



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.125

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM *In vitro* CỦA LÁ KHẾ (*Averrhoa carambola* L.)

Huỳnh Anh Duy^{1*} và Nguyễn Thị Tuyết Nhi²

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

²Sinh viên ngành Hoá dược, khóa 40, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Anh Duy (email: haduy@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 06/03/2018

Ngày nhận bài sửa: 23/05/2018

Ngày duyệt đăng: 29/10/2018

Title:

Primary study on chemical components and *in vitro* anti-inflammatory activity of the leaves of starfruit (*Averrhoa carambola* L.)

Từ khóa:

Averrhoa carambola, kháng viêm, tinh dầu, 9-eicosyne

Keywords:

Anti-inflammatory, *Averrhoa carambola* L., essential oil, 9-eicosyne

ABSTRACT

Ethanol extract from the leaves of starfruit (*Averrhoa carambola* L.) contains the phytochemical components such as alkaloid, flavonoid, triterpene, steroid, reducing sugar, saponin, and tannin. Essential oil of the starfruit leaves was extracted by steam distillation method. After that, it was analyzed by GC-MS for the presence of seven components, in which the most abundant components were 9-eicosyne (9.62%) and butylated hydroxytoluene (3.02%). In addition, the study also investigated the *in vitro* anti-inflammatory activity of the various extracts by albumin denaturation inhibitory assay. Results showed that ethyl acetate fraction had the strongest anti-inflammatory activity, followed by dichloromethane fraction, ethanolic extract, and water fraction with IC_{50} values of 79.89 $\mu\text{g/mL}$, 278 $\mu\text{g/mL}$, 414,64 $\mu\text{g/mL}$, 695,91 $\mu\text{g/mL}$, respectively, compared to prednisolone ($IC_{50} = 12.88 \mu\text{g/mL}$) and diclofenac ($IC_{50} = 36.88 \mu\text{g/mL}$). But n-hexane fraction showed that anti-inflammatory effect was weak. The results from this study were first reported from the leaves of *Averrhoa carambola* L.

TÓM TẮT

Cao ethanol của lá khế có chứa alkaloid, flavonoid, triterpene, steroid, đường khử, saponin và tannin. Tinh dầu lá khế sau khi chiết xuất bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước, được phân tích bằng GC-MS cho thấy hiện diện của 7 cấu tử, trong đó, các thành phần chiếm hàm lượng lớn gồm 9-eicosyne (9,62%) và butylated hydroxytoluene (3,02%). Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng khảo sát tác dụng kháng viêm *in vitro* của các cao chiết lá khế bằng thử nghiệm ức chế biến tính albumin bởi nhiệt. Kết quả cho thấy cao phân đoạn ethyl acetate có tác dụng kháng viêm mạnh nhất, tiếp theo là cao phân đoạn dichloromethane; cao ethanol tổng và cao phân đoạn nước với các giá trị IC_{50} lần lượt là 79,89 $\mu\text{g/mL}$, 278 $\mu\text{g/mL}$, 414,64 $\mu\text{g/mL}$, 695,91 $\mu\text{g/mL}$ khi so sánh với 2 chất đối chiếu là prednisolone ($IC_{50} = 12,88 \mu\text{g/mL}$) và diclofenac ($IC_{50} = 36,88 \mu\text{g/mL}$). Cao phân đoạn n-hexane cho tác dụng kháng viêm yếu nhất. Những kết quả này lần đầu được báo cáo từ lá khế tại Việt Nam.

Trích dẫn: Huỳnh Anh Duy và Nguyễn Thị Tuyết Nhi, 2018. Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng kháng viêm *in vitro* của lá khế (*Averrhoa carambola* L.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(7A): 72-76.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là kết quả có tính quy luật của các tác nhân gây viêm xuất hiện trong cơ thể, là quá trình

phức hợp giữa điều hòa và phản ứng. Quá trình này dẫn đến các hiện tượng thoát huyết tương, xuyên bạch cầu, tăng sinh tế bào tại ổ viêm và hiện tượng

thực bào, gây ra bốn triệu chứng điển hình là sưng, nóng, đỏ và đau. Trong nhiều nghiên cứu, phương pháp xác định khả năng kháng viêm bằng thử nghiệm khả năng ức chế biến tính albumin do nhiệt của các hợp chất từ thiên nhiên được coi là phương pháp nhanh chóng, đơn giản và chính xác cao (Dhingra *et al.*, 2015).

