

Kết quả thử khả năng kháng nấm, kháng khuẩn kiểm định được tóm tắt trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn kiểm định

STT	Vi sinh vật	Nồng độ ức chế tối thiểu: (MIC:µg/mL)	
		Cặn etanol	Cặn butanol
1	Vi khuẩn gram (-)	<i>E.coli</i>	(-)
		<i>P.aeruginosa</i>	(-)
2	Vi khuẩn gram (+)	<i>B.subtilis.</i>	(-)
		<i>S.aureus</i>	149,3
3	Nấm mốc	<i>Asp.niger</i>	(-)
		<i>F.oxysporum</i>	200
4	Nấm men	<i>S.serevisiae</i>	(-)
		<i>C.albicans</i>	(-)

Kết quả thử hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn kiểm định cho thấy căn chiết ethanol thể hiện khả năng kháng nấm yếu trên chủng vi sinh vật *Fusarium oxysporum* (200 µg/mL), cặn n-butanol thể hiện khả năng kháng khuẩn yếu với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (149,3 µg/mL)

3.3. Kết quả xác định hàm lượng jatrorrhizine trong cây mật gấu

3.3.1. Kết quả đo phổ LC/MS của mẫu chuẩn jatrorrhizine

Với 6 nồng độ x_i khác nhau của jatrorrhizine thu được diện tích pic y_i , thời gian lưu R_t .

Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đo phổ LC/MS mẫu chuẩn jatrorrhizine

STT	Nồng độ mẫu chuẩn x_i (mg/mL)	Diện tích pic mẫu chuẩn y_i (mAU*s)	Thời gian lưu R_t (phút)
1	0,05	77,05667	14,765
2	0,1	164,0641	14,837
3	0,2	354,013	14,236
4	0,3	578,964	14,367
5	0,4	770,157	14,178
6	0,5	984,996	14,634

3.3.2. Xác định phương trình hồi quy $y = ax + b$ của jatrorrhizine

Xử lý thống kê số liệu ở bảng 3 thu được sự tương quan giữa nồng độ x_i và diện tích pic y_i ở bảng 4. Thay số liệu vào phương trình (1), (2), (3) ở trên ta thu được

$$a = 2041.320825; b = -38.299379;$$

$$r = 5.4572087 \times 10^{-4}$$

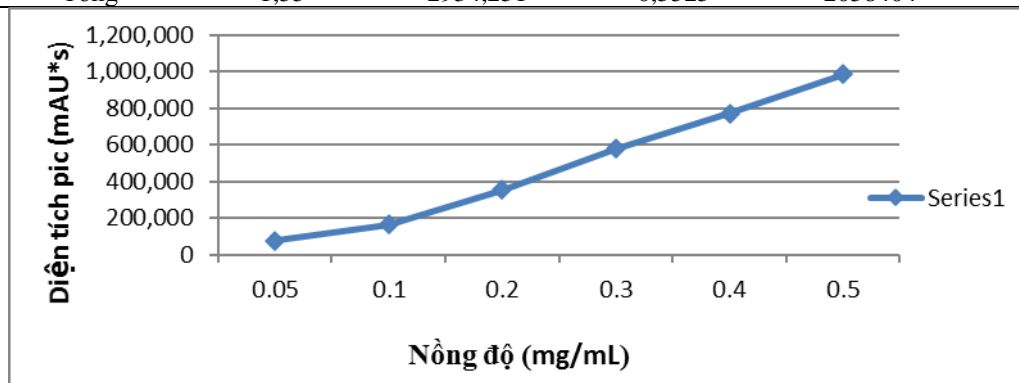
Vậy phương trình hồi quy là:

$$y = 2041.320825x - 38.299379 \quad (4)$$

Phương trình hồi quy được biểu diễn trên đồ thị hình 1.

Bảng 4. Sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic jatrorrhizine

STT	x_i	y_i	x_i^2	y_i^2	$x_i \cdot y_i$
1	0,05	77,05667	0,0025	5937,73	3,852834
2	0,1	164,0641	0,01	26917,03	16,40641
3	0,2	354,013	0,04	125325,2	70,8026
4	0,3	578,964	0,09	335199,3	173,6892
5	0,4	770,157	0,16	593141,8	308,0628
6	0,5	984,996	0,25	970217,1	492,498
Tổng	1,55	2934,251	0,5525	2058404	1065,812

**Hình 1.** Đồ thị biểu thị sự phụ thuộc giữa nồng độ và diện tích pic của jatrorrhizine

3.3.3. Kết quả xác định hàm lượng jatrorrhizine

Khối lượng mẫu thân cây mật gấu đã được phơi khô, nghiền nhỏ là 118,4450 g. Bằng phương pháp ngâm chiết thu được 4,1504 g cặn chiết.