Cây khế (*Averrhoa carambola* L.) thuộc họ Oxalidaceae, là loại cây đa niên, phân bố ở mọi vùng miền của Việt Nam (Cao Quốc Chánh và Nguyễn Văn Hoan, 2006). Lá của loại cây này thường được sử dụng trong các bài thuốc dân gian chữa nhiều bệnh như: mề đay, mẩn ngứa, mụn nhọt (Đỗ Tất Lợi, 2004). Báo cáo này tập trung nghiên cứu về thành phần hóa học của tinh dầu lá khế, khảo sát và sàng lọc hoạt tính kháng viêm *in vitro* của cao chiết khác nhau từ lá khế với mục đích bổ sung nguồn dữ liệu nghiên cứu về tác dụng của loài này trong việc hỗ trợ điều trị bệnh.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu:

Mẫu lá khế (*Averrhoa carambola* L.) được thu hái tại huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long vào tháng 06/2017, được định danh bởi ThS.DS. Lâm Thị Ngọc Giàu, Bộ môn Dược liệu, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu, có kèm chứng lại bằng tài liệu tham khảo (Đỗ Tất Lợi, 2004).

Hóa chất: Huyết thanh bò (BSA, Himedia - Ấn Độ), chất chuẩn prednisolone, diclofenac (độ tinh khiết 99,8%) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh và các hóa chất thông dụng khác.

Thiết bị: Bộ chưng cất tinh dầu Clevenger, máy GC-MS Agilent, máy quang phổ UV-Vis và các dụng cụ hỗ trợ khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Điều chế cao ethanol tổng, các cao phân đoạn từ lá khế

Bột lá khế khô (5 kg) được ngâm chiết với ethanol 96% ở nhiệt độ phòng. Cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao ethanol tổng (46,8 g). Cao tổng này được phân tán trong nước cất và chiết phân bố lỏng-lỏng lần lượt với các dung môi *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate thu được phân đoạn dịch chiết tương ứng. Loại dung môi thu được các cao phân đoạn tương ứng *n*-hexane (14,4 g), dichloromethane (0,48 g), ethyl acetate (5,24 g) và phần còn lại là cao nước (11,4 g).

2.2.2 Định tính sơ bộ thành phần hóa học của cao ethanol tổng

Tiến hành theo tài liệu hướng dẫn định tính của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), bao gồm định tính các thành phần: alkaloid, flavonoid, tannin, triterpene, steroid, đường khử, saponin.

2.2.3 Khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu lá khế

Mẫu lá khế tươi, rửa sạch, đã loại bỏ lá hỏng (200 g) được cắt nhỏ cho vào bình cầu tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước (ở 100°C trong 90 phút), thu được hỗn hợp tinh dầu và nước. Đem chiết lỏng-lỏng với diethyl ether, làm khan bằng Na₂SO₄, cô quay loại diethyl ether thu được tinh dầu.

Tinh dầu lá khế được phân tích tại Trung tâm Phân tích Cần Thơ với hệ thống sắc ký như sau: Máy GC-MS Agilent. Cột phân tích có ký hiệu DB-5 MS (60 m, 250 μm, 0,25 μm), khí mang là khí heli, áp suất 19,121 psi. Chương trình nhiệt độ: nhiệt độ ban đầu là 80°C giữ 2 phút, tăng lên 240°C, 4°C/phút, giữ 4 phút. Nguồn ion hóa EI: nhiệt độ bắn phá ion 230°C, nhiệt độ tứ cực 50°C, chế độ quét: Fullscan. Tiêm mẫu: chế độ tiêm mẫu chia dòng, tốc độ dòng: 0,8 mL/phút.

2.3 Khảo sát tác dụng kháng viêm *in vitro* bằng thử nghiệm ức chế biến tính albumin do nhiệt

Nguyên tắc

Albumin là protein chiếm tỷ lệ rất lớn trong huyết thanh, có khả năng liên kết tốt với NSAIDs (non-steroid anti-inflammatory drugs: kháng viêm không steroid) và kém bền với nhiệt độ. Ở nhiệt độ trên 50°C, albumin bắt đầu biến tính. Nhưng khi có sự hiện diện của NSAIDs, diễn tiến của quá trình biến tính này thay đổi do NSAIDs có khả năng ức chế biến tính albumin ở nồng độ thấp. Thuốc kháng viêm corticoid cũng được đánh giá có khả năng kháng viêm tốt nhưng chưa được sử dụng trong các thí nghiệm ức chế biến tính albumin do nhiệt. Do đó, nghiên cứu mở rộng khảo sát khả năng kháng viêm của nhóm thuốc này để so sánh với các NSAIDs về khả năng ức chế biến tính albumin do nhiệt. Bên cạnh đó, những hợp chất hay dịch chiết từ cây thuốc có khả năng kháng viêm cũng có hoạt tính này (Grant *et al.*, 1970).

Thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Habibur *et al.* (2015) có hiệu chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Chuẩn bị các dung dịch

Huyết thanh bò (Albumin Serum Bovine) (ký hiệu là BSA) 0,5%: Hòa tan 500 mg BSA với nước cất trong bình định mức 100 mL.

Dung dịch đệm phosphate pH 6,3: Hòa tan 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ trong 800 mL nước cất. Điều chỉnh pH đến 6,3 bằng HCl 1N. Thêm nước cất đến 1000 mL.

Cao ethanol tổng và các cao phân đoạn của lá khế: Pha trong methanol thành các dung dịch có nồng độ giảm dần từ 800 - 12,5 µg/mL.

Chất đối chiếu (diclofenac và prednisolone): pha với methanol thành các dung dịch có nồng độ giảm dần (800 - 12,5 µg/mL).

Tiến hành thí nghiệm

Các mẫu được pha theo tỷ lệ như sau:

Mẫu thử (test solution) (0,5 mL): 0,45 mL BSA 0,5% + 0,05 mL cao chiết ở các nồng độ giảm dần (800, 400,... 12,5 µg/mL). Mẫu đối chứng (test control solution) (0,5 mL): 0,45 mL BSA 0,5% + 0,05 mL nước cất. Mẫu đối chứng chiết xuất (product control solution) (0,5 mL): 0,45 mL nước cất + 0,05 mL cao chiết/ chất chuẩn ở các nồng độ giảm dần (800, 400,... 12,5 µg/mL). Mẫu đối chiếu (standard solution) (0,5 mL): 0,45 mL BSA 0,5% + 0,05 mL chất chuẩn ở các nồng độ giảm dần (800,

400,... 12,5 µg/mL). Các mẫu được đưa về pH 6,3 (bằng dung dịch HCl 1N) rồi ủ ở 37°C trong 20 phút, sau đó tăng nhiệt độ lên 57°C giữ trong 3 phút. Sau đó làm lạnh, thêm vào 2,5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 6,3). Tiến hành đo mật độ quang (OD) các mẫu ở bước sóng 225 nm.