Mẫu thử được pha với nồng độ chính xác 1 mg/mL. Diện tích pic thu được là: $y = 358,08935$, thay vào phương trình (4) ta được $x = 0,1941825$ mg/mL

Khối lượng jatrorrhizine có trong cao tổng là:

$$m_{\text{jatrorrhizine trong cao tổng}} = x \cdot m_{\text{cao tổng}} = 0,1941825 \times 4,1504 = 0,805934 \text{ (g)}$$

Hàm lượng jatrorrhizine có trong mẫu thử là:

$$m_{\text{jatrorrhizine trong cao tổng}} = x \cdot m_{\text{cao tổng}} = 0,1941825 \times 4,1504 = 0,805934 \text{ g}$$

Hàm lượng jatrorrhizine có trong mẫu thử là:

$$\% \text{ jatrorrhizine} = \frac{m_{\text{jatrorrhizine trong cao tổng}}}{m_{\text{mẫu}}} \times 100\%$$

$$\% \text{ jatrorrhizine} = \frac{0,805934}{118,4450} \times 100\% = 0,682203\%$$

Như vậy, bằng phương pháp phổ LC/MS và xử lý thống kê, đã định lượng được hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu ở Đại Từ - Thái Nguyên là 0,682203%. Với hàm lượng trên cho phép ta chiết jatrorrhizine phục vụ cho việc nghiên cứu một số thuốc sử dụng trong y học.

Trong phân đoạn n-butanol của dịch chiết cây mật gấu chứa nhiều alkaloid trong đó có jatrorrhizine có tác dụng mạnh mẽ trong việc ức chế enzym acetylcholinesterase - enzym có chức năng làm ngưng lại hoạt động của chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine tại các synapse thần kinh cholinergic thông qua việc thủy phân acetylcholine tạo thành cholin và acid acetic - việc ức chế enzym acetylcholinesterase có tác dụng làm tăng lượng acetylcholine và có tác dụng cải thiện rõ rệt bệnh alzheimer [5].

Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy jatrorrhizine cùng một số ancaloid khác như berberin, culumbamin, oxyberberin có khả năng ức chế enzym lipoxylase. Sự chuyển hóa enzym lipoxylase đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển vẩy nến [7].

Với liều lượng 0,5 mg/kg, 100 mg/kg, jatrorrhizine có khả năng làm giảm đáng kể lượng glucose có trong máu ở những con chuột bình thường và chuột bị đái tháo đường [5]. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu điều chỉnh lượng đường glucose có trong máu bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường.

4. Kết luận

Bằng phương pháp hóa học để khảo sát các lớp chất từ dịch chiết cây mật gấu, phương pháp Vanden Bergher và Vlietlink để thử hoạt tính sinh học đã xác định được trong thân cây mật gấu có chứa các lớp chất alkaloids, steroids, coumarin and cardiac glycosides. Cặn chiết ethanol thể hiện khả năng kháng nấm yếu trên chủng vi sinh vật *Fusarium oxysporum* (200 µg/mL), cặn n-butanol thể hiện khả năng kháng khuẩn yếu với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (149,3 µg/mL).

Bằng phương pháp đo phổ LC/MS và xử lý thống kê đã định lượng được hàm lượng jatrorrhizine có trong thân cây mật gấu ở Đại Từ - Thái Nguyên là 0,682203%. Việc xác định hàm lượng jatrorrhizine mở ra hướng nghiên cứu thuốc chữa bệnh tiểu đường, bệnh vẩy nến và bệnh alzheimer.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. H. B. Do et al., *Medicinal plants and medicinal animals in Vietnam*. Publishing House for Science & Technology, Hanoi, 2006, vol. 1, pp. 956-958.
- [2]. National Center for Natural Sciences and Technology - Institute of Ecology and Biological Resources, *Checklist of Plant Species of Vietnam*. Agriculture Publishing House, vol. 2, p. 162, 2003.
- [3]. T. L. Do, *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*. Medical Publishing House, Hanoi, 2014, pp. 192-194.
- [4]. T. G. Le, and V. Q. Nguyen, "Determination of Berberine content in the bitter leaf herb (*Mahonia nepaulensis* DC) in Dinh Hoa, Thai Nguyen," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 162, no. 02, pp. 129-131, 2017.
- [5]. T. T. Bui, K. S. Phan, K. T. Dang, T. H. Nguyen, X. B. Nguyen, and T. K. T Nguyen, "Evaluation of inhibiting enzyme acetylcholinesterase inhibitory activity in vitro of segments of extracts *Mahonia Nepalensis* DC., Berberidaceae," *Journal of Science, Viet nam National University, Hanoi*, vol. 33, no. 2, pp. 20-26, 2017.
- [6]. T. G. Le, *Initial research on chemical composition, mainly alkaloid of bear bile (*Mahonia Nepalensis* DC.)*, Master's thesis in science, Hanoi, 2007, pp.19.
- [7]. V. Misik, and L. Berakova, "Alkaloids isolated from *Mahonia quifolium*," *Planta Med*, vol. 61, no. 4, pp. 372-378, 1995.