Phần trăm ức chế biến tính BSA được tính theo công thức sau:

$$\text{Phần trăm ức chế} = \frac{ODc - (ODt - ODcs)}{ODc} \times 100$$

Trong đó,

ODt: mật độ quang đo được của mẫu thử;

ODc: mật độ quang đo được của mẫu chứng;

ODcs: mật độ quang đo được của mẫu chứng chiết xuất.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả định tính thành phần hóa học cao ethanol tổng

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học cho thấy trong cao ethanol tổng lá khế có sự hiện diện của các nhóm hợp chất: alkaloid, flavonoid, tannin, triterpene, steroid, đường khử, saponin (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả định tính các nhóm hợp chất trong cao tổng ethanol

Nhóm hợp chất	Tên thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	Wagner	Kết tủa nâu đen	+
	Mayer	Kết tủa trắng, dung dịch vàng nhạt	+
Flavonoid	Bột magie+HCl đậm đặc	Dung dịch màu đỏ	+
	FeCl ₃ 5%	Dung dịch màu xanh đen	+
	H ₂ SO ₄ đậm đặc	Dung dịch màu đỏ cam	+
Tannin	Stiasny	Không hiện tượng	-
	Gelatin mặn	Kết tủa bông trắng	+
Triterpene và Steroid	Liebermann-Burchard	Tạo vòng màu đỏ chuyển sang xanh đen	+
	Salkowski	Dung dịch màu xanh đen	+
Đường khử	Fehling	Kết tủa màu đỏ gạch	+
Saponin	Tạo bọt với nước	Cột bọt bền trong 15 phút	+

3.2 Kết quả khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu lá khế bằng phương pháp GC-MS

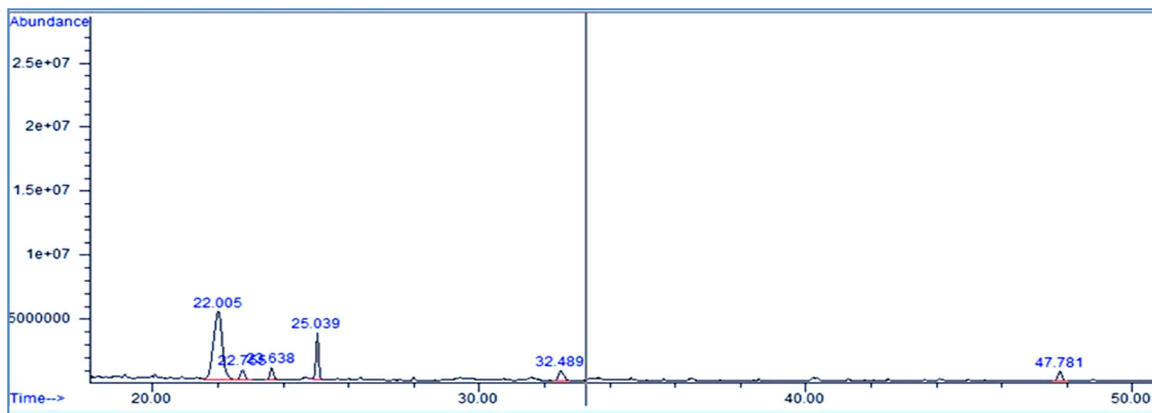
Kết quả tóm tắt những thành phần hóa học chính trong tinh dầu lá khế được trình bày trong Bảng 2.

Sắc ký đồ GC-MS (Hình 1) cho thấy có sự xuất hiện của 7 cấu tử, trong đó cấu tử có thời gian lưu là 22,005 phút là peak chính và được xác định là 9-

eicosyne (9,62%). Chất này cũng đã được phát hiện từ cao chiết methanol của loài *Cassia auriculata*, có thời gian lưu là 24,650 phút chiếm 1,74% bằng phương pháp GC-MS (Senthilrani and Renuka Devi, 2014). Ngoài ra, còn thấy sự xuất hiện của butylated hydroxytoluene (3,02%) có thời gian lưu là 25,039 phút, chất này được đánh giá có khả năng chống oxy hóa rất tốt (Krasowska *et al.*, 2001).

Bảng 2: Thành phần hóa học chính trong tinh dầu lá khế

STT	Thời gian lưu (phút)	Thành phần hóa học chính	Phần trăm (%)
1	22,005	9-Eicosyne	9,62
2	22,755	Linoleoyl chloride	0,94
3	23,638	trans-2-(2-propynyloxy)-cyclohexanol	0,85
4	25,039	Butylated hydroxytoluene	3,02
5	27,95	β-Ionone	0,15
6	32,489	Palmitic acid methyl ester	0,82
7	47,781	Dodecyl cis-9,10-epoxyoctadecanoate	0,75



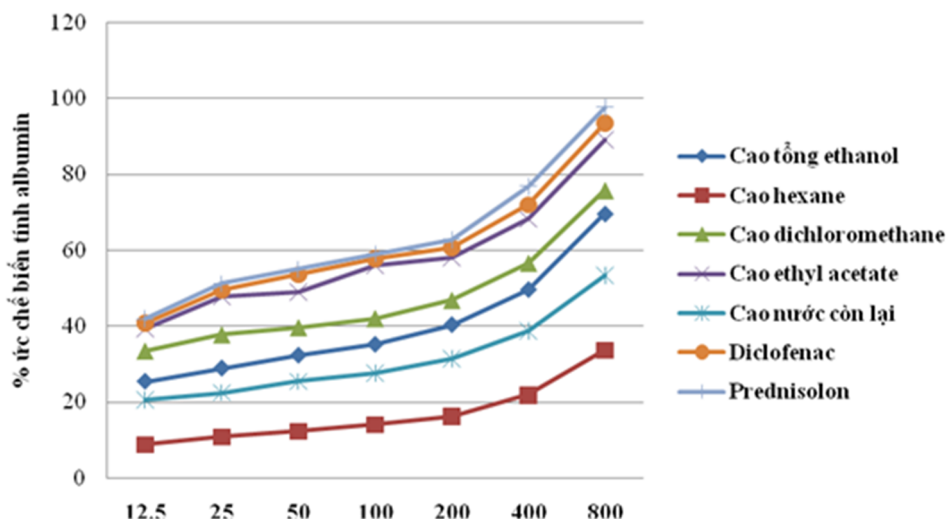
Hình 1: Sắc ký đồ GC-MS của tinh dầu lá khế

3.3 Kết quả khảo sát tác dụng kháng viêm in vitro của cao chiết lá khế bằng thử nghiệm ức chế biến tính albumin do nhiệt

Phân tích kết quả thu được trong dãy nồng độ khảo sát cho thấy, prednisolone (thuốc kháng viêm corticoid) và diclofenac (NSAIDs) là hai chất thể hiện khả năng ức chế biến tính albumin cao nhất xét ở nồng độ 800 µg/mL tương ứng là 97,5% và

93,5%. Cũng ở nồng độ trên, hai dạng cao chiết lá khế cho thấy phần trăm ức chế khá cao là phân đoạn cao ethyl acetate (89,2%) và cao dichloromethane (75,8%), các phân đoạn còn lại thể hiện phần trăm ức chế biến tính albumin theo thứ tự là cao ethanol tổng (69,6%), cao nước (53,4%) và cao n-hexane có phần trăm ức chế thấp nhất (33,6%).

Phần trăm (%) ức chế biến tính albumin theo nồng độ (mcg/ml)



Hình 2: Phần trăm (%) ức chế biến tính albumin theo nồng độ (µg/mL) của các cao chiết lá khế và chất đối chiếu

Dựa vào các giá trị khảo sát xác định được giá trị IC₅₀ (µg/mL) của cao ethanol tổng, các cao chiết phân đoạn lá khế và chất đối chiếu. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4: Giá trị IC₅₀ của cao chiết lá khế và chất đối chiếu

Mẫu	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao ethanol tổng	413,64
Cao <i>n</i> -hexane	-
Cao dichloromethane	278,00
Cao ethyl acetate	79,89
Cao nước	695,91
Diclofenac	36,88
Prednisolone	12,88

Khả năng ức chế biến tính albumin càng cao khi IC₅₀ càng thấp. Từ kết quả trên cho thấy Prednisolone (IC₅₀=12,88 µg/mL) có khả năng ức chế biến tính albumin mạnh hơn ba lần diclofenac (IC₅₀=36,88 µg/mL). Trong các cao chiết, cao phân đoạn ethyl acetate có khả năng ức chế biến tốt nhất so với các cao phân đoạn còn lại với IC₅₀=79,89 µg/mL, cụ thể là bằng khoảng 1/2 lần diclofenac. Trong năm phân đoạn cao chiết từ cao ethanol tổng, phân đoạn *n*-hexane có hiệu quả ức chế biến tính albumin thấp hơn 50%, do trong khoảng tuyến tính giữa nồng độ và phần trăm ức chế được khảo sát phân đoạn này không thể đạt được giá trị IC₅₀. Các phân đoạn có khả năng ức chế biến tính albumin do nhiệt dựa vào giá trị IC₅₀ được xếp theo thứ tự giảm dần là ethyl acetate > dichloromethane > cao tổng ethanol > cao nước.

Kết quả trên đây cho thấy lá khế có khả năng kháng viêm tốt và đa phần những chất có hoạt tính này tập trung ở phân đoạn ethyl acetate. Điều này có thể lý giải là do phân đoạn ethyl acetate thường chứa nhiều những hợp chất như polyphenol, flavonoid, saponin... Các hợp chất này đều được chứng minh là có khả năng kháng viêm tốt (Rice-Evans *et al.*, 1996). Điều này cho thấy kết quả của nghiên cứu cũng phù hợp với các nghiên cứu ngoài nước về tác dụng kháng viêm của cao chiết từ lá khế (Cabrini *et al.*, 2011).

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy lá khế có chứa các hợp chất như: alkaloid, flavonoid, triterpene, steroid, tannin, đường khử, saponin.

Thành phần hóa học chính trong tinh dầu lá khế khi phân tích bằng phương pháp GC-MS là 9-eicosyne (9,62%), butylated hydroxytoluene (BHT) (3,02%) và một số thành phần khác chiếm tỷ lệ nhỏ hơn.

Đã đánh giá được tác dụng kháng viêm *in vitro* của các cao chiết phân đoạn từ lá khế trên mô hình ức chế biến tính albumin do nhiệt. Kết quả cho thấy, phân đoạn chiết ethyl acetate (IC₅₀ = 79,89 µg/ml) của lá khế có tác dụng kháng viêm mạnh hơn so với các phân đoạn còn lại. Kết quả này định hướng tốt cho việc sử dụng dược liệu cũng như tiền đề cho việc phân lập các hợp chất tinh khiết từ phân đoạn ethyl acetate trong việc tìm kiếm các hoạt chất, dược liệu có tính kháng viêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cabrini, D.A., Moresco, H.H., Imazu, P., *et al.*, 2011. Analysis of the Potential Topical Anti-inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011: 1-7.

Dhingra, A.K., Chopra, B., Dass, R., and Kumar Mittal, S. 2015. An update on Anti-inflammatory Compounds: A Review. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. 14(2): 81-97.

Grant, N.H., Alburn, H.E., and Kryzanasuskas, C., 1970. Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs. Biochemical Pharmacology. 19(3): 715-722.

Habibur, R., Chinna Eswarajah, M., and Dutta, A.M., 2015. *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of *Oryza sativa* Var. *Joha Rice* (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). American Eurasian Journal Agricultural & Environment Science. 15(1): 115-121.

Cao Quốc Chánh và Nguyễn Văn Hoan, 2006. Cây khế. NXB Nông nghiệp Hà Nội, 121 trang.

Krasowska, A., Rosiak, D.A.W.I.D., Szkapiak, K., Oswiecimska, M., Witek, S., and Lukaszewicz, M., 2001. The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence. Cellular & Molecular Biology Letters. 6(1): 71-81.

Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học. Hà Nội, 1300 trang.

Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. NXB Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh, 528 trang.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 20(7): 933-956.

Senthilrani, S., Renuka Devi, P., 2014. Biological activities and chemical composition of *Cassia auriculata*. Asian Journal of Biochemistry. 9: 195-202.